

DOR E DISTRESSE

Data de aceite: 03/07/2023

Mariana Boechat de Abreu

Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brasil
ORCID 0000-0002-4878-2182

1 | INTRODUÇÃO

O princípio dos 3Rs (*replacement, refinement and reduction*), desenvolvido originalmente por Russel & Burch (RUSSEL; BURCH, 1959), é utilizado como base para legislações de diferentes países que regulam a utilização de animais para fins didáticos e científicos. Embora apresentem diferenças, a maioria dos requisitos legais, diretrizes não estatutárias ou recomendações sobre o cuidado e uso de animais utilizados em pesquisas compartilham dos mesmos ideais éticos fundamentais, que se baseiam nesses princípios. Portanto, eles podem ser considerados os princípios orientadores globais que servem de base para a harmonização (GUILLÉN; VERGARA, 2018).

O conceito de refinamento se refere

a melhorias de alojamento, cuidados e procedimentos, que minimizem dor real ou potencial, sofrimento, estresse ou danos físicos prolongados ou melhora do bem-estar do animal, quando seu uso não pode ser substituído. Já foi comprovado que o refinamento traz benefícios não apenas para os animais, como também para o resultado da pesquisa (BULGER, 1987). Dentro desse contexto, para cada laboratório e procedimento experimental preconizado devem ser elaboradas as medidas de alojamento, analgesia e cuidados adequadas, e, também, critérios de ponto final humanitário que garantam bem-estar e resultados confiáveis.

2 | BASES DA FISIOPATOLOGIA DA DOR E ANALGESIA MULTIMODAL

O componente fisiológico da dor é denominado nocicepção, consiste no processo de transdução, transmissão e modulação dos sinais nervosos gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. É um processo fisiológico que resulta na percepção consciente da dor quando o

estímulo é carregado por completo até o córtex cerebral (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). A transmissão da dor envolve o sistema nervoso periférico, o sistema nervoso central (SNC) e vários moduladores químicos. É um fenômeno que consiste em um processo de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo, que resulta em percepção consciente quando transmitido até o final da via de dor, chegando ao cortex cerebral. Essa via pode ser considerada como um grupo de três neurônios: os neurônios de primeira ordem, originados na periferia e que se projetam para a medula espinhal; os neurônios de segunda ordem, que ascendem a medula espinhal; e os neurônios de terceira ordem, que se projetam para o córtex cerebral (KITCHEN *et al.*, 1987; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). (Figura 1A).

O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de estímulos no sistema nervoso central, que se originam em receptores sensoriais (nociceptores) e que fornecem informações relacionadas ao dano tecidual. Os nociceptores são terminações nervosas não-encapsuladas ou livres que se despolarizam e geram um potencial de ação quando estímulos de natureza mecânica, química ou térmica alcançam níveis nociceptivos, isto é, quando ocorre lesão dos tecidos ou ameaças à sua integridade. Na pele, tecido subcutâneo e outros tecidos como periósteo, cápsulas articulares paredes arteriais, músculos e tendões, os nociceptores são particularmente numerosos. Nesses locais, os nociceptores são de três tipos: mecânicos, térmicos e polimodais. Os mecânicos são receptores de alto limiar, ativados por estímulo mecânico intenso ou nocivo. Suas fibras A-delta, mielinizadas e com diâmetro de 3-4 μm , conduzem o impulso numa velocidade de 5-30m/s (HALL; GUYTON, 2011). Os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas extremas ($>45^{\circ}\text{C}$ ou $<5^{\circ}\text{C}$) e suas fibras A-delta também conduzem o impulso numa velocidade de 5-30m/s. Já os nociceptores polimodais são ativados por estímulos mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade. As fibras nervosas correspondentes a esses receptores são as fibras C, não-mielinizadas, de pequeno diâmetro ($<2\mu\text{m}$) e que conduzem o impulso mais lentamente (0.5-2m/s) (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). Devido a seu maior calibre e mielinização, as fibras A-delta conduzem os impulsos muito mais rápido que as fibras C, de pequeno diâmetro e não-mielinizadas e, conseqüentemente, são responsáveis pela transmissão da dor aguda ou primeira dor, bem localizada. As fibras C são responsáveis pela transmissão da dor lenta, difusa ou mal localizada (HALL; GUYTON, 2011).

Ao entender os mecanismos fisiológicos da dor, pode-se compreender os diferentes analgésicos em diferentes pontos da via da dor. Por exemplo, na modulação dos impulsos (como os opioides), na interrupção da condução do impulso (anestésicos locais) ou na prevenção da sensibilização do nociceptor que acompanha o processo inflamatório (anti-inflamatórios não-esteroidais). (Figura 1B).

Um conceito importante é o da analgesia multimodal, que preconiza a utilização de diferentes fármacos e técnicas em ação sinérgica e não de um agente isolado (por maior que seja a dose empregada, não possibilita o bloqueio de todas as vias

responsáveis pelo processo das diferentes etapas da fisiopatologia da dor: transdução, transmissão, modulação e percepção do estímulo doloroso) (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007; HELANDER *et al.*, 2017). Entretanto, no caso do uso de analgésicos para pesquisa biomédica, deve ser avaliado o uso da analgesia multimodal, pois também é importante ter um controle da influência desses fármacos nos resultados experimentais.

