

Carlize Lopes

**Validação de métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico para
avaliação de dor de equinos tratados com metadona associada à detomidina
ou acepromazina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Anestesiologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu - SP
2014

Carlize Lopes

**Validação de métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico para
avaliação de dor de equinos tratados com metadona associada à detomidina
ou acepromazina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Anestesiologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna

Botucatu - SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Lopes, Carlize.

Validação de métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico para avaliação de dor de equinos tratados com metadona associada à detomidina ou acepromazina / Carlize Lopes. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Stelio Pacca Loureiro Luna

Capes: 40102130

1. Equino - Doenças. 2. Dor em animais. 3. Analgesia. 4. Estudos de validação.

Palavras-chave: Cavalos; Estímulo mecânico; Estímulo térmico; Estímuloelétrico; Validação.

Carlize Lopes

Validação de métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico para avaliação de dor de equinos tratados com metadona associada à detomidina ou acepromazina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Dr. Stelio Pacca Loureiro Luna
Presidente e Orientador
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Antonio José de Araújo Aguiar
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. André Escobar
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Jaboticabal

Prof. Dra. Marilda Onghero Taffarel
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Estadual de Maringá - Umuarama

Prof. Dra. Sílvia Elaine Rodolfo de Sá Lorena
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Jaguariúna - Campinas

Botucatu, 28 de fevereiro de 2014

Dedicatória

A minha mãe, por acreditar em mim e me apoiar sempre!

Ao meu esposo Tiago, pelo amor, companheirismo e paciência. Sem você eu não teria conseguido!

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. STELIO PACCA LOUREIRO LUNA pela confiança, pois mesmo sem me conhecer, aceitou o desafio de me orientar. Obrigada pela convivência sempre agradável e por toda ajuda dedicada. Espero ter retribuído a confiança!

Ao meu amigo e ex-orientador, Prof. Dr. ADRIANO BONFIM CARREGARO por ter sido “a ponte” entre eu e meu orientador. “Adriano”, você foi indispensável para que eu atingisse meus objetivos!

Ao meu marido TIAGO GOULART MARQUES, por todo apoio, incentivo, compreensão, companheirismo e flexibilidade. Mais uma vez você provou que está comigo para o que der e vier! Sem teu apoio e parceria eu não teria encarado esse desafio! Te amo!

À minha MÃE, para mim, exemplo de força, dedicação e perseverança. Ao meu PAI, que apesar da ausência física, continua sempre presente nos meus pensamentos, me dando forças para seguir adiante. Vocês são responsáveis por tudo que conquistei, pois sempre me apoiaram e me incentivaram nas minhas escolhas. Amo muito vocês!

À NELÍ APARECIDA PAVAN pela imensa ajuda desde a inscrição para o doutorado. Mesmo sem me conhecer, não mediu esforços para ajudar, sempre com boa vontade e muita disposição e simpatia. Obrigada! Também por toda disposição e compreensão demonstrada pela TATIANE DE FÁTIMA PINEIZ, principalmente na finaleira dos prazos...

Ao amigo GUILHERME SCHIESS por toda ajuda dedicada, principalmente para que meus papéis chegassem a tempo de fazer a inscrição na pós-graduação. Sua ajuda foi muito importante! Meus sinceros agradecimentos!

À todos os colegas da pós-graduação pela amizade, aprendizagem e boa convivência! Em especial àqueles que trabalharam diretamente na execução deste projeto: ADEMIR CASSIANO DA ROSA, FLÁVIA AUGUSTA DE OLIVEIRA, CAROLINA QUARTERONE e NADIA CROSIGNANI. Foi muito bom poder contar com a ajuda de todos!

À POLLY TAYLOR pela ajuda na fase experimental e, principalmente, na redação do artigo científico.

À ANA TARDEVO pela ótima convivência e intensa boa vontade, sempre!

Ao Prof. Dr. JOSÉ NICOLAU pelo empréstimo dos animais e ao seu ALTAMIRO por toda ajuda dedicada, pela imensa paciência e boa vontade.

Ao Prof. Dr. JOSÉ CARLOS PANTOJA pela paciência, dedicação e tranquilidade dispensadas na realização da análise estatística deste estudo.

Aos professores ANTONIO JOSÉ DE ARAÚJO AGUIAR e FRANCISCO JOSÉ TEIXEIRA NETO, pela boa convivência e conhecimentos compartilhados.

Aos “amigos do sul”: ADEMIR CASSIANO DA ROSA, HUGO SALVADOR OLIVEIRA e THAYANA WANGINIAC pela amizade,

parceria e convivência mais que agradáveis! Nosso companheirismo e afinidades fizeram a diferença!

Às minhas vizinhas e amigas, SANTINA, NELY e GABI pela amizade que se criou e todo o carinho que sempre demonstraram! Vocês foram minha família em Botucatu!

Aos amigos MARCO MONTOYA e LIANDRA VOGEL, pela amizade, companheirismo e ensinamentos desde a época da graduação. Sinto muita falta de vocês!

À GABRIELLE COELHO FREITAS pela amizade, companheirismo e, principalmente, pelo apoio psicológico que sempre me deu! Sempre disposta a me ouvir quando eu precisei desabafar! Valeu danada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo financiamento da bolsa de doutorado (auxílio pesquisa, processo 2011/21927-0) e à UNESP, pela oportunidade de realização de mais uma etapa de minha formação.

Por fim agradeço a TODOS OS CAVALOS envolvidos neste trabalho, em especial: ESPLENDOR, FANTOCHE, BELO, BAINHO, TUFÃO, ARAPONGA, BYRON e GUARANI. A todos eles, o meu eterno respeito e gratidão!!!

Resumo

LOPES, C. *Validação de métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico para avaliação de dor de equinos tratados com metadona associada à detomidina ou acepromazina*. Botucatu, 2014. 91 p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

