

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS COMPORTAMENTAL, CLÍNICO E ANTINOCICEPTIVO
DA CROTALFINA EM EQUÍNOS: COMPARAÇÃO COM MORFINA,
U50-488H E FENILBUTAZONA**

Erica Cristina Bueno do Prado Guirro

Orientador: Profº Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

Co-orientadora: Yara Cury - Pesquisadora Científica VI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Cirurgia Veterinária).

Jaboticabal – São Paulo
Dezembro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO – nasceu em São Bernardo do Campo/SP, em 04 de setembro de 1975, filha de Sidson Guirro e de Dirce Bueno do Prado Guirro. Em 1995, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, *Campus* de Jaboticabal, no curso de Medicina Veterinária. No período de 1996 a 1999 participou do Programa de Educação Tutorial – PET e, em 1999, foi monitora da disciplina “Clínica Médica de Equinos”. Graduiu-se Médica Veterinária em dezembro de 1999. Entre 2000 e 2002 atuou como Médica Veterinária na Clínica de Equinos Atletas “Azevedo & Montello”, no Clube Hípico Santo Amaro, em São Paulo/SP. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, *Campus* de Jaboticabal em agosto de 2003, obteve o título de Mestre em julho de 2005 e iniciou o Doutorado em agosto do mesmo ano. Em junho de 2006, foi aprovada no concurso público para vaga do Magistério Superior da Universidade Federal do Paraná/UFPR, no *Campus* Palotina, na área de Clínica Médica de Equídeos e Clínica Médica de Ruminantes, disciplina pelas quais é a responsável. Além disso, na UFPR/*Campus* Palotina, atua no Serviço de Atendimento Clínico e no Plantão de Grandes Animais, Serviço de Anestesiologia Veterinária, possui projeto de iniciação científica e de extensão universitária, foi vice-coordenadora do Curso de Medicina Veterinária, é membro do Colegiado de Curso, do Comitê de Ética e Bem-estar Animal e do Conselho Diretor do *Campus* e é a atual Diretora do Hospital Veterinário.

*O Senhor é meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva, por amor do seu nome.
Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estais
comigo.
Vosso bordão e vosso báculo são o meu amparo.
Preparais para mim a mesa à vista de meus inimigos.
Derramais o perfume sobre minha cabeça e transborda minha taça.
A vossa bondade e misericórdia não de seguir-me por todos os dias
de minha vida.
E habitarei na casa do Senhor por longos dias.*

(Salmo 22/23 atribuído ao Rei Davi)

Agradeço...

A Deus, que me orienta na busca dos meus ideais e me permitiu alcançar mais essa vitória de forma digna. Agradeço a Ele pela minha família e pelos meus amigos que tornam mais fácil cumprir esta missão chamada de vida.

Ainda, agradeço a Deus por me dar coragem suficiente para lutar em prol dos animais e fazer do bem-estar deles um dos maiores objetivos da minha vida. Tenho certeza que esta luta não está sendo em vão e não irei decepcioná-Lo.

Ao meu anjo da guarda, que é o espírito de luz que me acompanha diariamente e me dá inúmeras provas de sua presença ao meu lado. É com sua presença que tenho conseguido superar os desafios que me são impostos. Obrigada por proteger e iluminar os meus incertos passos sempre em busca de melhorar a qualidade de vida dos animais.

*Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação,
seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu
semelhante.*

(Albert Schweitzer, prêmio Nobel da Paz - 1952)

Aos animais, que expressam com muita naturalidade o verdadeiro significado de amor, carinho, respeito e lealdade. Livres de preconceitos e de segundas intenções são exemplos que deveriam ser seguidos pela humanidade.

Aos cavalos Puro Sangue Árabes que participaram deste projeto, me desculpem os transtornos! Esse “em prol da Ciência” tem suas perturbações! Agradeço também a todos os cavalos que passaram pela minha vida, sejam como pacientes, como animais de experimento, como animais de aula, animais de passeio e, em especial, a Image Onda JP, pois todos fortaleceram minha vontade de estar sempre ao lado dos eqüinos.

Aos meus mais fiéis companheiros, Juan, Ringo e Zeca, que agora estão comigo em Palotina, e a Dot, que está um pouco distante, pois todos estiveram incondicionalmente ao meu lado, viajaram num caminhão de mudança e chegaram mais felizes do que eu, sempre mostrando o real sentido da amizade e lealdade e que, durante a nova empreitada em Palotina, eu poderia contar com a presença deles. A Winnie e ao Nino (*in memoriam*), que me deram muitos momentos de alegria e cumpriram sua jornada muito antes do que eu queria... a saudade dói muito! Tina, Vicky e Ula, sintam-se igualmente lembradas.

*Há um tempo para deixar as coisas acontecerem e um tempo para
fazer com que as coisas aconteçam.*

(Hugh Prather)

Dedico...

Aos meus pais, Sidson e Dirce, pois sem eles nada teria sido possível. Exemplos de união, justiça, respeito, amizade, carinho e amor, vocês me ensinaram que sempre é possível recomeçar. Lembro de quanto me incentivaram nesta conquista, dando-me força, ouvindo minhas lamentações e alegrando-se a cada vitória. Desculpem-me pela distância, pela saudade e pela ausência.

Pai e mãe, fico feliz em saber que nossa família é repleta de amor. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos, muitas vezes até mais do que eu. Obrigada pelos conselhos e conversas nos momentos de incerteza. Obrigada pelos elogios e carinhos nas horas de alegria. Obrigada pelos “puxões de orelha” quando só vocês tiveram a coragem de fazê-lo. Obrigada, sempre, por tudo. Se hoje isto foi concluído, é porque vocês permitiram. Que Deus nunca nos separe e que, a cada dia, aumente nossos laços.

Úrsula e Pedro, vocês também integram esse momento. Sei que não perdi a irmã, mas ganhei um cunhado que faz minha irmã muito feliz e, juntos comemoram a minha conquista.

Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.

(Chico Xavier)

Agradeço...

Ao meu orientador, Profº Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, por ter acreditado em mim, no meu potencial e em minhas idéias. Foi ao seu lado que tive contato com a pesquisa e descobri os encantos do mundo científico. Não esquecerei suas palavras durante uma banca de Doutorado, quando você deixou claro o valor desse momento e desse título como um divisor de águas em nossas vidas... recebi aquelas palavras como um conselho e sonhei com o dia em que alcançaria esse objetivo. Agradeço pelo apoio que me deu quando eu decidi que prestaria o concurso de Professor, pelos convites para ministrar aula para a pós-graduação e pela palestra durante o Ciclo de Cólica, pois foram momentos em que notei que você acreditava no meu crescimento. Essa vitória não é apenas minha e divido com você a satisfação

dessas conquistas. Agora, como docente, entendo muito do que me dizia e espero ter a mesma qualidade de relacionamento com os alunos que você teve comigo durante a minha formação.

Aos Professores que aceitaram participar da banca de Defesa desta Tese, seja como membro titular ou suplente, certamente com o objetivo de enriquecê-lo. Aos professores que compuseram a banca de Qualificação e que possibilitaram o momento agora presente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pela oportunidade e apoio dedicados.

Aos professores e funcionários desta instituição que permitiram a execução deste projeto. Em especial, agradeço aos Professores José Corrêa de Lacerda Neto, por ter sido o primeiro a me colocar ao lado dos cavalos, por ter acreditado em mim e por ter sido meu amigo em muitos momentos; ao Professor Antonio de Queiroz Neto que permitiu o uso das baias comportamentais e ainda discutiu comigo alguns detalhes desse projeto; ao Professor José Jurandir Fagliari, que foi um exemplo de docência e me fez acreditar que esse caminho era válido; ao Professor Newton Nunes, pelas belas palavras ditas e escritas durante a obtenção do meu título de Mestre e na Qualificação de Doutorado; ao funcionário Deco, do Setor de Equideocultura da FCAV/UNESP, que certamente torna mais viável a vida daqueles cavalos.

A pesquisadora Yara Cury do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que acreditou na proposta desse projeto e de co-orientação. Você é um grande exemplo de como fazer pesquisa de ponta no Brasil. Aos demais pesquisadores e pós-graduandos que trabalham nesse laboratório, em especial à Patrícia Brigatte que foi uma amiga importante e me apresentou a Yara Cury.

Ao COINFAR, representado pelo senhor William Marandola, que aceitou minha proposta. Agradeço especialmente ao Márcio de Paula, que esteve em Jaboticabal e acompanhou o início de nossos ensaios experimentais.

Aos colegas e amigos de orientação João Henrique Perotta, Luciane Maria Laskoski, Paulo Alécio Canola, Renata Gebara Sampaio Dória, Eric Schmidt Rondon,

Marina Cecato Mendes, André Escobar, Andrea Del Pilar Uribe Diaz, Ricardo Miyasaka de Almeida, Adriana Helena de Souza, Marsel Carvalho, José Henrique Saraiva Borges, Simone Bopp, Cândice Mara Bertonha, Alexandre Agreli de Melo, Thiago Horwath e Patrícia Évora. Agradeço especialmente ao amigo João Henrique Perotta, pois sem ele este trabalho não teria sido executado com a mesma qualidade. Desculpe a ausência, mas saiba que agradeço a Deus e ao Professor Valadão por ter colocado você no meu caminho, justamente no momento em que trocamos de Estado. Você já é um excelente pesquisador e certamente será um ótimo professor. Não desista dos cavalos!

Aos meus amigos da pós-graduação, que tornaram esta etapa mais fácil e, sem dúvida, mais divertida. Agradeço a todos, mas principalmente àqueles que estiveram presentes nos momentos alegres e tristes do mesmo modo. Muitos já foram embora dessa instituição, mas sempre serão lembrados. Maricy e Aracelle, agradeço pelo alojamento e principalmente pelas conversas! Gesi, Renata Gebara e Paulinha, vocês me ensinaram que eu poderia anestesiá-lo um cavalo e ainda foram excelentes companheiras enquanto estivemos juntas. Carla Braga, que é um exemplo de saber viver. Renata Gemio, que é uma amiga para sempre. Oleskovicz, Juan, Anderson, Celina, Denise, Lílian e Fernanda, amigos que já viveram esse momento, eu adoraria tê-los aqui agora. A todos que não pude citar aqui, mas sabem como foram importantes, muito obrigada.

Aos Professores, alunos e funcionários da Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina, que compartilham comigo o desafio de minha nova empreitada como Professora. Quero agradecer a todos que me aceitaram e que têm acreditado em minhas propostas. Agradeço aos meus alunos que também me ensinam e aos meus orientados que depositaram muita confiança nos meus sonhos. Espero poder retribuir a confiança de todos dessa casa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão do auxílio financeiro (processo nº 05/044 80-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudos.

Me dá um beijo, então... Aperta a minha mão...

Tolice é viver a vida, assim, sem aventura...

Deixa ser, pelo coração...

Se é loucura, então, melhor não ter razão.

(O Último Romântico – Lulu Santos)

Dedico...

Ao Volmir Sponchiado, que hoje faz parte de minha vida. Por estranhos caminhos, Deus nos colocou frente a frente e agora depende de nós tornarmos esta caminhada mais ou menos florida. Obrigada por acreditar em mim, por me ouvir, por sustentar meus sonhos e por tantas outras coisas que você tem feito. O poeta disse que o amor é eterno enquanto dura, pois bem, seremos nós que decidiremos o ritmo dessa ampulheta.

"You are a great champion. When you ran, the ground shook. The sky opened, and mere mortals parted. Parted the way to victory, where you'll meet me in the winner's circle—and I'll put a blanket of flowers on your back."

(citação do filme *Dreamer*, 2005)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxv
RESUMO	xxviii
SUMMARY	xxix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
OBJETIVOS	9
HIPÓTESE	9
JUSTIFICATIVA	10
EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE DIFERENTES DOSES DE CROTALFINA EM EQUINOS: COMPARAÇÃO COM U50-488H	11
Material e Métodos	11
A. Comitê de Ética e Bem-Estar Animal	11
B. Animais	11
C. Delineamento Experimental	11
C.1. Estudo Piloto	12
C. 2. Estudo Comportamental	13
D. Análise Estatística	15
Resultados e Discussão	16
Conclusão	21
EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CROTALFINA EM EQUINOS: COMPARAÇÃO COM MORFINA, U50-488H, FENILBUTAZONA OU NaCl 0,9%	22
Material e Métodos	22
A. Comitê de Ética e Bem-Estar Animal	22

B. Animais	22
C. Delineamento Experimental	22
D. Análise Estatística	25
Resultados e Discussão	26
Conclusão	38
EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA CROTALFINA EM EQUINOS SUBMETIDOS A MODELO INCISIONAL DE DOR INFLAMATÓRIA: COMPARAÇÃO COM MORFINA, U50-488H, FENILBUTAZONA OU NaCl 0,9%	39
Material e Métodos	39
A. Comitê de Ética e Bem-Estar Animal	39
B. Animais	39
C. Delineamento Experimental	39
C.1. Efeito Antinociceptivo em Pele Íntegra	40
C.2. Efeito Antinociceptivo em Pele Incisionada	42
C.3. Outras Comparações	44
D. Análise Estatística	44
Resultados	46
Discussão	60
Conclusão	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	75
Apêndice A - Ordem aleatória dos equinos PSA utilizados na avaliação comportamental dos efeitos promovidos por NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCROa, GCROb e GCROc) ou U50-488H (GK)	76
Apêndice B - Ordem dos equinos PSA usados na avaliação dos efeitos clínicos causados por crotalfina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%	77

Apêndice C - Ordem aleatória dos eqüinos PSA utilizados para verificar o efeito antinociceptivo gerado pela administração intravenosa de crotalfina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em pele íntegra	78
Apêndice D - Ordem aleatória dos eqüinos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória para verificar o efeito antinociceptivo gerado pela administração intravenosa de crotalfina, morfina, U50-488H ou fenilbutazona	79
Apêndice E – Numeração dos filamentos de von Frey com os correspondentes valores em força (gramas), diâmetros e conversão logarítmica	80

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
μg/kg	micrograma por quilograma
°C	graus Celsius
AC	altura da cabeça em relação ao solo
AINE	antiinflamatório não-esteroidal
ALE	atividade locomotora espontânea
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina tri-fosfato
bat/min	batimentos cardíacos por minuto
CEBEA	Comitê de Ética e Bem-estar Animal
CO ₂	dióxido de carbono
d	dia
ETCO ₂	dióxido de carbono no fim da expiração
<i>f</i>	frequência respiratória
FC	frequência cardíaca
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
g	grama
GC	grupo experimental controle, tratado com NaCl 0,9%
GCRO	grupo experimental tratado com 3,8ng/kg crotalfina
GCROa	grupo experimental tratado com 1,4ng/kg crotalfina
GCROb	grupo experimental tratado com 2,2ng/kg crotalfina
GCROc	grupo experimental tratado com 3,8ng/kg crotalfina
GF	grupo experimental tratado com 4,4mg/kg fenilbutazona
GK	grupo experimental tratado com 160μg/kg U50-488H
GM	grupo experimental tratado com 0,1mg/kg morfina
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
h	hora

im	via intramuscular
iv	via intravenosa
kg	quilograma
LNEMesc	limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região escapular
LNEMisq	limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática
LRFCesc	latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região escapular
LRFCisq	latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região isquiática
mg/kg	miligrama por quilograma
MI	motilidade intestinal
min	minutos
mov/min	movimentos respiratórios por minuto
ng/kg	nanogramas por quilograma
O ₂	oxigênio
PaCO ₂	pressão parcial de CO ₂ do sangue arterial
PaO ₂	pressão parcial de O ₂ do sangue arterial
PSA	raça equina Puro Sangue Árabe
QID	quadrante inferior direito
QIE	quadrante inferior esquerdo
QSD	quadrante superior direito
QSE	quadrante superior esquerdo
seg	segundos
SPO ₂	saturação periférica de oxigênio
T	tempo de aferição dos parâmetros
T°	temperatura ambiente
TD	latência para defecar
TR	temperatura retal
TU	latência para urinar
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UR	umidade relativa

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Temperatura (T ^o) e umidade relativa (UR) (média ± desvio padrão) mensuradas no interior das baias no início e no final da avaliação comportamental dos eqüinos PSA tratados com NaCl 0,9%, crotalfina ou U50-488H	16
2 Perfil da atividade locomotora espontânea, em pulsos (média ± desvio padrão) dos eqüinos PSA submetidos aos grupos GC (NaCl 0,9%), GCROa (1,4ng/kg crotalfina), GCROb (2,2ng/kg crotalfina), GCROc (3,8ng/kg crotalfina) ou GK (160µg/kg U50-488H)	17
3 Alterações comportamentais observadas na primeira hora após a administração intravenosa de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO) ou U50-488H (GK), em eqüinos PSA	19
4 Escores da motilidade intestinal aferida por auscultação abdominal em eqüinos PSA submetidos a injeção intravenosa de NaCl 0,9% (5mL), crotalfina (3,8ng/kg), morfina (0,1mg/kg), U50-488H (160µg/kg) ou fenilbutazona (4,4mg/kg)	24
5 Escores da ataxia aferida por inspeção em eqüinos PSA submetidos a injeção intravenosa de NaCl 0,9% (5mL), crotalfina (3,8ng/kg), morfina (0,1mg/kg), U50-488H (160µg/kg) ou fenilbutazona (4,4mg/kg)	25
6 Testes estatísticos empregados durante a avaliação clínica dos efeitos promovidos pela crotalfina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em eqüinos PSA	25
7 Porcentagem (%) e latência (média ± erro padrão) para urinar e defecar apresentada pelos eqüinos PSA que receberam administração intravenosa de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO),	

	morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em minutos..	28
8	Frequência cardíaca (bpm) (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	28
9	Frequência respiratória (mpm) (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	30
10	Temperatura retal ($^{\circ}$ C) (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	32
11	Manutenção da altura de cabeça em relação ao solo em porcentagem (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	34
12	Porcentagem de ptose palpebral observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	34
13	Escores de motilidade intestinal (média $\pm$ erro padrão) no quadrante superior direito (A), superior esquerdo (B), inferior direito (C) e inferior esquerdo (D) observados durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	37
14	Testes estatísticos empregados durante a avaliação do efeito antinociceptivo promovido pela crotalina, morfina, U50-488H,	

	fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em equínos PSA	45
15	Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região escapular (segundos) (média $\pm$ erro padrão) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	46
16	Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região isquiática (segundos) (média $\pm$ erro padrão) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	47
17	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região escapular de cavalos PSA	49
18	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região isquiática de cavalos PSA	51
19	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região escapular após a administração de crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória	52
20	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região isquiática após a administração de crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória	54
21	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região da escápula (LNEMesc) e da região	

	isquiática (LNEMisq), em pele íntegra de eqüinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF)	55
22	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região da escápula (LNEMesc) e da região isquiática (LNEMisq), em pele incisionada de eqüinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF)	56
23	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou incisionada na região da escápula (LNEMesc) de eqüinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF)	57
24	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou incisionada na região isquiática (LNEMisq) de eqüinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF)	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Desenho esquemático da disposição dos sensores no interior da baia comportamental instalada no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – FCAV – UNESP	13
2	Perfil da atividade locomotora espontânea (média) dos eqüinos PSA submetidos aos grupos GC (NaCl 0,9%), GCROa (1,4ng/kg crotalfina), GCROb (2,2ng/kg crotalfina), GCROc (3,8ng/kg crotalfina) ou GK (160µg/kg U50-488H)	18
3	Frequência cardíaca (média) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	29
4	Frequência respiratória (mpm) (média) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	31
5	Temperatura retal (°C) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	32
6	Porcentagem (média) de manutenção da altura de cabeça em relação ao solo (A) e porcentagem de animais que apresentaram ptose palpebral (B) observadas durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	33
7	Média dos escores de motilidade intestinal no quadrante superior	

	esquerdo (A), superior direito (B), inferior esquerdo (C) e inferior direito (D) (média) observadas durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	36
8	Região isquiática tricotomizada e preparada para a aplicação do estímulo em eqüino PSA. Nota-se um ponto central e círculos eqüidistantes a 1, 3 e 5cm	41
9	Modelo incisional de dor inflamatória realizado na região escapular e utilizado na avaliação antinociceptiva em eqüinos PSA. A ilustra região escapular tricotomizada. B exibe região escapular incisionada e suturada	43
10	Modelo incisional de dor inflamatória realizado na região isquiática e utilizado na avaliação antinociceptiva em eqüinos PSA. A ilustra a região tricotomizada, cauda enfaixada e o momento inicial da infiltração local de lidocaína 2%. B exibe região isquiática já infiltrada, previamente à incisão. C mostra região isquiática incisionada e suturada	43
11	Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região escapular (segundos) (média) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	46
12	Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região isquiática (segundos) (média) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA	47
13	Lesão de pele decorrente de queimadura provocada pela exposição ao foco de luz artificial sete dias após a aplicação do estímulo térmico, na região isquiática de um eqüino PSA	48
14	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina	

	(GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região escapular de cavalos PSA	50
15	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região isquiática de cavalos PSA	51
16	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado na região escapular após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória	53
17	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado na região isquiática após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória	54
18	Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou submetida a modelo incisional de dor inflamatória na região escapular ou isquiática de cavalos PSA tratados com crotalfina (A), morfina (B), U50-488H (C) ou fenilbutazona (D)	59

EFEITOS COMPORTAMENTAL, CLÍNICO E ANTINOCICEPTIVO DA CROTALFINA EM EQUÍNOS: COMPARAÇÃO COM MORFINA, U50-488H E FENILBUTAZONA

RESUMO – A dor interfere na homeostase e dificulta a realização de diversos procedimentos em eqüinos. Os opióides agonistas μ são analgésicos potentes, porém podem induzir efeitos adversos como aumento da atividade locomotora espontânea, enquanto que agonistas de receptores kappa, como o U50-488H, produzem analgesia e alterações comportamentais mínimas em eqüinos. A crotalfina é um agonista kappa que produz analgesia potente em ratos. Assim, dezoito eqüinos Puro Sangue Árabe foram utilizados para se avaliar os efeitos comportamentais, clínicos e antinociceptivos promovidos pela injeção intravenosa de dose única de crotalfina (3,8ng/kg) em comparação com morfina (0,1mg/kg), U50-488H (160 μ g/kg), fenilbutazona (4,4mg/kg) ou NaCl 0,9%. A crotalfina não alterou a atividade locomotora espontânea, a taxa de micção e/ou defecação, a frequência cardíaca e a motilidade intestinal; houve apenas discretas mudanças comportamentais, sedação leve e aumento sutil e transitório de temperatura retal e de frequência respiratória. Em pele incisionada ocorreu efeito antinociceptivo por até seis horas e efeito anti-hipernociceptivo por até três dias em região isquiática, mas em pele íntegra e em região escapular incisionada o efeito antinociceptivo não foi significativo. Portanto, a administração intravenosa de dose única de crotalfina (3,8ng/kg), em eqüinos, não gera alterações clínicas e/ou comportamentais severas e promove efeito antinociceptivo por até seis horas e inibe a instalação de estados hipernociceptivos por até três dias, em modelo incisional de dor inflamatória realizado em região isquiática, enquanto que a crotalfina em pele íntegra e em região escapular incisionada não promove efeito antinociceptivo relevante.

Palavras-chave: crotalfina, eqüinos, kappa, nocicepção, opióides, U50-488H

**BEHAVIORAL, CLINICAL AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS PROMOTED BY
CROTALFINE IN HORSES: COMPARISON TO MORPHINE, U50-488H AND
PHENYLBUTAZONE.**

SUMMARY – Pain unbalances in homeostase and makes difficult a lot of procedures in horses. The mu-opioids agonists are powerful analgesics powerful, however can induce adverse effect as increase of the spontaneous locomotor activity, while kappa agonists, like U50-488H, produce analgesia and minimal behavioral changes in horses. Crotalfine is a kappa opioid that promote potent analgesia in rats. Thus, eighteen Arabian horses were used to evaluate behavioral, clinical and antinociceptive effects promoted by only intravenous injection of crotalfina (3,8ng/kg) in comparison with morphine (0,1mg/kg), U50-488H (160µg/kg), phenylbutazone (4,4mg/kg) or NaCl 0.9%. Crotalfine didn't change spontaneous locomotor activity, rate to urine and defecate, heart rate and intestinal motility; were observed just discrete behavioral changes, light sedation and subtle and transitory increase of body temperature and respiratory rate. At incisioned skin was verified antinociceptive effect for up to six hours and anti-hypernociceptive effect occurred from six hours until three days in isquiatic region, but in complete skin and incisioned scapular region the antinociceptive effect was not significant. Therefore, only intravenous administration of crotalfina (3,8ng/kg), in horses, does not generate severe clinical and behavioral changes and promotes antinociceptive effect for up to six hours and inhibits installation of hypernociceptive states for up to three days in incisional model of inflammatory pain at isquiatic region, whereas crotalfine does not promote relevant antinociceptive effect in complete skin and in incisioned scapular region.

Keywords: crotalfine, horses, kappa receptor, nociception, opioid, U50-488H

INTRODUÇÃO

A dor em eqüinos, ainda hoje, é subestimada, seja por falta de conhecimento em identificá-la e/ou quantificá-la ou por falhas técnicas quanto ao uso de analgésicos (TAYLOR, 2005).

A nocicepção é uma função sensitiva que na maioria das vezes é interpretada como prejudicial, todavia tal sensação é fisiologicamente importante para que o organismo identifique os estímulos nocivos. Após a integração do estímulo nócico pelo sistema nervoso central, o organismo interpreta o fenômeno que conceitualmente é denominado de dor (LEMONICA & PEREIRA, 1992).

Diversas classes de fármacos podem ser utilizadas na terapia da dor, sendo os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais os de maior destaque. Desde 4000 a.C. já existem relatos dos sumérios quanto ao uso do ópio para combater a dor, mas foi o grego Theophrastus no século III a.C. que utilizou a palavra ópio (suco) para se referir ao líquido leitoso obtido das sementes maduras de papoula. Em 1806, o farmacêutico alemão Frederick Sertürner isolou e descreveu uma substância pura no ópio e a denominou morfina (GÓRNIAK, 1996). Os antiinflamatórios foram descritos pela primeira vez em 1763, quando o Reverendo Edmund Stone relatou a propriedade anti-térmica da casca do salgueiro, que é rica em salicina, a partir da qual foi sintetizado o ácido salicílico, que é o fármaco padrão da classe (TASAKA, 1996).

Na busca por novos analgésicos, foram revistos os relatos de Vital Brazil, feitos entre 1930 e 1940, nos quais era sugerido que o veneno de cascavel talvez possuísse um fator analgésico, pois as vítimas de acidentes crotálicos não se queixavam de dor severa (SOUSA E SILVA et al., 1996; PICOLO, 2003). Associando-se as pesquisas com a tecnologia da indústria farmacêutica foi possível identificar, isolar, caracterizar e sintetizar o fator analgésico, atualmente denominado de crotalfina. Este fármaco foi classificado como opióide e atua, centralmente, em receptores kappa (GIORGI et al., 1993; PICOLO et al., 1998; BRIGATTE et al., 2001) e, periféricamente, em receptores kappa e delta (PICOLO et al., 2000; PICOLO et al., 2003; PICOLO & CURY, 2004). Os ensaios pré-clínicos provaram que a crotalfina produz analgesia potente e prolongada

em roedores, sem efeitos colaterais marcantes (GIORGI et al., 1993; PICOLO et al., 1998; PICOLO et al., 2000; BRIGATTE et al., 2001; PICOLO & CURY, 2004; NUNES et al., 2007), trazendo assim a perspectiva positiva quanto ao uso desse analgésico em animais e, também, no ser humano.