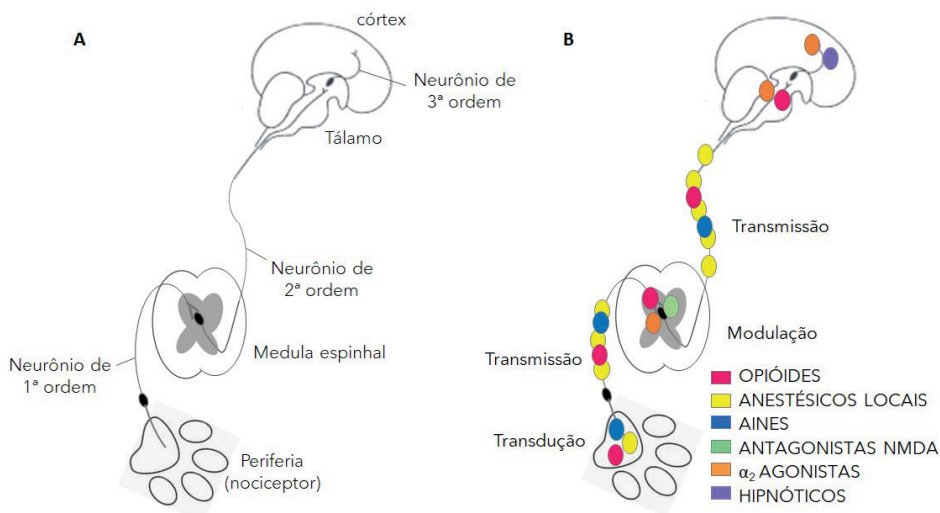


Figura 1. A- Representação esquemática dos componentes responsáveis pela transdução, transmissão, modulação e percepção da dor. B- Representação esquemática dos locais de atuação das diferentes classes de fármacos analgésicos.

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

3 | CONTROLE DA DOR TRANSOPERATÓRIA E PLANO ANESTÉSICO

Uma anestesia com plano adequado para realização de uma cirurgia deve possuir três componentes fundamentais: inconsciência, analgesia e relaxamento muscular. Por isso, antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico, deve ser testado o plano anestésico, para se garantir que é adequado.

Após a indução da anestesia geral, são descritos 4 planos anestésicos (Planos de Guedel). Em uma indução adequada, recomenda-se que se passe de forma rápida e imperceptível pelo primeiro e segundo planos (excitação). O terceiro estágio do terceiro plano é caracterizado por inconsciência, relaxamento muscular e analgesia (componentes fundamentais para anestesia cirúrgica); as respostas reflexas motoras estão abolidas. O quarto estágio do terceiro estágio e quarto plano já se caracterizam por anestesia demasiadamente profunda, podendo evoluir para paralisia bulbar e morte. Durante a indução e manutenção da anestesia, parâmetros de profundidade de plano, tais como resposta reflexa motora a estímulos dolorosos, reflexos oculares (avaliação limitada em

roedores e alterações cardiopulmonares devem ser avaliados.

Um método simples, e comumente utilizado, para a avaliação de plano anestésico em roedores e lagomorfos se dá por meio da resposta reflexa motora a um estímulo doloroso supra máximo (tais como pinçamento de cauda ou de prega interdigital), para se avaliar se o animal se encontra em plano anestésico adequado para realização de cirurgia. Tal método se baseia no conhecimento da progressão da abolição de respostas fisiológicas de acordo com o aprofundamento do plano anestésico. Sabe-se que a abolição da resposta motora reflexa ocorre em um estágio imediatamente posterior à abolição da consciência. Assim, ao detectar a ausência de resposta motora reflexa (mais facilmente medida que ausência de consciência), sabe-se que a consciência já foi, anteriormente, abolida, e que, com isso, a dor não pode ser percebida. A resposta de movimento a estímulos nocivos em pacientes humanos anestesiados com propofol foi prevista de forma comparável a partir da avaliação do limiar de reflexo motor por eletromiografia ou do Índice Bispectral (BIS), índice para avaliação de nível de consciência. Considerando suscetibilidade estabelecida do limiar de reflexo motor às influências analgésicas, em protocolos anestésicos que incluam substâncias analgésicas, seu uso poderia ser considerado vantajoso frente ao uso do BIS (JAKUSCHEIT *et al.*, 2017; VON DINCKLAGE *et al.*, 2009).

De acordo com Arras e colaboradores (2001), o indicador de resposta motora mais sensível para a tolerância cirúrgica parece ser o reflexo de retirada do podal - foi o último reflexo a desaparecer e o primeiro a retornar durante a anestesia. Todos os outros testes (reflexo cutâneo, reflexo de pinça de cauda, reflexo de endireitamento) e observações (endireitamento, movimentos, excitação) foram menos sensíveis e, portanto, menos úteis como indicadores de anestesia (ARRAS *et al.*, 2001).

Qualquer procedimento cirúrgico só deve ser realizado após a comprovação de que o resposta motora reflexa foi abolida. Caso esteja presente, uma nova dose de anestésico deve ser aplicada e, esperado o tempo de latência, a resposta deve ser testada novamente. Durante o procedimento cirúrgico, o plano anestésico deve ser periodicamente reavaliado, já que a duração de efeito dos fármacos anestésicos pode sofrer variações entre indivíduos.

Em geral, os procedimentos experimentais envolvendo roedores e lagomorfos costumam a ser finalizados com a eutanásia do animal. Porém, ao analisarmos os procedimentos cirúrgico-anestésicos, é conveniente classificá-los em: procedimento sem despertar, no qual a eutanásia ocorre sem que o animal saia do plano de anestesia cirúrgica; e procedimento com despertar, quando o animal retoma consciência, independente do tempo que vai ser mantido em observação antes do momento da eutanásia (horas, dias, meses ou anos).