O reconhecimento da dor é fundamental para desenvolver estratégias analgésicas efetivas e para tal é imprescindível criar instrumentos de avaliação válidos e confiáveis. Um instrumento válido para reconhecer a dor deve produzir escores sensíveis e que se modifiquem após administração de analgésicos, além de não resultar em dano tecidual, ser de fácil aplicação, e apresentar validade e reprodutibilidade. Desta forma, compararam-se os estímulos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico, quanto a sua exequibilidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade em oito equinos adultos conscientes e avaliaram-se os efeitos antinociceptivos da administração intravenosa da metadona associada à detomidina ou à acepromazina nos mesmos animais. Os estímulos mecânico (M) e térmico no membro (TM) foram aplicados sobre o metacarpo esquerdo e direito, respectivamente. O elétrico (E) foi aplicado sobre a banda coronária do membro torácico esquerdo e o térmico torácico (TT) no tórax, caudal à cernelha. Na etapa 1, realizaram-se aleatoriamente três estímulos verdadeiros e um falso, para cada um dos quatro testes, totalizando 32 estímulos/animal, em cada fase, realizadas com 6 meses de intervalo. Na etapa 2, os cavalos foram tratados com salina (C); metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10µg/kg) – MD ou à acepromazina (0,05 mg/kg) – MA, com intervalo mínimo de uma semana. A nocicepção foi mensurada antes e aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 150 minutos após os tratamentos. As concordâncias geral e nas fases 1 e 2, avaliadas pelo coeficiente kappa, foram de 90%, 92% e 88%, respectivamente. O estímulo M apresentou 100% de concordância entre observadores, seguido de TM (97%), E (84%) e TT (75%). A sensibilidade e especificidade foram de 89% e 92%, respectivamente. Utilizaram-se o teste da soma de postos de Wilcoxon e o teste de postos de sinais de Wilcoxon para comparações entre grupos, dentro de cada momento e entre o momento basal e os momentos subsequentes, respectivamente. A significância estatística foi definida como $p <$

0,05. O estímulo M foi o mais sensível para diferenciar os efeitos analgésicos dos fármacos. Para M, MD apresentou valores maiores que MA, que apresentou valores maiores que C dos 15 aos 30 minutos. Os tratamentos MD e MA apresentaram maiores limiares para M que C até 60 minutos. Para os estímulos E e TM, apenas MD apresentou valores superiores a C de 15 a 45 minutos e dos 15 aos 105 minutos, respectivamente. Para o limiar TT, MD e MA foram maiores que C aos 15, 45, 90 e 120 minutos e dos 30 aos 75 minutos, respectivamente. A alta concordância, sensibilidade e especificidade sugerem que os testes são válidos para utilização em condições experimentais. Além disso, a associação MD promoveu efeito antinociceptivo mais acentuado que a associação MA para os três estímulos nociceptivos M, E e TM, exceto para o TT.

Palavras-chave: validação, cavalos, estímulo elétrico, estímulo térmico, estímulo mecânico, analgesia

Abstract

LOPES, C. *Validation of nociceptive methods electrical, mechanical and thermal pain assessment of horses treated with methadone associated with detomidine or acepromazine*. Botucatu, 2014. 91 p. These (PhD degree in Anesthesiology) – Botucatu Medicine School, São Paulo State University, Campus of Botucatu.

Recognition of pain is fundamental for the development of effective analgesic strategies, therefore, it is essential to develop valid and reliable instruments for assessment of pain. A valid instrument to recognize the pain should produce sensitive scores, which should be modified after the administration of analgesics and should not result in tissue damage, should be easy to apply, with a clear cut-off and present validity and reproducibility. This study aimed to compare the electrical, mechanical and thermal nociceptive stimuli and investigate their feasibility, repeatability, sensitivity and specificity in eight horses. In the second part of the study, the antinociceptive effects of intravenous administration of methadone combined with detomidine or acepromazine were evaluated in the same animals. The mechanical (M) and thermal in the limb (TL) stimuli were measured at the left and right metacarpus regions, respectively. The electrical stimulus (E) was measured at the left coronary band and thorax thermal stimulus (TT) in the thorax, caudal to the withers. In part 1 of the study, three real and one sham stimuli were randomly applied, for each of the four tests, giving a total of 32 stimulations/animal in each phase, repeated six months later. In the part 2 of the study, the horses were treated with saline (C), methadone (0,2 mg/kg) combined with detomidine (10 µg/kg) – MD or acepromazine (0,05 mg/kg), with a minimum of one week interval. Thresholds were measured before and at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 and 150 minutes after treatment. The agreement between observers measured by kappa coefficient was 90% for both phases grouped and 92% and 88% in phases 1 and 2, respectively. The M stimulus showed 100% agreement between observers, followed by TL (97%), E (84%) and TT (75%). Sensitivity and specificity were 89% and 92%, respectively. The Wilcoxon rank sum test and Wilcoxon signed rank test were used to compare differences between groups within each moment and between the baseline and subsequent times, respectively. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. The M stimulus was the most sensitive to distinguish the

analgesic effects of the drugs. Values for M were greater in MD than MA, which were greater than C from 15 to 30 minutes. Both MD and MA M values were greater than C for 60 minutes. For E and TL, MD values were greater than C from 15 to 45 minutes and from 15 to 105 minutes, respectively. For TT, MD and MA values were greater than C at 15, 45, 90 and 120 minutes and from 30 to 75 minutes, respectively. The high agreement, sensitivity and specificity of the tests suggest that are valid for use under experimental conditions. The antinociceptive effects in animals treated with MD was greater than in MA for M, E, and TL.

Key words: validation, horses, electrical stimulus, thermal stimulus, mechanical stimulus, analgesia.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Posicionamento dos dispositivos dos equipamentos para determinar os limiares nociceptivos mecânico e térmico no membro, fixados sobre a face dorsal do terço médio do metacarpo esquerdo e direito do equino, respectivamente. O dispositivo mecânico registra a pressão em Newtons (N) e o térmico, registra a temperatura em graus Celsius (°C) (Topcat Metrology Ltd).....	28
Figura 2 -	Posicionamento do dispositivo do equipamento para determinar o limiar nociceptivo térmico torácico, fixado na região torácica, caudal à cernelha do equino. O dispositivo registra a temperatura em graus Celsius (°C) (Topcat Metrology Ltd).....	29
Figura 3 -	Posicionamento dos eletrodos adesivos na banda coronária do membro torácico esquerdo do equino, para determinar o limiar nociceptivo elétrico. O equipamento registra a voltagem (V).....	30
Figura 4 -	Limiares nociceptivos do estímulo (a) elétrico (Volts), (b) mecânico (Newtons), (c) térmico no membro (graus Celsius) e (d) térmico torácico (graus Celsius), com os dados combinados ou em cada fase. *Diferença entre as fases do estudo.....	36
Figura 5 -	Valores médios do limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico (Newtons) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento (p < 0,05).....	41
Figura 6 -	Valores médios do limiar nociceptivo frente ao estímulo elétrico (Volts) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento (p < 0,05).....	43
Figura 7 -	Valores médios do limiar nociceptivo (ΔT°C) frente ao estímulo térmico no membro de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento (p < 0,05).....	45
Figura 8 -	Valores médios do limiar nociceptivo (ΔT°C) frente ao estímulo térmico torácico de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento (p < 0,05).....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Número e percentagem das respostas individuais de aversão e o número e percentagem de falso negativos e falso positivos, apresentados pelos cavalos, frente aos 512 estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico, realizados durante as duas fases.....	35
Tabela 2 -	Número e percentagem de respostas positivas e negativas identificadas pelos dois observadores, para os estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico aplicados em cavalos, em cada fase e nas duas fases agrupadas.....	38
Tabela 3 -	Sensibilidade e especificidade para os estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico aplicados em cavalos, em cada fase do estudo ou nas duas fases agrupadas, pelos dois observadores agrupados.....	39
Tabela 4 -	Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico (Newtons) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV.....	41
Tabela 5 -	Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo elétrico (Volts) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV.....	42
Tabela 6 -	Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico no membro ($\Delta T^{\circ}C$) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV.....	44
Tabela 7 -	Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico torácico ($\Delta T^{\circ}C$) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV.....	46