REVISÃO DE LITERATURA

A dor pode comprometer a homeostase e gerar alterações adaptativas autonômicas, endócrinas e comportamentais (DANNEMAN, 1997) e, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial” (LEMONICA & PEREIRA, 1992). Na experimentação animal, sugere-se a substituição dos termos dor e analgesia por nocicepção e antinocicepção, respectivamente (JONES, 1992; PARADA et al., 2003). PARADA et al. (2003) e CUNHA et al. (2004) propõem o termo hipernocicepção para referir, indistintamente, os fenômenos de alteração da sensibilidade (alodinia, hiperalgisia primária ou secundária).

Os nociceptores captam estímulos nocivos e os traduzem em potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras A-delta e C até os corpos celulares no gânglio da raiz dorsal, penetrando o sistema nervoso central pelo corno dorsal da medula espinhal, onde o impulso é modulado antes de alcançar os tratos espinotalâmico, espinorreticular e espinomesencefálico, responsáveis por levar a informação nociceptiva ao córtex cerebral, onde o impulso é reconhecido como doloroso (LEMONICA & PEREIRA, 1992; BESTER et al., 1995; FINE & ASHBURN, 1998; KINGDON et al., 1998; MILLAN, 1999).

Uma classe de fármacos amplamente utilizada no tratamento da dor é a dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), pois estes possuem ação analgésica, além dos efeitos antiinflamatório e antipirético (MITTEN & HINCHCLIFF, 1997; RANG et al., 2004b). Embora os opióides sejam os analgésicos de primeira escolha no alívio da dor inflamatória, os AINEs são utilizados em estágios mais tardios da dor aguda, como na dor pós-operatória, e no tratamento de dor crônica. Ao reduzir a síntese de prostaglandinas, os AINEs promovem analgesia de duas formas: periféricamente (forma clássica), pois a redução da síntese de prostaglandinas minimiza a sensibilização dos nociceptores polimodais aos mediadores inflamatórios como a bradicinina e histamina; centralmente, visto que alguns AINEs atuam na modulação inibitória da dor quando o fármaco é administrado de forma preventiva (ESTES & KAPLAN, 1980; MATHER &

GLYNN, 1982; FERREIRA, 1983; TAIWO & LEVINE, 1988; DENSON & KATZ, 1992; MITTEN & HINCHCLIFF, 1997; RANG et al., 2004b).

Dentre os AINEs usados na Medicina Veterinária, a fenilbutazona se destaca como um princípio ativo amplamente adotado no tratamento da resposta inflamatória durante o período pós-operatório de eqüinos (MAY, 1992; COLAHAN et al., 1999). A fenilbutazona é um derivado da pirazolona extremamente efetivo como antiinflamatório e analgésico que além de inibir a síntese de prostaglandina também interfere na forforilação oxidativa inibindo a biossíntese ATP-dependente de sulfato de mucopolissacarídeo nas cartilagens. A fenilbutazona exerce ação uricosúrica moderada pela redução da reabsorção tubular do ácido úrico (DENSON & KATZ, 1992).

Outra classe de fármacos utilizada na terapia anti-álgica é a dos opióides (SAMMARCO et al., 1996; PASCOE & TAYLOR, 2003), que interagem principalmente com receptores opióides mu, kappa e delta (GAVERIAUX-RUFF & KIEFFER, 1999). Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na ação analgésica dos opióides, dentre eles a abertura de canais de potássio, com conseqüente hiperpolarização da membrana celular e/ou a inibição do sistema de adenilato ciclase, diminuindo a produção de AMPc, o que impede a abertura dos canais de cálcio (SCHULTZ & GROSS, 2001). A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão do impulso nervoso (DICKENSON & SULLIVAN, 1987).

Os receptores opióides estão distribuídos por todo o sistema nervoso central e geram analgesia espinhal e supra-espinhal (THURMON et al., 1996; FINE & ASHBURN, 1998). Quanto à distribuição espinhal, os receptores mu localizam-se por toda a medula, enquanto os receptores kappa e delta estão restritos aos segmentos lombo-sacro e cervical, respectivamente (CHRUBASIK et al., 1993; SINATRA, 1993). A partir de 1980, foi admitida a presença de opióides endógenos e de receptores opióides em tecidos periféricos, sugerindo que peptídeos opióides endógenos regulem processos fisiológicos (NORTH & EGAN, 1983; WITTERT et al., 1996).

A morfina é o agonista padrão de receptores mu cujo principal efeito farmacológico é a analgesia. Todavia, após administração intravenosa em eqüinos

podem ocorrer efeitos colaterais como aumento da frequência cardíaca, das pressões arterial e venosa central e da atividade locomotora; depressão respiratória e redução da temperatura corporal; tremores, sudorese e rigidez da marcha (COMBIE et al., 1979; MUIR III, 1991; THURMON et al., 1996; MUIR et al., 2001). A dose terapêutica de morfina para eqüinos varia de 0,04 a 0,1mg/kg (MUIR III, 1991; TAYLOR & CLARKE, 1999), porém o conceito de que o uso de opióides cause efeitos adversos, particularmente sobre o sistema respiratório e locomotor (KAMERLING et al., 1985; PASCOE et al., 1991), tem desencorajado o uso isolado dos agonistas mu em eqüinos (TAYLOR et al., 2002).

A estimulação locomotora decorrente da administração de opióides agonistas mu tem sido estudada em camundongos e ratos e está associada com o aumento de atividade dopaminérgica (DI CHIARA & IMPERATO, 1988). TOBIN (1978) relatou que as alterações comportamentais induzidas pelos opióides nos eqüinos, como aumento da atividade locomotora e do número de bocejos, foram similares ao que se observa em ratos e podem decorrer da liberação extracelular de dopamina causada pelos agonistas opióides mu. Tais alterações de comportamento podem ser revertidas com antagonistas dopaminérgicos (MORELLI et al. 1989) como, por exemplo, a acepromazina que é um antagonista de receptores dopaminérgicos D1 e D2 (TOBIN, 1978).

Assim, os opióides devem ser encarados como importantes aliados no combate aos estados nociceptivos. Embora alguns efeitos colaterais desencorajem o uso isolado desses fármacos em eqüinos (TAYLOR et al., 2002), é preciso rever esse conceito pois é óbvia a vantagem do uso de opióides livres dos efeitos adversos para melhorar o bem-estar animal (PASCOE & TAYLOR, 2003). Os conhecimentos já adquiridos de farmacologia clínica permitem selecionar o opióide melhor indicado para que se obtenha analgesia máxima e efeitos colaterais mínimos. Essa relação custo-benefício se torna mais efetiva com o avanço das pesquisas que identificam receptores, subtipos de receptores e suas ações, esclarecendo a interação opióide-receptor e levando à síntese de novos opióides (DUARTE, 2005). O entendimento mais adequado dessa classe farmacológica permite que clínicos e pacientes usufruam as vantagens terapêuticas dos opióides (DAUDT et al., 1998; RANG et al., 2004a).

Dessa forma, buscando associar a analgesia potente dos opióides à menor incidência de efeitos colaterais, particularmente sobre o sistema respiratório e locomotor, várias pesquisas foram realizadas com agonistas de receptores opióides kappa (KAMERLING et al., 1986; KAMERLING et al., 1988; MUIR III, 1991; MAMA et al., 1992; PASCOE, 2002), dentre eles o U50-488 que é considerado o protótipo dos agonistas deste tipo de receptor (DHAWAN et al., 1989; RANG et al., 2004a). O U50-488H não promove alterações na atividade locomotora de camundongos (KUZMIN et al., 2000) e ratos (BECHARA & VAN DER KOOY, 1987; SHIPPENBERG et al., 1988) e, utilizando-se a dose de 160µg/kg em eqüinos induz analgesia potente com efeitos colaterais autonômicos e comportamentais discretos (KAMERLING et al., 1988).

A analgesia promovida por venenos e/ou toxinas animais já foi objeto de diversos estudos (PICOLO, 2003) e Vital Brazil na primeira metade do século XX já relatava que vítimas de acidentes crotálicos não apresentavam reação inflamatória significativa no local da picada e ainda referiam analgesia na área afetada (SOUSA E SILVA et al., 1996). Posteriormente, ficou evidente que o veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* possuía ação analgésica (PICOLO, 2003), além da atividade neurotóxica, miotóxica, coagulante (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003), antiinflamatória (SAMPAIO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005; SAMPAIO et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; NUNES et al., 2007), imunogênica e imunossupressora (RANGEL-SANTOS & MOTA, 2000).

A administração de dose não letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos não libera prostaglandinas, não modifica a expressão protéica de COX₁ e não induz a expressão de COX₂ por até 24 horas (MOREIRA et al., 2007), sinais de efeito antiinflamatório mediados pela citocina antiinflamatória IL-10 (FIORENTINO et al., 1991; WAAL MALEFYT et al., 1991). Ademais, eleva o nível plasmático de glicocorticóides por meio da estimulação do eixo adrenal-hipófise-hipotálamo (CHISARI et al., 1998).

O efeito antinociceptivo promovido pelo veneno de cascavel em ratos já foi objeto de diversos estudos. Utilizando-se o modelo da placa quente verificou-se que a ação antinociceptiva prolongou-se por até cinco dias (BRIGATTE et al., 2001). No teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (GIORGI et al., 1993) e no

teste da hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina observou-se que a antinocicepção é mediada por receptores kappa e delta (PICOLO et al., 2000; PICOLO & CURY, 2004). Pelo modelo de hiperalgesia induzida por carragenina na pata de ratos, notou-se que uma dose preventiva do veneno produziu efeito antinociceptivo (PICOLO et al., 1998) e antiinflamatório por até sete dias e inibiu a migração celular por até 21 dias (NUNES et al., 2007). O veneno crotálico também apresentou ação antinociceptiva potente por até três dias em modelos de dor persistente, como na dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo ciático (GUTIERREZ, 2005) e de dor oncológica induzida experimentalmente (BRIGATTE et al., 2004).

Recentemente, o fator analgésico presente no veneno bruto foi isolado, sua estrutura química foi caracterizada e denominada de ENPAK (*Endogenous Pain Killer*) e o uso deste fator antinociceptivo em ratos ou camundongos induziu antinocicepção de origem central e periférica. Centralmente, este efeito é mediado em centros supra-espinhais do sistema nervoso central (GIORGI et al., 1993; PICOLO et al., 1998) com participação de receptores opióides (GIORGI et al., 1993) do tipo kappa (BRIGATTE et al., 2001). Periféricamente, envolve a participação de receptores opióides periféricos dos tipos kappa e delta e também da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc e dos canais de K⁺ sensíveis a ATP (PICOLO et al., 2000; PICOLO et al., 2003; PICOLO & CURY, 2004). Por atuar em mais de um receptor, o veneno crotálico não é um agonista opióide específico (BRIGATTE et al., 2001).

A estrutura química do fator analgésico foi caracterizada por pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, sob a coordenação da Doutora Yara Cury, em colaboração com o Centro de Toxicologia Aplicada. Em 2003, obteve-se por síntese o fator analgésico denominado CNF021.03, que se mostrou tão eficaz quanto o ENPAK. Atualmente, o fator sintético CNF021.03 é denominado crotalfina. O pedido de patente referente à obtenção, uso destes fatores e das formulações foi depositado, em 2004, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, PI nº 0401702-1) e, internacionalmente, via Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT). O desenvolvimento deste fármaco está sob a responsabilidade do COINFAR (Consórcio das Indústrias Farmacêuticas), que detém o licenciamento do produto.

O estudo da dor encontra dificuldades quanto aos modelos a serem empregados na produção da nocicepção e em sua avaliação, pois embora existam inúmeras alternativas, nenhuma delas pode ser aplicada incondicionalmente a qualquer situação e é necessário fazer a opção conforme o objetivo de cada estudo.

O modelo incisional de dor inflamatória já foi utilizado previamente em diversos estudos que avaliaram com sucesso o efeito antinociceptivo de fármacos administrados em eqüinos (OLESKOVICZ, 2001; RÉDUA et al., 2002; MORAES, 2003). Admite-se que a incisão cutânea promova dor aguda e induza hiperalgesia mecânica ao redor da ferida (TVERSKOY et al., 1994), semelhante à situação encontrada no período pós-cirúrgico em pacientes humanos (CHIARI & EISENACH, 1999). O emprego deste modelo, em ratos, provou ser reprodutível e quantificar eficientemente a alodinia mecânica pós-incisional (BRENNAN et al., 1996).

A estimulação mecânica pelos filamentos de von Frey é um método não invasivo utilizado para avaliar o tratamento da dor inflamatória, no qual filamentos de náilon de mesmo tamanho e calibres diferentes, presos a um bastão de acrílico, são aplicados ao redor do tecido lesionado. Inicia-se o teste com o filamento de menor diâmetro e, troca-se, seqüencialmente, pelos filamentos mais calibrosos. O limiar de dor é calculado a partir do filamento de maior diâmetro ainda incapaz de produzir desconforto no paciente (PEDERSEN et al., 1998). Este método já foi utilizado com sucesso em eqüinos (OLESKOVICZ, 2001; RÉDUA et al., 2002; MORAES, 2003; GUIRRO, 2005). Outra técnica descrita para aferir a ação antinociceptiva de determinado fármaco, em eqüinos, é a lâmpada que emite feixe de luz artificial que atinge 140°C, portanto capaz de estabelecer a latência da resposta aversiva frente à estimulação térmica potencialmente nociva (PIPPI, 1979; PIPPI & LUMB, 1979; MENDES, 2004).

Dessa forma, foram realizados três experimentos distintos para se avaliar os efeitos comportamental, clínico e antinociceptivo promovidos pela injeção intravenosa de dose única de crotalina em eqüinos.

OBJETIVOS

A. Geral

Avaliar os efeitos comportamental, clínico e antinociceptivo promovidos pela injeção intravenosa de crotalfina em eqüinos.

B. Específicos

- Avaliar o efeito comportamental promovido pela administração intravenosa de dose única de crotalfina, por meio da determinação da atividade locomotora espontânea, porcentagem de animais que urinaram e/ou defecaram e demais alterações comportamentais, em comparação com U50-488H ou NaCl 0,9%;
- Avaliar os efeitos clínicos induzidos pela injeção intravenosa de dose única de crotalfina, comparando-os com os efeitos da morfina, U50-488H, fenibutazona ou NaCl 0,9%;
- Avaliar, em pele íntegra, os efeitos antinociceptivos induzidos pela injeção intravenosa de dose única de crotalfina,, comparando-os com morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%;
- Avaliar, em pele submetida a modelo incisional de dor inflamatória, os efeitos antinociceptivos induzidos pela injeção intravenosa de dose única de crotalfina,, comparando-os com morfina, U50-488H ou fenilbutazona.

HIPÓTESE

Acredita-se que a crotalfina seja capaz de promover efeito antinociceptivo, em eqüinos, todavia não se sabe se tal princípio ativo produz alterações comportamentais e/ou clínicas.

JUSTIFICATIVA

O bem-estar animal é um tema atual na Medicina Veterinária e, neste contexto, se insere a minimização da dor, sensação capaz de desequilibrar a homeostase e que dificulta a realização de procedimentos terapêuticos, especialmente com grandes animais. Os opióides promovem excelente analgesia, por vezes acompanhada de efeitos colaterais. Contudo, estudos mostram que alguns agonistas de receptores opióides kappa produzem efeito antinociceptivo acompanhada por efeitos colaterais mínimos. Neste contexto, a crotalfina apresenta importante ação antinociceptiva em diferentes modelos experimentais que utilizaram roedores. Este fármaco ainda requer avaliação dos efeitos comportamental, clínico e antinociceptivo, em eqüinos, espécie extremamente susceptível às diversas formas de estimulação nociceptiva. Além disso, pesquisas veterinárias poderão auxiliar estudos futuros sobre o uso deste novo princípio ativo em humanos.

EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE DIFERENTES DOSES DE CROTALFINA EM EQUÍNOS: COMPARAÇÃO COM U50-488H

MATERIAL E MÉTODOS

A. Comitê de Ética e Bem-estar dos Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista e recebeu o protocolo número 009974-05.

B. Animais

Foram selecionados 18 equínos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) após exame clínico, hemograma completo e proteína total, sendo nove machos castrados e nove fêmeas não prenhes e fora do período de estro, de quatro a seis anos de idade, com $377 \pm 27\text{kg}$, pertencentes ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP. Durante o estudo, os animais foram mantidos no Setor de Eqüideocultura - FCAV – UNESP, em piquetes de *tifton*, receberam feno de *coast-cross*, arraçoamento individual à base de milho, soja, farelo de trigo e premix mineral e vitamínico (3kg/animal/dia), além de acesso irrestrito ao sal mineral e à água.

Trinta dias antes do início do experimento, os animais foram vermifugados com ivermectina¹ (50µg/kg, im), vacinados contra encefalomielite, tétano e influenza² e iniciou-se o manejo diário a fim de adaptar os cavalos à rotina experimental. Os animais foram pesados na véspera de cada ensaio experimental.

C. Delineamento Experimental

¹ Ivomec®, Merial, Campinas, São Paulo, Brasil

² Fluvac Innovator EWT®, Fort Dodge, Campinas, São Paulo, Brasil

C.1. Estudo Piloto

Após a seleção dos animais, foi possível iniciar a administração intravenosa de crotalfina³ a fim de se avaliar a ocorrência de alterações comportamentais que inviabilizassem a continuidade do estudo.

A dose inicial calculada (1,4ng/kg) foi obtida a partir da extrapolação alométrica (PACHALY & BRITO, 2001) da dose de crotalfina utilizada em ratos de ± 200 g e, então, estabeleceu-se o escalonamento de doses para 2,2 e 3,8ng/kg para os ensaios comportamentais.

C.2. Estudo Comportamental

O estudo foi conduzido de modo aleatório e cego, ou seja, os animais foram distribuídos ao acaso entre os grupos experimentais e o avaliador não teve conhecimento do fármaco e da dose administrada.

Após ser pesado, cada animal foi levado à baia comportamental a partir das 17:00h da véspera do experimento. No dia seguinte, retirou-se o feno às 7:30h, a pele sobre a veia jugular esquerda foi tricotomizada e inseriu-se o cateter nesta veia a fim de facilitar a administração dos fármacos, sendo que o cateter foi mantido com solução heparinizada⁴ (10UI/mL). Às 8:00h, os aparelhos foram ligados para mensuração da atividade locomotora espontânea (ALE) basal, durante 60 minutos. Às 9:00h, os fármacos foram administrados no denominado tempo zero (T0) e a ALE foi mensurada durante 6 horas (T360). Para reduzir possíveis interferências comportamentais, após cada ensaio as baias foram lavadas antes da entrada do próximo animal.

Seguindo a metodologia proposta por COMBIE et al. (1979) e utilizada por KAMERLING et al. (1988) para avaliar a ALE e verificar a estimulação promovida sobre o sistema locomotor de eqüinos, no presente estudo foram utilizadas duas baias experimentais (4x4m) climatizadas, pertencentes ao Departamento de Morfologia e

³ Crotalfina, gentilmente doada pelo COINFAR, São Paulo, São Paulo, Brasil

⁴ Heparin®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil

Fisiologia Animal da FCAV - UNESP, cada uma dotada de quatro pares de sensores fotoelétricos⁵ fixados a 45cm de altura em relação ao piso. Tais sensores encontravam-se dispostos nas quatro paredes de cada baia, de modo que em cada parede haviam dois sensores em posição eqüidistante, direcionados ao outro par diametralmente oposto, assumindo o esquema de “jogo da velha” (Figura 1). Nesta metodologia, cada vez que um feixe de raio infravermelho é interrompido por um membro do cavalo, é gerado um pulso que é armazenado por um programa de computador⁶, em intervalos de 5 minutos (QUEIROZ-NETO, 1997; QUEIROZ-NETO et al. 2001; CHRISTOVÃO, 2002; QUEIROZ-NETO et al., 2002; ZAMUR, 2002). O computador utilizado encontra-se numa sala própria, entre as duas baias comportamentais e, neste recindo, ainda haviam duas pequenas janelas de vidros escuros que permitem a observação dos animais no interior das baias.

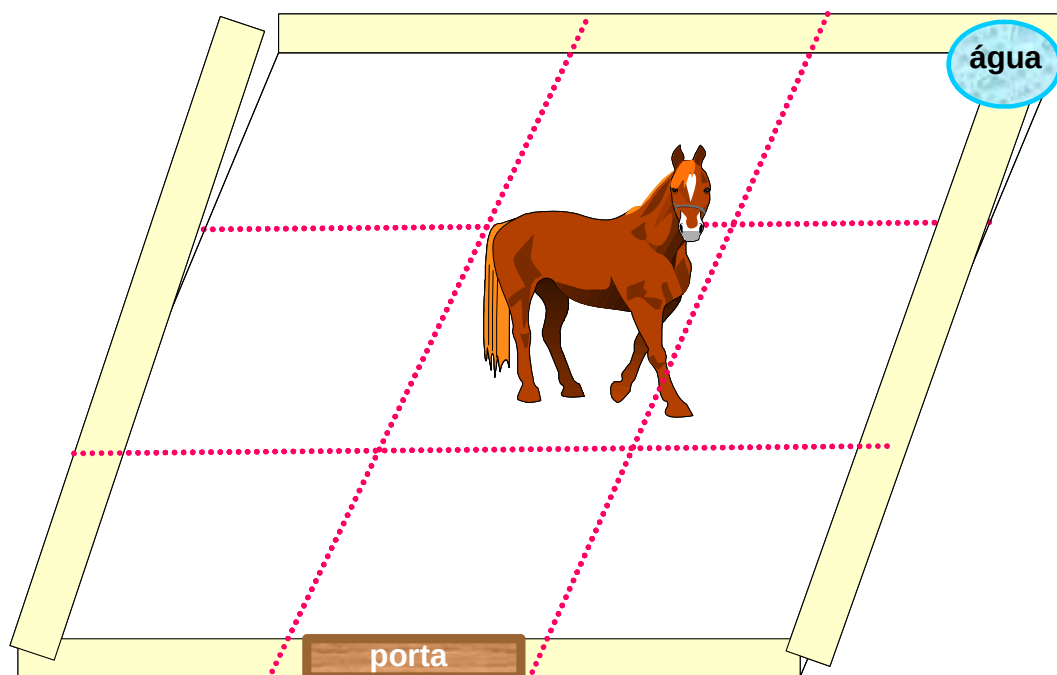


Figura 1 – Desenho esquemático da disposição dos sensores no interior da baia comportamental instalada no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – FCAV - UNESP.

⁵ Slot Sensors®, Banner Engineering Corporation, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos

⁶ Data Logger®, Campbell Scientific Inc., Logan, Utah, Estados Unidos

Este estudo foi conduzido sob condições de climatização para reduzir possíveis interferências decorrentes de variação térmica acentuada. Para tanto, os aparelhos de ar-condicionado foram mantidos ligados durante os ensaios experimentais para que a temperatura ambiente fosse controlada entre 18°C e 22°C. Os valores de temperatura e de umidade relativa foram mensurados por meio do uso de termo-higrômetros colocados no interior das baias.

Considerando a existência de duas baias comportamentais, o estudo foi desenvolvido com dois animais por dia, sendo que a ordem dos ensaios e dos animais foi estabelecida aleatoriamente (Apêndice A). No total haviam 18 eqüinos e, no delineamento proposto, seriam necessários 30 ensaios. Dessa forma, alguns animais foram utilizados mais de uma vez. A fim de reduzir possíveis interferências externas, decidiu-se impor as seguintes restrições: não utilizar, no mesmo dia, animais do mesmo sexo e animais do mesmo grupo e, também, de não alojar na mesma baia, em dias subseqüentes, animais do mesmo sexo. Ao término de cada ensaio experimental, as baias foram lavadas antes da introdução do próximo eqüino.

Os eqüinos foram submetidos aos seguintes tratamentos, sabendo-se que todas as injeções foram realizadas pela via intravenosa e o volume final ajustado em 5mL:

- GC (grupo controle, n=6) – 5mL de NaCl 0,9%
- GCROa (grupo crotalfina, dose a, n=6) - 1,4ng/kg de crotalfina
- GCROb (grupo crotalfina, dose b, n=6) - 2,2ng/kg de crotalfina
- GCROc (grupo crotalfina, dose c, n=6) - 3,8ng/kg de crotalfina
- GK (grupo agonista kappa U50-488H, n=6) - 160µg/kg de U50-488H⁷

Verificou-se, por grupo experimental, a porcentagem de animais que urinaram e/ou defecaram durante as seis horas de avaliação nas baias comportamentais. Na primeira hora, os animais foram continuamente observados e quaisquer alterações comportamentais ocorridas foram anotadas. Optou-se por não permanecer mais tempo ao lado das baias dos animais devido à possível interferência nos resultados da ALE.

⁷ U50-488H®, Sigma Aldrich do Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil

D. Análise Estatística

Os dados de ALE foram submetidos ao teste ANOVA de uma via com repetições múltiplas seguida do teste de Dunnett na avaliação entre tempos e ao teste ANOVA de uma via para verificar a existência de diferenças entre grupos. A porcentagem de animais que urinaram e/ou defecaram foi analisada estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis. Considerou-se o nível de significância $p < 0,05$ em todos os casos. As alterações comportamentais ocorridas na primeira hora de observação foram apenas descritas. Utilizaram-se programas computacionais para realização dos testes estatísticos⁸ e dos gráficos⁹. Para facilitar a visualização do gráfico, o erro padrão foi representado somente na tabela.

⁸ SigmaStat for Windows® Version 3.0.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos

⁹ SigmaPlot 2000 for Windows® Version 6.00, SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de temperatura e umidade relativa medidos no interior das baias durante a avaliação comportamental não oscilaram significativamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Temperatura (T°) e umidade relativa (UR) (média ± desvio padrão) mensuradas no interior das baias no início e no final da avaliação comportamental dos eqüinos PSA tratados com NaCl 0,9%, crotalfina ou U50-488H:

	8:00h		15:00h	
	T (°C)	UR (%)	T (°C)	UR (%)
Mínima	18,8 ± 1	44,8 ± 4	19,0 ± 1	46,3 ± 6
Média	19,5 ± 1	60,9 ± 5	20,3 ± 1	53,7 ± 10
Máxima	21,5 ± 2	68,0 ± 2	21,7 ± 1	67,3 ± 2

A observação direta na baia comportamental permite analisar não somente a atividade geral, mas também as alterações de comportamento. Diversos fatores, entre eles os fármacos, podem eliciar mudanças comportamentais causando diminuição ou aumento da atividade. Sabe-se que os agonistas de receptores opióides do tipo mu aumentam a atividade locomotora espontânea em algumas espécies, dentre elas a eqüina (KAMERLING et al., 1985; PASCOE et al., 1991), por induzir a liberação extracelular de dopamina pelo núcleo accumbens e corpo estriato (SPANAGEL, 1995), que está diretamente associada à euforia e estereotipia (MAMA et al., 1992). Por sua vez, os agonistas de receptores kappa, como o U50-488H, reduzem a liberação extracelular de dopamina no núcleo accumbens de ratos (DI CHIARA & IMPERATO, 1988; MANSOUR et al., 1995; DUKE et al., 1997; PAN, 1998). Esses relatos sustentam os resultados obtidos no presente estudo quanto à atividade locomotora espontânea, pois entre grupos não houve diferença significativa e, entre tempos, ocorreu redução da ALE apenas em T30 e T40 no grupo tratado com 2,2ng/kg de crotalfina, conforme exibem a Tabela 2 e a Figura 2. Esses achados corroboram com estudos anteriores que relatam manutenção da atividade locomotora de eqüinos tratados com opióides agonistas de receptores kappa (KAMERLING et al., 1986; KAMERLING et al., 1988; MUIR III, 1991), incluindo o U50-488H (BECHARA & VAN DER KOOY, 1987; SHIPPENBERG et al., 1988; KUZMIN et al., 2000; RANG et al., 2004a). Sabe-se que a

maior seletividade para receptores opióides kappa favorece a analgesia isenta de alterações na atividade locomotora (KAMERLING et al., 1988).