Em procedimentos sem despertar, a preocupação central é que o animal seja mantido em plano anestésico adequado durante todo o procedimento, já que isso garante que estará inconsciente e, portanto, incapaz de experimentar a experiência de dor. Entretanto, em procedimentos com despertar, além de garantir a manutenção de plano

adequado de anestesia, é fundamental o uso de analgésicos que atuem nos diferentes pontos das vias da dor, garantindo que sejam protegidos, reduzindo a sua ativação pelos estímulos nociceptivos. Esse cuidado deve ser tomado para que, quando o animal recupere a consciência e possa perceber a dor, esta seja mais facilmente controlada. Nesse ponto, é interessante citar o conceito de analgesia preemptiva, que se refere à administração de fármacos antes de expor o paciente ao estímulo nociceptivo, e é considerado um procedimento adequado para prevenir ou minimizar a intensidade da dor pós-operatória (KISSIN; WEISKOPF, 2000).

4 | CONSIDERAÇÕES SOBRE PROTOCOLOS ANESTÉSICOS/ANALGÉSICOS TRANSOPERATÓRIOS

O anestésico injetável mais comumente utilizado em animais de laboratório é a quetamina. Em pequenos roedores, não é aconselhável o uso da via de administração intramuscular devido à massa muscular reduzida, sendo, usualmente, substituída pela via intraperitoneal para evitar dor local. A quetamina pode ser utilizada como sedativo potente, indutor anestésico e fármaco de manutenção em procedimentos curtos. Costuma ser associada a sedativos ou analgésicos. Nas associações, podem ser utilizados um ou mais fármacos analgésicos e/ou sedativos. As doses de cada fármaco devem ser ajustadas de acordo com as combinações, garantindo plano anestésico adequado e segurança do protocolo.

Foram testadas a eficácia e segurança de 8 protocolos anestésicos de associação quetamina associada a diferentes doses de fármacos sedativos e analgésicos (xilazina, medetomidina, azaperone e acepromazina). O protocolo de quetamina, 100 mg/ kg; xilazina, 20 mg/ kg; e acepromazina, 3 mg/ kg foi a mistura que apresentou maior eficácia e ausência de mortalidade. Três outras misturas tiveram menor eficácia e margem de segurança: induziram taxas mais baixas de tolerância cirúrgica (apenas 30 a 50% dos animais apresentaram plano anestésico satisfatório) e taxas de mortalidade mais altas (10 a 40%). Outras quatro não foram capazes de induzir tolerância cirúrgica (ARRAS *et al.*, 2001). No estudo citado não foram testados protocolos incluindo fármacos opioides, como o tramadol ou morfina, que, por seu alto poder analgésico, têm sido utilizados em associação com a quetamina e demonstrado eficácia e segurança.

O uso de anestésicos inalatórios também é bastante recomendável. Dentre eles, os mais utilizados para anestesia de animais em pesquisa são o isoflurano e o sevoflurano. O sevoflurano apresenta tempo e indução e de despertar ligeiramente mais rápido que o isoflurano, mas o mecanismo de ação é basicamente o mesmo.

O uso correto de anestésicos inalatórios se dá através do uso de vaporizador e fonte de ar comprimido e/ou oxigênio. O uso desses fármacos, embebidos em algodão ou gaze, implicam em concentrações de anestésico muito acima do ideal para a manutenção de anestesia, criando a necessidade e oferta intermitente dos fármacos. Assim, a concentração

de anestésico se mantém instável durante o procedimento cirúrgico e o animal apresenta períodos de overdose anestésica (aumenta o risco de óbito no procedimento) e períodos de superficialização de plano (presença de consciência e dor para o animal).

Quando utilizados de forma correta, os anestésicos inalatórios apresentam algumas vantagens quando comparados com os agentes injetáveis: maior controle do plano anestésico (possibilidade de alteração de plano anestésico de forma rápida); rápida indução e rápido retorno da anestesia; menor custo por hora de anestesia depois de diluído o custo inicial para implantação do sistema. Os anestésicos inalatórios não possuem efeito analgésico, além do efeito de perda da consciência, por isso devem ser associados a analgésicos em procedimentos cirúrgicos com despertar.

5 | OUTROS CUIDADOS TRANSOPERATÓRIOS PARA GARANTIA DE BEM-ESTAR

O controle da temperatura corporal é um fator importante a ser controlado durante e após o procedimento anestésico. O uso de anestésico reduz o metabolismo e predispõe a queda da temperatura, e, em caso de cirurgia com a abertura de cavidades, aumenta a perda de calor. Além disso, deve-se considerar que, em animais muito pequenos (ratos, camundongos, cobaias, inclusive coelhos), a perda de calor é muito mais acentuada pela alta relação superfície/volume corporal (CLARK-PRICE *et al.*, 2021).

A coloração e o tempo de preenchimento de mucosa, o balanceamento hídrico (fluidoterapia) e o ressecamento da córnea (uso de pomadas ou colírios) também devem ser controlados.

6 | EFEITOS DA DOR NA FISIOLOGIA

A dor não tratada pode dificultar a cicatrização dos tecidos. A cura óssea, por exemplo, é promovida por estimulação mecânica. Assim como foi demonstrado em ratos, o alívio eficaz da dor e o consequente aumento do uso da parte afetada do corpo são importantes para a cura (SCHWARZ *et al.*, 2013).