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1	Introdução.....	16
2	Revisão da Literatura.....	18
2.1	Métodos de nocicepção em animais.....	18
2.2	Analgesia em equinos.....	21
2.2.1	Metadona.....	21
2.2.2	Agonistas α_2 -adrenérgicos.....	22
2.2.3	Acepromazina.....	23
2.3	Hipóteses e justificativas do estudo.....	24
3	Objetivos.....	25
4	Material e Métodos.....	26
4.1	Avaliação da atividade antinociceptiva.....	27
4.1.1	Estímulo mecânico e térmico.....	27
4.1.2	Estímulo térmico torácico.....	28
4.1.3	Estímulo elétrico.....	29
4.2	<i>Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em equinos.....</i>	<i>31</i>
4.2.1	Delineamento experimental.....	31
4.2.2	Repetibilidade.....	31
4.2.3	Falsidade dos testes.....	31
4.3	<i>Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos.....</i>	<i>32</i>
4.3.1	Delineamento experimental.....	32
4.4	Análise estatística.....	32
5	Resultados.....	34
5.1	<i>Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em</i>	

equinos.....	34
5.2 <i>Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos.....</i>	40
6 Discussão.....	48
6.1 <i>Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em equinos.....</i>	48
6.2 <i>Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos.....</i>	51
7 Conclusões.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
Apêndices.....	64
Trabalho Científico.....	72

1. Introdução

A carência de métodos validados para avaliar a nocicepção, bem como a pouca disponibilidade de escalas de avaliação de dor espécie-específicas,⁽¹⁾ contribuem para o tratamento inadequado da dor na espécie equina, dada a dificuldade do reconhecimento do fenômeno e o receio dos efeitos adversos dos fármacos.⁽²⁾

Tanto o desenvolvimento de escalas espécie-específicas, como de testes nociceptivos são fundamentais para as pesquisas e uso na rotina em situações clínicas. No que concerne às escalas de dor específicas para equinos, só há disponibilidade de escala de avaliação de dor ortopédica.⁽¹⁾ No que diz respeito à avaliação experimental da dor, não há na literatura a validação de testes nociceptivos nesta espécie, cuja informação é fundamental para definir as respostas comportamentais da espécie alvo frente a estímulos nociceptivos padronizados.

Diferentes testes nociceptivos já foram utilizados em várias espécies. A espécie doméstica mais estudada no que concerne à avaliação da nocicepção foi a felina;⁽³⁻¹⁰⁾ porém, em várias outras como cães,⁽¹¹⁻¹³⁾ ovelhas,⁽¹⁴⁾ bovinos,⁽¹⁵⁾ jumentos,⁽¹⁶⁾ suínos⁽¹⁷⁾ e equinos⁽¹⁸⁻²⁶⁾ também se utilizaram diferentes métodos para avaliar a nocicepção; entretanto, na maioria dos estudos, os testes não foram previamente validados.

O processo de validação de um instrumento é realizado por acúmulo de evidências que apoiem as inferências realizadas a partir dos resultados deste instrumento.⁽²⁷⁾ A validade de um instrumento diz respeito ao grau de certeza de que as medidas realmente representam os conceitos, sendo definida como sua capacidade em realmente mensurar aquilo que se propõe.⁽²⁸⁾ Para tal avalia-se a sensibilidade, especificidade e confiabilidade.

Diversos fatores dificultam o correto tratamento da dor em animais, sendo que os principais obstáculos relacionam-se com a falta de critérios objetivos para avaliar a dor, aliada a variabilidade farmacocinética entre as espécies e ao receio dos efeitos adversos dos fármacos.^(2, 29) O uso de opioides na espécie equina ainda é restrito, principalmente devido as suas ações sobre o sistema nervoso central, locomotor e digestório.^(18, 24, 30, 31)

Uma das formas de melhorar a qualidade da sedação e da analgesia é a associação dos opioides com outros fármacos, como os agonistas α_2 -adrenérgicos.⁽²³⁾ Os agonistas α_2 -adrenérgicos reduzem a frequência cardíaca e causam arritmia, hipertensão inicial, seguida de hipotensão, reduzem o débito cardíaco e causam depressão respiratória.⁽³²⁾ Apesar dos efeitos adversos, os mesmos produzem sedação e analgesia e potencializam os efeitos de outros agentes sedativos e analgésicos.^(24, 32)

Outra possibilidade de protocolo analgésico efetivo para equinos seria associar os opioides aos fenotiazínicos, com o intuito de minimizar os efeitos adversos dos opioides, particularmente relacionados à excitação do sistema nervoso central (SNC). A acepromazina poderia reduzir a atividade locomotora induzida pelos opioides em equinos, uma vez que diminuiu os efeitos na função locomotora ocasionados pela administração de fentanil e morfina, nesta espécie,⁽³³⁾ bem como quando administrada com buprenorfina em cavalos, produziu antinocicepção para o estímulo térmico.^(26, 34)

2. Revisão da Literatura

2.1. Métodos de nocicepção em animais

A avaliação experimental da nocicepção pode ser realizada por diferentes estímulos nociceptivos, com elucidação de vias nociceptivas distintas frente aos diferentes mecanismos de ação dos analgésicos. Esta abordagem permite uma avaliação qualitativa e quantitativa do fenômeno nociceptivo.⁽³⁵⁾

Os testes nociceptivos mais utilizados são os elétricos, os mecânicos e os térmicos.^(3, 4, 7, 36) Aparentemente os estímulos elétricos ativam de forma inespecífica as fibras periféricas, incluindo as fibras de grande diâmetro, não diretamente implicadas na nocicepção;⁽³⁷⁾ os mecânicos geram corrente devido ao influxo iônico em canais ativados pelo estiramento e os térmicos provavelmente envolvem proteínas de membranas ou moléculas efetoras intracelulares de elevado coeficiente de temperatura.⁽³⁵⁾

O estímulo doloroso é processado quando da transmissão pelos neurônios aferentes primários tanto de baixo como de alto limiar (nociceptivos).⁽³⁸⁾ O tamanho da fibra determina a velocidade de condução neuronal e desta forma, os neurônios nociceptivos somáticos dividem-se em dois principais grupos distintos: neurônios de fibras A e de fibras, C⁽³⁸⁾ os quais possuem velocidade de condução de 6 a 25 m/s e 1 m/s, respectivamente.⁽³⁹⁾ Desta forma, os neurônios de fibras A representam a “primeira dor” (rápida) e os de fibras C, a “segunda dor” (lenta).⁽³⁹⁾