Tabela 2 – Perfil da atividade locomotora espontânea, em pulsos (média $\pm$ desvio padrão) dos equinos PSA submetidos aos grupos GC (NaCl 0,9%), GCROa (1,4ng/kg crotalfina), GCROb (2,2ng/kg crotalfina), GCROc (3,8ng/kg crotalfina) ou GK (160 μ g/kg U50-488H).

Tempo (min)	GC	GCROa	GCROb	GCROc	GK
T0	19 $\pm$ 0	19 $\pm$ 0	19 $\pm$ 0	19 $\pm$ 0	19 $\pm$ 0
T10	42 $\pm$ 11	35 $\pm$ 9	32 $\pm$ 11	47 $\pm$ 9	31 $\pm$ 5
T20	17 $\pm$ 10	24 $\pm$ 8	16 $\pm$ 13	38 $\pm$ 12	20 $\pm$ 2
T30	11 $\pm$ 8	15 $\pm$ 8	1 $\pm$ 1 *	21 $\pm$ 9	22 $\pm$ 5
T40	11 $\pm$ 10	14 $\pm$ 6	2 $\pm$ 1 *	15 $\pm$ 11	22 $\pm$ 8
T50	3 $\pm$ 2	11 $\pm$ 5	3 $\pm$ 1	12 $\pm$ 8	11 $\pm$ 5
T60	3 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	23 $\pm$ 9	16 $\pm$ 7
T90	28 $\pm$ 15	47 $\pm$ 24	32 $\pm$ 28	78 $\pm$ 35	15 $\pm$ 5
T120	33 $\pm$ 16	38 $\pm$ 22	7 $\pm$ 3	27 $\pm$ 15	61 $\pm$ 25
T150	51 $\pm$ 35	33 $\pm$ 16	9 $\pm$ 4	82 $\pm$ 23	72 $\pm$ 21
T180	65 $\pm$ 48	52 $\pm$ 32	32 $\pm$ 17	43 $\pm$ 23	72 $\pm$ 26
T210	37 $\pm$ 21	63 $\pm$ 35	11 $\pm$ 3	61 $\pm$ 23	43 $\pm$ 19
T240	41 $\pm$ 24	50 $\pm$ 30	11 $\pm$ 5	122 $\pm$ 46	54 $\pm$ 26
T270	42 $\pm$ 26	73 $\pm$ 37	46 $\pm$ 20	111 $\pm$ 50	52 $\pm$ 21
T300	42 $\pm$ 13	45 $\pm$ 27	86 $\pm$ 43	48 $\pm$ 24	39 $\pm$ 23
T330	60 $\pm$ 32	61 $\pm$ 33	58 $\pm$ 30	72 $\pm$ 34	50 $\pm$ 20
T360	36 $\pm$ 24	42 $\pm$ 28	53 $\pm$ 24	47 $\pm$ 23	72 $\pm$ 29

* diferente de T0 (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, com $p < 0,05$)

Alguns estudos sugerem que exista uma subdivisão nos receptores kappa (κ_1 e κ_2) ou, mais provavelmente, ação bifásica correspondente a diferentes estágios de afinidade no mesmo receptor, conforme a ligação com a proteína G (CLARK et al., 1989; RICHARDSON et al., 1992; HORAN et al., 1993). Em ratos foi comprovado o efeito dose-dependente do U50-488H sobre a atividade locomotora, visto que doses subalgésicas de U50-488H podem estimular a atividade locomotora, enquanto que doses analgésicas reduzem esse efeito (KUZMIN et al., 2000). Esta diferença de resposta conforme a dose de U50-488H empregada não foi verificada, pois utilizou-se a dose de 160 μ g/kg de U50-488H já descrita por KAMERLING et al. (1988) como incapaz de produzir alterações comportamentais severas. Entretanto, entre T30 e T60 os cinco grupos exibiram tendência à redução da ALE, mesmo que estatisticamente não significativa, sendo que o grupo tratado com 2,2ng/kg de crotalfina sofreu diminuição

mais marcante. Esse comportamento pode estar relacionado à diferença de resposta conforme a dose empregada do agonista kappa.

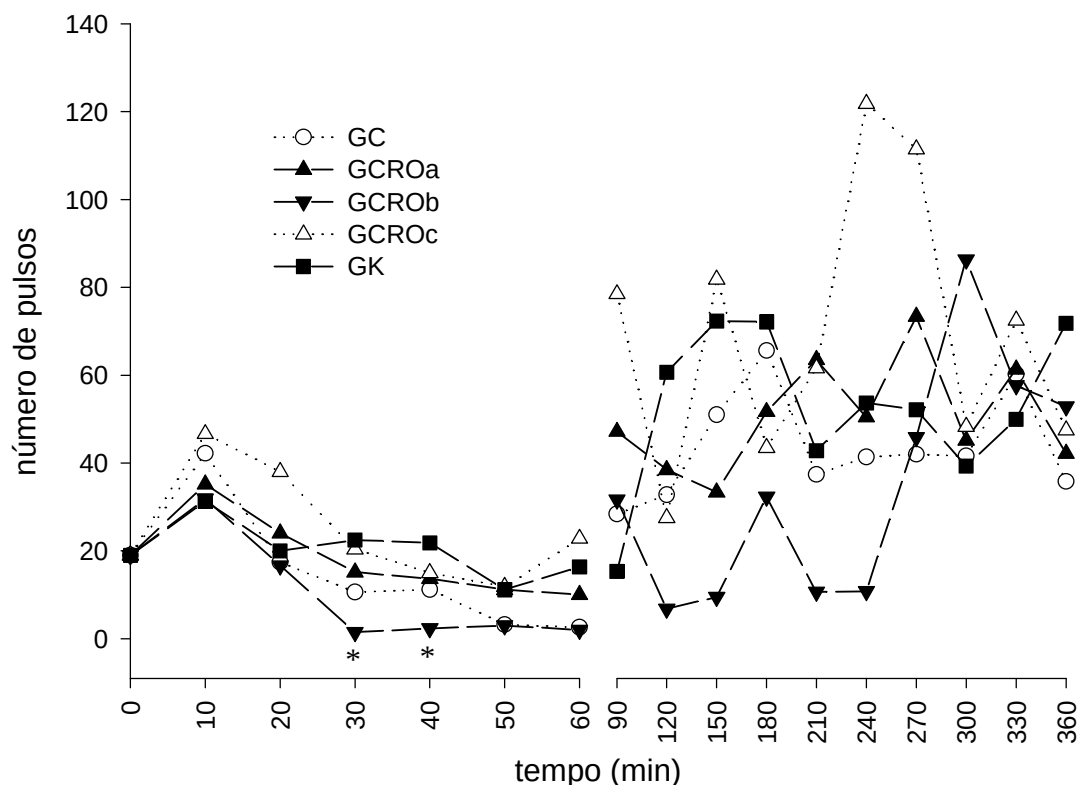


Figura 2 - Perfil da atividade locomotora espontânea (média) dos equinos PSA submetidos aos grupos GC (NaCl 0,9%), GCROa (1,4ng/kg crotalfina), GCROb (2,2ng/kg crotalfina), GCROc (3,8ng/kg crotalfina) ou GK (160µg/kg U50-488H).

* diferente de T0 (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$))

As alterações comportamentais observadas na 1ª hora após a administração dos fármacos não foram severas e, portanto, não comprometeram a continuidade do estudo, como exibe a Tabela 3. Houve semelhança entre as alterações decorrentes do uso de crotalfina e de U50-488H, pois ambos ativam os receptores kappa e, portanto, torna-se lógico que a crotalfina promova alterações comportamentais mínimas possivelmente porque minimiza a liberação de dopamina, visto que KAMERLING et al. (1988) fizeram essas considerações para o U50-488H. Em linhas gerais, os animais mantiveram-se calmos, pois os agonistas de receptores kappa causam mais sedação

que excitação (KAMERLING et al., 1988). A ocorrência de bocejos após a administração intravenosa de U50-488H já foi observada, mas seu significado ainda não foi elucidado (KAMERLING et al., 1989).

Tabela 3 - Alterações comportamentais observadas na primeira hora após a administração intravenosa de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO) ou U50-488H (GK), em eqüinos PSA:

Tempo (min)	GC (NaCl 0,9%)	GCROa (1,4ng/Kg)	GCROb (2,2ng/Kg)	GCROc (3,8ng/Kg)	GK (160 µg/kg)
0 – 5	A, C, M	A, C, M	A, B, C, M, R	A, M	A, B, M, S, X
6 – 10	C, M, X	C, M, P, X, Y	A, B, C, F, M, P, X	C, F, M, P, R, X, Y	B, C, F, M, X, Y
11 – 15	C, P	C, M, Y	A, B, C, F, M, P, X,	M, P, X, Y	C, L, M, X
16 – 20	C	B, C, F, M, Y	C, F, M, P	C, M, X, Y	B, C, F, M, Y
21- 25	C, M, X	C, M	B, C, F, M, P	C, X	C, M
26 – 30	C, P	C, M	B, C, F, M	A, C, F, X	C, F, M, R
31 – 35	B, C, M, P	C, M, X	B, C, M, P	A, C, F	A, C, F, X, M
36 – 40	C, P	C, M	C, F, M	A, C, X	A, F, M, R, X
41 – 45	C, M, Y	C, M	C, M	A, C, M, X	C, X
46 – 50	C	B, C, M	B, C, M, P	A, C, F	C, L, M, Y
51 – 55	C	C, M	C, F, M, P, X	C, M	A, C, M
56 – 60	C, M, Y	C, M	C	C	C, M, X

Sendo: A – andar compulsivo; B - balançar a cabeça; C – calma; F - olhar para o flanco; L - exposição da língua; M – mastigação; P - ptose da cabeça; R – relincho; S – salivação; X – bocejo; Y - atenção aos ruídos.

Os sinais de estereotipia como balançar a cabeça, mastigar e bocejar foram observados nos eqüinos tratados com crotalfina ou U50-488H, mas nota-se que os dois primeiros sinais foram mais freqüentes nos animais tratados com 1,4ng/kg e principalmente 2,2ng/kg de crotalfina, enquanto que o bocejo foi mais freqüente nos cavalos que receberam 3,8ng/kg de crotalfina. Essa distinção é importante e acredita-se que decorra dos fatores dose empregada e subpopulação de receptores dopaminérgicos ativado. Ademais, talvez doses diferentes possam causar efeitos distintos nos receptores dopaminérgicos D1 e D2. KUZMIN et al. (2000) relataram que os efeitos do U50-488H em ratos são dose-dependentes e, então, isso poderia explicar os diferentes sinais de estereotipia apresentados conforme a dose utilizada. Embora esteja claro que os receptores kappa inibam a liberação de dopamina no núcleo accumbens e corpo estriato (DI CHIARA & IMPERATO, 1988; MANSOUR et al., 1995; DUKE et al., 1997), já foi verificado que a administração de U50-488H em ratos inibe as

alterações comportamentais induzidas pela ativação de D1 e aumenta a catalepsia resultante do antagonismo de D1, mas apenas reduz as estereotipias induzidas pela ativação de D2 e não interfere na catalepsia induzida pelo antagonismo de D2 (MARIN et al., 1996). Desse modo, parece que a localização pré (D2) ou pós-sináptica (D1 e D2) dos receptores dopaminérgicos interfere na ação dos opióides kappa (PERREAULT et al., 2006). A interação entre opióides e receptores dopaminérgicos já foi amplamente investigada e nota-se que ratos tratados com bloqueadores dopaminérgicos podem desenvolver aumento da atividade geral em campo aberto e movimentação estereotipada induzida pela apomorfina (TARSY & BALDESSARINI, 1974; BERNARDI et al., 1981; VITAL et al., 1997), resultantes do aumento da expressão e da sensibilidade de receptores D2 (VITAL et al., 1995). Nesse caso, ocorre perda de captação de dopamina pelas vesículas na terminação pré-sináptica, acarretando em aumento da concentração do agonista na fenda sináptica (TRENDELEMBURG, 1963; TRENDELEMBURG, 1966; LANGER & TRENDELEMBURG, 1968; PALERMO-NETO, 1982) e, portanto, são necessárias doses menores de apomorfina para produzir estereotipia em animais tratados com neurolépticos (GIANUTSOS et al., 1974).

Entre grupos, não houve diferença quanto à taxa de micção nas seis horas de avaliação após a administração dos fármacos, pois nenhum animal urinou, sugerindo que os fármacos não interferiram nesta variável, já que o grupo tratado com NaCl 0,9% apresentou a mesma resposta. Alguns estudos com ratos inferem aumento da diurese após a utilização de U50-488H (VONVOIGTLANDER et al., 1983; LEANDER et al., 1987; BORKOWSKI, 1989), mas o único estudo já feito com U50-488H em eqüinos também observou que este fármaco não alterou este parâmetro (KAMERLING et al., 1989). Dessa forma, talvez ocorra alguma diferença de resposta conforme a espécie animal. A crotalfina também não aumentou a micção e permaneceu semelhante ao observado no grupo controle, seguindo o mesmo padrão de resposta do U50-488H.

Quanto à taxa de defecação, também não se verificou diferença entre grupos. A porcentagem de animais que defecou foi de 67% no grupo controle, 83% nos três grupos tratados com crotalfina e de 50% no grupo tratado com U50-488H. A partir de um estudo com ratos verificou-se que os receptores μ estão envolvidos central e

periféricamente com analgesia, ação anti-secretória e redução da motilidade, enquanto que os receptores kappa regulam a analgesia e inibem a ação secretória em altas doses, mas não exercem nenhum efeito sobre o trânsito gastrointestinal, independente da administração ser central ou periférica (SMITH & CHANG, 1993). Estudos com eqüinos mostraram que a morfina reduz a motilidade progressiva do intestino delgado e do cólon, porém aumenta os movimentos de mescla e o tônus dos esfíncteres, ou seja, diminui o peristaltismo enquanto favorece o movimento segmentar e pendular, o que torna a morfina contra-indicada depois de cirurgias gastrintestinais (DUCHARME, 2003). Já o butorfanol, que é um opióide com ação predominante sobre os receptores kappa e é muito utilizado em cavalos, produz boa analgesia visceral, com menos efeitos adversos, visto que embora ocorra redução da motilidade do intestino delgado não se observam alterações cardiovasculares, o que torna este fármaco uma opção adequada para que se obtenha analgesia nos quadros de desconforto ou em cirurgias gastrintestinais em eqüinos (DUCHARME, 2003; GLEED, 2003). ROGER et al. (1994) apontam o U50-488H como fármaco de escolha no alívio da dor visceral nos quadros de cólica causados por hipomotilidade, já que este medicamento não prejudica o trânsito gastrointestinal como ocorre após o uso de opióides agonistas de receptores mu. Um estudo com cães mostrou que o U50-488H beneficia o esvaziamento gástrico (GUÉ et al. 1988). Considerando que a crotalfina é um fármaco opióide com ação em receptores kappa, possivelmente as mesmas observações já feitas para o U50-488H se apliquem à crotalfina e isso também justifique a semelhança observada entre os grupos que receberam tais fármacos.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que o uso de U50-488H (160µg/kg) ou de crotalfina (até 3,8ng/Kg) não causa alterações comportamentais severas e pouco interfere na atividade locomotora espontânea de eqüinos.

EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CROTALFINA EM EQÜINOS: COMPARAÇÃO COM MORFINA, U50-488H, FENILBUTAZONA OU NaCl 0,9%

MATERIAL E MÉTODOS

A. Comitê de Ética e Bem-estar dos Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista e recebeu o protocolo número 009974-05.

B. Animais

Foram selecionados 18 eqüinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) após exame clínico, hemograma completo e proteína total, sendo nove machos castrados e nove fêmeas não prenhes e fora do período de estro, de quatro a seis anos de idade, com 377 ± 27 kg, pertencentes ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP. Durante o estudo, os animais foram mantidos no Setor de Eqüideocultura - FCAV – UNESP, em piquetes de *tifton*, receberam feno de *coast-cross*, arraçoamento individual à base de milho, soja, farelo de trigo e premix mineral e vitamínico (3kg/animal/dia), além de acesso irrestrito ao sal mineral e à água.

Trinta dias antes do início do experimento, os animais foram vermifugados com ivermectina (50µg/kg, im), vacinados contra encefalomielite, tétano e influenza e iniciou-se o manejo diário a fim de adaptar os cavalos à rotina experimental. Na véspera de cada ensaio experimental, os animais foram pesados.

C. Delineamento Experimental

As alterações circadianas foram minimizadas com a padronização da hora do início do experimento (8:00h), quando os animais foram colocados em tronco de

contenção para eqüinos. Realizado repouso por 30min, os eqüinos foram submetidos a duas avaliações clínicas basais (T-20 e T-10) e, em T0, realizou-se a injeção intravenosa dos fármacos, conforme o grupo experimental:

- GC (grupo controle, n=6) – 5mL de NaCl 0,9%
- GCRO (grupo crotalina, n=6) - 3,8ng/kg de crotalina
- GM (grupo agonista mu morfina, n=6) - 0,1mg/kg de morfina¹⁰
- GK (grupo agonista kappa U50-488H, n=6) - 160µg/kg de U50-488H
- GF (grupo antiinflamatório não-esteroidal fenilbutazona, n=6) - 4,4mg/kg de fenilbutazona¹¹

Respeitando-se o intervalo mínimo de 14 dias entre as administrações em cada animal, os 18 eqüinos PSA foram distribuídos aleatoriamente e mais de uma vez (Apêndice B). Nos grupos GC, GCRO, GM e GK ajustou-se o volume final das injeções em 5mL. No GF, empregou-se o volume de fármaco condizente com a concentração do medicamento (200mg/mL). O presente estudo foi realizado de modo cego.

Novas avaliações clínicas foram realizadas em T30min, T60min, T90min, T2h, T3h, T6h, T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d. A partir de T2h, os animais foram levados a uma baia anexa e retornavam ao tronco de contenção 15min antes das demais mensurações. Os parâmetros avaliados neste experimento incluíram:

- porcentagem de animais que urinaram até T3h;
- porcentagem de animais que defecaram até T3h;
- latência para urinar (TU), em minutos até T3h;
- latência para defecar (TD), em minutos até T3h;
- frequência cardíaca (FC, em bat/min), por meio de auscultação sobre o 5º espaço intercostal esquerdo, sob o olecrano, durante 1 minuto;
- frequência respiratória (*f*, em mov/min), pela contagem da movimentação do gradil costal durante 1 minuto;

¹⁰ Dimorf®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil

¹¹ Equipalazone®, Marcolab, São Paulo, São Paulo, Brasil

- temperatura retal (TR, em °C), por meio de termometria clínica convencional, durante 2 minutos;
- manutenção da altura da cabeça em relação ao solo (AC), para verificar a presença de sedação ou excitação. Este parâmetro foi medido utilizando-se uma fita métrica fixada ao tronco de contenção e observando-se a distância do lábio inferior ao solo. O valor medido foi convertido em porcentagem comparada à medida obtida na aferição basal do próprio equino, para evitar discrepâncias entre as alturas de diferentes indivíduos;
- porcentagem de animais que apresentaram ptose palpebral, verificada por inspeção;
- porcentagem de animais que apresentaram ptose labial, verificada por inspeção;
- motilidade intestinal (MI) verificada por auscultação abdominal nos quadrantes superior direito (QSD), superior esquerdo (QSE), inferior direito (QID) e inferior esquerdo (QIE), classificada em escores, conforme a Tabela 4. O QSD, referente ao ceco, foi aferido durante cinco minutos e considerou-se como normomotilidade a ocorrência de 2 a 4 descargas íleo-cecais completas neste período. Os demais quadrantes foram aferidos durante um minuto e a avaliação foi qualitativa;
- ataxia, avaliada por inspeção e classificada em escores, conforme a Tabela 5.

Os parâmetros aferidos através de inspeção foram medidos antes dos demais, para evitar que a manipulação dos animais interferisse nos resultados, especialmente na altura de cabeça, ataxia ptose palpebral e labial. Além disso, a inspeção foi realizada pelo avaliador que se posicionou a alguns metros do tronco de contenção.

Tabela 4 – Escores da motilidade intestinal aferida por auscultação abdominal em equinos PSA submetidos a injeção intravenosa de NaCl 0,9% (5mL), crotalina (3,8ng/kg), morfina (0,1mg/kg), U50-488H (160µg/kg) ou fenilbutazona (4,4mg/kg):

Escore	Descrição da motilidade intestinal
0	ausência de motilidade
1	movimentos intestinais incompletos
2	hipomotilidade
3	motilidade normal
4	hipermotilidade

Tabela 5 – Escores da ataxia aferida por inspeção em equínos PSA submetidos a injeção intravenosa de NaCl 0,9% (5mL), crotalina (3,8ng/kg), morfina (0,1mg/kg), U50-488H (160µg/kg) ou fenilbutazona (4,4mg/kg):

Escore	Descrição da ataxia
0 (ausência)	estabilidade
1 (leve)	redução de estabilidade com alguma movimentação lateral
2 (moderada)	movimentação lateral mais intensa, tendência à inclinação
3 (severa)	apoio no tronco, membros pélvicos cruzados, flexões súbitas e freqüentes das articulações carpais

Fonte: adaptada de BRYANT et al. (1991)

D. Análise Estatística

A Tabela 6 exibe os diversos testes estatístico que foram utilizados neste estudo, conforme a característica de cada variável, sempre considerando-se o nível de significância $p \leq 0,05$. Utilizaram-se programas computacionais para realização da análise estatística e dos gráficos. Os resultados foram apresentados de modo descritivo, tabelas e gráficos. O erro padrão e os símbolos de significância foram ilustrados somente nas tabelas para facilitar a visualização dos gráficos.

Tabela 6 – Testes estatísticos empregados durante a avaliação clínica dos efeitos promovidos pela crotalina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em equínos PSA:

Teste Estatístico	Variável
ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett entre tempos e pelo teste Student-Newman-Keuls entre grupos	▪ frequência cardíaca ▪ frequência respiratória ▪ temperatura retal ▪ altura da cabeça em relação ao solo
ANOVA de uma via	▪ latência para urinar ▪ latência para defecar
Kruskal-Wallis em blocos	▪ porcentagem de animais que urinaram ▪ porcentagem de animais que defecaram ▪ porcentagem de animais que apresentaram ptose palpebral ▪ porcentagem de animais que apresentaram ptose labial
Friedman com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste de Dunnett entre tempos e pelo teste Student-Newman-Keuls entre grupos	▪ motilidade intestinal ▪ ataxia

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum animal dos grupos GC e GM apresentou micção até a 3ª hora de observação; nos grupos GCRO e GF a porcentagem de animais que urinaram até a 3ª hora de observação foi 16,6% em GCRO e GF; no grupo GK foi 50%. Quanto à latência, não houve diferença estatística entre os grupos e foi verificado tempo superior a 180 minutos em GC e GM; $167,5 \pm 12,5$ min para GCRO; $125,8 \pm 24,4$ min para GK; $173,3 \pm 6,7$ min para GF. Esses dados estão ilustrados na Tabela 7.

Embora alguns estudos com ratos relatem aumento da diurese após a utilização de U50-488H (VONVOIGTLANDER et al., 1983; LEANDER et al., 1987; BORKOWSKI, 1989), o estudo realizado em eqüinos por KAMERLING et al. (1989) também observou que o U50-488H não alterou este parâmetro. Dessa forma, talvez ocorra alguma diferença de resposta conforme a espécie animal. A crotalfina também não aumentou a micção e mostrou-se semelhante ao observado no grupo controle e no grupo tratado com U50-488H. Vale considerar, ainda, que esta avaliação ocorreu enquanto os animais estavam no tronco de contenção e esta situação pode inibir a micção nos eqüinos devido ao estado de alerta de origem multi-sensorial, vigilância instantânea e marcante reatividade inerente à espécie eqüina (McDONNELL, 2002).

A porcentagem de animais que defecaram durante os 180 minutos iniciais de observação foi de 66,6% para GC e GF; 83,3% para GCRO; 50% para GK; 33,3% para GM, como exhibe a Figura 2. Não houve diferença estatística entre os grupos e resultados idênticos foram observados no estudo comportamental sobre o efeito da crotalfina em eqüinos, o que sedimenta ainda mais tal observação. A latência para defecar foi de $69,7 \pm 35$ min para GC; $82,3 \pm 25$ min para GCRO; $143,3 \pm 23,3$ min para GM; 134 ± 29 min para GK; $94,8 \pm 29$ min para GF. Não houve diferença estatística entre os grupos e esses dados estão ilustrados na Tabela 7.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa, os grupos tratados com crotalfina ou U50-488H exibiram alta freqüência de defecação, corroborando com THURMON et al. (1996) que inferem que os opióides podem aumentar a motilidade intestinal. Todavia, parece haver diferença de resposta conforme o receptor opióide

envolvido, sendo que os agonistas kappa interferem menos na taxa de defecação. Essa hipótese é sustentada pelas observações de ROGER et al. (1994) que apontam o U50-488H como fármaco de escolha no alívio da dor visceral nos quadros de cólica causados por hipomotilidade em eqüinos, já que este medicamento não prejudica o trânsito gastrointestinal como pode ocorrer após o uso de opióides agonistas mu, conforme pôde ser notado no grupo tratado com morfina, que apresentou a menor taxa de defecação. A partir de um estudo com ratos verificou-se que os receptores mu estão envolvidos central e periféricamente com analgesia, ação anti-secretória e redução da motilidade, enquanto que os receptores kappa regulam a analgesia e inibem a ação secretória em altas doses, mas não exercem nenhum efeito sobre o trânsito gastrointestinal, independente da administração ser central ou periférica (SMITH & CHANG, 1993). Estudos com eqüinos mostraram que a morfina reduz a motilidade progressiva do intestino delgado e do cólon, porém aumenta os movimentos de mescla e o tônus dos esfíncteres, ou seja, diminui o peristaltismo enquanto favorece o movimento segmentar e pendular, o que torna a morfina contra-indicada depois de cirurgias gastrintestinais (DUCHARME, 2003). Já o butorfanol, que é um opióide com ação predominante sobre os receptores kappa e é muito utilizado em cavalos, produz boa analgesia visceral, com menos efeitos adversos, visto que embora ocorra redução da motilidade do intestino delgado, não se observam alterações cardiovasculares, o que torna este fármaco uma opção adequada para que se obtenha analgesia nos quadros de desconforto ou em cirurgias gastrintestinais em eqüinos (DUCHARME, 2003; GLEED, 2003). Considerando que a crotalfina é um agonista kappa, possivelmente as mesmas observações feitas para o U50-488H e ao butorfanol se apliquem à crotalfina, mas o presente estudo apenas avaliou a crotalfina em eqüinos hígdos e ainda é necessário que se verifique a eficácia deste fármacos em cavalos portadores de distúrbios gastrintestinais.