Além dos mecanismos locais, os impulsos dolorosos ascendentes levam à ativação hipotalâmica e aumento da atividade simpático-adrenérgica do sistema. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais, tais como mudanças na frequência cardíaca e na sua variabilidade, como foi demonstrado em camundongos (ARRAS *et al.*, 2007), além de aumento da contratilidade, que gera aumento do consumo de oxigênio com risco de hipóxia isquêmica de miocárdio e arritmias e maior vasoconstrição periférica, que aumenta o risco de hipóxia em órgãos. No sistema gastrointestinal há vasoconstrição, redução de motilidade e translocação bacteriana. Entre as alterações no sistema respiratório, podem ser citadas: variações no tônus vascular pulmonar; aumentos nas concentrações de dióxido de carbono no ar expirado; diminuição da capacidade residual funcional, o que pode levar

a atelectasias e, por consequência, hipoventilação e hipóxia.

A dor é indutora de estresse e afeta a secreção de muitos hormônios, neurotransmissores e enzimas. Por exemplo, a dor não tratada aumenta a secreção de catecolaminas, como noradrenalina, corticoides, glucagon, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio antidiurético (ADH), e diminui a secreção de insulina e testosterona em muitas espécies (CARSTENS; MOBERG, 2000). O aumento do cortisol e hormônio adeno-cortico-esteróide geram imunossupressão, e ambos, em conjunto com as catecolaminas, levam à redução das concentrações plasmáticas de insulina e aumento de glicose. Com a redução de insulina, a glicose não consegue ser captada do sangue para as células e há lipólise e catabolismo muscular proteico (para garantir disponibilidade de energia para o organismo) com resultante caquexia. O aumento do hormônio antidiurético gera retenção urinária, desbalanço hídrico eletrolítico com retenção hídrica e sódica e aumento da excreção de potássio.

Além disso, a dor não tratada pode afetar o sistema imunológico através da redução das células *natural killer* e da reatividade mista de linfócitos (PAGE, 2003).

Em situação de dor não tratada, mudanças típicas no comportamento do roedor incluem redução da ingestão de alimentos e água, mudanças no padrão de atividade, redução do sono, um ritmo circadiano alterado, perda de diversidade comportamental e mudanças nos cuidados sociais, na construção de ninhos e no comportamento de escavação (CARSTENS; MOBERG, 2000; JIRKOF *et al.*, 2010, 2013).

A dor manifestada durante um período prolongado pode provocar hipersensibilidade central, assumindo um caráter crônico e tornando-se mais difícil de ser tratada (DRUMMOND, 2000).

7 | ROTINA DE USO DE ANALGÉSICOS NA PESQUISA BIOMÉDICA

A dor induzida por procedimentos, doenças e lesões é uma causa potencial de sofrimento em animais utilizados na experimentação. No entanto, o controle da dor é mais do que uma questão ética e de bem-estar animal, tendo importantes implicações científicas e metodológicas para a concepção de experimentos e a qualidade dos resultados do estudo (JIRKOF, 2017).

Entre 1990-1992, na avaliação de uma amostra de estudos publicados em periódicos com revisão por pares e que incluíam procedimento cirúrgico, apenas 3% relataram administração de analgésicos (RICHARDSON; FLECKNELL, 2005). Em uma amostra de 172 artigos, entre 2000-2001, analgésicos foram administrados em 10% dos estudos, e entre 2005-2006, em 20% dos estudos (STOKES; FLECKNELL; RICHARDSON, 2009). Resultados sobre anestesia e analgesia em pesquisas realizadas com animais foram avaliados a partir da revisão de 77 publicações consecutivas em três revistas de cuidados intensivos durante o ano de 2012. O monitoramento do nível de anestesia durante os

procedimentos invasivos descritos foi demonstrado em apenas 7% dos estudos. Quando a dor era esperada, alguma medicação analgésica foi utilizada em apenas 14% dos casos, e o monitoramento do nível de dor foi realizado em apenas 4%. Não foi dada justificativa para nenhum dos casos em que a analgesia seria recomendada e não foi utilizada (BARA; JOFFE, 2014).

Apesar do uso de analgésicos em animais de laboratório ter aumentado nos últimos anos, o cenário é ainda de negligência no uso (RICHARDSON; FLECKNELL, 2005). A maioria dos artigos que descrevem procedimentos potencialmente dolorosos em roedores ainda não relatam administração de analgésicos sistêmicos (STOKES; FLECKNELL; RICHARDSON, 2009).

Um dos fatores que contribuem para relutância em administrar analgésicos em protocolos experimentais é o temor dos pesquisadores quanto à possível interferência do efeito dos analgésicos nos resultados experimentais. A escolha do protocolo de analgesia para uma questão de pesquisa específica é desafiadora. O protocolo de analgesia ideal deve aliviar dor de forma confiável e sem efeitos colaterais que possam prejudicar o bem-estar animal. Além disso, deve ter um efeito controlável no sistema específico em foco no experimento. A dor, em muitos casos, não pode ser completamente abolida, mas deveria ser minimizada e controlada. Para escolher um protocolo de analgesia adequado, deve-se identificar o tipo de dor (nociceptiva, neuropática, idiopática ou mista), bem como sua intensidade e duração, e não existe analgesia que sirva para todos (JIRKOF, 2017). Porém, é fundamental que o pesquisador não deixe de considerar os efeitos da própria dor na fisiologia. A dor e o estresse geralmente aumentam a variação do resultado experimental, e, conseqüentemente, um animal com dor ou estresse é um objeto pobre de pesquisa.

Além disso, a resistência à utilização de analgésicos ocorre também por falta de conhecimento dos benefícios fisiológicos da analgesia, falta de familiarização com os fármacos disponíveis, temor de que a utilização de agentes potentes possa levar os animais a quadros de dependência química, depressão respiratória ou a problemas gastrintestinais e, principalmente, pela dificuldade de se diagnosticar a dor nos animais e desvalorização da dor em animais (HEWSON; DOHOO; LEMKE, 2006).