A espécie doméstica que recebeu maior enfoque de pesquisas na área de nocicepção foi a felina, onde validou-se⁽³⁻⁵⁾ ou comparou-se⁽⁶⁻⁹⁾ os estímulos térmico e mecânico, além de se comparar os estímulos térmicos, mecânicos e elétricos.⁽¹⁰⁾

Para cães avaliou-se um modelo nociceptivo térmico composto por um carrinho personalizado, o qual possuía lâmpadas de projeção de calor dispostas sob uma placa de vidro onde os animais eram posicionados.⁽¹¹⁾ Avaliou-se a latência (em segundos) para a retirada do membro após a colocação dos animais sobre a placa de vidro, com os membros pélvicos localizados sobre as lâmpadas de calor. Com este dispositivo observou-se aumento do tempo até a retirada do membro, após a administração de vários opioides. Para essa mesma espécie,

utilizaram-se estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos a fim de avaliar o efeito antinociceptivo da buprenorfina aplicada pela via transdérmica.⁽¹²⁾ O dispositivo térmico, constituído de um dispositivo fixado no metacarpo dos animais, aumentava gradualmente a temperatura até que houvesse o reflexo de retirada do membro ou se atingisse a temperatura máxima de 53°C. Para a mensuração dos limiares mecânicos utilizou-se um equipamento semelhante ao von Frey, constituído de uma série de filamentos de nylon de diâmetros diferentes aplicados sobre o metacarpo dos animais, até se observar uma resposta de aversão. O mesmo dispositivo validado para gatos⁽³⁾ foi testado em cães, a fim de avaliar a reprodutibilidade dos dados e o efeito analgésico da acepromazina e da levometadona nessa espécie.⁽¹³⁾ O dispositivo mostrou-se adequado para testar o limiar nociceptivo térmico em cães. Além disso, utilizou-se outro dispositivo mecânico nessa espécie, para avaliar os efeitos antinociceptivos de diferentes protocolos analgésicos.⁽⁴⁰⁾ O equipamento era composto por um pino de 8 mm de diâmetro, o qual aumentava gradativamente a pressão contra a pele do animal, a uma taxa de 2 N/s até que o mesmo apresentasse uma resposta aversiva.

Em ovelhas, a atividade analgésica da meperidina foi avaliada por meio da estimulação térmica e mecânica e o estímulo térmico foi mais sensível na detecção do fármaco, quando comparado ao estímulo mecânico.⁽¹⁴⁾ Em bovinos, utilizou-se um dispositivo mecânico composto por pinos pressionados contra o metacarpo dos animais, a fim de comparar os limiares nociceptivos de animais com e sem claudicação.⁽¹⁵⁾ Também-se utilizou um dispositivo mecânico para avaliação dos efeitos antinociceptivos da xilazina e da acepromazina em jumentos e cavalos e percebeu-se que os limiares mecânicos aumentaram após a administração de xilazina em ambas as espécies.⁽¹⁶⁾ Ao se avaliar as respostas nociceptivas a estímulos térmicos e mecânicos em suínos, concluiu-se que animais menores apresentam limiares de dor mais baixos, ou seja, menor latência para a resposta, quando comparados aos maiores.⁽¹⁷⁾

Em equinos, o uso de estímulos térmicos^(18, 34) e elétricos⁽¹⁹⁻²²⁾ foram aparentemente úteis para o estudo da nocicepção; entretanto, só há disponibilidade de estudos que combinaram os estímulos mecânico e elétrico,⁽²³⁾ elétrico e térmico^(24, 25) e térmico e mecânico.⁽²⁶⁾ Desta forma, ainda não há estudos que tenham correlacionado e validado os três diferentes tipos de estímulos nociceptivos nesta espécie.

Apesar de certa disponibilidade de estudos que utilizam diferentes métodos para avaliar a nocicepção em cavalos, estes são muito heterogêneos. No caso dos métodos elétricos

não há um padrão de localização dos eletrodos e da corrente elétrica utilizada. Alguns modelos são pouco aplicáveis para animais conscientes ou sob efeito de sedativos e analgésicos, como por exemplo, a implantação de eletrodos na polpa dentária.⁽⁴¹⁾ Aparentemente a melhor região de avaliação nociceptiva elétrica é a banda coronária^(23, 42, 43) por expressar uma resposta aversiva característica de flexão do membro em resposta ao estímulo. Entretanto, alguns outros estudos utilizaram esse mesmo estímulo diretamente no nervo digital palmar.⁽²¹⁾

Alguns métodos nociceptivos mecânicos foram propostos para avaliar a dor visceral: um balão inserido por uma fístula criada cirurgicamente, para ocasionar distensão cecal após aplicação de pressão,⁽⁴⁴⁾ um balão introduzido através de uma cânula gástrica permanentemente implantada⁽⁴⁵⁾ e distensão colo-retal com balão inserido no reto.^(46, 47) Alguns dispositivos mecânicos foram adaptados ao membro dos animais,^(23, 43, 48) os quais ocasionaram reações de aversão, em resposta a pressão crescente aplicada por pinos sobre a pele. Nestes estudos, a pressão foi aplicada na superfície dorsal do metacarpo dos animais e essa localização possui a vantagem de apresentar mínimas variações anatômicas entre cavalos, além de pouco tecido mole entre a pele e o periósteo, o que proporciona uma aplicação de força a uma taxa mais constante e homogênea.⁽⁴⁹⁾

O estímulo térmico mais relatado na espécie equina foi o uso de lâmpadas de projeção de calor, focadas na banda coronária^(18, 25, 44, 50) ou na cernelha.^(18, 50) O estímulo aplicado na cernelha evita a interferência do aumento ou redução da atividade locomotora espontânea, comumente observada em equinos tratados com opioides ou agonistas α_2 -adrenérgicos, respectivamente.^(50, 51) Entretanto, ainda não há uma padronização em relação ao melhor local de aplicação do estímulo térmico já que, se a fonte luminosa for utilizada na cernelha, poderá haver a possibilidade de interferência com o reflexo de frêmito cutâneo.⁽¹⁸⁾ Adicionalmente, o uso de lâmpada pode gerar uma resposta condicionada do animal.