Cabe salientar que este estudo foi conduzido sob condições naturais a fim de simular os possíveis efeitos promovidos pela crotalfina aplicada clinicamente em eqüinos. Assim, os animais utilizados não foram submetidos a jejum hídrico ou alimentar previamente à administração dos fármacos.

Tabela 7 - Porcentagem (%) e latência (média $\pm$ erro padrão) para urinar e defecar apresentada pelos equinos PSA que receberam administração intravenosa de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em minutos.

	Urinar		Defecar	
	porcentagem (%)	latência (min)	porcentagem (%)	latência (min)
GC	0	>180	67	70 $\pm$ 35
GCRO	17	168 $\pm$ 13	83	82 $\pm$ 25
GM	0	> 180	33	143 $\pm$ 23
GK	50	126 $\pm$ 24	50	134 $\pm$ 29
GF	17	173 $\pm$ 7	67	95 $\pm$ 29

Os valores de frequência cardíaca (Tabela 8 e Figura 3), entre tempos, não variaram de maneira significativa em GC, GCRO e GM; em GK, T3d, T5d e T7d foi menor que T-20; em GF, T3d foi menor que T-20. Entre grupos, houve diferença apenas em T0, quando GF foi superior ao GCRO; em T3d, quando GC foi maior que GM; em T5d, quando GC foi maior que GCRO, GM, GK e GF; GF foi superior a GCRO, GM e GK; GK superou GCRO e GM; GM foi maior que GCRO.

Tabela 8 – Frequência cardíaca (bpm) (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA:

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	40,7 $\pm$ 3,0	36,7 $\pm$ 1,8	38,0 $\pm$ 2,7	45,2 $\pm$ 3,2	48,7 $\pm$ 4,4
T-10	39,0 $\pm$ 3,0	35,0 $\pm$ 0,9	35,3 $\pm$ 2,3	42,8 $\pm$ 3,3	45,0 $\pm$ 3,4
T0	41,0 $\pm$ 3,0	35,0 $\pm$ 1,1	43,7 $\pm$ 2,2	38,7 $\pm$ 1,8	48,3 $\pm$ 4,3a
T30	42,0 $\pm$ 2,5	35,0 $\pm$ 0,9	36,0 $\pm$ 1,9	39,7 $\pm$ 1,7	47,3 $\pm$ 4,1
T60	41,0 $\pm$ 3,3	35,7 $\pm$ 1,0	37,0 $\pm$ 2,0	42,7 $\pm$ 2,3	42,0 $\pm$ 2,0
T90	37,7 $\pm$ 2,2	35,0 $\pm$ 1,3	37,3 $\pm$ 2,0	41,7 $\pm$ 2,8	44,0 $\pm$ 3,4
T2h	37,3 $\pm$ 2,4	34,7 $\pm$ 1,2	38,3 $\pm$ 2,3	39,3 $\pm$ 1,3	42,3 $\pm$ 2,8
T3h	44,3 $\pm$ 4,1	40,7 $\pm$ 1,1	42,0 $\pm$ 2,2	44,0 $\pm$ 3,0	45,7 $\pm$ 2,8
T6h	47,3 $\pm$ 5,1	39,7 $\pm$ 1,2	42,2 $\pm$ 5,5	43,0 $\pm$ 3,2	48,3 $\pm$ 2,6
T12h	45,3 $\pm$ 5,0	39,7 $\pm$ 2,3	42,0 $\pm$ 3,5	42,3 $\pm$ 2,2	47,0 $\pm$ 3,1
T24h	46,0 $\pm$ 4,2	38,3 $\pm$ 2,2	38,3 $\pm$ 2,7	39,3 $\pm$ 3,1	46,7 $\pm$ 4,6
T2d	44,0 $\pm$ 4,2	39,0 $\pm$ 2,5	34,0 $\pm$ 2,8	37,3 $\pm$ 1,9	43,3 $\pm$ 3,4
T3d	40,7 $\pm$ 2,2b	38,3 $\pm$ 1,4	32,0 $\pm$ 2,3	35,0 $\pm$ 2,1 *	37,0 $\pm$ 1,3 *
T5d	44,0 $\pm$ 3,8 a b c d	32,0 $\pm$ 1,9	33,3 $\pm$ 2,6 a	34,7 $\pm$ 1,2 * a b	41,0 $\pm$ 3,9 a b c
T7d	38,2 $\pm$ 3,6	34,3 $\pm$ 1,4	37,3 $\pm$ 2,0	36,0 $\pm$ 1,6 *	44,3 $\pm$ 3,6

* diferente de T-20 (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

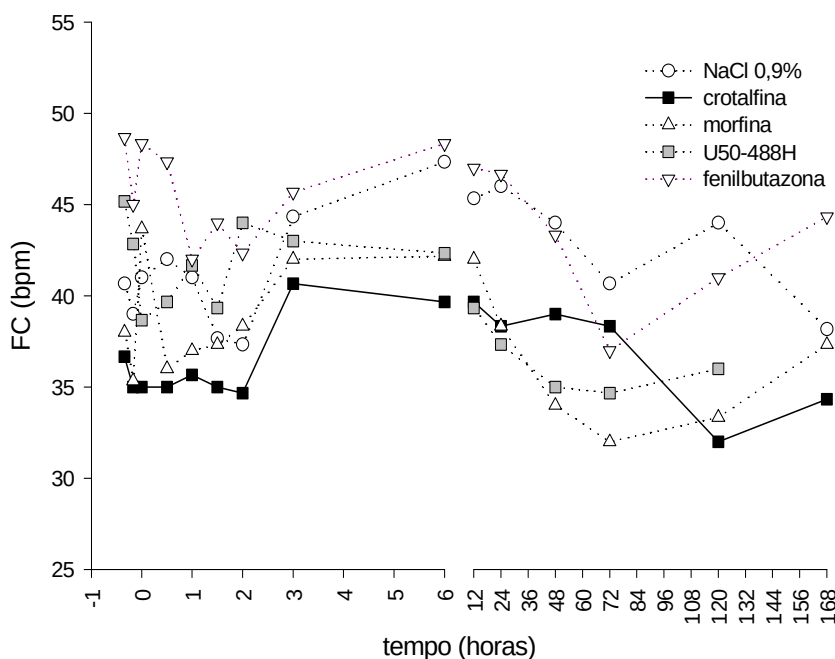


Figura 3 – Frequência cardíaca (média) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

A manutenção dos valores de frequência cardíaca até T2d sugere que as alterações posteriores decorram de influência externa, podendo ser até mesmo dependente da temperatura ambiente já que este estudo foi conduzido sob condições naturais de climatização. A ausência de alteração no grupo tratado com crotalfina pode ser explicada com base na interação do fármaco com receptores kappa, pois KAMERLING et al. (1988) já haviam relatado que a administração intravenosa de U50-488H em eqüinos causa apenas a instalação de mínimos efeitos colaterais autonômicos e comportamentais.

Os valores de frequência respiratória (Tabela 9 e Figura 4), entre tempos, apresentaram diferença apenas em GCRO, quando se verificou que T3h, T6h e T24h foram maiores que T-20. Entre grupos, não houve diferença. Isto é interessante ao se considerar que a crotalfina, a exemplo de outros opióides, poderia deprimir a função respiratória. Os agonistas mu, como a morfina, podem reduzir a frequência respiratória (COMBIE et al., 1979; MUIR III, 1991; THURMON et al., 1996), mas isso não foi observado no presente estudo, que apontou a dose de 0,1mg/kg de morfina como

segura para ser empregada em eqüinos. No que tange à crotalfina, o resultado é ainda mais satisfatório, pois de três a doze horas após a injeção do fármaco houve, inclusive, aumento da frequência respiratória, sugerindo que este princípio ativo talvez não seja capaz de promover depressão respiratória, todavia essa confirmação depende da aferição do volume-corrente, volume-minuto, saturação periférica de oxigênio (SPO₂), pressão parcial de O₂ do sangue arterial (PaO₂), dióxido de carbono no fim da expiração (ETCO₂) e pressão parcial de CO₂ do sangue arterial (PaCO₂). Ademais, a crotalfina interage com receptores kappa e KAMERLING et al. (1988) já relataram ausência de alteração na função respiratória após o uso intravenoso do agonista kappa U50-488H em eqüinos.

O fato do U50-488H e da crotalfina não alterarem as frequências cardíaca e respiratória os diferencia de outros opióides, particularmente dos agonistas mu, cuja interferência na função respiratória os limita para tratamento da dor trans-operatória (KAMERLING et al., 1988).

Tabela 9 – Frequência respiratória (mpm) (média ± erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA:

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	26,7±3,2	19,0±2,8	23,3±5,1	22,7±3,0	23,5±3,1
T-10	24,3±4,4	21,0±3,0	21,3±2,6	18,0±4,0	25,5±4,3
T0	26,7±3,0	22,7±2,8	30,7±1,9	26,7±5,7	26,0±2,9
T30	27,0±2,7	25,3±2,3	29,7±3,8	30,0±5,3	25,7±2,2
T60	28,7±2,3	27,0±2,9	32,3±3,0	32,7±4,7	27,5±2,4
T90	25,3±3,2	27,0±2,7	34,4±4,0	25,7±3,6	26,7±2,4
T2h	26,8±3,0	25,3±3,3	29,3±4,0	28,7±3,4	25,7±2,6
T3h	32,7±4,6	41,3±4,8 *	31,7±2,6	37,7±6,7	32,3±4,6
T6h	27,0±1,8	30,7±2,5 *	31,7±2,2	28,7±6,1	21,3±1,9
T12h	23,3±2,4	22,0±2,3	24,7±3,6	19,0±3,0	23,3±3,1
T24h	28,4±5,3	30,3±2,6 *	27,3±3,9	22,8±3,4	30,5±3,7
T2d	26,3±5,7	23,7±1,7	22,3±4,4	23,3±2,7	24,0±2,7
T3d	26,3±4,2	26,0±3,4	22,0±3,7	22,7±1,4	25,7±2,6
T5d	26,7±3,4	25,5±2,0	30,0±4,8	30,0±3,4	23,6±4,4
T7d	25,2±5,0	20,7±2,4	21,0±3,9	19,0±4,2	32,0±2,7

* diferente de T-20 (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, p≤0,05)

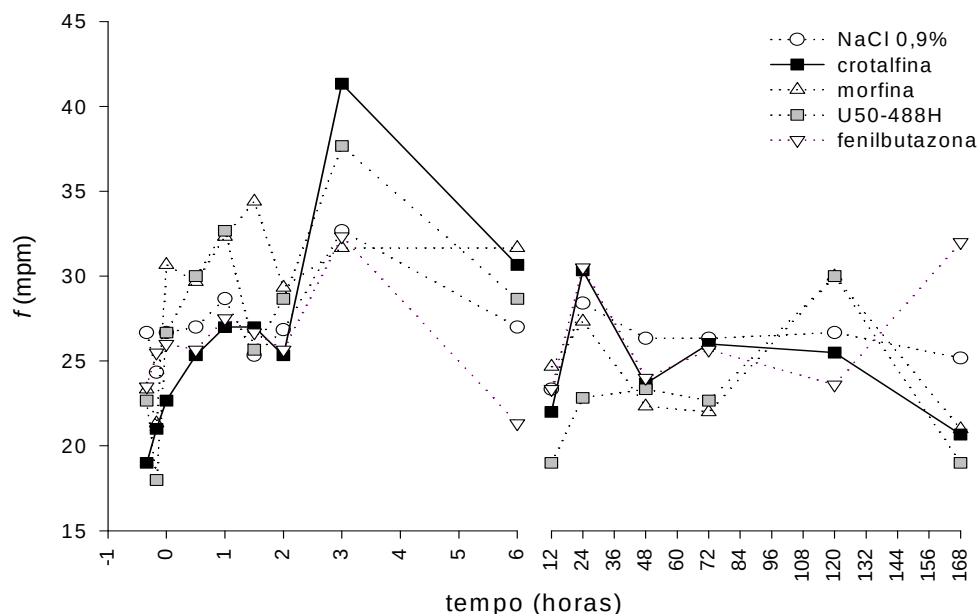


Figura 4 - Frequência respiratória (mpm) (média) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

A temperatura retal (Tabela 10 e Figura 5), entre tempos, foi maior que T-20 nos tempos T0, T3h e T12h do GC; nos tempos T3h, T6h e T12h de GCRO; nos tempos T60, T90 e T12h de GK. Entre grupos, houve diferença em T7d, quando GF foi maior que GK e GCRO. As alterações ocorreram de três a doze horas após a injeção dos fármacos, ou seja, entre 12:00h e 21:00h, sendo necessário salientar que este estudo foi conduzido sob condições naturais, sem climatização controlada, e provavelmente a temperatura ambiental tenha interferido nos valores, pois a temperatura média em Jaboticabal durante agosto e setembro de 2007, quando este experimento foi realizado, foi de 21°C a 31°C (CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2007; TEMPO AGORA; 2007). De qualquer forma, as alterações foram sutis e se limitaram à faixa fisiológica de temperatura retal para a espécie equina (FEITOSA, 2004; SPEIRS, 1999), apontando para ausência de interferência dos fármacos neste parâmetro.

Tabela 10 – Temperatura retal (°C) (média ± erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA:

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	37,5±0,1	37,3±0,1	37,1±0,2	37,3±0,1	37,6±0,2
T-10	37,7±0,1	37,4±0,1	37,4±0,2	37,5±0,2	37,8±0,2
T0	37,8±0,1 *	37,4±0,1	37,4±0,2	37,6±0,2	37,8±0,1
T30	37,7±0,1	37,6±0,1	37,6±0,2	37,7±0,1	37,8±0,0
T60	37,8±0,1	37,5±0,1	37,6±0,2	37,9±0,1 *	37,8±0,1
T90	37,8±0,1	37,5±0,1	37,6±0,3	37,9±0,2 *	37,7±0,1
T2h	37,7±0,1	37,7±0,1	37,5±0,3	37,8±0,2	37,9±0,1
T3h	37,9±0,1 *	38,1±0,1 *	37,7±0,2	37,8±0,2	37,7±0,1
T6h	37,8±0,1	37,9±0,1 *	37,7±0,1	37,7±0,1	37,5±0,1
T12h	38,1±0,1 *	38,1±0,1 *	37,9±0,2	38,0±0,1 *	37,9±0,2
T24h	37,7±0,2	37,6±0,1	37,6±0,3	37,2±0,2	37,7±0,2
T2d	37,5±0,1	37,3±0,2	37,3±0,2	37,2±0,1	37,6±0,1
T3d	37,7±0,2	37,2±0,2	37,2±0,1	37,3±0,1	37,7±0,1
T5d	37,8±0,1	37,3±0,1	37,6±0,1	37,5±0,1	37,7±0,2
T7d	37,5±0,1	37,2±0,1	37,3±0,1	37,1±0,1	37,7±0,1 a c

* diferente de T-20 (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (ANOVA de uma via com repetições múltiplas, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

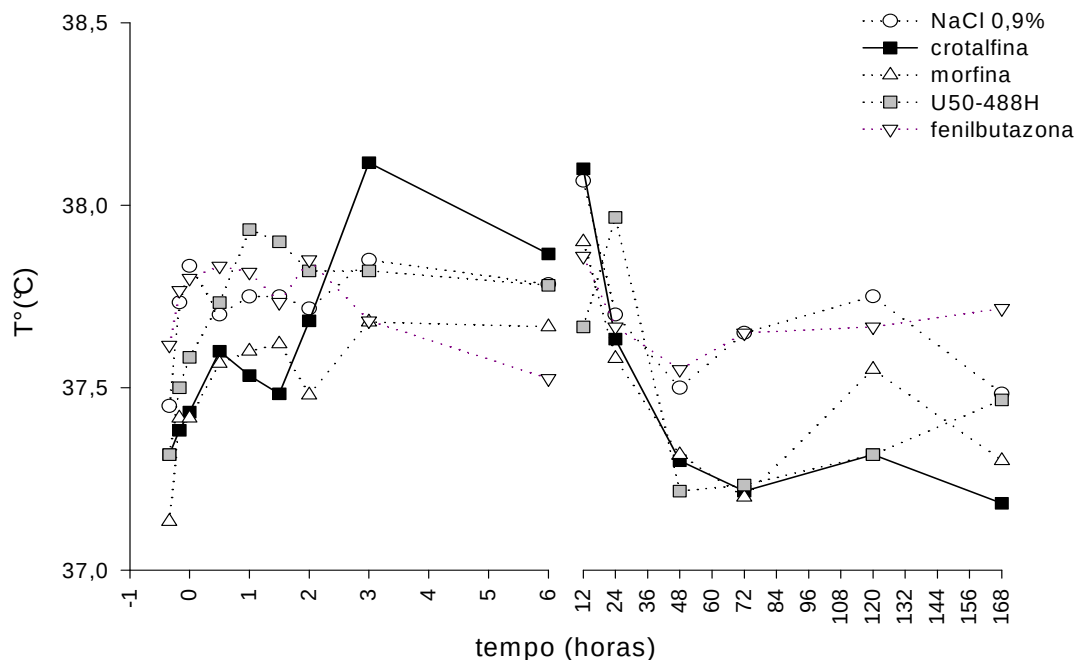


Figura 5 – Temperatura retal (°C) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Nenhum animal apresentou ataxia e nem ptose labial. Quanto à altura de cabeça em relação ao solo (Tabela 11 e Figura 6A) e ptose palpebral (Tabela 12 e Figura 6B), houve variação não significativa e pode-se observar que os grupos tratados com opióides (GCRO, GM e GK) apresentaram variação semelhante e nos mesmos tempos.

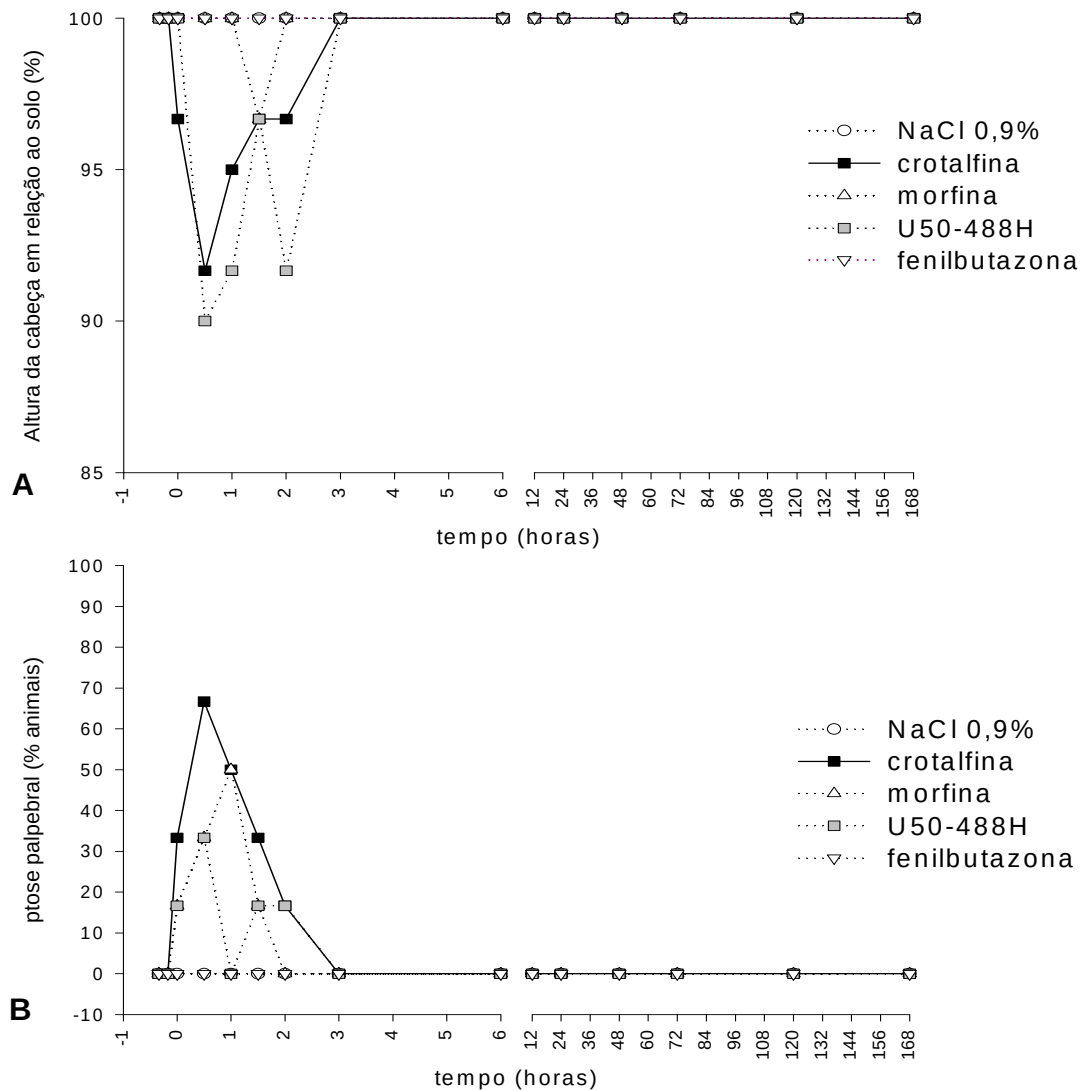


Figura 6 – Porcentagem (média) de manutenção da altura de cabeça em relação ao solo (A) e porcentagem de animais que apresentaram ptose palpebral (B) observadas durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tabela 11 – Manutenção da altura de cabeça em relação ao solo em porcentagem (média $\pm$ erro padrão) observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA:

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T-10	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T0	100 $\pm$ 0	96,7 $\pm$ 3,3	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T30	100 $\pm$ 0	91,7 $\pm$ 4,0	100 $\pm$ 0	90 $\pm$ 8,2	100 $\pm$ 0
T60	100 $\pm$ 0	95,0 $\pm$ 3,4	100 $\pm$ 0	91,7 $\pm$ 8,3	100 $\pm$ 0
T90	100 $\pm$ 0	96,7 $\pm$ 2,1	96,7 $\pm$ 3,3	96,7 $\pm$ 3,3	100 $\pm$ 0
T2h	100 $\pm$ 0	96,7 $\pm$ 2,5	100 $\pm$ 0	91,7 $\pm$ 4,0	100 $\pm$ 0
T3h	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T6h	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T12h	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T24h	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T2d	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T3d	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T5d	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
T7d	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0

Tabela 12 – Porcentagem de ptose palpebral observada durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA:

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	0	0	0	0	0
T-10	0	0	0	0	0
T0	0	33,3	16,7	16,7	0
T30	0	66,7	33,3	33,3	0
T60	0	50,0	50,0	0	0
T90	0	33,3	16,7	16,7	0
T2h	0	16,7	0	16,7	0
T3h	0	0	0	0	0
T6h	0	0	0	0	0
T12h	0	0	0	0	0
T24h	0	0	0	0	0
T2d	0	0	0	0	0
T3d	0	0	0	0	0
T5d	0	0	0	0	0
T7d	0	0	0	0	0

Embora não tenha ocorrido diferença significativa no parâmetro altura de cabeça em relação ao solo, o U50-488H foi o fármaco que mais interferiu nos valores deste parâmetro, seguido pelos outros opióides. O U50-488H e a crotalina são agonistas

kappa e já no estudo comportamental foi observado algum grau de sedação caracterizado pela calma dos animais. Uma das vantagens do uso de U50-488 é a analgesia prolongada e sedação, pois receptores opióides mu e kappa induzem analgesia, mas o receptor kappa ainda está implicado na sedação (KAMERLING et al., 1988; KAMERLING et al., 1989) devido à liberação extracelular de dopamina (PAN, 1998), conforme já foi evidenciado em experimentos de microdiálise que analisaram o núcleo accumbens de ratos tratados com U50-488H (DI CHIARA & IMPERATO, 1988). Portanto, sugere-se que a crotalina também minimize a liberação de dopamina, levando ao estado de sedação comportamental e essa hipótese é baseada em estudos que mostraram que os agonistas de receptores kappa produzem sedação comportamental, analgesia e miose, mas promovem poucos efeitos na frequência cardíaca, temperatura corporal ou frêmito cutâneo (KAMERLING et al., 1985; KAMERLING et al., 1988; KAMERLING et al., 1989).

Os valores obtidos para a motilidade intestinal estão apresentados na Figura 7 e na Tabela 13. No quadrante superior direito (ceco), entre tempos, houve redução nos tempos T30, T60, T90 e T2h do GM. Entre grupos, GM foi menor que GCRO em T0 e menor que GCRO e GF em T90 e T2h. No quadrante superior esquerdo (intestino delgado) não houve alteração da motilidade intestinal entre tempos. Entre grupos, GM foi menor que GCRO e GF em T0; menor que GC, GCRO, GK e GF em T60 e T90; menor que GC, GCRO e GF em T2h; menor que GCRO em T3d. Além disso, GC foi maior que GK em T3h. No quadrante inferior direito (cólon ventral direito), entre tempos, a motilidade intestinal do GM foi menor em T30, T60, T90 e T2h. Entre grupos, GM foi menor que GC, GCRO, GK e GF em T30, T60, T90 e T2h; em T2h, GC foi maior que GM e GK. No quadrante inferior esquerdo (cólon ventral esquerdo), entre tempos, foi menor no GM de T30 a T2h. Entre grupos, GM foi menor que GCRO em T0; menor que GC, GCRO, GK e GF em T60; menor que GC, GCRO e GF em T90; menor que GC em T2h. Além disso, em T60 o valor obtido em GK foi menor que GCRO.

Cabe salientar que este estudo foi conduzido sob condições naturais a fim de simular os possíveis efeitos promovidos pela crotalina aplicada clinicamente em

equínos. Assim, os animais utilizados não foram submetidos a jejum hídrico ou alimentar previamente à administração dos fármacos.