Qualquer fármaco incluído em uma pesquisa apresentará influência nos resultados, sendo responsabilidade do pesquisador buscar na literatura os fármacos que apresentem mínimos efeitos nos objetivos principais da pesquisa em questão, podendo solicitar auxílio de um veterinário com experiência em analgesia veterinária. Os efeitos esperados pelo uso de fármacos analgésicos a uma determinada dose são muito mais controlados - e afetarão tanto animais do grupo controle quanto animais do grupo experimental (devem ser aplicados em todos os animais) – do que os efeitos fisiológicos causados pela dor e estresse (que afetarão apenas os animais que passarem pelo procedimento, e apresentam variabilidade individual muito maior).

Além disso, sob o ponto de vista ético, é inaceitável realizar um procedimento

cirúrgico ou outro procedimento doloroso com despertar do animal e não realizar analgesia pós-operatória.

8 | AVALIAÇÃO DE GRAVIDADE DE PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A gravidade de um procedimento deve ser determinada pelo grau de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro que um animal pode sentir durante o procedimento (SMITH *et al.*, 2018).

De acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), a gravidade dos protocolos experimentais deve ser classificada de acordo com uma escala de grau de invasividade. O grau de invasividade de um protocolo deve ser igual ao maior grau de invasividade atribuído dentre os procedimentos que compõem o protocolo (BRASIL, 2021). (Quadro 1).

Na Diretiva europeia em vigor (2010/63/EU), a classificação da gravidade é dada pelo grau de severidade estimada que deve ser atribuída a cada um dos procedimentos realizados nos animais utilizados para fins científicos (Quadro 1). Porém, além da classificação de gravidade prospectiva, após a realização dos procedimentos, a gravidade real experimentada por cada animal durante seu curso deve ser avaliada e determinada individualmente, e relatada nas informações estatísticas anuais disponibilizadas publicamente. Essa abordagem oferece uma oportunidade para uma análise do refinamento desde o início até a conclusão de um procedimento, contribuindo para melhorar a qualidade da ciência e do bem-estar animal e proporcionando maior transparência e confiança do público quanto ao uso de animais na pesquisa, já que os dados são divulgados em relatórios públicos. Tais publicações podem fornecer informações para reavaliação contínua do refinamento, estabelecendo padrões mais altos de refinamento para estudos futuros nos casos em que o grau de severidade real foi subestimado (SMITH *et al.*, 2018; THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2010).

Ainda na diretiva Europeia, além da classificação de severidade prospectiva, é indicado que seja realizada a análise de dano/benefício para todos os projetos avaliados nos comitês de ética. Para análise de todos os possíveis danos ao bem-estar de todos os animais, são necessárias mais informações sobre cada um dos procedimentos do que as fornecidas por uma simples classificação de severidade (BRØNSTAD *et al.*, 2016; LABER *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2018).

Para exemplificar, em um estudo de desafio de vacinação, alguns animais (controles não vacinados) podem apresentar doença clínica grave, exigindo uma atribuição de “grave” ao procedimento de infecção experimental e ao estudo, ainda que, em contraste, seria de se esperar que a maioria dos animais que receberam uma vacina eficaz não apresentasse mais do que efeitos adversos leves. Apesar de o estudo ser classificado como “grave”, em se tratando de um projeto que visa contribuir para o desenvolvimento de uma nova vacina

contra uma doença associada a quadro clínico grave e uma alta mortalidade, a análise de dano/benefício poderia ser favorável. Obviamente levando em consideração outros fatores, como experiência dos pesquisadores e implementação dos 3Rs nos procedimentos (BRØNSTAD *et al.*, 2016; LABER *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2018).

Para determinar a gravidade real, há uma necessidade do desenvolvimento de sistemas de registro e avaliação, adaptados para cada projeto, que irão capturar todas as informações necessárias e facilitar a avaliação subsequente e categorização da gravidade real, além de serem ferramentas úteis para a avaliação de bem-estar e critérios de ponto final.

Grau de invasividade (RN 52//2021)	Grau de severidade (2010/63/EU)
<p>Grau de invasividade I: Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza).</p>	<p>Sem recuperação: Os procedimentos realizados inteiramente sob anestesia geral, da qual o animal não recupere a consciência.</p>
<p>Grau de invasividade II: Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves).</p>	<p>Leve: Os procedimentos com resultados nos quais é provável que os animais sintam dor, sofrimento ou angústia ligeiros a curto prazo, bem como os procedimentos sem prejuízo significativo do bem-estar ou do estado geral dos animais.</p>
<p>Grau de invasividade III: Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardiaca e intracerebral).</p>	<p>Moderado: Procedimentos em animais com resultados nos quais eles podem sentir dor, sofrimento ou angústia moderada de curto prazo, ou dor leve de longa duração, sofrimento ou angústia, bem como procedimentos que podem causar comprometimento moderado do bem-estar ou estado geral dos animais.</p>
<p>Grau de invasividade IV: Experimentos que causam dor de alta intensidade (ex.: indução de trauma a animais não sedados).</p>	<p>Severo: Procedimentos com resultados nos quais os animais são susceptíveis de sentir dor severa, sofrimento ou angústia, ou dor moderada de longa duração, sofrimento ou angústia, bem como procedimentos que são susceptíveis de causar graves prejuízos ao bem-estar ou condição geral dos animais.</p>

QUADRO 1: Classificação de gravidade de protocolos/procedimentos experimentais

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

9 | CRITÉRIOS PARA RECONHECIMENTO DE BEM-ESTAR E DOR PÓS-PROCEDIMENTO

Reconhecer e classificar a severidade da dor inicia-se com a observação do animal. Esse procedimento é subjetivo e, por isso, complicado em diversos aspectos. Primeiro, porque os animais não podem expressar a dor verbalmente. Segundo, porque o comportamento observado pode não refletir a intensidade da dor, e o grau de domesticação e socialização do animal poderá influenciar sua percepção (quando se torna vantajoso, ou não, exprimir seu comportamento de forma clara). Terceiro, porque o comportamento varia entre os diferentes indivíduos. Quarto, porque os observadores, clínicos e pesquisadores com pensamentos e experiências diferentes, podem ter múltiplas interpretações de uma mesma observação (CONZEMIUS *et al.*, 1997).