Para se aplicar os resultados experimentais dos testes nociceptivos em um dado contexto clínico, deve-se considerar a validade, caracterizada pela confiabilidade, sensibilidade e especificidade de cada teste e das correlações entre os testes. A confiabilidade ou reprodutibilidade refere-se à comparação de diversas aplicações de um mesmo estímulo, a um mesmo indivíduo, enquanto a sensibilidade e especificidade são definidas como as corretas identificações dos estímulos verdadeiros e falsos, respectivamente. Logo, para se produzir um instrumento satisfatório para o reconhecimento da dor, é necessário que o mesmo

seja facilmente entendido da perspectiva do paciente e do observador (no caso de animais), produza escores sensíveis e que se modifiquem após a administração de analgésicos, tenha efeito dose-resposta, apresente boa correlação entre a intensidade do estímulo e da dor, não resulte em dano tecidual, seja de fácil aplicação, com um ponto de corte claro, tenha validade e seja reproduzível.^(49, 52, 53)

Ademais, para que um instrumento seja considerado válido, é necessário que haja um acúmulo de evidências que apoiem as inferências realizadas a partir dos resultados deste instrumento; portanto, validade não é um conceito unitário e há várias formas de estimá-la.⁽²⁷⁾ A validade de um instrumento diz respeito ao grau de certeza de que as medidas realmente representam os conceitos, definida como sua capacidade em realmente mensurar aquilo que se propõe.⁽²⁸⁾ Por outro lado, a confiabilidade de um instrumento é a propriedade que assegura a obtenção de resultados semelhantes, quando a mensuração é repetida.⁽²⁸⁾ A avaliação da confiabilidade de um equipamento é realizada por meio da comparação de diversas aplicações do mesmo, a um mesmo indivíduo.⁽⁵⁴⁾

2.2. Analgesia em equinos

Fatores como a falta de critérios objetivos, a variabilidade farmacocinética entre as espécies e as diferentes respostas frente a estímulos nociceptivos distintos, dificultam a avaliação da necessidade de analgésicos no pós-operatório.⁽²⁹⁾ Muitas vezes, a dor é tratada de maneira inapropriada em grandes animais, devido, principalmente, à grande dificuldade no seu reconhecimento e o receio dos efeitos adversos dos fármacos, por parte dos profissionais.⁽²⁾ Em equinos, o uso de opioides ocasiona alguns efeitos adversos que limitam sua utilização, tais como excitação do sistema nervoso central, quando administrados pela via intravenosa,⁽¹⁹⁾ aumento da atividade locomotora espontânea^(18, 24, 30) e redução da motilidade gastrointestinal.⁽³¹⁾

2.2.1. Metadona

A metadona é um opioide desenvolvido nos anos de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, como alternativa ao uso da morfina.⁽⁵⁵⁾ É um opioide agonista sintético dos receptores μ , com propriedades farmacológicas similares à morfina, além de possuir atividade

antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)⁽⁵⁶⁾ e inibir a receptação de serotonina e norepinefrina no SNC.⁽⁵⁷⁾ O bloqueio do receptor NMDA pode prevenir o desenvolvimento de tolerância da metadona, já que a ativação do receptor pode produzir sensibilização central, que reduz os limiares de dor do sistema nervoso central.⁽⁵⁸⁾

A metadona é comumente utilizada para o alívio da dor crônica e neuropática, bem como no tratamento da dependência de opioides.⁽⁵⁹⁾ Também se emprega esse fármaco no controle da dor não responsiva a outros opioides μ agonistas, tais como o fentanil, a hidromorfona e a oxicodona.⁽⁵⁶⁾

Após administração intravenosa (IV) da metadona em equinos, nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg, observou-se aumento dose-dependente da atividade locomotora espontânea e estimulação do sistema nervoso central, iniciando 5 minutos após a administração do fármaco, com pico em 30 minutos e de acordo com a dose perdurando por 1 a 4 horas.^(24, 51) Por outro lado, a utilização da formulação injetável de metadona, administrada por via oral em equinos, foi bem tolerada e não ocasionou efeitos adversos tais como excitação, sedação e alterações comportamentais e fisiológicas, nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4 mg/kg.⁽⁶⁰⁾ Observou-se rápida e elevada concentração sérica do fármaco, consistente com analgesia em outras espécies, além de apresentar elevada depuração, pequeno volume de distribuição e meia-vida de eliminação curta nesta espécie.⁽⁶⁰⁾ Por fim, tanto a administração epidural de metadona,⁽⁶¹⁾ como a administração subaracnóidea de metadona hiperbárica,⁽²⁰⁾ produziram analgesia sem depressão cardiorrespiratória, ataxia ou excitação do sistema nervoso central em equinos.

A metadona apresenta biotransformação hepática e eliminação renal e fecal, sendo o citocromo P-450, a principal enzima envolvida na sua biotransformação.^(55, 62, 63)

Os equinos são mais sensíveis à ação dos opioides quando comparados ao rato e a cobaia, pois possuem maior densidade de receptores μ no córtex cerebral e no cerebelo.⁽⁶⁴⁾ Uma das formas de reduzir os efeitos indesejáveis do uso desses fármacos, como o aumento da atividade locomotora espontânea, é a administração de pequenas doses de tranquilizantes ou sedativos.⁽⁶⁵⁾ De acordo com a literatura,⁽²³⁾ os opioides podem ser associados a outros fármacos, como agonistas α_2 -adrenérgicos, a fim de melhorar a qualidade da sedação e da analgesia.

2.2.2. Agonistas α_2 -adrenérgicos

A utilização de baixas doses de opioides associados com α_2 -agonistas, além de reduzir os efeitos adversos ocasionados pelos opioides, potencializa os efeitos analgésicos e sedativos produzidos por estes fármacos em equinos.^(23, 24) A administração IV de butorfanol (25 $\mu\text{g/kg}$) ou levometadona (100 $\mu\text{g/kg}$) em associação à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$), além de aumentar o limiar nociceptivo, tanto para o estímulo térmico quanto para o pressórico, prolongou o efeito analgésico da detomidina.⁽²³⁾ Além disso, a associação intravenosa de metadona (0,2 mg/kg) à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$), potencializou a antinocicepção induzida pela detomidina tanto para o estímulo térmico, como para o elétrico, além de reduzir os efeitos adversos, principalmente de aumento da atividade locomotora espontânea, observados quando a metadona foi administrada como único fármaco, na dose de 0,5 mg/kg IV.⁽²⁴⁾

Os agonistas α_2 -adrenérgicos são amplamente empregados na prática veterinária, para sedação e analgesia.⁽³²⁾ São analgésicos potentes e induzem mudanças fisiológicas e comportamentais, tais como hipertensão, bradicardia, bloqueio atrioventricular, sedação intensa e ataxia.⁽⁶⁶⁾ Esses medicamentos muitas vezes são utilizados em associação com outros fármacos analgésicos, como os opioides, a fim de melhorar a qualidade da sedação, bem como a analgesia.⁽²³⁾

Conforme descrito previamente,⁽⁵⁰⁾ a detomidina ocasiona aumentos dose-dependentes na intensidade e duração da analgesia, quando administrada pela via IV em equinos. Porém, o aumento da dose não está relacionado com a intensidade da sedação. Diante deste fato, os autores concluíram que a detomidina é um analgésico efetivo para equinos, todavia, é mais potente em produzir sedação do que analgesia.