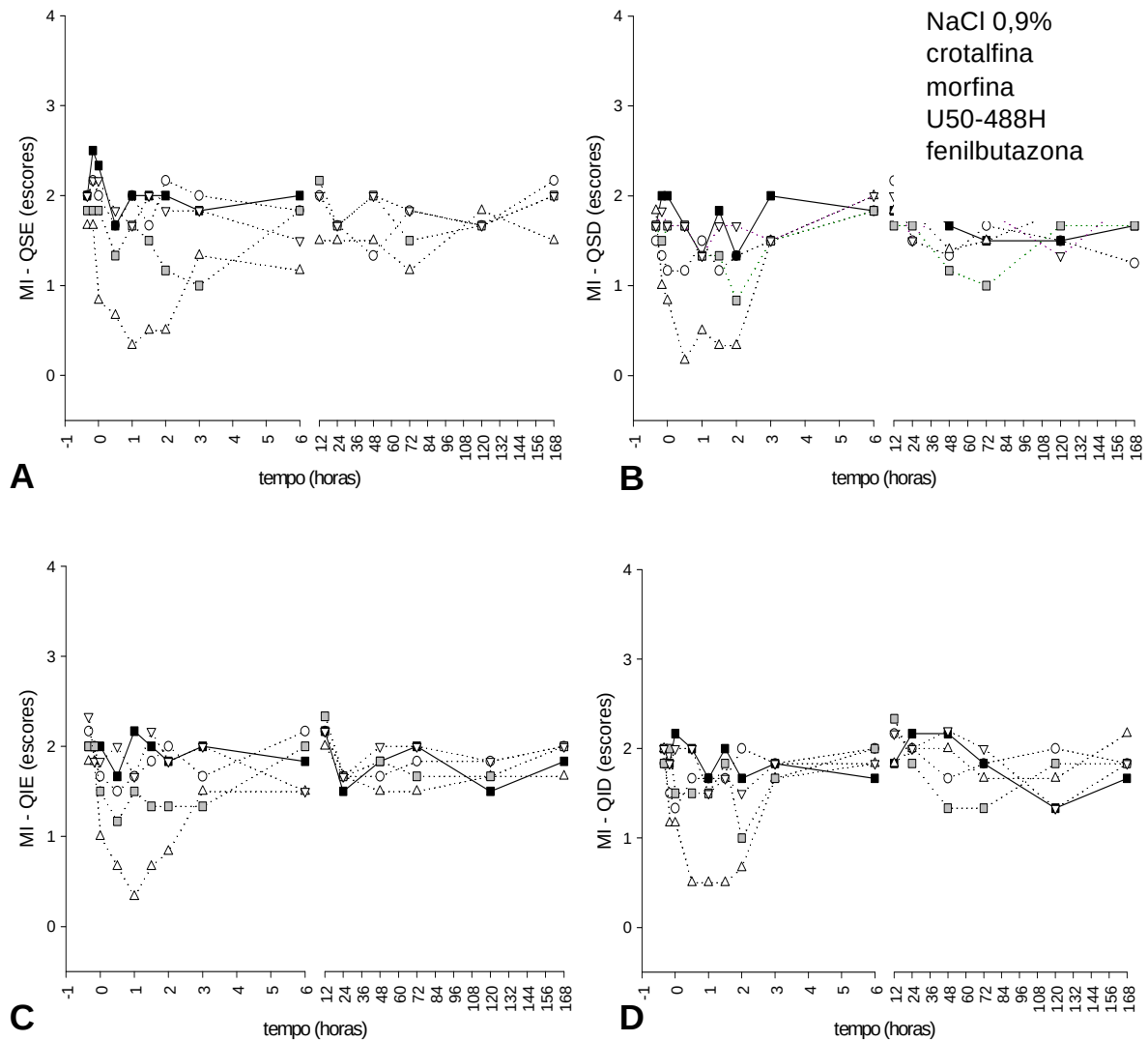


Figura 7 – Média dos escores de motilidade intestinal no quadrante superior esquerdo (A), superior direito (B), inferior esquerdo (C) e inferior direito (D) (média) observadas durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tabela 13 – Escores de motilidade intestinal (média $\pm$ erro padrão) no quadrante superior direito (A), superior esquerdo (B), inferior direito (C) e inferior esquerdo (D) observados durante os 7 dias de aferição após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tempo	T-20	T-10	T0	T30	T60	T90	T2h	T3h	T6h	T12h	T24h	T2d	T3d	T5d	T7d	
GC	QSD	1,5± 0,3	1,3± 0,3	1,2± 0,2	1,2± 0,2	1,5± 0,2	1,2± 0,2	1,3± 0,3	1,5± 0,2	1,8± 0,2	2,2± 0,3	1,5± 0,4	1,3± 0,3	1,7± 0,2	1,5± 0,4	1,3± 0,3
	QSE	2,0± 0	2,2± 0,2	2,0± 0,4	1,7± 0,3	2,0± 0,3 b	1,7± 0,3 b	2,2± 0,2 b	2,0± 0,3	1,8± 0,2	2,0± 0,4	1,7± 0,2	1,3± 0,3	1,8± 0,2	1,7± 0,3	2,2± 0,2
	QID	1,8± 0,4	1,5± 0,3	1,3± 0,2	1,7± 0,3 b	1,7± 0,2 b	1,7± 0,2 b	2,0± 0,0 bc	1,8± 0,2	2,0± 0,3	2,2± 0,2 b	2,0± 0,4	1,7± 0,2	1,8± 0,2	2,0± 0,3	1,8± 0,3
	QIE	2,2± 0,2	2,0± 0,3	1,7± 0,2	1,5± 0,2	1,7± 0,2 b	1,8± 0,3 b	2,0± 0,3 b	1,7± 0,2	2,2± 0,2	2,2± 0,5	1,7± 0,2	1,7± 0,2	1,8± 0,2	1,8± 0,2	2,0± 0
GCRO	QSD	1,7± 0,2	2,0± 0,3	2,0± 0,3	1,7± 0,2	1,3± 0,4	1,8± 0,2	1,3± 0,2	2,0± 0,3	1,8± 0,2	1,8± 0,4	2,0± 0,3	1,7± 0,4	1,5± 0,3	1,5± 0,2	1,7± 0,4
	QSE	2,0± 0,3	2,5± 0,2	2,3± 0,2	1,7± 0,2	2,0± 0,3	2,0± 0,3	2,0± 0,4	1,8± 0,3	2,0± 0	2,2± 0,3	1,8± 0,5	2,2± 0,3	2,3± 0,2	1,2± 0,4	1,8± 0,4
	QID	2,0± 0	1,8± 0,3	2,2± 0,2	2,0± 0	1,7± 0,2	2,0± 0	1,7± 0,2	1,8± 0,2	1,7± 0,4	1,8± 0,4	2,2± 0,3	2,2± 0,4	1,8± 0,2	1,3± 0,3	1,7± 0,4
	QIE	2,0± 0	2,0± 0	2,0± 0	1,7± 0,2 b	2,2± 0,2	2,0± 0,3	1,8± 0,3	2,0± 0	1,8± 0,2	2,2± 0,2	1,5± 0,4	1,8± 0,2	2,0± 0	1,5± 0,2	1,8± 0,4
GM	QSD	1,8± 0,4	1,0± 0,4	0,8± 0,3	0,2± 0,2 a	0,5± 0,2	0,3± 0,2 ad	0,3± 0,2 ad	1,5± 0,5	2,0± 0,3	1,8± 0,2	1,8± 0,4	1,4± 0,4	1,5± 0,2	1,8± 0,2	1,8± 0,3
	QSE	1,7± 0,3	1,7± 0,2	0,8± 0,3 ad	0,7± 0,3	0,2 a c d	0,2 a c d	0,3 a d	1,3± 0,2	1,2± 0,3	1,5± 0,3	1,5± 0,3	1,5± 0,2	1,2± 0,4 a	1,8± 0,3	1,5± 0,4
	QID	2,0± 0,3	1,2± 0,3	1,2± 0,2	0,5± 0,2 acd	0,5± 0,2 acd	0,5± 0,2 * a c d	0,7± 0,3	1,7± 0,4	1,8± 0,4	1,8± 0,2 acd	2,0± 0,3	2,0± 0	1,7± 0,2	1,7± 0,3	2,2± 0,3
	QIE	1,8± 0,2	1,8± 0,2	1,0± 0,4	0,7± 0,3	0,2 acd	0,7± 0,2 ad	0,8± 0,4	1,5± 0,2	1,5± 0,2	2,0± 0,3	1,7± 0,3	1,5± 0,3	1,5± 0,3	1,7± 0,3	1,7± 0,2
GK	QSD	1,7± 0,2	1,5± 0,2	1,7± 0,3	1,7± 0,3	1,3± 0,3	1,3± 0,4	0,8± 0,2	1,5± 0,3	1,8± 0,2	1,7± 0,3	1,7± 0,3	1,2± 0,4	1,0± 0,3	1,7± 0,4	1,7± 0,4
	QSE	1,8± 0,2	1,8± 0,2	1,8± 0,3	1,3± 0,4	1,7± 0,3	1,5± 0,2	1,2± 0,3	1,0± 0,3	1,8± 0,3	2,2± 0,2	1,7± 0,3	2,0± 0,4	1,5± 0,2	1,7± 0,2	2,0± 0,3
	QID	1,8± 0,2	2,0± 0	1,5± 0,3	1,5± 0,2	1,5± 0,2	1,8± 0,3	1,0± 0,3	1,7± 0,2	2,0± 0	2,3± 0,2	1,8± 0,2	1,3± 0,5	1,3± 0,3	1,8± 0,2	1,8± 0,4
	QIE	2,0± 0	2,0± 0	1,5± 0,2	1,2± 0,2	1,5± 0,2 a	1,3± 0,2	1,3± 0,4	1,3± 0,2	2,0± 0,3	2,3± 0,2	1,7± 0,2	1,8± 0,4	1,7± 0,2	1,7± 0,2	2,0± 0,3
GF	QSD	1,7± 0,2	1,8± 0,2	1,7± 0,2	1,7± 0,2	1,3± 0,2	1,7± 0,2	1,7± 0,2	1,5± 0,2	2,0± 0,3	2,0± 0,3	1,5± 0,3	2,0± 0	1,8± 0,2	1,3± 0,3	2,0± 0
	QSE	2,0± 0,3	2,2± 0,3	2,2± 0,2	1,8± 0,2	1,7± 0,2	2,0± 0	1,8± 0,2	1,8± 0,2	1,5± 0,2	2,0± 0	1,7± 0,2	2,0± 0,3	1,8± 0,2	1,7± 0,3	2,0± 0,3
	QID	1,8± 0,2	2,0± 0	1,5± 0,3	1,5± 0,2	1,5± 0,2	1,8± 0,3	1,0± 0,3	1,7± 0,2	2,0± 0	2,3± 0,2	1,8± 0,2	1,3± 0,5	1,3± 0,3	1,8± 0,2	1,8± 0,4
	QIE	2,3± 0,2	1,8± 0,3	1,8± 0,2	2,0± 0	1,7± 0,2	2,2± 0,2	1,8± 0,2	2,0± 0	1,5± 0,2	2,2± 0,2	1,7± 0,2	2,0± 0	2,0± 0	1,8± 0,4	2,0± 0,3

- as áreas em cinza indicam que o valor é diferente de T-20 (Friedman ANOVA com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Friedman com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Friedman com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Friedman com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Friedman com repetições múltiplas em blocos, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

A crotalfina não alterou a motilidade intestinal, fato reforçado pela manutenção da taxa de defecação. Como a crotalfina é um opióide kappa, as observações feitas para o U50-488H possivelmente justifiquem os efeitos causados pela crotalfina. A ausência de alterações na motilidade intestinal já foi observada por ROGER et al. (1994) que apontam o U50-488H como fármaco de escolha no alívio da dor visceral nos quadros de cólica causados por hipomotilidade, já que este medicamento não prejudica o trânsito gastrointestinal como ocorre após o uso de agonistas mu.

No presente estudo, a morfina reduziu a motilidade de modo significativo no intestino grosso e, mesmo que sem diferença estatística, no intestino delgado. Essas observações decorrem do efeito promovido pelo agonistas mu, como é o caso da morfina que diminui a motilidade do intestino grosso por até 120 minutos (THURMON et al., 1996), exatamente como foi verificado. TAYLOR (2005) salienta a necessidade de se investigar melhor os efeitos do uso sistêmico de morfina, em eqüinos, e o presente estudo mostrou que a injeção intravenosa de morfina (0,1mg/kg) em cavalos PSA foi segura e causou apenas alterações leves e transitórias na motilidade intestinal, que foi restaurada após a segunda hora de avaliação, sem que os cavalos apresentassem outras manifestações. A inexistência de efeitos colaterais maiores em eqüinos tratados com 0,1mg/kg morfina corrobora com CAMARGO et al. (2005) que também não observaram alterações da motilidade intestinal. Alguns dos autores que citam a instalação de efeitos colaterais após o uso intravenoso de morfina, referem-se ao emprego de doses superiores a 0,3mg/kg (KALPRAVIDH, 1984; THURMON et al., 1996; HUBBELL, 2006).

CONCLUSÃO

A administração intravenosa de dose única de crotalfina (3,8ng/kg), em eqüinos, não causa alterações clínicas relevantes por até sete dias.

EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA CROTALFINA EM EQUINOS SUBMETIDOS A MODELO INCISIONAL DE DOR INFLAMATÓRIA: COMPARAÇÃO COM MORFINA, U50-488H, FENILBUTAZONA OU NaCl 0,9%

MATERIAL E MÉTODOS

A. Comitê de Ética e Bem-estar dos Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista e recebeu o protocolo número 009974-05.

B. Animais

Foram selecionados 18 eqüinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) após exame clínico, hemograma completo e proteína total, sendo nove machos castrados e nove fêmeas não prenhes e fora do período de estro, de quatro a seis anos de idade, com $377 \pm 27\text{kg}$, pertencentes ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP. Durante o estudo, os animais foram mantidos no Setor de Eqüideocultura – FCAV – UNESP, em piquetes de *tifton*, receberam feno de *coast-cross*, arraçoamento individual à base de milho, soja, farelo de trigo e premix mineral e vitamínico (3kg/animal/dia), além de acesso irrestrito ao sal mineral e à água.

Trinta dias antes do início do experimento, os animais foram vermifugados com ivermectina (50µg/kg, im), vacinados contra encefalomielite, tétano e influenza e iniciou-se o manejo diário a fim de adaptar os cavalos à rotina experimental. Na véspera de cada ensaio experimental, os animais foram pesados.

C. Delineamento Experimental

Este estudo foi realizado de modo cego, a escolha do fármaco ocorreu ao acaso e, para minimizar as alterações decorrentes do ciclo circadiano, padronizou-se o início do experimento para as 8:00h, quando os eqüinos foram levados ao tronco de contenção. A dose de crotalina foi estabelecida previamente e o modelo incisional de dor inflamatória foi adaptado de outros trabalhos com eqüinos (OLESKOVICZ, 2001; OLESKOVICZ et al., 2001; RÉDUA et al., 2002 ; MORAES, 2003; GUIRRO, 2005).

O estudo foi desenvolvido em duas fases experimentais, sendo que na primeira ocorreu a avaliação em pele íntegra, enquanto que na segunda fase verificou-se o efeito dos fármacos em pele incisionada. Em cada uma das fases, houve distribuição aleatória dos animais entre os grupos experimentais, excluiu-se a possibilidade de um eqüino receber o mesmo fármaco mais de uma vez (Apêndice C e Apêndice D). O intervalo entre as duas fases experimentais foi de trinta dias.

C.1. Efeito Antinociceptivo em Pele Íntegra

Inicialmente, as regiões escapular e isquiática contra-lateral foram submetidas à tricotomia (10X10cm) e pintura com tinta preta lavável¹² para padronizar a absorção e reflexão da luz. Após secagem, utilizou-se tinta branca hidrossolúvel¹³ para desenhar um ponto central e círculos a 1, 3 e 5cm distantes deste ponto em cada uma dessas regiões (Figura 8). Em seguida, a cauda dos animais foi enfaixada e houve repouso de 30 minutos antes que se realizassem duas avaliações basais (T-20 e T-10). Em T0, ocorreu a administração intravenosa dos fármacos, conforme o grupo:

- GC (grupo controle, n=6) – 5mL NaCl 0,9%
- GCRO (grupo crotalina, n=6) - 3,8ng/kg de crotalina
- GM (grupo agonista mu morfina, n=6) - 0,1mg/kg de morfina
- GK (grupo agonista kappa U50-488H, n=6) - 160 µg/kg de U50-488H
- GF (grupo antiinflamatório não-esteroidal fenilbutazona, n=6) - 4,4mg/kg de fenilbutazona

¹² Tinta Preta Pilot para Carimbo® – Pilot, São Paulo, SP, Brasil

¹³ Toque Mágico® (corretivo à base de água) – Hélios Carbex, Barueri, SP, Brasil

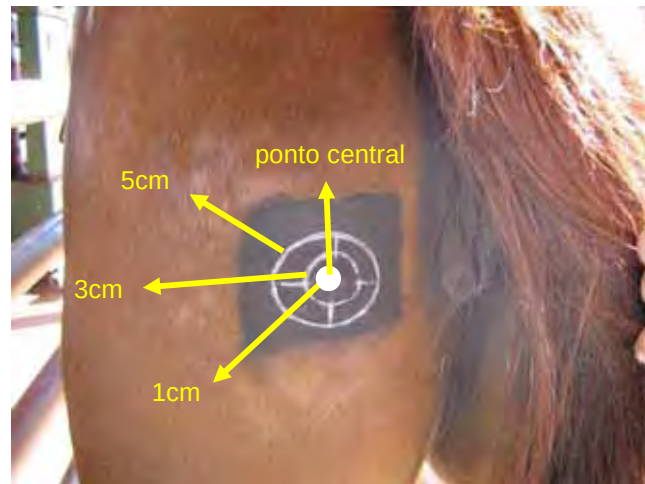


Figura 8 – Região isquiática tricotomizada e preparada para a aplicação do estímulo em equino PSA. Nota-se um ponto central e círculos equidistantes a 1, 3 e 5cm.

Após T2h, os equinos foram levados a uma baia anexa e eram reconduzidos ao tronco de contenção 15 minutos antes das demais aferições. Na avaliação antinociceptiva verificou-se:

- latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região da região escapular (LRFCesc): o limiar nociceptivo foi verificado a partir da exposição de um feixe de luz artificial emitido por um processador¹⁴, direcionado para o ponto central desenhado na região da escápula, à distância necessária para que se obtivesse foco adequado. A contagem do tempo era interrompida quando o animal respondia de forma adversa à estimulação e, para evitar lesões de pele, estabeleceu-se o tempo de corte do estímulo aos 10 segundos. Essa avaliação foi realizada em T0, T15min, T30min, T60min, T90min, T2h e T3h;
- latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região isquiática (LRFCisq): semelhante à LRFCesc, porém realizada na região isquiática contra-lateral, nos mesmos tempos;
- limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região escapular (LNEMesc): avaliou-se a sensibilidade cutânea a 1, 3 e 5cm dos mesmos pontos testados com a lâmpada por meio da estimulação mecânica promovida pelos filamentos de von Frey¹⁵. Utilizou-se

¹⁴ Dolorimeter model 331®, IITC Life Science Inc., Los Angeles, Califórnia, Estados Unidos

¹⁵ von Frey filaments®, Stoelting Company, Chicago, Illinois, Estados Unidos

um conjunto de 20 filamentos de náilon que foram seqüencialmente pressionados ao redor do tecido a partir do filamento de menor calibre e, na ausência de reação aversiva, foi substituído pelo filamento imediatamente mais calibroso. A resposta aversiva deveria envolver componentes supra-espinhais e, portanto, foi caracterizada pela movimentação da cabeça e/ou cauda, tentativa de observar o avaliador, reação de esquiva, recolhimento dos posteriores, frêmito cutâneo, coices ou quaisquer outras demonstrações de defesa ao estímulo supra-limiar. O LNEM foi determinado a partir do filamento imediatamente anterior àquele que capaz de promover resposta aversiva, cujo valor foi convertido em gramas, conforme escala fornecida pelo fabricante (Apêndice E). Adotou-se o valor do filamento mais espesso nos casos em que inclusive o filamento mais espesso foi incapaz de gerar resposta aversiva. Tal avaliação foi realizada na ordem dos quadrantes dorsal, direito, esquerdo e ventral, nos tempos T0, T3h, T6h, T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d;

- limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq): semelhante à LNEMesc, porém realizada na região isquiática contra-lateral, nos mesmos tempos.

C.2. Efeito Antinociceptivo em Pele Incisionada

As regiões da escápula e do ísquio contra-lateral foram submetidas à tricotomia (10X10cm) e, em seguida, foram lavadas com água e sabão neutro, secadas com compressa cirúrgica, a cauda dos animais foi enfaixada e houve repouso de 30 minutos. Na região escapular e isquiática previamente preparadas, procedeu-se a pintura com tinta preta lavável para padronizar a absorção e reflexão da luz e utilizou-se tinta branca hidrossolúvel para desenhar uma linha vertical central de 5cm e retângulos a 1, 3 e 5cm eqüidistantes desta linha em cada uma dessas regiões. Foram infiltrados 5mL de lidocaína 2%¹⁶ no tecido subcutâneo da linha central, realizou-se antisepsia com iodopovidona¹⁷ e decorridos 10 minutos da infiltração do anestésico local, efetuou-

¹⁶ Xylestesin® 2% sem vasoconstritor, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

¹⁷ Riodine Tópico (Iodopovidona P.V.P.-I.) – Rioquímica Indústria Farmacêutica, S. J. Rio Preto, SP, Brasil

se a incisão vertical da linha de 5cm, abrangendo pele e tecido subcutâneo na região escapular e isquiática contra-lateral, imediatamente antes da sutura com fio náilon 2-0, no padrão ponto simples separado (Figuras 9 e 10).

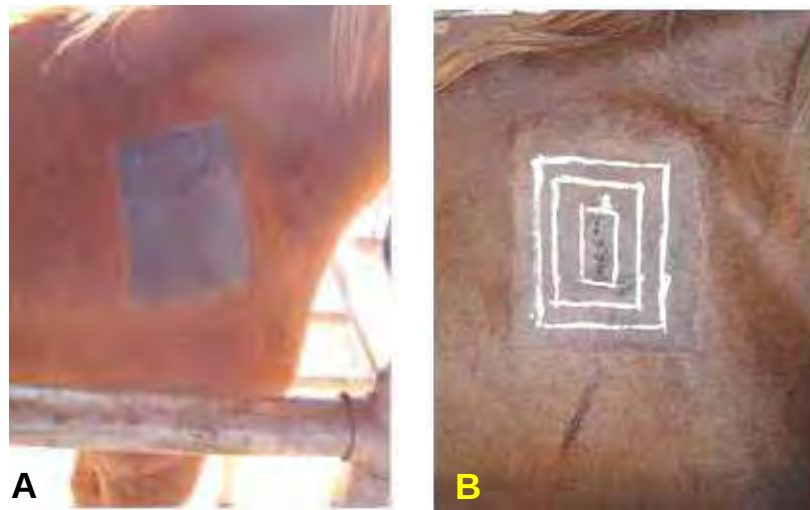


Figura 9 – Modelo incisional de dor inflamatória realizado na região escapular e utilizado na avaliação antinociceptiva em eqüinos PSA. A ilustra região escapular tricotomizada. B exibe região escapular incisionada e suturada.

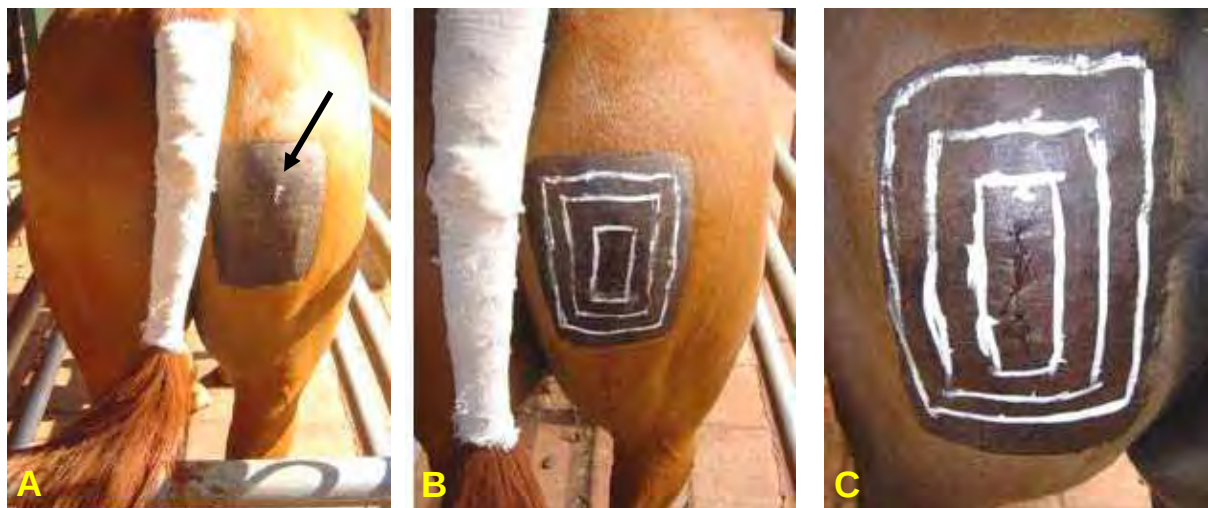


Figura 10 – Modelo incisional de dor inflamatória realizado na região isquiática e utilizado na avaliação antinociceptiva em eqüinos PSA. A ilustra a região tricotomizada, cauda enfaixada e o momento inicial da infiltração local de lidocaína 2%. B exibe região isquiática já infiltrada, previamente à incisão. C mostra região isquiática incisionada e suturada.

Ato imediato, os fármacos foram injetados conforme os grupos experimentais:

- GCRO (grupo crotalfina, n=6) - 3,8ng/kg de crotalfina
- GM (grupo agonista mu morfina, n=6) - 0,1mg/kg de morfina
- GK (grupo agonista kappa U50-488H, n=6) - 160 µg/kg de U50-488H
- GF (grupo antiinflamatório não esteroide fenilbutazona, n=6) - 4,4mg/kg de fenilbutazona

Nesta fase, não se instituiu um grupo tratado apenas com NaCl 0,9%, pois este procedimento seria contrário ao bem-estar animal, aos princípios éticos e humanitários.

Realizou-se a avaliação antinociceptiva da pele incisionada por meio da avaliação de LNE Mesc e LNE Misq, conforme já foi descrito para a avaliação em pele íntegra. As aferições ocorreram em T0, T3h, T6h, T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d. Após cada aferição, os eqüinos foram levados à baia anexa e eram reconduzidos ao tronco de contenção 15 minutos antes da aferição seguinte.

C.3. Outras Comparações

A partir dos dados obtidos na avaliação antinociceptiva da pele íntegra e da pele incisionada, foi possível fazer outras comparações sobre os efeitos promovidos pela crotalfina, morfina, U50-488H e fenilbutazona, segundo as respostas obtidas:

- entre a região escapular e isquiática, em pele íntegra;
- entre a região escapular e isquiática, em pele incisionada;
- na região da escápula, entre pele íntegra e pele incisionada;
- na região isquiática, entre pele íntegra e pele incisionada.

D. Análise Estatística

Diversos testes estatísticos foram utilizados neste estudo, sempre considerando o nível de significância $p \leq 0,05$, como pode ser visualizado na Tabela 14. Utilizaram-se programas computacionais apropriados para realização dos testes estatísticos e dos gráficos. Os resultados foram apresentados de modo descritivo, em tabelas e gráficos.

O erro padrão e os símbolos de significância foram ilustrados somente nas tabelas para melhorar a visualização dos gráficos.

Tabela 14 – Testes estatísticos empregados durante a avaliação do efeito antinociceptivo promovido pela crotalfina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em equinos PSA:

Teste Estatístico	Variável
Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett	■ latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região da escápula (LRFcEsc), entre grupos ■ latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região isquiática (LRFcIsq), entre grupos ■ latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região da escápula (LRFcEsc), entre tempos ■ latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região isquiática (LRFcIsq), entre tempos ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região da escápula (LNEMesc), entre tempos, em pele íntegra ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq), entre tempos, em pele íntegra ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região da escápula (LNEMesc), entre tempos, em pele incisionada ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq), entre tempos, em pele incisionada
Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn	■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região da escápula (LNEMesc), entre grupos, em pele íntegra ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq), entre grupos, em pele íntegra ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região da escápula (LNEMesc), entre grupos, em pele incisionada ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq), entre grupos, em pele incisionada
Mann-Whitney	■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico entre região da escápula (LNEMesc) e isquiática (LNEMisq), em pele íntegra ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico entre região da escápula (LNEMesc) e isquiática (LNEMisq), em pele incisionada ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região da escápula (LNEMesc), entre pele íntegra e incisionada ■ limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq), entre pele íntegra e incisionada

RESULTADOS

Na avaliação da latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região escapular (LRFCesc), entre tempos, o valor de T2h foi maior que T-20 no grupo controle. Entre grupos, não houve diferença. Esses dados estão expostos na Tabela 15 e na Figura 11.