Considerando as dificuldades na avaliação da dor, a intensidade do trauma deve ser estimada antes do procedimento (através da classificação de gravidade estimada do procedimento). Essa classificação deve ser um ponto de partida para estimar a dor pós-operatória e definir o tratamento analgésico inicial. Em geral, quanto mais invasivo o procedimento, mais extensa a lesão tecidual e maior a gravidade estimada. Podemos, então, estimar a dor pós-procedimento em leve, moderada ou severa. Considerando que os animais possuem um sistema nervoso semelhante ao dos seres humano, consideramos a intensidade da dor para um determinado procedimento em humanos como um guia para a classificação da gravidade do procedimento para os animais (princípio da analogia). A partir da classificação inicial, deve ser estabelecido um protocolo analgésico e constantes reavaliações devem ser realizadas para verificar se o tratamento instituído está adequado ou se deve ser realizado resgate analgésico ou aplicação de critério de ponto final. A intensidade de dor frente a um estímulo é uma resposta individual (HELLYER; GAYNOR, 1998). (Figura 2).



Figura 2. Esquema básico de etapas de tratamento da dor pós-operatória

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

Assim sendo, apesar das diversas limitações teóricas e práticas, a observação e a interpretação criteriosa do comportamento e dos sinais fisiológicos constituem, essencialmente, o único meio clínico para avaliar a resposta do animal a uma injúria ou uma doença. É importante ressaltar que doença ou injúria são rotineiramente acompanhadas por outros fatores de estresse, que também afetam o comportamento (HANSEN, 1997).

Sinais fisiológicos indiretos de dor moderada incluem identificação de elevação nos valores de alguns parâmetros, como frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial e verificação de determinadas alterações fisiológicas, tais como: dilatação da pupila, aumento da temperatura corporal, salivação, identificação de complexos ventriculares prematuros (HELLYER; GAYNOR, 1998; MORTON; GRIFFITHS, 1985).

Os sinais comportamentais gerais relacionados à presença de dor incluem em camundongos: redução do comportamento de autolimpeza, nível reduzido de atividade espontânea, piloereção, postura curvada, olhos semicerrados, aumento da agressividade quando manuseados, distanciamento de outros animais da gaiola, redução da ingestão de alimentos / água. E em ratos: redução do comportamento de autolimpeza, nível reduzido de atividade espontânea, piloereção, secreções de porfirina (oculares / nasais), olhos vesgos e semicerrados, redução da ingestão de alimentos e água, aumento da agressividade quando manuseados (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007), aumento do arqueamento das costas, alongamento horizontal, contorções abdominais, queda / cambaleando, marcha deficiente e espasmos (ROUGHAN; FLECKNELL, 2001, 2003). Em coelhos, podem ser citados: atividade reduzida, redução do comportamento de autolimpeza, redução da ingestão de alimentos e / ou água, olhos vesgos, postura alterada, contração do abdômen, tensionamento de músculos, postura de defesa, tentativa de se esconder ou agressividade,

ranger de dentes (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007).

Dentre as formas de avaliar a dor, as escalas de expressão facial constituem ferramentas úteis para avaliar dor e analgesia em populações que não apresentam possibilidade de comunicação verbal (bebês, crianças, pessoas com déficit cognitivo) (LANGFORD *et al.*, 2010). Apesar de evidências prévias de que mamíferos, inclusive roedores, são capazes de utilizar expressão facial para demonstrar estados emocionais (GRILL; NORGREN, 1978), esse parâmetro ainda não tinha sido utilizado para a avaliação da dor. Em 2010, o departamento de fisiologia da Universidade McGill, Montreal, publicou uma escala de avaliação de dor por expressão facial para camundongos (LANGFORD *et al.*, 2010) e, no ano seguinte, outra para ratos (SOTOCINAL *et al.*, 2011). São as únicas duas escalas para avaliação de dor em roedores que passaram por um processo de validação, e, depois das publicações iniciais, houve diversas outras nas quais as escalas foram utilizadas para avaliar dor associada a diferentes modelos experimentais. Os parâmetros avaliados por essas escalas são: (1) Contração orbital - estreitamento da área orbital, com pálpebra bem fechada ou olho apertado (denotado por rugas ao redor dos olhos); (2) achatamento do nariz e bochecha - animais com dor podem exibir sucessivamente menos abaulamento do nariz e bochecha, com eventual ausência do vinco entre a bochecha e área dos bigodes; (3) alterações da posição das orelhas - as orelhas de animais com dor tendem a dobrar, curvar e inclinar para frente ou para fora, resultando em uma forma pontiaguda. O espaço entre as orelhas pode aparecer maior; (4) posição de bigodes - animais com dor apresentam deslocamento da posição normal dos bigodes; para trás, contra a face, ou para a frente (“em pé”). Os bigodes podem também podem estar aglutinados (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011).