2.2.3. Acepromazina

Outro fármaco comumente utilizado na espécie equina é a acepromazina, a qual regularmente é empregada para reduzir o estresse durante transporte e em procedimentos clínicos e cirúrgicos.⁽⁶⁷⁾ Os efeitos da acepromazina (0,1 mg/kg IV) foram comparados à detomidina (20 $\mu\text{g/kg}$ IV) e romifidina (80 $\mu\text{g/kg}$ IV) em equinos, a fim de determinar qual seria o agente mais seguro e efetivo para esta espécie.⁽⁶⁸⁾ Neste estudo, avaliaram-se frequência e ritmo cardíacos, frequência respiratória, pressão arterial sistólica, além de pH, pressão parcial de oxigênio e pressão parcial de dióxido de carbono. Não se observou

excitação nos animais que receberam acepromazina; porém, a sedação observada com este agente não foi a desejada, contrariamente aos animais tratados com agonistas α_2 -adrenérgicos, os quais demonstraram uma sedação adequada.⁽⁶⁸⁾

A associação de acepromazina a diferentes doses de buprenorfina aumentou os limiares nociceptivos para o estímulo térmico, quando comparado ao seu uso isolado ou em associação com butorfanol em equinos.^(26, 34)

2.3. Hipóteses e justificativas do estudo

O reconhecimento da dor é fundamental para desenvolver estratégias analgésicas efetivas. Como não existem testes nociceptivos validados para uso em equinos, supõe-se que a comparação dos diversos estímulos irá gerar dados consistentes, que possibilitarão validar os diferentes estímulos nociceptivos para uso nesta espécie. O estudo em pauta justifica-se pelo fato que ainda não se estabeleceu uma comparação entre os diferentes modelos de estímulos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico na espécie equina, bem como, é necessário definir um modelo válido para avaliar com precisão a eficácia de fármacos analgésicos.

Por outro lado, a dor nem sempre é tratada adequadamente em grandes animais pelo receio dos efeitos adversos dos fármacos. Neste estudo, hipotetizou-se que a associação de metadona à acepromazina ocasiona antinocicepção, sem produzir excitação, que normalmente é observada com o uso isolado de opioides, e com efeitos adversos menos acentuados, quando comparada a associação com detomidina. Como a literatura cita que o uso concomitante de opioides com tranquilizantes ou sedativos apresenta inúmeros benefícios, tais como redução dos efeitos indesejáveis ocasionados pelo uso isolado de opioides⁽⁶⁵⁾ e melhora na qualidade da sedação e da analgesia,⁽²³⁾ o estudo proposto se justifica, uma vez que a associação de metadona à acepromazina pode ser uma alternativa de protocolo analgésico efetivo para uso em equinos.

3. Objetivos

Comparar os diferentes estímulos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico quanto a sua exequibilidade, confiabilidade, sensibilidade e especificidade em cavalos conscientes, para desenvolver um modelo metodológico válido para servir para estudos futuros que avaliem a eficácia e duração analgésica de diferentes fármacos.

Avaliar os efeitos antinociceptivos da administração IV da metadona associada à detomidina ou à acepromazina em cavalos e o método nociceptivo mais sensível para identificar o efeito destes analgésicos.

4. Material e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Instituição, sob o protocolo número 238/2011. Utilizaram-se oito equinos adultos com idade média de 10 ± 3 anos e peso médio de 405 ± 43 kg. Os animais eram de raças variáveis, sendo três quarto de milha, três manga larga, um árabe e um apalooza e foram considerados saudáveis após exame físico e laboratorial (hemograma e perfil bioquímico renal e hepático).

No período pré-experimental os equinos passaram por uma fase de adaptação prévia na baia, onde foram condicionados ao ambiente, aos observadores e aos equipamentos utilizados para avaliação da nocicepção. Além disso, durante o experimento, a baia foi mantida calma, com restrição à entrada de pessoas estranhas, ausência de movimentos bruscos e conversas em tons baixos. As avaliações foram realizadas sempre no mesmo período do dia, iniciando entre 7:00 e 8:00 da manhã. Os animais não foram submetidos a jejum hídrico ou alimentar.

O estudo foi dividido em duas etapas distintas (1 e 2), sendo a primeira correspondente à validação dos métodos nociceptivos elétrico, mecânico e térmico e a segunda, correspondente à avaliação dos efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos. A etapa 1 foi dividida em duas fases (1 e 2), a fim de avaliarmos a repetibilidade dos dados.

No dia do estudo, realizaram-se tricotomia bilateral na região dorsal do metacarpo, na região coronária do membro torácico e na lateral do tórax, próximo à inserção entre a décima e a décima quinta costela, ambos do lado esquerdo, para colocação dos equipamentos de avaliação nociceptiva. Para a segunda etapa, além dos locais citados acima, realizou-se tricotomia e antissepsia no terço médio da região cervical, para venopunção jugular, realizada com um cateter 14 G no sentido do fluxo sanguíneo, para posterior administração dos tratamentos. Em seguida, levou-se cada animal para uma baia onde permaneceram presos frouxamente com um cabresto, durante a realização dos testes.

4.1. Avaliação da atividade antinociceptiva

4.1.1. Estímulo mecânico e térmico

Considerou-se positivo o reflexo de retirada do membro frente ao estímulo mecânico e térmico quando o animal levantou o membro, bateu o membro no chão, contraiu o membro ou movimentou-se em reação de fuga. Avaliaram-se os limiares nociceptivos mecânico e térmico com equipamentos que utilizam sinais de infravermelho, operados com controle remoto, que ativavam um dispositivo mecânico e um térmico e registravam a pressão em Newtons (N) e a temperatura em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$), respectivamente (Topcat Metrology Ltd).

Para mensuração dos limiares nociceptivos mecânico e térmico, colocaram-se os dispositivos, fixados com ataduras de velcro, sobre a face dorsal do terço médio do metacarpo esquerdo e direito, respectivamente (Figura 1). Para avaliar o limiar mecânico utilizou-se um pino de 1 mm, pressionado contra a superfície da pele na razão de 0,8 N/s, por meio de dispositivo pneumático, até que o animal apresentasse a resposta de aversão descrita anteriormente ou se atingisse o ponto de corte de 20 N. Para o estímulo térmico, após a fixação do dispositivo aguardou-se aproximadamente 5 minutos para que houvesse equilíbrio entre a temperatura corporal e a do dispositivo. A partir daí aumentou-se gradativamente a temperatura na razão de 0,8 $^{\circ}\text{C/s}$, até se observar a resposta de aversão ou se atingir a temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$. Os valores correspondentes aos limiares nociceptivos mecânico e térmico foram registrados automaticamente nos visores digitais dos respectivos equipamentos. Para o estímulo térmico, o limiar foi calculado subtraindo-se a temperatura atingida da temperatura da pele.