Tabela 15 – Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região escapular (segundos) (média $\pm$ erro padrão) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	3,3 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 0,6
T-10	3,5 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,4
T0	3,2 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,3
T30	3,1 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,8	4,6 $\pm$ 0,7
T60	3,3 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 0,6
T90	3,8 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 0,5
T2h	4,8 $\pm$ 0,5 *	3,2 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,6
T3h	3,3 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5	4,5 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,5

* diferente de T-20 (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

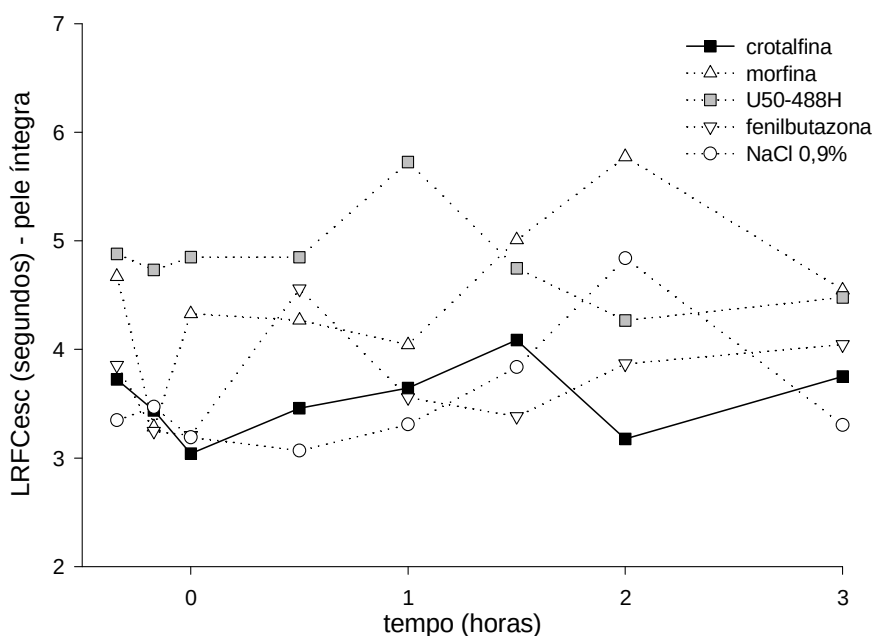


Figura 11 – Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região escapular (segundos) (média) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Na avaliação da latência para o reflexo do frêmito cutâneo na região isquiática (LRFCSiq), entre tempos, o valor de T30 foi maior que T-20 no GK. Entre grupos, no T0 o valor obtido em GF foi menor que o de GM e GK e, em T30 e T60, a latência de GK foi superior à de GC, GCRO, GM e GF, como expõem a Tabela 16 e a Figura 12.

Tabela 16 – Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região isquiática (segundos) (média $\pm$ erro padrão) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T-20	5,1 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,6
T-10	5,8 $\pm$ 0,7	4,3 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,7	3,8 $\pm$ 0,6
T0	4,7 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,5 b c
T30	5,0 $\pm$ 0,5 c	3,8 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,6	8,6 $\pm$ 0,5 * a b d	4,0 $\pm$ 0,6
T60	4,6 $\pm$ 0,6 c	4,4 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 0,6 a b d	4,1 $\pm$ 0,7
T90	6,1 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 0,7
T2h	5,6 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 0,6
T3h	5,1 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,6

* diferente de T-20 (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Friedman em blocos com repetições múltiplas, seguido pelo teste de Dunnett, $p \leq 0,05$)

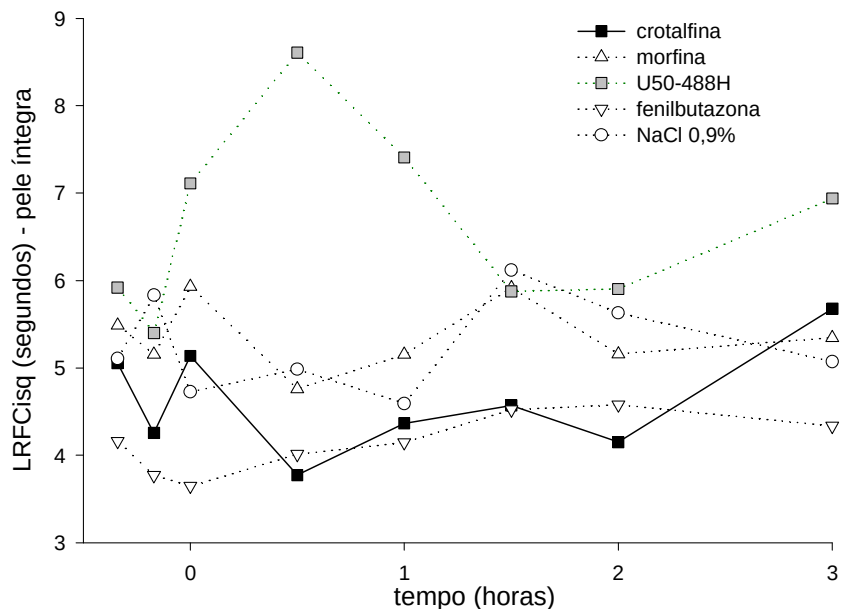


Figura 12 - Latência para o reflexo do frêmito cutâneo na pele íntegra da região isquiática (segundos) (média) observada após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA.

Tanto na região escapular como na isquiática, o estímulo térmico gerado pela lâmpada (140°C) ocasionou queimadura cutânea nos cavalos e a lesão permaneceu até o sétimo dia de aferição (Figura 13).



Figura 13 – Lesão de pele decorrente de queimadura provocada pela exposição ao foco de luz artificial sete dias após a aplicação do estímulo térmico, na região isquiática de um equino PSA.

Na avaliação do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região escapular (LNEMesc) em pele íntegra (Tabela 17 e na Figura 14) observou-se:

- entre tempos:
 - em GC, T0 foi maior que T3h, T6h, T12h, T24h, T2d, T3d e T5d;
 - em GCRO, T0 foi maior que T3h, T2d, T3d, T5d e T7d;
 - em GM, T0 foi maior que T3h, T6h e T12h;
 - em GK, T0 foi menor que T6h e maior que T5d e T7d;
 - em GF, T0 foi menor que T3h, T6h, T12h e maior que T7d.
- entre grupos:
 - em T0, GC foi maior que GCRO, GM, GK e GF; GM foi maior que GCRO e GF;

- em T3h, GK foi maior que GC, GCRO, GM and GF; GM foi maior que GC, GCRO e GF; GC foi maior que GCRO; GF foi menor que GC e GCRO;
- em T6h, GM foi maior que GC, GCRO, GK e GF; GK foi maior que GCRO e GF; GF e GC foram superiores a GK; GC foi maior que GCRO e GF.
- em T12h, GK foi maior que GC, GCRO, GM e GF; GM foi maior que GC, GCRO e GF; GCRO foi maior que GF e menor que GC;
- em T24h e T5d, GK foi maior que GC, GCRO, GM e GF; GM foi maior que GC, GCRO e GF.
- em T2d, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF;
- em T3d, não houve diferença;
- em T7d, GK foi maior que GCRO.

Tabela 17 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região escapular de cavalos PSA.

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T0	261 $\pm$ 27 a b c d	80 $\pm$ 23	211 $\pm$ 30 a d	153 $\pm$ 29	75 $\pm$ 23
T3h	17 $\pm$ 12 * a b c d	5 $\pm$ 5 *	59 $\pm$ 21 * a d	57 $\pm$ 18 a b d	2 $\pm$ 2 * a
T6h	104 $\pm$ 25 * a b c d	5 $\pm$ 5	141 $\pm$ 29 * a c d	51 $\pm$ 19 * a d	0 $\pm$ 0*
T12h	75,6 $\pm$ 23 * a b c	39 $\pm$ 17d	111 $\pm$ 26 * a d	284 $\pm$ 29 a b d	0 $\pm$ 0*
T24h	85 $\pm$ 24 * b c	21 $\pm$ 11	156 $\pm$ 28 a d	298 $\pm$ 27 a b d	50 $\pm$ 19
T2d	172 $\pm$ 30 * a	86 $\pm$ 23 * b c d	222 $\pm$ 29	297 $\pm$ 29	158 $\pm$ 29
T3d	223 $\pm$ 31 *	81 $\pm$ 23 *	216 $\pm$ 30	224 $\pm$ 30	68 $\pm$ 22
T5d	193 $\pm$ 45 * b c	78 $\pm$ 22 *	255 $\pm$ 30 a d	308 $\pm$ 28 * a b d	135 $\pm$ 28
T7d	224 $\pm$ 31	120 $\pm$ 27 *	273 $\pm$ 30	294 $\pm$ 29 * a	214 $\pm$ 28 *

* diferente de T0 (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

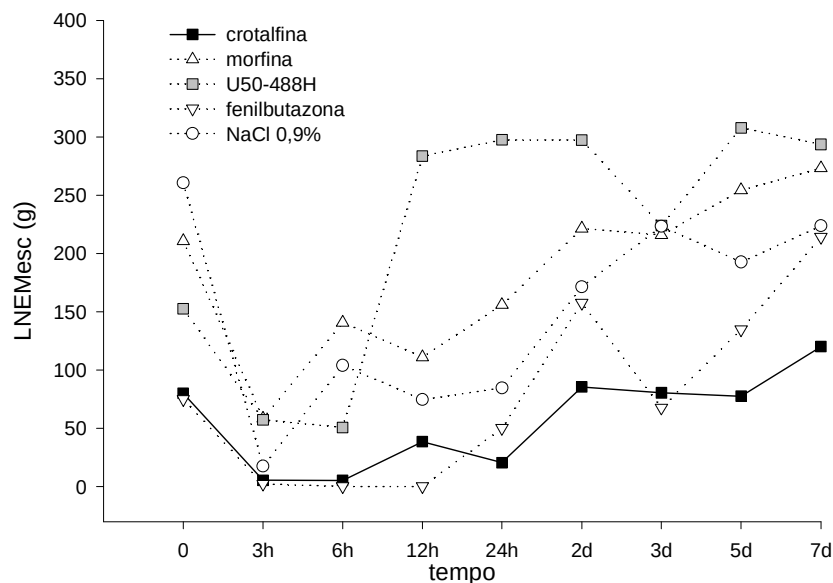


Figura 14 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região escapular de cavalos PSA.

Na avaliação do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMiscq) em pele íntegra (Tabela 18 e Figura 15) verificou-se:

- entre tempos:
 - não ocorreu mudança significativa em GM e GK;
 - em GC, T0 foi maior que T3h, T6h, T12h e T24h;
 - em GCRO, T0 foi maior que T3h;
 - em GF, T0 foi maior que T3h e T12h.
- entre grupos:
 - em T0, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF; GC foi maior que GM, GK e GF; GK foi maior que GM;
 - em T3h, GCRO foi maior que GC, GM, GF e GK; GF foi menor que GC, GM e GK;
 - em T6h, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF;
 - em T12h, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF; GK foi maior que GC e GF; GM foi maior que GC e GF;
 - em T24h, GC foi menor que GCRO, GM, GK e GF;

- em T2d, não ocorreu mudança significativa;
- em T3d, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF;
- em T5d, GCRO foi maior que GC, GM, GK e GF; GC foi maior que GM;
- em T7d, GCRO foi maior que GM.

Tabela 18 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região isquiática de cavalos PSA.

Tempo	GC	GCRO	GM	GK	GF
T0	390 $\pm$ 17 a b c d	438 $\pm$ 8 b c d	276 $\pm$ 29	326 $\pm$ 27 b	280 $\pm$ 26
T3h	204 $\pm$ 29 * a d	316 $\pm$ 28 * b c d	269 $\pm$ 29	281 $\pm$ 29	91 $\pm$ 23 * b c
T6h	213 $\pm$ 30*	361 $\pm$ 24	213 $\pm$ 29	298 $\pm$ 29	217 $\pm$ 30
T12h	167 $\pm$ 28 * a b c	378 $\pm$ 20 b c d	209 $\pm$ 29	298 $\pm$ 29	107 $\pm$ 24 * b c
T24h	218 $\pm$ 30 * a b c d	377 $\pm$ 22	263 $\pm$ 29	292 $\pm$ 29	273 $\pm$ 29
T2d	300 $\pm$ 29	373 $\pm$ 23	263 $\pm$ 30	313 $\pm$ 28	241 $\pm$ 27
T3d	315 $\pm$ 28 a	444 $\pm$ 3 b c d	224 $\pm$ 31	339 $\pm$ 26	194 $\pm$ 27
T5d	365 $\pm$ 24 a b	447 $\pm$ 0 b c d	236 $\pm$ 29	324 $\pm$ 27	303 $\pm$ 26
T7d	372 $\pm$ 23	447 $\pm$ 0 b	292 $\pm$ 29	359 $\pm$ 24	376 $\pm$ 18

* diferente de T0 (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

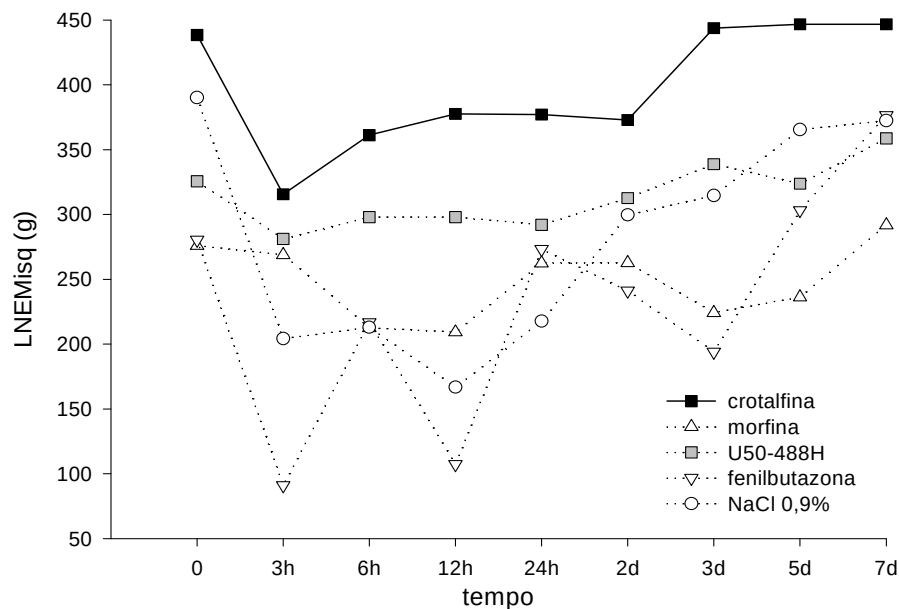


Figura 15 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), na pele íntegra da região isquiática de cavalos PSA.

Na avaliação do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região escapular (LNEMesc) em pele incisionada (Tabela 19 e Figura 16), observou-se:

- entre tempos:
 - em GCRO, T0 foi menor que T3d e T5d; T0 foi maior que T12h, T24h, T2d e T7d;
 - em GM, T0 foi maior que T6h, T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d;
 - em GK, T0 foi maior que T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d;
 - em GF, T0 foi menor que T24h, T3d e T5d; T0 superou T6h, T12h, T2d e T7d.
- entre grupos:
 - em T0, GK foi maior que GCRO e GF; GM foi maior que GCRO e GF;
 - em T3h, GK foi maior que GM e GF; GF foi menor que GCRO e GM;
 - em T6h, GK foi maior que GCRO, GM e GF; GF foi menor que GCRO e GM;
 - em T12h, GM foi maior que GCRO e GF; GF foi menor que GK;
 - em T2d, GF foi menor que GCRO e GM;
 - em T3d, GF foi menor que GCRO e GM; GF foi maior que GK;
 - em T5d, GF foi maior que GM; GF foi menor que GCRO; GCRO foi maior que GK;
 - em T24h e T7d, não houve diferença significativa.

Tabela 19 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região escapular após a administração de crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória.

Tempo	GCRO	GM	GK	GF
T0	61 $\pm$ 17	197 $\pm$ 25 a d	285 $\pm$ 26 a d	28 $\pm$ 11
T3h	155 $\pm$ 24	121 $\pm$ 20	158 $\pm$ 22 b d	1 $\pm$ 0 a b
T6h	56 $\pm$ 16	41 $\pm$ 13 * a d	202 $\pm$ 28 a b d	2 $\pm$ 0 * a b
T12h	56 $\pm$ 17 *	59 $\pm$ 16 *	22 $\pm$ 8 *	0 $\pm$ 0 * c
T24h	38 $\pm$ 15 *	64 $\pm$ 17 *	30 $\pm$ 14 *	54 $\pm$ 15 *
T2d	61 $\pm$ 18 *	43 $\pm$ 15 *	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0 * a b
T3d	72 $\pm$ 19 *	69 $\pm$ 17 *	42 $\pm$ 16 *	48 $\pm$ 14 * a b c
T5d	100 $\pm$ 21 * c	15 $\pm$ 9 *	33 $\pm$ 14 *	50 $\pm$ 15 * a b
T7d	13 $\pm$ 9 *	7 $\pm$ 6 *	67 $\pm$ 21 *	12 $\pm$ 6 *

* diferente de T0 (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

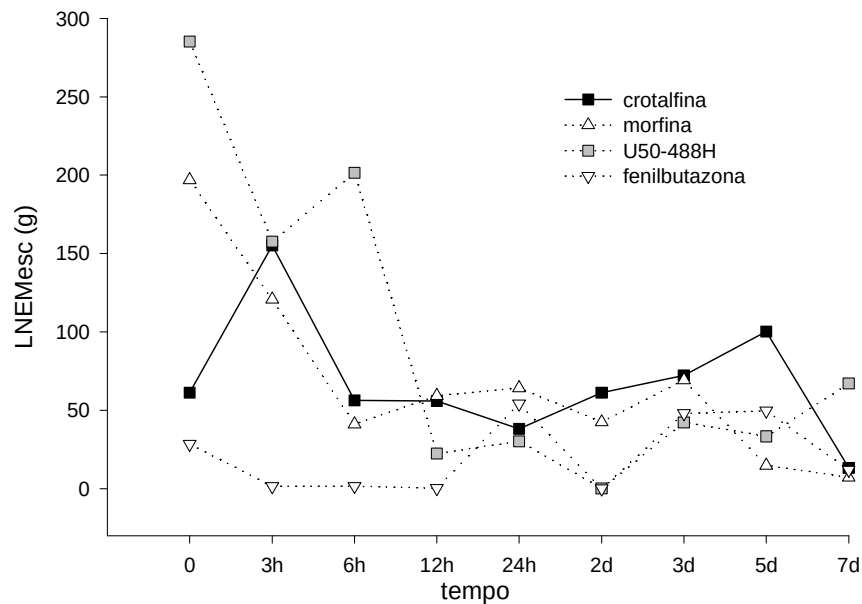


Figura 16 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado na região escapular após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória.

Na avaliação do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (LNEMisq) em pele incisionada (Tabela 20 e Figura 17), verificou-se:

- entre tempos:
 - em GCRO, T0 foi menor que T3h;
 - em GM, T0 foi maior que T6h e T12h;
 - em GK, T0 foi maior que T12h;
 - em GF, T0 foi maior que T24h.
- entre grupos:
 - em T0, T24h, T2d, T5d e T7d, GF foi menor que GCRO, GM e GK;
 - em T3h, GCRO foi maior que GM, GK e GF; GF foi menor que GM e GK;
 - em T6h, GCRO foi maior que GM e GF; GK foi maior que GF;
 - em T12h, GCRO foi maior que GM, GK e GF;
 - em T3d, GF foi menor que GCRO, GM e GK; GCRO foi maior que GM;

Tabela 20 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico na região isquiática (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região isquiática após a administração de crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória.

Tempo	GCRO	GM	GK	GF
T0	353 $\pm$ 19	349 $\pm$ 18	336 $\pm$ 23	193 $\pm$ 24 a b c
T3h	440 $\pm$ 5 * b c d	284 $\pm$ 23	297 $\pm$ 24	176 $\pm$ 23 b c
T6h	348 $\pm$ 18 b d	246 $\pm$ 23 *	304 $\pm$ 25 d	187 $\pm$ 22
T12h	395 $\pm$ 15 b c d	267 $\pm$ 22 *	244 $\pm$ 28 *	228 $\pm$ 23
T24h	387 $\pm$ 17	330 $\pm$ 23	336 $\pm$ 24	159 $\pm$ 23 * a b c
T2d	394 $\pm$ 16	321 $\pm$ 22	299 $\pm$ 27	194 $\pm$ 22 a b c
T3d	388 $\pm$ 16 b	287 $\pm$ 24	351 $\pm$ 24	214 $\pm$ 20 a b c
T5d	374 $\pm$ 16 a b c	373 $\pm$ 20	397 $\pm$ 16	190 $\pm$ 22
T7d	388 $\pm$ 14 a b c	328 $\pm$ 20	356 $\pm$ 23	132 $\pm$ 18

* diferente de T0 (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

a diferente de GCRO (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

b diferente de GM (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

c diferente de GK (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

d diferente de GF (Kruskal-Wallis em blocos, seguido pelo teste de Dunn, $p \leq 0,05$)

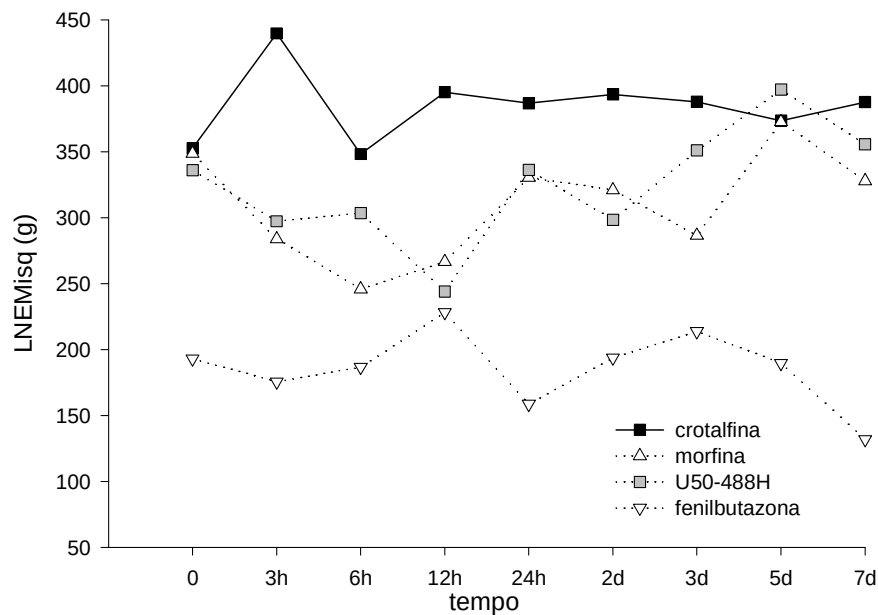


Figura 17 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média) observado na região isquiática após a administração de NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF), em cavalos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória.

Comparando-se os dados obtidos na aferição do LNE Mesc e LNE Misq em pele íntegra observou-se que os valores obtidos para a região isquiática foram superiores aos valores observados na região escapular em todos os tempos de GCRO e GF; T3h, T12h e T24h de GM; T0, T3h, T6h e T3d de GK. Em nenhum momento os valores da região escapular foram maiores que aqueles observados na região isquiática. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 21 e na Figura 18.

Tabela 21 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região da escápula (LNE Mesc) e da região isquiática (LNE Misq), em pele íntegra de equinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF).

	GCRO		GM		GK		GF	
Tempo	LNE Mesc	LNE Misq	LNE Mesc	LNE Misq	LNE Mesc	LNE Misq	LNE Mesc	LNE Misq
T0	80 $\pm$ 23	438 $\pm$ 8 #	211 $\pm$ 30	276 $\pm$ 29	153 $\pm$ 29	326 $\pm$ 27 #	75 $\pm$ 23	280 $\pm$ 26 #
T3h	5 $\pm$ 5	316 $\pm$ 28 #	59 $\pm$ 21	269 $\pm$ 29 #	57 $\pm$ 18	281 $\pm$ 29 #	2 $\pm$ 2	91 $\pm$ 23 #
T6h	5 $\pm$ 5	361 $\pm$ 24 #	141 $\pm$ 29	213 $\pm$ 29	51 $\pm$ 19	298 $\pm$ 29 #	0 $\pm$ 0	217 $\pm$ 30 #
T12h	39 $\pm$ 17	378 $\pm$ 20 #	111 $\pm$ 26	209 $\pm$ 29 #	284 $\pm$ 29	298 $\pm$ 29	0 $\pm$ 0	107 $\pm$ 24 #
T24h	21 $\pm$ 11	377 $\pm$ 22 #	156 $\pm$ 28	263 $\pm$ 29 #	298 $\pm$ 27	292 $\pm$ 29	50 $\pm$ 19	273 $\pm$ 29 #
T2d	86 $\pm$ 23	373 $\pm$ 23 #	222 $\pm$ 29	263 $\pm$ 30	297 $\pm$ 29	313 $\pm$ 28	158 $\pm$ 29	241 $\pm$ 27 #
T3d	81 $\pm$ 23	444 $\pm$ 3 #	216 $\pm$ 30	224 $\pm$ 31	224 $\pm$ 30	339 $\pm$ 26 #	68 $\pm$ 22	194 $\pm$ 27 #
T5d	78 $\pm$ 22	44 $\pm$ 0 #	255 $\pm$ 30	236 $\pm$ 29	308 $\pm$ 28	324 $\pm$ 27	135 $\pm$ 28	303 $\pm$ 26 #
T7d	120 $\pm$ 27	446 $\pm$ 0 #	273 $\pm$ 30	292 $\pm$ 29	294 $\pm$ 29	359 $\pm$ 24	214 $\pm$ 28	376 $\pm$ 18 #

diferente do valor verificado na região escapular (teste Mann-Whitney Runk Sam, $p \leq 0,05$)

Comparando-se os valores obtidos na aferição do LNEMesc e LNEMisq em pele incisionada, não houve diferença significativa apenas no T0 do GK; em todos os outros tempos de todos os grupos os valores de LNEMisq foram superiores aos de LNEMesc. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 22 e na Figura 18.

Tabela 22 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado na região da escápula (LNEMesc) e da região isquiática (LNEMisq), em pele incisionada de equínos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF).