Também foi publicada uma escala de dor por expressão facial para lagomorfos (KEATING *et al.*, 2012) e, recentemente, foi validada uma escala composta para avaliação de dor em lagomorfos (BANCHI *et al.*, 2020).

As escalas de expressão facial para ratos e camundongos apresentaram alto nível de evidências de suas propriedades de medição, e a escala de expressão facial para coelhos apresentou processo de validação parcial e moderado nível de evidências de suas propriedades de medição (EVANGELISTA; MONTEIRO; STEAGALL, 2021).

Os autores indicam o grau de alteração de cada um dos parâmetros de expressão facial em caso de dor leve, moderada e severa. Na prática, consideramos que o uso da escala de expressão facial de forma isolada é útil para avaliar dor severa, apenas. Nos casos de dor leve ou moderada, consideramos necessária a associação da avaliação da escala facial com outros parâmetros fisiológicos e comportamentais citados anteriormente, criando escores de avaliação de dor incluindo os diferentes parâmetros, e que podem ser construídos com detalhes específicos das alterações esperadas de acordo com o a região do corpo do animal em que procedimento foi realizado.

O uso de escalas de escore de avaliação de dor é uma forma de converter

observações subjetivas de dor em um sistema de pontuação objetivo. Para cada critério escolhido pelos pesquisadores como indicativo de percepção da dor, é dado um valor ponderado (geralmente variando de 1 a 5) e somado para criar uma pontuação geral de dor para a intervenção. As pontuações totais mais altas são indicativas de maior estado de dor. Devem ser definidos os pontos de corte da pontuação que indiquem necessidade de intervenções, tais como resgate analgésico ou desfechos humanitários (exclusão do animal do estudo, podendo também ser indicada a eutanásia precoce) (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007). As normas para decisões sobre aplicação de resgate analgésico e desfechos humanitários nos animais submetidos a procedimentos de pesquisa devem ser estabelecidas no momento de submissão do projeto ao Comitê de Ética para uso de Animais. Ou seja, antes de iniciado protocolo experimental, e, inclusive, antes dos estudos piloto (BRASIL, 2018).

10 | VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E PROTOCOLOS ANALGÉSICOS PARA CONTROLE DA DOR PÓS-PROCEDIMENTOS

Considerando a redução de estresse de manuseio, menor necessidade de habilidade técnica e menor tempo dispendido pelo pesquisador, a administração de analgésicos para roedores em água ou alimentos poderia ter um apelo em comparação com a aplicação de injeções. Entretanto, esse tipo de administração não apresenta garantia de que a dose adequada é efetivamente administrada para cada animal (SPETH; SMITH; BROGAN, 2001). A buprenorfina preparada em formato de gelatina com sabor tem sido recomendada e amplamente utilizada (FLECKNELL; ROUGHAN; STEWART, 1999), entretanto, o consumo da gelatina deve ser, obrigatoriamente, monitorado e há dados que apontam dúvidas sobre o poder analgésico ser efetivamente alcançado (MARTIN *et al.*, 2001). Simplesmente contar com ingestão suficiente de alimentos ou água no pós-operatório para atingir níveis sanguíneos de analgésicos eficazes é problemático.

Até que a extensão e reprodutibilidade da analgesia fornecida por compostos ofertados por meio de alimentos ou água potável sejam confirmadas, é mais prudente confiar apenas na administração de analgésicos com eficácia comprovada para alívio da dor por via parenteral ou por gavagem (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007).

Os fármacos analgésicos em geral têm uma ação relativamente curta, o que pode limitar o tratamento, considerando as horas em que há pessoal trabalhando nos biotérios. A recomendação geral obrigatória é que é fundamental garantir que os fármacos analgésicos ou associações escolhidas mantenham seu efeito analgésico por todo o intervalo entre as aplicações. Por isso, devem ser priorizados fármacos com tempo de ação maior ou fármacos de liberação contínua com o implante de bombas osmóticas subcutâneas.

A seleção do analgésico apropriado depende de tempo entre a aplicação e início do efeito, magnitude de seu efeito e duração. A intensidade e a duração da dor após a cirurgia dependem não apenas do procedimento específico, mas, também, da habilidade

do operador, do protocolo anestésico, detalhes do período perioperatório e do manejo dos animais. Idade, sexo e antecedentes genéticos também desempenham um papel importante. A última variável é particularmente problemática para camundongos geneticamente modificados com diferentes fundos genéticos. Consequentemente, a seleção de uma dosagem específica em uma cepa pode levar à sobredosagem ou analgesia ineficaz em algumas cepas (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007).

Portanto, o tratamento eficaz da dor em camundongos, ratos e lagomorfos depende da avaliação clínica e ajuste de fármacos e doses para atender as necessidades analgésicas do animal ou específicas da cepa. Um estudo piloto é uma forma interessante de determinar o protocolo analgésico adequado para um estudo específico ou grupos de estudos semelhantes realizados de um determinado laboratório, considerando o modelo animal e o desenho experimental (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007). Também deve ser considerado o objetivo do estudo, buscando um protocolo analgésico que interfira o mínimo possível nos resultados experimentais.

REFERÊNCIAS

ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.* Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 46, n. 2, p. 97–108, mar. 2007.

ARRAS, M. *et al.* Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, out. 2001.

ARRAS, M. *et al.* Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. **BMC veterinary research**, v. 3, p. 16, 2 ago. 2007.

BANCHI, P. *et al.* Reliability and construct validity of a composite pain scale for rabbit (CANCRS) in a clinical environment. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0221377, 30 abr. 2020.