Figura 1 - Posicionamento dos dispositivos dos equipamentos para determinar os limiares nociceptivos mecânico e térmico no membro, fixados sobre a face dorsal do terço médio do metacarpo esquerdo e direito do equino, respectivamente. O dispositivo mecânico registra a pressão em Newtons (N) e o térmico, registra a temperatura em graus Celsius (°C) (Topcat Metrology Ltd)

4.1.2. Estímulo térmico torácico

Para avaliar o limiar nociceptivo térmico torácico, fixou-se outro dispositivo na região torácica, caudal à cernelha⁽²⁶⁾ (Figura 2). Ajustou-se o dispositivo com uma cinta torácica, a qual recebeu uma pressão entre 60 e 80 mmHg a fim de garantir o ajuste correto. O modo de funcionamento foi igual ao descrito para avaliar o limiar nociceptivo térmico no membro; porém, o reflexo de aversão nesse caso, caracterizou-se pela contração muscular da pele no local ou olhar para trás em direção ao sensor. Para evitar dano tissular, o estímulo máximo limitou-se a 60°C.

Sempre que três estímulos térmicos consecutivos atingissem 60°C, reposicionava-se o dispositivo para uma região lateral a fim de evitar a sensibilização dos receptores e/ou danos tissulares na área de estímulo.



Figura 2 - Posicionamento do dispositivo do equipamento para determinar o limiar nociceptivo térmico torácico, fixado na região torácica, caudal à cernelha do equino. O dispositivo registra a temperatura em graus Celsius (°C) (Topcat Metrology Ltd)

4.1.3. Estímulo elétrico

Produziu-se o estímulo elétrico com auxílio de um estimulador de nervos¹. Fixou-se dois eletrodos adesivos, aproximadamente sete centímetros de distância entre si, sobre a banda coronária do membro torácico esquerdo, previamente submetido à tricotomia e lavado com água e sabão⁽³⁶⁾ (Figura 3). Aplicou-se um estímulo elétrico seriado, iniciado em 1 V e incrementado até o máximo 15 V na fase 1 e 40 V na fase 2, com corrente alternada, quadrada, de 50 Hz e com 10 ms de duração, de forma crescente, 1 V para cada 5 segundos,

¹Estimulador elétrico GRASS S-48

até o reflexo de retirada. As respostas positivas foram consideradas da mesma forma que para os estímulos térmicos e mecânicos descritos anteriormente para os membros.



Figura 3 - Posicionamento dos eletrodos adesivos na banda coronária do membro torácico esquerdo do equino, para determinar o limiar nociceptivo elétrico. O equipamento registra a voltagem (V)

4.2. Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em equinos

4.2.1. Delineamento experimental

Em cada fase, dois observadores encobertos aos estímulos falsos ou verdadeiros, executavam oito séries de quatro testes nociceptivos distintos, sendo quatro séries para cada observador. Cada série correspondia a três estímulos verdadeiros e um falso, de forma aleatória, com um intervalo de 10 minutos entre cada série. Como o tipo (mecânico, elétrico, térmico no membro e térmico torácico) e a sequência dos estímulos foram distribuídos aleatoriamente entre os cavalos e os observadores, não necessariamente o número de estímulos verdadeiros e falsos foi distribuído igualmente entre os observadores e os cavalos. Em cada fase, cada cavalo foi submetido a 32 estímulos, dos quais 16 para cada observador. Como se utilizaram oito animais, em cada fase realizaram-se 256 estímulos, totalizando 512 nas duas fases.

4.2.2. Repetibilidade

Avaliou-se a repetibilidade dos dados pela realização de uma nova série de estímulos, repetidos após seis meses e avaliados pelos mesmos observadores.

4.2.3. Falsidade dos testes

Para assegurar que os animais e os observadores reconheceriam estímulos falsos como tal, realizou-se um estímulo falso aleatório, para cada um dos quatro testes nociceptivos, com o equipamento desligado ou desconectado. Para realizar o estímulo mecânico falso, desconectava-se o cabo que ligava o visor digital do referido equipamento ao dispositivo pressórico fixado no metacarpo do animal e desta forma, este não recebia a pressão do pino contra a superfície da sua pele. Para realizar o estímulo térmico falso, adaptou-se um outro dispositivo térmico, o qual permanecia sem contato com a pele do animal. Por fim, para realizar o estímulo elétrico falso, realizava-se o estímulo com o equipamento desligado.

De um total de 32 estímulos realizados por animal, em cada fase, oito (25%) eram falsos. Nestes casos esperava-se alcançar os limiares máximos.

4.3. Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos

4.3.1. Delineamento experimental

Os mesmos oito equinos foram submetidos a três tratamentos IV: controle - C (15 mL de solução salina²); MD (0,2 mg/kg de metadona³ associada à 10 µg/kg de detomidina⁴) e MA (0,2 mg/kg de metadona associada à 0,05 mg/kg de acepromazina⁵), administrados aleatoriamente, com intervalo mínimo de uma semana entre cada tratamento. Para todos os tratamentos, o volume final foi ajustado até 15 mL, com adição de solução salina e administrado em *bolus*, durante um minuto.

Antes da administração dos tratamentos, realizaram-se três mensurações dos testes nociceptivos, com intervalo de 10 minutos entre cada mensuração, na sequência: estímulo mecânico, térmico no membro, elétrico e térmico torácico. Aplicaram-se o estímulo mecânico e o térmico no membro nos metacarpos esquerdo e direito, respectivamente. Realizou-se o estímulo elétrico na região coronária do casco do membro torácico esquerdo e o térmico torácico na região lateral esquerda do tórax. Para o estímulo térmico, calculou-se o limiar subtraindo-se a temperatura atingida da temperatura da pele. Para todos os estímulos, considerou-se a média aritmética dos três valores obtidos como o limiar nociceptivo basal.

Após a obtenção do limiar nociceptivo basal (tempo 0), instituiu-se o tratamento e realizou-se a avaliação nociceptiva aos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 150 minutos.

4.4. Análise Estatística

Na etapa 1, produziram-se distribuições de frequência para validar os dados e apresentar as estatísticas descritivas. Utilizou-se o teste de Qui-quadrado para comparar a

² Cloreto de sódio 0,9% - solução fisiológica, Halex Istar Indústria Farmacêutica, Goiânia, GO.

³ Mytedom, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira-SP.

⁴ DormiunV, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP.

⁵ Acepran 1%, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP.

proporção de respostas positivas entre os observadores. Realizou-se esta análise para cada fase do estudo e pela combinação das duas fases. Utilizou-se o teste de McNemar para comparar a proporção de respostas positivas entre as fases do estudo, para cada observador e para cada estímulo.