Tempo	GCRO		GM		GK		GF	
	LNEMesc	LNEMisq	LNEMesc	LNEMisq	LNEMesc	LNEMisq	LNEMesc	LNEMisq
T0	61 $\pm$ 17	353 $\pm$ 19 #	197 $\pm$ 25	349 $\pm$ 18 #	285 $\pm$ 26	336 $\pm$ 23	28 $\pm$ 11	193 $\pm$ 24 #
T3h	155 $\pm$ 24	440 $\pm$ 5 #	121 $\pm$ 20	284 $\pm$ 23 #	158 $\pm$ 22	297 $\pm$ 24 #	1 $\pm$ 0	176 $\pm$ 23 #
T6h	56 $\pm$ 16	348 $\pm$ 18 #	41 $\pm$ 13	246 $\pm$ 23 #	202 $\pm$ 28	304 $\pm$ 25 #	2 $\pm$ 0	187 $\pm$ 22 #
T12h	56 $\pm$ 17	395 $\pm$ 15 #	59 $\pm$ 16	267 $\pm$ 22 #	22 $\pm$ 8	244 $\pm$ 28 #	0 $\pm$ 0	228 $\pm$ 23 #
T24h	38 $\pm$ 15	387 $\pm$ 17 #	64 $\pm$ 17	330 $\pm$ 23 #	30 $\pm$ 14	336 $\pm$ 24 #	54 $\pm$ 15	159 $\pm$ 23 #
T2d	61 $\pm$ 18	394 $\pm$ 16 #	43 $\pm$ 15	321 $\pm$ 22 #	0 $\pm$ 0	299 $\pm$ 27 #	0 $\pm$ 0	194 $\pm$ 22 #
T3d	72 $\pm$ 19	388 $\pm$ 16 #	69 $\pm$ 17	287 $\pm$ 24 #	42 $\pm$ 16	351 $\pm$ 24 #	48 $\pm$ 14	214 $\pm$ 20 #
T5d	100 $\pm$ 21	374 $\pm$ 16 #	15 $\pm$ 9	373 $\pm$ 20 #	33 $\pm$ 14	397 $\pm$ 16 #	50 $\pm$ 15	190 $\pm$ 22 #
T7d	13 $\pm$ 9	388 $\pm$ 14 #	7 $\pm$ 6	328 $\pm$ 20 #	67 $\pm$ 21	356 $\pm$ 23 #	12 $\pm$ 6	132 $\pm$ 18 #

diferente do valor verificado na região escapular (teste Mann-Whitney Runk Sam, $p \leq 0,05$)

Na comparação entre os valores obtidos de LNE Mesc entre pele íntegra e incisionada, observou-se que os valores encontrados na pele íntegra foram superiores aos valores verificados na pele incisionada em GCRO nos tempos T2d, T3d e T7d; GM nos tempos T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d; GK nos tempos T12h, T24h, T2d, T3d, T5d e T7d; GF nos tempos T2d, T3d, T5d e T7d. Os valores encontrados na pele incisionada foram superiores aos valores verificados na pele íntegra em GCRO nos tempos T3h, T6h, T24h e T5d; GM no tempo T3h; GK nos tempos T0, T3h e T6h; GF no tempo T24h. Tais dados estão exibidos na Tabela 23 e na Figura 18.

Tabela 23 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou incisionada na região da escápula (LNE Mesc) de eqüinos PSA tratados com crotalfina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF).

Tempo	GCRO		GM		GK		GF	
	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada
T0	80 $\pm$ 23	61 $\pm$ 17	211 $\pm$ 30	197 $\pm$ 25	153 $\pm$ 29	285 $\pm$ 26 &	75 $\pm$ 23	28 $\pm$ 11
T3h	5 $\pm$ 5	155 $\pm$ 24 &	59 $\pm$ 21	121 $\pm$ 20 &	57 $\pm$ 18	158 $\pm$ 22 &	2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0
T6h	5 $\pm$ 5	56 $\pm$ 16 &	141 $\pm$ 29	41 $\pm$ 13	51 $\pm$ 19 d	202 $\pm$ 28 &	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1
T12h	39 $\pm$ 17	56 $\pm$ 17	111 $\pm$ 26	59 $\pm$ 16 &	284 $\pm$ 29	22 $\pm$ 8 &	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
T24h	21 $\pm$ 11	38 $\pm$ 15 &	156 $\pm$ 28	64 $\pm$ 17 &	298 $\pm$ 27	30 $\pm$ 14 &	50 $\pm$ 19	54 $\pm$ 15 &
T2d	86 $\pm$ 23	61 $\pm$ 18 &	222 $\pm$ 29	43 $\pm$ 15 &	297 $\pm$ 29	0 $\pm$ 0 &	158 $\pm$ 29	0 $\pm$ 0 &
T3d	81 $\pm$ 23	72 $\pm$ 19 &	216 $\pm$ 28	69 $\pm$ 17 &	224 $\pm$ 30	42 $\pm$ 16 &	68 $\pm$ 22	48 $\pm$ 14 &
T5d	78 $\pm$ 22	100 $\pm$ 21 &	255 $\pm$ 30	15 $\pm$ 9 &	308 $\pm$ 28	33 $\pm$ 14 &	135 $\pm$ 28	50 $\pm$ 15 &
T7d	120 $\pm$ 27	13 $\pm$ 9 &	273 $\pm$ 30	7 $\pm$ 61 &	294 $\pm$ 29	67 $\pm$ 21 &	214 $\pm$ 28	12 $\pm$ 6 &

& diferente do valor verificado na pele íntegra (teste Mann-Whitney Runk Sam, $p \leq 0,05$)

Na comparação entre os valores obtidos de LNEMisq entre pele íntegra e incisionada, observou-se que os valores encontrados na pele íntegra foram superiores aos valores verificados na pele incisionada em GCRO em T0, T5d e T7d; GF nos tempos T24h, T2d, T5d e T7d. Os valores encontrados na pele incisionada foram superiores aos valores verificados na pele íntegra em GCRO no tempo T3h; GM nos tempos T3d e T5d; GF nos tempos T3h e T12h. Esses achados encontram-se ilustrados na Tabela 24 e na Figura 18.

Tabela 24 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou incisionada na região isquiática (LNEMisq) de eqüinos PSA tratados com crotalina (GCRO), morfina (GM), U50-488H (GK) ou fenilbutazona (GF).

Tempo	GCRO		GM		GK		GF	
	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada	íntegra	incisionada
T0	438 $\pm$ 8	353 $\pm$ 19 &	276 $\pm$ 29	349 $\pm$ 18	326 $\pm$ 27	336 $\pm$ 23	280 $\pm$ 26	193 $\pm$ 24
T3h	316 $\pm$ 28	440 $\pm$ 5 &	269 $\pm$ 29	284 $\pm$ 23	281 $\pm$ 29	297 $\pm$ 24	91 $\pm$ 23	176 $\pm$ 23 &
T6h	361 $\pm$ 24	348 $\pm$ 18	213 $\pm$ 29	246 $\pm$ 23	298 $\pm$ 29	304 $\pm$ 25	217 $\pm$ 30	187 $\pm$ 22
T12h	378 $\pm$ 20	395 $\pm$ 15	209 $\pm$ 29	267 $\pm$ 22	298 $\pm$ 29	244 $\pm$ 28	107 $\pm$ 24	228 $\pm$ 23 &
T24h	377 $\pm$ 22	387 $\pm$ 17	263 $\pm$ 29	330 $\pm$ 23	292 $\pm$ 29	336 $\pm$ 24	273 $\pm$ 29	159 $\pm$ 23 &
T2d	373 $\pm$ 23	394 $\pm$ 16	263 $\pm$ 30	321 $\pm$ 22	313 $\pm$ 28	299 $\pm$ 27	241 $\pm$ 27	194 $\pm$ 22 &
T3d	444 $\pm$ 3	388 $\pm$ 16	224 $\pm$ 31	287 $\pm$ 24 &	339 $\pm$ 26	351 $\pm$ 24	194 $\pm$ 27	214 $\pm$ 20
T5d	447 $\pm$ 0	374 $\pm$ 16 &	236 $\pm$ 29	373 $\pm$ 20 &	324 $\pm$ 27	397 $\pm$ 16	303 $\pm$ 26	190 $\pm$ 22 &
T7d	447 $\pm$ 0	388 $\pm$ 14 &	292 $\pm$ 29	328 $\pm$ 20	359 $\pm$ 24	356 $\pm$ 23	376 $\pm$ 18	132 $\pm$ 18 &

& diferente do valor verificado na pele íntegra (teste Mann-Whitney Runk Sam, $p \leq 0,05$)

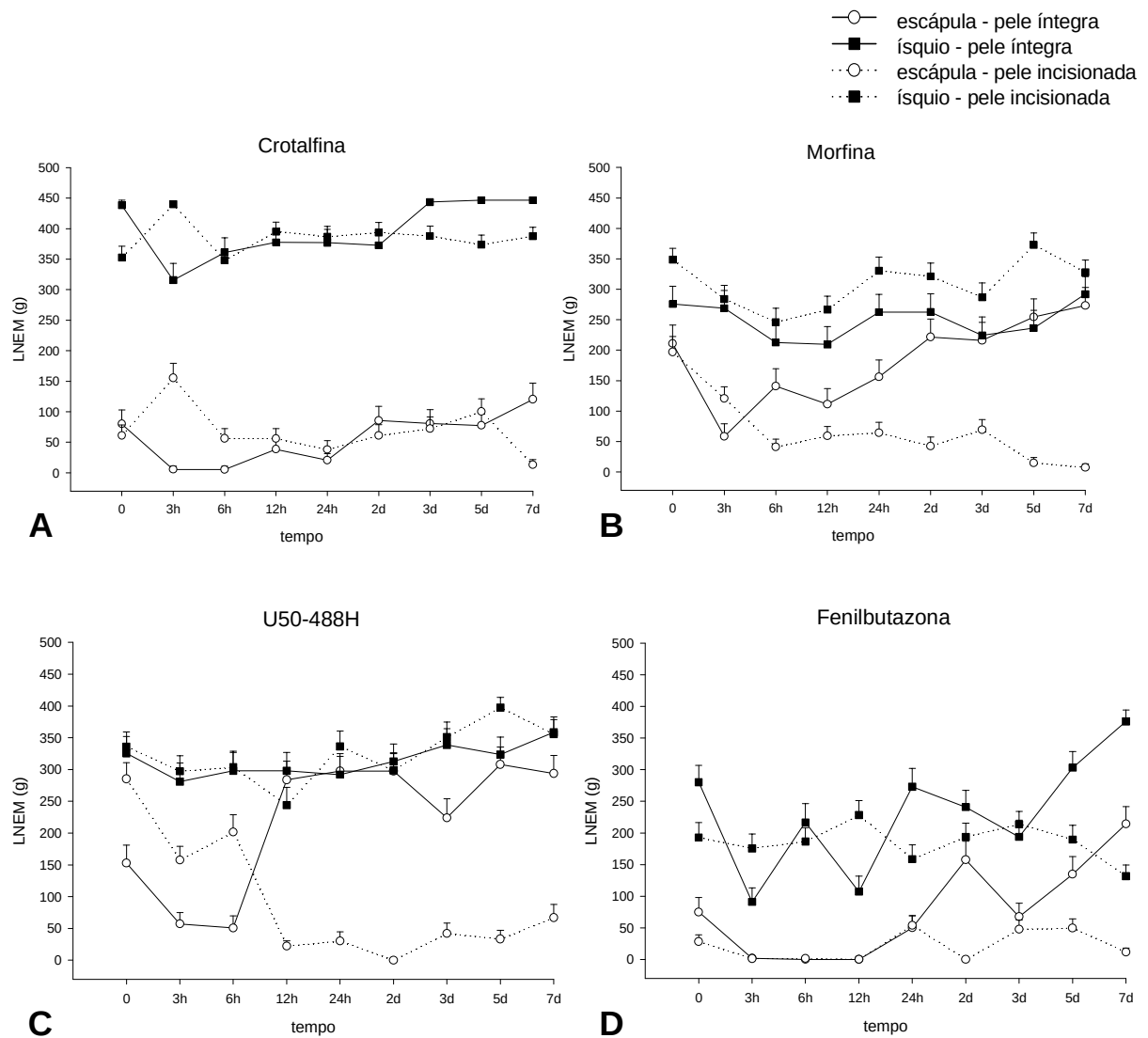


Figura 18 – Limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (gramas) (média $\pm$ erro padrão) observado em pele íntegra ou submetida a modelo incisional de dor inflamatória na região escapular ou isquiática de cavalos PSA tratados com crotalina (A), morfina (B), U50-488H (C) ou fenilbutazona (D).

DISCUSSÃO

Os estímulos nociceptivos são conduzidos por diferentes fibras sensitivas e estimulam os receptores glutaminérgicos no corno dorsal da medula espinhal. O sistema opioide modula a resposta nociceptiva produzindo efeito antinociceptivo periférico pronunciado no tecido inflamado (STEIN, 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; TRUONG et al., 2003). A expressão de receptores e sua distribuição no tecido lesionado (HASSAN et al., 1993; CAHILL et al., 2003) interferem na potência dos agonistas opióides de acordo com a natureza do estímulo e o tecido lesionado (MILLAN, 1986) e conforme o estágio da reação inflamatória, há ativação dos receptores opióides periféricos (STEIN, 1993). A distribuição espinhal dos receptores mu se dá por toda a medula, enquanto os receptores kappa e delta restringem-se, respectivamente, aos segmentos lombo-sacro e cervical (CHRUBASIK et al., 1993; SINATRA, 1993). Sabe-se que os agonistas kappa estão implicados na sedação e analgesia isentas de efeitos sobre a frequência cardíaca e temperatura corporal (KAMERLING et al., 1985; KAMERLING et al., 1989). O U50-488H é considerado o agonista kappa padrão (DHAWAN et al., 1989; RANG et al., 2004a) e, em eqüinos, gera analgesia ao aumentar o limiar nociceptivo, além de promover sedação e efeitos colaterais mínimos (KAMERLING et al., 1988).

Como a crotalfina é um agonista de receptores kappa, espera-se que muitas das observações obtidas com o U50-488H lhes sejam comuns. Da mesma forma, os estudos realizados com a administração do veneno crotálico favorecem a obtenção de subsídios para que se interprete o efeito antinociceptivo da crotalfina, em eqüinos.

Assim, na avaliação da latência para o frêmito cutâneo na região escapular e isquiática verificou-se que o efeito produzido pela crotalfina foi praticamente nulo, corroborando com STEIN (1993) e ANTONIJEVIC et al. (1995) que inferem que ação antinociceptiva dos agonistas opióides é pronunciada no tecido inflamado, mas pouco evidente em tecidos íntegros. Neste particular, foi similar o efeito também observado para a morfina. O U50-488H superou as expectativas ao aumentar a latência ao estímulo térmico entre T30 e T60, mas notou-se redução dessa resposta nos períodos

subseqüentes. Possivelmente, um dos aspectos a ser focado é o fato da crotalina induzir a liberação de IL-10 e, portanto, exercer ação antiinflamatória (FIORENTINO et al., 1991; WALL MALEFYT et al., 1991). Por outro lado, a aplicação do estímulo térmico sobre o mesmo ponto pode ter favorecido a instalação de hiperalgesia (LEMONICA & PEREIRA, 1992). Não há dúvida que o modelo de estimulação térmica seja válido para avaliar o efeito da crotalina, pois já se empregou com sucesso o modelo da placa quente em ratos submetidos à administração do veneno crotálico (BRIGATTE et al., 2001), no qual a crotalina mostrou-se analgésica.

Na avaliação do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico em pele íntegra, a crotalina foi mais eficiente, mas ainda é preciso considerar que o efeito antinociceptivo das agonistas opióides é mais pronunciado no tecido inflamado (STEIN, 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995). Nesta avaliação houve diferença de ação da crotalina conforme o local de avaliação, sendo que na região escapular o U50-488H foi o fármaco que promoveu melhor resposta, mas na região isquiática a crotalina mostrou-se mais eficaz. No modelo de estimulação mecânica, a crotalina foi importante, principalmente quando o estímulo foi realizado na região isquiática, exibindo a importância da distribuição lombo-sacra dos receptores kappa na medula espinhal (CHRUBASIK et al., 1993; SINATRA, 1993), fato que favorece a resposta antinociceptiva na região isquiática.

Ao aferir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico em pele incisionada nota-se melhor a ação da crotalina. A crotalina mostra maior capacidade de elevar o limiar nociceptivo na região isquiática, pois este fármaco interage com receptores kappa, que se concentram na região lombo-sacra da medula espinhal (CHRUBASIK et al., 1993; SINATRA, 1993), deixando claro que a localização dos receptores kappa e o local da injúria são importantes para que o fármaco induza analgesia satisfatória. Como se utilizou modelo experimental de dor inflamatória, os relatos prévios de efeito antinociceptivo após a administração do veneno de cascavel em roedores submetidos a diferentes modelos experimentais de dor inflamatória podem ser extrapolados (GIORGI et al., 1993; PICCOLO et al., 2000; BRIGATTE et al., 2001; PICCOLO & CURY, 2004). No modelo da hiperalgesia induzida por carragenina em ratos, uma única dose preventiva

do veneno promoveu efeito analgésico potente quando o estímulo foi realizado no membro pélvico (PICOLO et al., 1998), efeito antiinflamatório sobre o edema por até sete dias e sobre a migração celular por até 21 dias (NUNES et al., 2007). Diante da evidência que o veneno de cascavel possui atividade antiinflamatória, seu efeito antinociceptivo é melhor quando a administração ocorra após o início da inflamação (NUNES et al., 2007), conforme foi realizado neste experimento. Assim, fica óbvio que para a ação antinociceptiva promovida pela injeção intravenosa de crotalina seja máxima, em eqüinos, existe dependência da presença de reação inflamatória e, ainda, da localização da injúria.

O tempo de ação da crotalina é melhor explorado ao se utilizar a região isquiática submetida ao modelo incisional de dor inflamatória. Notam-se duas fases importantes, sendo que a primeira vai de T0 a T6h, quando a força necessária para provocar reação aversiva é significativamente maior que os valores encontrados em pele íntegra. Uma segunda fase vai de T6h até T3d, quando o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico é igual ao verificado em pele íntegra, evidenciando que o fármaco conseguiu combater a instalação da hiperalgesia, evitando estados hipernociceptivos. Só após T3d nota-se que a região lesionada apresenta limiar menor que o da pele íntegra, mostrando que o fármaco já não é capaz de impedir a hiperalgesia.

A antinocicepção prolongada da crotalina corrobora com os relatos sobre a ação do veneno crotálico que evidenciam efeito analgésico potente e duradouro (PICOLO et al., 1998), além de ação antiinflamatória importante por até sete dias e sobre a migração celular por até 21 dias (NUNES et al., 2007) devido a menor liberação de prostaglandinas, inalteração da expressão protéica de COX₁ e não indução da expressão de COX₂ por até 24 horas após a injeção (MOREIRA et al., 2007). Esses sinais de efeito antiinflamatório ocorrem porque o veneno crotálico aumenta a liberação da citocina antiinflamatória IL-10 (FIORENTINO et al., 1991; WAAL MALEFYT et al., 1991) e eleva o nível plasmático de glicocorticóides por meio da estimulação do eixo adrenal-hipófise-hipotálamo (CHISARI et al., 1998). Estes eventos são evidentes nas vítimas de acidentes ofídicos com a serpente *Crotalus durissus terrificus*, pois não se verifica reação inflamatória significativa no local da picada e, ainda, há relato de

analgesia na área afetada (SOUSA E SILVA et al., 1996). Esses relatos do efeito antiinflamatório promovido pelo veneno podem ser utilizados para explicar a ação da crotalina e explicar o tempo prolongado da ação anti-hipernociceptiva.

Outro aspecto a se considerar é a possível capacidade da crotalina em inibir a sensibilização central, o que justificaria o efeito anti-hipernociceptivo por até três dias, como foi observado. Sabe-se que os estímulos nocivos mecânicos ou térmicos sensibilizam os nociceptores específicos e causam hiperalgesia primária na região lesionada e inflamada, além da hiperalgesia secundária evidenciada pela maior sensibilidade na área não lesionada ao redor da injúria, refletindo as alterações decorrentes da sensibilização central (STUBHAUG et al., 1997; FINE & ASHBURN, 1998). Quanto aos opióides, já foi comprovado que a administração sistêmica preventiva de doses baixas de morfina inibe a sensibilização central e, conseqüentemente, os estados hipernociceptivos. Todavia, após estabelecimento da sensibilização central são necessárias maiores doses de morfina para que se alcance analgesia adequada, o que pode promover efeitos colaterais (WARNCKE et al., 2000). Assim, há melhor analgesia pós-operatória se os opióides forem administrados de modo preventivo (KEEGAN et al., 1995) devido à prevenção da sensibilização central que é comprovada pela redução da dor e retardo da necessidade de analgesia pós-cirúrgica em humanos pré-tratados com opióides (SCULL et al., 1998). Assim, o longo período de ação anti-hipernociceptiva da crotalina provavelmente se deva à capacidade deste fármaco de combater a sensibilização central e, conseqüentemente, inibir os estados hipernociceptivos. Ademais, embora o fármaco não tenha sido aplicado antes da injúria, foi administrado imediatamente após a sutura, o que talvez ainda tenha favorecido a prevenção da hiperalgesia.

Neste estudo utilizou-se a dose de crotalina (3,8 ng/kg) que foi calculada por escalonamento logarítmico a partir da extrapolação alométrica da dose de crotalina administrada com sucesso em ratos e, posteriormente, estudada por meio de avaliação comportamental. Portanto, não se realizou a curva dose-efeito da crotalina em relação ao efeito antinociceptivo. Assim, embora seja conhecido que os opióides atuam melhor mediante tecido inflamado (CHISARI et al., 1998; MOREIRA et al., 2007; NUNES et al.,

2007), talvez o aumento da dose de crotalfina poderia promover maior eficiência na instalação de efeito anti-nociceptivo, inclusive em pele íntegra. Outro aspecto é que a analgesia gerada pela ativação dos receptores kappa geralmente está associada à analgesia visceral (THURMON et al., 1996), comprovado pela analgesia eficiente após o uso de butorfanol em eqüinos portadores de distúrbios gastrintestinais (DUCHARME, 2003; GLEED, 2003) e, no presente estudo aferiu-se a presença de desconforto em tecido somático. Embora CHRUBASIK et al. (1993) e SINATRA (1993) relatem que os receptores kappa não interfiram na nocicepção somática, em gatos já foi demonstrado que doses baixas de butorfanol promovem analgesia visceral efetiva e prolongada por até seis horas, mas com doses mais altas pode-se obter analgesia somática por até duas horas (WAGNER, 1999). Dessa forma, é possível sugerir que como neste estudo observou-se analgesia somática com o uso de 3,8ng/kg de crotalfina, provavelmente esta dose já seria capaz de promover analgesia visceral efetiva em eqüinos, mas isto ainda requer estudos futuros.

Assim, provavelmente a crotalfina possa ser indicada como um analgésico eficiente no combate a dor em eqüinos e futuros estudos que avaliem a ação da crotalfina frente a modelos de dor que incluam a participação de cavalos portadores de processos álgicos de origem visceral e somática, assim como pesquisas que avaliem outros protocolos de administração da crotalfina, poderão auxiliar o uso deste fármaco na espécie eqüina. Além disso, a realização de pesquisas sobre a utilização da crotalfina em outras espécies animais e no ser humano surge como uma importante alternativa terapêutica para beneficiar a saúde e o bem-estar desses indivíduos.

CONCLUSÃO

A administração intravenosa de crotalfina (3,8ng/kg), em eqüinos, gera efeito antinociceptivo por até seis horas e inibe a instalação de estados hipernociceptivos por até três dias, em modelo incisional de dor inflamatória realizado em região isquiática. O uso de crotalfina em pele íntegra e em região escapular incisionada não promove efeito antinociceptivo relevante.

REFERÊNCIAS¹⁸

- ANTONIJEVIC, I.; MOUSA, S. A.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Perineural defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 165-172, 1995.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAH JR., V.; **Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier - FAPESP, 2003. p.91-98.
- BECHARA, A.; VAN DER KOOY, D. Kappa receptors mediate the peripheral aversive effects of opiates. **Pharmacological Biochemistry and Behavior**, v.28, p.227-233, 1987.
- BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of a single and long-term haloperidol administration on open-field behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 73, p. 171-175, 1981.
- BESTER, H.; MENENDEZ, L.; BESSON, J. M.; BERNARD, J. F. Spino(trigemio)parabrachiohypotalamic pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. **Journal of Neurophysiology**, v.73, n.2, p.568-585, 1995.
- BORKOWSKI, K. R. Studies on the adrenomedullary dependence of kappa-opioid agonist-induced diuresis in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, n.4, p. 1151-1156, 1989.
- BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v.64, p.493-501, 1996.
- BRIGATE, P.; SAMPAIO, S.; GUTIERREZ, V.; CURI, R.; SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; GUERRA, J. L.; CURY, Y. Whole *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces antinociception in a rat model of cancer pain and crotoxin inhibits tumor growth. In: International Symposium of Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: International Symposium of Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation, 2004. p.127.
- BRIGATTE, P.; HOFFMANN, F. A.; BERNARDI, M. M.; GIORGI, R.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; BARROS, S. B. M.; ALMEIDA, M. G.; CURY, Y. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediate by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon**, v.39, p.1399-1410, 2001.
- BRYANT, C. E.; ENGLAND, G. C.; CLARKE, K. W. Comparison of the sedative effects of medetomidine and xylazine in horses. **Veterinary Records**, v. 129, p. 421-423, 1991.
- CAHILL, C.M.; MORINVILLE, A.; HOFFERT, C.; O'DONNELL, D.; BEAUDET, A. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. **Pain**, v. 101, p. 199-208, 2003.
- CAMARGO, F. C.; LEHNER, A. F.; KARPIESIUKE, W.; STIRLING, K.; KAVANAGH, P. V.; BRENNAN, N.; DOWLING, M.; TOBIN, T. Review of Environmental Morphine Identifications: Worldwide Occurrences and Responses of Authorities. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 51, 2005, Seattle. **Anais...** Seattle: American Association of Equine Practitioners, 2005. Disponível em

¹⁸ Conforme normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

<<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 11/01/2008.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS. Disponível em: <<http://tempo1.cptec.inpe.br/>>. Acesso em 08/11/2007.

CHIARI, A. I.; EISENACH, J. C. Intrathecal adenosine: interactions with spinal clonidine and neostigmine in rat models of acute nociception and postoperative hypersensitivity. **Anesthesiology**, v. 90, n.5, p.1413-1421, 1999.

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M. J. GIOVAMBATTISTA, A.; GAILLARD, R. C. A phospholipase A₂-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: determination of different sites of action. **Endocrinology**, v.139, p.617-625, 1998.

CHRISTOVÃO, F. G. **Comparação dos Efeitos Sedativos e Antinociceptivo da Romifidina e da Xilazina em Equinos.** 2002. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

CHRUBASIK, J., CHRUBASIK, S., MARTIN, E. The ideal epidural opioid - Fact or fantasy?. **European Journal of Anaesthesia**, v.10, p.79-100, 1993.

CLARK, J. A.; LIU, L.; PRICE, M.; HERSH, B.; EDELSON, M.; PASTERNAK, G. W. Kappa opioid receptor multiplicity: evidence for two U50-488H-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.251, p.461-468, 1989.

COLAHAN, P. T.; MAYHEW, I. G.; MERRITT, A. M.; MOORE, J. N. Integument. In: _____ **Equine Medicine and Surgery**. 5^a ed. St. Louis: Mosby, 1999. p.1787-1946.

COMBIE, J.; DOUGHERTY, J.; NUGENT, E.; TOBIN, T. The pharmacology of narcotic analgesics in the horse – IV – Dose and time response relationship for behavioral responses to morphine, meperidine, pentazocine, anileridine, methodone and hydromorphone. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v.3, p.377-385, 1979.

CUNHA, T. M.; VERRI JR., W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.3, p.401-407, 2004.

DANNEMAN, P. J. Monitoring of analgesia. In: KOHN, D. F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. London: Academic Press, 1997. p.83-103.

DAUDT, A.W.; HADLICH, E.; FACIN, M.A.; APRATO, R.M.S.; PEREIRA, R.P. Opióides no manejo da dor - uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.44, n.2, p.106-110, 1998.

DENSON, D. D.; KATZ, J. A. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. M. **Acute Pain - Mechanisms and Management**. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. p.112-123.

DHAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P. S.; HAMON, M. Classification of opioid receptors. **Pharmacological Reviews**, v.48, p.567-592, 1989.

DI CHIARA, G. D.; IMPERATO, A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.244, p.1067-1080, 1988.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology**, v.26, p.1235-1238, 1987.

DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.55, n.1, p. 135-146, 2005.

DUCHARME, N. G. Tratamiento postoperatorio y complicaciones. In: MAIR, T.; DIVERS, T.; DUCHARME, N. **Manual de Gastroenterología Equina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2003. p. 221-282.

DUKE, M. A.; MEIER, T. L.; BOLANOS, C. A.; CRAWFORD, C. A.; McDOUGALL, S. A. Paradoxical effects of kappa-opioid stimulation on the locomotor activity and Fos immunoreactivity of the preweaning rat: role of dopamine receptors. **Behavioral Neuroscience**, v.111, p.1114-1422, 1997.

ESTES, D.; KAPLAN, K. Lack of platelet effect with the aspirin analog, salsalate. **Arthritis and Rheumatism**, v.23, p.1303-1307, 1980.

FEITOSA, F. L. F. Exame físico geral ou de rotina. In: _____ **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. p.77-102.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins: peripheral and central analgesia. In: BONICA, J. J.; LINDBLOM, U.; IGGO, A. **Advances in Pain Research and Therapy**. New York: Raven Press, 1983. p.627-634. v.5.

FINE, P. G.; ASHBURN, M. A. Functional neuroanatomy and nociception. In: ASHBURN, M. A.; RICE, L. J. **The Management of Pain**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1998. p.1-16.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, p.3815-3822, 1991.

GAVERIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, B. Opioid receptors: gene structure and function. In: STEIN, C. **Opioids in Pain Control - Basic and Clinical Aspects**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p.1-21.

GIANUTSOS, G.; DRAWBAUGH, R. B.; HYNES, M. D.; LAL, H. Behavioral evidence for dopaminergic supersensitivity after chronic haloperidol. **Life Science**, v. 14, p. 887 – 898, 1974.

GIORGI, R. BERNARDI, M. M.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.31, p.1257-1265, 1993.

GLEED, R. D. Cirugía del cólico (incluyendo anestesia). In: MAIR, T.; DIVERS, T.; DUCHARME, N. **Manual de Gastroenterología Equina**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2003. p. 171-220.

GÓRNIK, S. L. Hipnoanalgésicos e neuroleptoanalgesia. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. p. 140-146.

- GUÉ, M., FIORAMONTI, J., JUNIEN, J. L., BUENO L. Orally administered kappa but not mu opiate agonists enhance gastric emptying of a solid canned food meal in dogs. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.40, n.12, p.873-875, 1988.
- GUIRRO, E. C. B. P. **Injeção Epidural de Morfina, Xilazina ou Clonidina na Dor Pós-incisional, em Eqüinos**. 2005. 116f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- GUTIERREZ, V. P. **Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a Dor Neuropática e a Resposta Imune**. 2005. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- HASSAN, A. H. S.; ABLEITNER, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v. 55, p. 185-195, 1993.
- HORAN, P. J.; DE COSTA, B. R.; RICE, K.; HAASETH, R. C.; HRUBY, V. J.; PORRECCA, F. Differential antagonism of bremazocine and U69,593 induced antinociception by quadozacine: further functional avoidance of opioid receptor multiplicity in the mouse. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.266, p.926-933, 1993.
- HUBBELL, J.A.E. Chemical Restraint for Standing Procedures in the Horse. In: North American Veterinary Conference, 5, 2006, Orlando. **Anais...** Orlando: North American Veterinary Conference, 2006. Disponível em <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 11/01/2008.
- JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. M. **Acute Pain - Mechanisms & Management**. Missouri: Mosby Year Book, 1992. p.8-28.
- KALPRAVIDH, M.; LUMB, W.V.; WRIGHT, R.B. Effects of butorphanol, flunixin, levorphanol, morphine, and xylazine in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.2, p. 217-223, 1984.
- KAMERLING, S.; DEQUICK, D. J.; WECKMAN, T. J; TOBIN, T. Dose related effects of fentanyl on autonomic and behavioral responses in performance horses. **General Pharmacology**, v.16, p.253-258, 1985.
- KAMERLING, S.; DEQUICK, D.; WECKMAN, T.; TOBIN, T. Dose-related effects of etilketazocina on nociception, behavioral and autonomic responses in the horse. **Journal of Pharmacology**, v.38, p.40-45, 1986.
- KAMERLING, S.; WECKMAN, T.; DONAHOE, J.; TOBIN, T. Dose related effects of the kappa agonist U-50,488H on behavioral, nociception and autonomic response in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.20, n.2, p.114-118, 1988.
- KAMERLING, S.; WOOD, T.; DeQUICK, T. J.; WECKMAN, C.; BLAKE, J. W.; TOBIN, T. Narcotic analgesics, their detection and pain measurement in the horse: a review. **Equine Veterinary Journal**, v.21, n.1, p.4-12, 1989.
- KEEGAN, R. D.; GREENE, S. A.; WEIL, A. B. Cardiovascular effects of epidurally administered morphine and a xylazine-morphine combination in isoflurane-anesthetized dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.496-500, 1995.

- KINGDON, R. T.; STANLEY, K. J.; KIZIOR, R. J. The physiology and experience of pain. In: _____ **Handbook for Pain Management**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p.7-22.
- KUZMIN, A.; SANDIN, J.; TERENIUS, L.; ÖGREN, S. O. Dose- and time-dependent bimodal effects of kappa-opioid agonists on locomotor activity in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.295, n.3, p.1031-1042, 2000.
- LANGER, S. Z.; TRENDELEMBURG, U. Decrease of effectiveness of phenoxybenzamine after chronic denervation and chronic decentralization on the nictitating membrane of the pithed cat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 63, p. 290-299, 1968.
- LEANDER, J. D.; HART, J. C.; ZERBE, R. L. Kappa agonist-induced diuresis: evidence for stereoselectivity, strain differences, independence of hydration variables and a result of decreased plasma vasopressin levels. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 242, n.1, p. 33-39, 1987.
- LEMONICA, L.; PEREIRA, S. M. Dor: bases anátomo-fisiológicas e do tratamento. In: BRAZ, J. R. C.; CASTIGLIA, Y. M. M. **Temas de Anestesiologia**. Botucatu: Unesp, 1992. p.163-170.
- MAMA, K. R.; PASCOE, P. J.; STEFFEY, E. P. Evaluation on the interaction of mu and kappa opioid agonists on locomotor behavior in the horse. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p.106-109, 1992.
- MANSOUR, A.; FOX, C. A.; AKIL, H. ; WATSON, S. J. Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. **Trends in Neurosciences**, v.18, p.22-29, 1995.
- MARIN, C.; ENGBER, T. M.; CHAUDHURI, P.; PEPPE, A.; CHASE, T. N. Effects of kappa receptor agonists on D1 and D2 dopamine agonist and antagonist-induced behaviors. **Psychopharmacologia**, v. 123, n. 2, p. 215-221, 1996.
- MATHER, L. E.; GLYNN, C. J. The minimum effective analgetic blood concentration of pethidine in patients with intractable pain. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.14, p.385-390, 1982.
- MAY, S. A. Anti-inflammatory agents. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. p.14-18.
- MCDONNELL, S. M. Behaviour of Horses. In: Jensen, P. **The Ethology of Domestic Animals – An Introductory Text**. London: CABI Publishing, 2002. p.119-129.
- MENDES, M. C. **Avaliação do Amitraz e da Romifidina em Equinos**. 2004. 53f. Trabalho de Graduação (Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- MILLAN, M. J. Multiple opioid systems and pain. **Pain**, v.27, p. 303-347, 1986.
- MILLAN, M. J. The introduction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.31, 1999.
- MITTEN, L. A.; HINCHCLIFF, K. W. Nonesteroidal anti-inflammatory drugs. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. 4^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. p.724-727.

MORAES, A. T. B. **Lidocaína Associada à Morfina ou Butorfanol, por Via Epidural, na Prevenção da Dor Pós-incisional em Éguas**. 2003. 64f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J. L. TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v.49, p.615-624, 2007.

MORELLI, M; FENU, S.; DI CHIARA, G. Substantia nigra as a site of origin of dopamine-dependent motor syndromes induced by stimulation of mu and kappa opioid receptors. **Brain Research**, v.487, p.120-130, 1989.

MUIR III, W. W. Standing Chemical Restraint in Horses. In: MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Equine Anesthesia**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. p.247-280.

MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. Fármacos usados na medicação pré anestésica. In: **Manual de Anestesia Veterinária**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p.31-44.

NORTH, R. A.; EGAN, T. M. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. **British Medical Bulletin**, v.39, p.71-75, 1983.

NUNES, F. P. B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUZA E SILVA, M. C. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v.49, p.1090-1098, 2007.

OLESKOVICZ, N. **Injeção Epidural de Cetamina ou Cetamina Levógira no Controle da Dor Pós-incisional, em Equinos**. 2001. 61f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

OLESKOVICZ, N.; DUQUE, J. C.; BALESTRERO, L. T.; FARIAS, A.; VALADÃO, C. A. A. Preemptive analgesic effect of epidural ketamine or ketamine S(+) in postincisional pain in horse. **Archives of Veterinary Science**, v.6, p.13, 2001.

PACHALY, J. R.; BRITO, H. F. V. Interespecific allometric scaling. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p.475-481.

PALERMO-NETO, J. Supersensitivity, drug withdrawal and open field behavior. **Psychopharmacology Bull**, v. 18, p. 11-12, 1982.

PAN, Z. Z. mu-Opposing actions of the kappa-opioid receptor. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, p.94-98, 1998.

PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.3, p.401-407, 2004.

PARADA, C. A.; VIVANCOS, G. G.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v.100, n.5, p.2923-2928, 2003.

PASCOE, P. J. Opioids in horses and cats. LUDDERS, J.W.; PAUL-MURPHY, J.; ROBERTSON, S.; GAYNOR, J.; HELLYER, P.W.; WONG, P.; BARAKATT, C. **A Cross-Species Approach to Pain and Analgesia**. 2002. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 11/01/2008.

PASCOE, P. J.; BLACK, W. D.; CLAXTON, J. M.; SANSOM, R. E. The pharmacokinetics and locomotor activity of alfentanil in the horse. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.14, p.317-325, 1991.

PASCOE, P. J.; TAYLOR, P. M. Effects of dopamine antagonists on alfentanil-induced locomotor activity in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 30, p.165-171, 2003.

PEDERSEN, J. L.; GALLE, T. S.; KEHLET, H. Peripheral analgesic effects of ketamine in acute inflammatory pain. **Anesthesiology**, v.89, n.1, p.58-66, 1998.

PERREAULT, M. L. ; GRAHAM, D. ; BISNAIRE, L. ; SIMMS, J. ; HAYTON, S.; SZECHTMAN, H. Kappa-opioid agonist U69593 potentiates locomotor sensitization to the D2/D3 agonist quinpirole : Pre- and postsynaptic mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1967-1981, 2006.

PICOLO, G. **Estudos Farmacológicos e Eletrofisiológicos do Efeito Antinociceptivo do Veneno de Serpentes *Crotalus durissus terrificus***. 2003. 114f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia) - Instituto Butantan e Instituto de Ciência Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PICOLO, G.; CASSOLA, A. C.; CURY, Y. Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive affect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **European Journal of Pharmacology**, v.469, p.57-64, 2003.

PICOLO, G.; CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a δ- and κ-opioid receptor agonist. **Life Sciences**, v.75, p.559-573, 2004.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; BERNARDI, M. M.; CURY, Y. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to supraspinally integrated response. **Toxicon**, v.36, n.1, p.223-227, 1998.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **European Journal of Pharmacology**, v. 391, p.55-62, 2000.

PIPPI, N. L. A model for evaluating pain in ponies. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v.3, p.430-435, 1979.

PIPPI, N. L.; LUMB, W. V. Objective tests of analgesic drugs in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.8, p., 1979.

QUEIROZ-NETO, A. **Estudo dos Efeitos do Amitraz em Animais de Laboratório e Equinos**. 1997. 133f. Tese (Livre Docência em Farmacologia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

QUEIROZ-NETO, A.; ZAMUR, G.; CARREGARO, A. B.; MATAQUEIRO, M. I.; SALVADORI, M. C.; AZEVEDO, C. P.; HARKINS, J. D.; TOBIN, T. Effects of caffeine on locomotor activity of horses: determination of the no-effect threshold. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, p.229-234, 2001.

QUEIROZ-NETO, A.; ZAMUR, G.; LACERDA-NETO, J. C.; TOBIN, T. Determination of the highest no-effect dose (HNED) and of the elimination pattern for cocaine in horses. **Journal of Applied Toxicology**, v. 22, p.117-121, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Fármacos analgésicos. In: _____. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 2004. p.640-665. (a)

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Substâncias antiinflamatórias e imunossupressoras. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 2004. p.277-297. (b)

RANGEL-SANTOS, A. C.; MOTA, I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.38, p.1451-1457, 2000.

RÉDUA, M. A.; VALADÃO, C. A.; DUQUE, J. C.; BALESTERO, L. T. The pre-emptive effect of epidural ketamine on wound sensitivity in horses tested by using von Frey filaments. **Veterinary Anesthesia and Analgesia**, v.29, p.200-206, 2002.

RICHARDSON, A.; DEMOLIOU-MASON, C.; BARNARD, E. A. Guanine nucleotide-binding protein-coupled and uncoupled states of opioid receptors and their relevance to the determination of subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.10189-10202, 1992.

ROGER, T.; BARDON, T.; RUCKEBUSCH, Y. Comparative effects of mu and kappa opiate agonists on the cecocolic motility in the pony. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.8, n.3, p.163-166, 1994.

SAMMARCO, J. L.; CONZEMIUS, M. G.; PERKOWSKI, S. Z. Postoperative analgesia for stifle surgery: a comparison of intra-articular bupivacaine, morphine or saline. **Veterinary Surgery**, v.25, p.59-69, 1996.

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v.47, p.313-321, 2006.

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA E SILVA, M. C. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v.41, p.899-907, 2003.

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v.45, p.671-676, 2005.

SAMPAIO, S. C.; SOUSA E SILVA, M. C. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, p.551-558, 2001.

SCHULTZ, J. E. J.; GROSS, G. J. Opioids and cardioprotection. **Pharmacology and Therapeutics**, v.89, p.123-137, 2001.

SCULL, T.; MOTAMED, C.; CARLI, F. The stress response and pre-emptive analgesia. In: ASHBURN, M.A.; RICE, L.; J. **The management of pain**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1998. p.557-576.

SHIPPENBERG, T. S.; STEIN, C.; HUBER, A.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. Motivational effects of opioids in an animal model of prolonged inflammatory pain: Alteration of κ - but not μ -receptor agonists. **Pain**, v.35, p.179-186, 1988.

SINATRA, R. S. Spinal and epidural opioids. In: ROGERS, M. C.; COVINO, B. G.; TINKER, J. H. **Principles and practice of anesthesiology**. St. Louis: Mosby-Year Book, 1993. p.1425-1443.

SMITH, M. B.; CHANG, E. B. Antidiarrheals and cathartics. In: WOLFE, M. M. **Gastrointestinal Pharmacotherapy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 139-156.

SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnake inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators of Inflammation**, v.5, p.18-23, 1996.

SPANAGEL, R. Modulation of drug-induced sensitization processes by endogenous opioid systems. **Behavioural Brain Research**, v.70, p.37-49, 1995.

SPEIRS, V. C. O exame clínico. In: _____ **Exame Clínico de Equinos**. São Paulo: Artes Médicas Sul, 1999. p. 19-36.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesy. **Anesthesia and Analgesia**, v. 76, p. 182-191, 1993

STUBHAUG, A.; BREIVIK, H.; EIDE, P. K. Mapping of hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.41, p.1124-1132, 1997.

TAIWO, Y.; LEVINE, J. Prostaglandins inhibit endogenous pain control mechanisms by blocking transmission at spinal noradrenergic synapses. **The Journal of Neuroscience**, v.8, p.1346-1349, 1988.

TARSY, D.; BALDESSARINI, R.J. – Behavioral supersensitivity to apomorphine following chronic treatment with drugs which interfere with the synaptic function of catecholamines. **Neuropharmacology**, v. 13, p. 927 – 940, 1974.

TASAKA, A. C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. p. 195-207.

TAYLOR, P. M.; CLARKE, K. W. Sedation, Analgesia and Premedication. In: _____ **Handbook of Equine Anaesthesia**. London: W. B. Saunders, 1999. p.15-32.

TAYLOR, P. M. Pharmacological Approaches to Pain Management in the Horse. In: Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 51, 2005, Seattle. **Anais...** Seattle: American Association of Equine Practitioners, 2005. Disponível em <<http://www.iaav.org>>. Acesso em: 11/01/2008.

TAYLOR, P. M.; PASCOE, P.J.; MAMA, K.R. Diagnosing and treating pain in the horse: where are we today? **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.18, p.1-19, 2002.

TEMPO AGORA. Disponível em: <<http://tempoagora.uol.com.br/previsaodotempo.html/brasil/Jaboticabal-SP/>>. Acesso em 12/11/2007.

- THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. Preanesthetics and anesthetic adjuncts. In: _____ **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia**. Maryland: Williams & Wilkins, 1996. p.183-210.
- TOBIN, T. Pharmacology review: narcotic analgesics and the opiate receptor in the horse. **Journal of Equine Medicine and Surgery**, v.2, p.397-399, 1978.
- TRENDELEMBURG, U. Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetics amines. **Pharmacological reviews**, v. 18, p. 629-640, 1966.
- TRENDELEMBURG, U. Time course of changes in sensitivity after denervation of the nictitating membrane of the spinal cat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 142, p. 335-342, 1963.
- TRUONG, W.; CHENG, C. ; XU, Q. G.; LI, X. Q.; ZOCHODNE, D. W. Mu opioid receptors and analgesia at a site of a peripheral nerve injury. **Annals of Neurology**, v. 53, p. 366-375, 2003.
- TVERSKOY, M.; OZ, Y.; ISAKSON, A.; FINGER, J.; BRADLEY, E. L.; KRISSIN, I. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. **Anaesthesia and Analgesia**, v.78, p.205-209, 1994.
- VITAL, M. A. B. F.; FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J Effects of monosialoganglioside on dopaminergic supersensitivity. **Life Science**, v. 56, . 26, p. 2299-2307, 1995.
- VITAL, M. A. B. F.; FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of monosialoganglioside on a new model of tardive dyskinesia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 21, p. 1169- 1179, 1997.
- VONVOIGTLANDER, P. F.; LAHTI, R. A. LUDENS, J. H. U50-488H: a selective and structurally novel non-mu (kapp) opioid agonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 224, p.7-12, 1983.
- WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, R.; BENNETT, J.; FIGDOR, B.; VRIES, C. G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.174, p.12,9-1220, 1991.
- WAGNER, A.E. Is butorphanol analgesic in dogs and cats? **Veterinary Medicine**, v. 4, p. 346–350, 1999.
- WARNCKE, T.; STUBHAUG, A.; JORUM, E. Pre-injury treatment with morphine or ketamine inhibits the development of experimentally induced secondary hyperalgesia in man. **Pain**, v.86, p.293-303, 2000.
- WITTERT, G.; HOPE, P.; PYLE, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.218, p.877-81, 1996.
- ZAMUR, G. **Estudo dos Efeitos Antinociceptivos e Sedativos dos Anestésicos Gerais, Tranquilizantes, Ansiolíticos e Opióides em Equinos**. 2002. 122f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A - Ordem aleatória dos eqüinos PSA utilizados na avaliação comportamental dos efeitos promovidos por NaCl 0,9% (GC), crotalina (GCROa, GCROb e GCROc) ou U50-488H (GK):

Dia do estudo	GC	GCROa (1,4 ng/kg)	GCROb (2,2 ng/kg)	GCROc (3,8 ng/kg)	GK (160 µg/Kg)
1	5F		5M		
2	2F			2M	
3		3F			3M
4	8M			8F	
5				6F	6M
6		1M	1F		
7	7M		7F		
8		4F	4M		
9			5F		5M
10		2F		2M	
11			9M		9F
12	3M				3F
13		8M		8F	
14	6F	6M			
15				7M	7F

M = macho; F = fêmea

Apêndice B - Ordem dos equinos PSA usados na avaliação dos efeitos clínicos causados por crotalfina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%:

Dia do Estudo	NaCl 0,9%	Crotalfina	Morfina	U50-488H	Fenilbutazona
1				4F	
2		3M		4F	
3		3M		4F	
4	1M	3M		4F	
5	8M / 1M	3M		4F	
6	1M / 8M	3M		4F	9F
7	1M / 8M	3M	6M	4F	9F
8	1M / 8M	3M	6M		6F / 9F
9	1F / 1M / 8M		6M		6F / 9F
10	1M / 8M / 1F	4M	6M		6F / 9F
11	8M / 1F	4M	6M		6F / 9F
12	8M / 1F	4M	6M		7M / 6F / 9F
13	1F	4M	6M	7F	7M / 6F
14	1F	4M		7F	7M / 6F
15	1F	4M		7F	7M
16		4M		7F	7M
17				7F	3M / 7M
18	5F			7F	3F / 7M / 3M
19	2F / 5F		5M	7F	3M / 3F
20	5F / 2F		9M / 4F / 5M		3M / 3F
21	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
22	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
23	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
24	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3F
25	2F	2M / 6F	9M / 4F / 5M	6M / 1M	
26	7M	1F / 2M / 6F	9M / 4F	6M / 1M	
27	7M	1F / 2M / 6F		9F / 6M / 1M	8M
28	7M	1F / 2M / 6F		9F	8M
29	7M	1F / 2M / 6F		9F	8M
30	7M	1F / 2M / 6F		9F	8M
31	7M	1F / 2M / 6F		9F	8M
32	7M	1F		9F	8M
33		8F		9F	8M
34		8F	7F		
35		8F	3F / 7F	3M	
36		8F	3F / 7F	3M	
37		8F	3F / 7F	3M	
38		8F	3F / 7F	3M	
39		8F	3F / 7F	3M	
40			3F / 7F	3M	
41			3F	3M	

M = macho; F = fêmea

letra preta indica o início de cada ensaio e, em cinza, os outros seis dias de aferição de cada animal

Apêndice C - Ordem aleatória dos equinos PSA utilizados para verificar o efeito antinociceptivo gerado pela administração intravenosa de crotalina, morfina, U50-488H, fenilbutazona ou NaCl 0,9%, em pele íntegra:

Dia do Estudo	NaCl 0,9%	Crotalina	Morfina	U50-488H	Fenilbutazona
1				4F	
2				4F	
3				4F	
4	1M			4F	
5	8M / 1M			4F	
6	1M / 8M			4F	9F
7	1M / 8M		6M	4F	9F
8	1M / 8M		6M		6F / 9F
9	1F / 1M / 8M		6M		6F / 9F
10	1M / 8M / 1F	7M	6M		6F / 9F
11	8M / 1F	7M	6M		6F / 9F
12	1F	7M	6M		7M / 6F / 9F
13	1F	7M	6M	7F	7M / 6F
14	1F	7M		7F	7M / 6F
15	1F	7M		7F	7M
16		7M		7F	7M
17				7F	3M / 7M
18	5F			7F	3F / 7M / 3M
19	2F / 5F		5M	7F	3M / 3F
20	5F / 2F		9M / 4F / 5M		3M / 3F
21	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
22	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
23	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3M / 3F
24	5F / 2F		9M / 4F / 5M	6M / 1M	3F
25	2F	8M / 6F	9M / 4F / 5M	6M / 1M	
26	2M	1F / 8M / 6F	9M / 4F	6M / 1M	
27	2M	1F / 8M / 6F		9F / 6M / 1M	4M
28	2M	1F / 8M / 6F		9F	4M
29	2M	1F / 8M / 6F		9F	4M
30	2M	1F / 8M / 6F		9F	4M
31	2M	2M / 1F / 8M / 6F		9F	4M
32	2M	1F / 2M		9F	4M
33		8F / 2M		9F	4M
34		8F / 2M	7F		
35		8F / 2M	3F / 7F	3M	
36		8F / 2M	7F / 3F	3M	
37		8F / 2M	7F / 3F	3M	
38		8F	7F / 3F	3M	
39		8F	7F / 3F	3M	
40			7F / 3F	3M	
41			3F	3M	

M = macho; F = fêmea

letra preta indica o início de cada ensaio e, em cinza, os outros seis dias de aferição de cada animal

Apêndice D - Ordem aleatória dos equinos PSA submetidos a modelo incisional de dor inflamatória para verificar o efeito antinociceptivo gerado pela administração intravenosa de crotalina, morfina, U50-488H ou fenilbutazona:

Dia do Estudo	Crotalina	Morfina	U50-488H	Fenilbutazona
1	2M			8M
2	2M		1M	7M / 8M
3	2M	9M	4F / 1M	8M / 7M
4	8F / 2M	9M	1M / 4F	9F / 8M / 7M
5	6F / 2M / 8F	6M / 9M	1M / 4F	8M / 7M / 9F
6	2M / 8F / 6F	6M / 9M	1M / 4F	8M / 7M / 9F
7	1F / 2M / 8F / 6F	6M / 9M	1M / 4F	5F / 8M / 7M / 9F
8	4M / 8F / 6F / 1F	6M / 9M	3M / 1M / 4F	5F / 7M / 9F
9	8F / 6F / 1F / 4M	2F / 6M / 9M	7F / 3M / 4F	5F / 9F
10	1M / 8F / 6F / 1F / 4M	5M / 6M / 9M / 2F	3M / 7F	5F / 9F
11	6F / 1F / 4M / 1M	6M / 9M / 2F / 5M	2M / 3M / 7F	5F
12	1F / 4M / 1M	4F / 2F / 5M	3M / 7F / 2M	5F
13	1F / 4M / 1M	2F / 5M / 4F	3M / 7F / 2M	6F / 5F
14	4M / 1M	8F / 2F / 5M / 4F	3M / 7F / 2M	6F
15	1M	2F / 5M / 4F / 8F	9F / 7F / 2M	9M / 6F
16	1M	5M / 4F / 8F	2M / 9F	6F / 9M
17		4F / 8F	2M / 9F	6F / 9M
18		4F / 8F	9F	6F / 9M
19		8F	9F	6F / 9M
20		8F	9F	9M
21			9F	9M

M = macho; F = fêmea

letra preta indica o início de cada ensaio e, em cinza, os outros seis dias de aferição de cada animal

Apêndice E – Numeração dos filamentos de von Frey com os correspondentes valores em força (gramas), diâmetros e conversão logarítmica

Filamento	Força	Diâmetro	Log	Log ⁺²
1,65	0,005	0,064	-2,35	-0,35
2,36	0,023	0,076	-1,64	0,36
2,44	0,028	0,102	-1,56	0,44
2,83	0,068	0,127	-1,17	0,83
3,22	0,166	0,152	-0,78	1,22
3,61	0,407	0,178	-0,39	1,61
3,84	0,692	0,203	-0,16	1,84
4,08	1,202	0,229	0,08	2,08
4,17	1,479	0,254	0,17	2,17
4,31	2,041	0,305	0,31	2,31
4,56	3,63	0,356	0,66	2,66
4,74	5,495	0,381	0,74	2,74
4,93	8,511	0,406	0,93	2,93
5,07	11,749	0,432	1,07	3,07
5,18	15,136	0,483	1,18	3,18
5,46	28,84	0,559	1,46	3,46
5,88	75,858	0,711	1,88	3,88
6,1	125,892	0,813	2,1	4,1
6,45	281,838	1,016	2,45	5,45
6,65	446,683	1,143	2,65	4,65