BARA, M.; JOFFE, A. R. The ethical dimension in published animal research in critical care: the public face of science. **Critical Care (London, England)**, v. 18, n. 1, p. R15, 14 jan. 2014.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, out. 2014.

BRASIL. Resolução Normativa nº 32. **Baixa as Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. 6 set. 2016.

BRASIL. Resolução Normativa nº 37. **Anexo da diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. 15 fev. 2018.

BRØNSTAD, A. *et al.* Current concepts of Harm–Benefit Analysis of Animal Experiments – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 1. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 1_suppl, p. 1–20, jun. 2016.

BULGER, R. E. Use of animals in experimental research: a scientist's perspective. **The Anatomical Record**, v. 219, n. 3, p. 215–220, nov. 1987.

CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 62–71, 1 jan. 2000.

CLARK-PRICE, S. C. *et al.* Multicenter study to investigate factors associated with change in rectal temperature during anesthesia in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 258, n. 1, p. 64–71, 1 jan. 2021.

CONZEMIUS, M. G. *et al.* Correlation between subjective and objective measures used to determine severity of postoperative pain in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 11, p. 1619–1622, 1 jun. 1997.

DRUMMOND, J. P. Dor pós-operatória. *In: Dor aguda: Fisiopatologia, clínica e terapêutica.* [s.l.] Atheneu, 2000. p. 27–55.

EVANGELISTA, M. C.; MONTEIRO, B. P.; STEAGALL, P. V. Measurement properties of grimace scales for pain assessment in non-human mammals: a systematic review. **Pain**, 9 set. 2021.

FLECKNELL, P. A.; ROUGHAN, J. V.; STEWART, R. Use of oral buprenorphine ('buprenorphine jello') for postoperative analgesia in rats—a clinical trial. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 169–174, 1 abr. 1999.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Research**, v. 143, n. 2, p. 263–279, mar. 1978.

GUILLEN, J.; VERGARA, P. Chapter 1 - Global Guiding Principles: A Tool for Harmonization. *In: Laboratory Animals: Regulations and Recommendations for the Care and Use of Animals in Research Book.* 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–13.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology.** 12. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2011.

HANSEN, B. Through a glass darkly: Using behavior to assess pain. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery: Small Animal**, v. 12, n. 2, p. 61–74, maio 1997.

HELANDER, E. M. *et al.* Multimodal Analgesia, Current Concepts, and Acute Pain Considerations. **Current Pain and Headache Reports**, v. 21, n. 1, p. 3, jan. 2017.

HELLYER, P. W.; GAYNOR, J. S. Acute postsurgical pain in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 2, p. 140–154, 1998.

HEWSON, C. J.; DOHOO, I. R.; LEMKE, K. A. Factors affecting the use of postincisional analgesics in dogs and cats by Canadian veterinarians in 2001. **The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 47, n. 5, p. 453–459, maio 2006.

JAKUSCHEIT, A. *et al.* Utility of nociceptive flexion reflex threshold and bispectral index to predict movement responses under propofol anaesthesia. **Somatosensory & Motor Research**, v. 34, n. 2, p. 139–144, 3 abr. 2017.

JIRKOF, P. *et al.* Burrowing Behavior as an Indicator of Post-Laparotomy Pain in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, 2010.

JIRKOF, P. *et al.* Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 3, p. 153–161, jul. 2013.

JIRKOF, P. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 123–128, abr. 2017.

KEATING, S. C. J. *et al.* Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44437, 7 set. 2012.

KISSIN, I.; WEISKOPF, R. B. Preemptive Analgesia. **Anesthesiology**, v. 93, n. 4, p. 1138–1143, 1 out. 2000.

KITCHEN, H. *et al.* Panel Report on the Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and distress. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 10, p. 1186–1192, 1987.

LABER, K. *et al.* Recommendations for Addressing Harm–Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 2. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 1_suppl, p. 21–42, jun. 2016.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703–728, jul. 2000.

LANGFORD, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, jun. 2010.

MARTIN, L. B. *et al.* Analgesic efficacy of orally administered buprenorphine in rats. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 1, p. 43–48, fev. 2001.

MORTON, D.; GRIFFITHS, P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. **Veterinary Record**, v. 116, n. 16, p. 431–436, 20 abr. 1985.

PAGE, G. G. The immune-suppressive effects of pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 521, p. 117–125, 2003.

RICHARDSON, C. A.; FLECKNELL, P. A. Anaesthesia and Post-operative Analgesia following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are we Making Progress? **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 119–127, abr. 2005.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. **Pain**, v. 90, n. 1, p. 65–74, fev. 2001.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. **European Journal of Pain**, v. 7, n. 5, p. 397–406, out. 2003.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SCHWARZ, C. *et al.* Mechanical Load Modulates the Stimulatory Effect of BMP2 in a Rat Nonunion Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 1–2, p. 247–254, jan. 2013.

SMITH, D. *et al.* Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. **Laboratory Animals**, v. 52, n. 1_suppl, p. 5–57, fev. 2018.

SOTOCINAL, S. G. *et al.* The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7–55, 1 jan. 2011.

SPETH, R. C.; SMITH, M. S.; BROGAN, R. S. Regarding the inadvisability of administering postoperative analgesics in the drinking water of rats (*Rattus norvegicus*). **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 15–17, nov. 2001.

STOKES, E. L.; FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 2, p. 149–154, abr. 2009.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Off J Eur Union 2010**, v. L 276, p. 33–79, 2010.

VON DINCKLAGE, F. *et al.* Comparison of the nociceptive flexion reflex threshold and the bispectral index as monitors of movement responses to noxious stimuli under propofol mono-anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 102, n. 2, p. 244–250, fev. 2009.