Avaliou-se a acurácia diagnóstica dos observadores para classificar corretamente os estímulos como verdadeiros ou falsos por meio da sensibilidade e especificidade, avaliadas por combinação de todos os dados (observadores, fases e estímulos) e para cada variável em separado (por observador, fase e estímulo).

Estimou-se o coeficiente Kappa para avaliar a concordância entre os dois observadores nas duas fases e estímulos agrupados. Avaliou-se a homogeneidade dos coeficientes Kappa para testar as diferenças na concordância entre os observadores entre as fases do estudo e os diferentes estímulos. Realizaram-se as análises com o procedimento estatístico PROC FREQ,⁽⁶⁹⁾ com a significância estatística definida por $p < 0,05$.

As diferenças entre os estímulos aplicados nas duas fases foram analisadas pelo teste t pareado.

Para a etapa 2, inicialmente analisou-se a distribuição das variáveis-resposta com um dos critérios para escolha do método analítico. Devido à presença de graus variados de assimetria e desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, usou-se o teste da soma de postos de Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test)⁽⁷⁰⁾ para comparar a mediana de cada variável-resposta entre os grupos de estudo. Estas comparações foram feitas dentro de cada momento. Para cada grupo experimental, o teste de postos de sinais de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test) foi usado para comparar a mediana das variáveis-resposta entre o momento basal e os momentos subsequentes. O método de Bonferroni⁽⁷¹⁾ foi usado para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas. Realizou-se a análise estatística com o procedimento PROC NPAR1WAY⁽⁶⁹⁾ e definiu-se a significância estatística como $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. *Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em equinos*

Durante a etapa 1, os animais toleraram bem os testes, que duraram em torno de 1,5 horas em cada fase. De um total de 512 estímulos nas duas fases, 384 (75%) foram verdadeiros e 128 (25%) falsos. Cada observador realizou 256 estímulos (50%). O número e porcentagem das respostas individuais de aversão aos estímulos nociceptivos e o número e porcentagem de falso negativos e positivos, encontram-se na Tabela 1.

Na Figura 4 encontram-se os limiares nociceptivos de cada estímulo, nas duas fases isoladas e combinadas. A única diferença foi para o estímulo térmico no membro, onde os valores da fase 2 foram significativamente maiores que os da fase 1 ($p = 0,0001$).

Tabela 1 – Número e percentagem das respostas individuais de aversão e o número e percentagem de falso negativos e falso positivos, apresentados pelos cavalos, frente aos 512 estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico, realizados durante as duas fases

Estímulo	Resposta de aversão	Número	%	Nº e % de falso negativos	Nº e % de falso positivos
Elétrico	Levantou o membro	66	52	11 (11%)	2 (6%)
	Não reagiu	39	30		
	Bateu o membro no chão	16	12		1 (3%)
	Movimentou-se	3	2		1 (3%)
	Contraiu o membro	2	2		
	Olhou para o local do estímulo	2	2		
Total		128	100	11	4
Mecânico	Levantou o membro	65	51	0	1 (3%)
	Não reagiu	31	24		
	Bateu o membro no chão	25	20		
	Contraiu o membro	5	3		
	Movimentou-se	2	2		
Total		128	100	0	1
Térmico no membro	Levantou o membro	75	59	2 (2%)	2 (6%)
	Não reagiu	31	24		
	Bateu o membro no chão	11	9		
	Movimentou-se	8	6		1 (3%)
	Contraiu o membro	3	2		
Total		128	100	2	3
Térmico torácico	Não reagiu	59	46	29 (30%)	
	Tremeu a cernelha	45	35		
	Olhou para o local do estímulo	21	16		1 (3%)
	Movimentou-se	2	2		1 (3%)
	Levantou o pescoço para trás	1	1		
Total		128	100	29	2

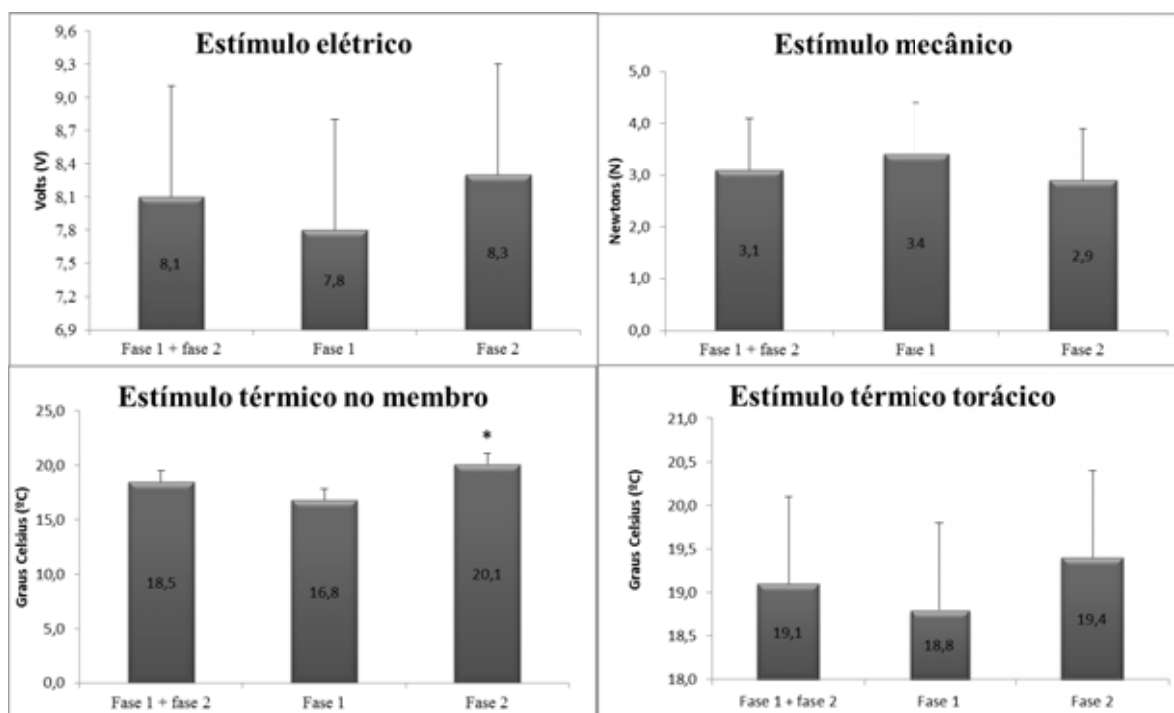


Figura 4 – Limiares nociceptivos do estímulo (a) elétrico (Volts), (b) mecânico (Newtons), (c) térmico no membro (graus Celsius) e (d) térmico torácico (graus Celsius), com os dados combinados ou em cada fase. *Diferença entre as fases do estudo

Dos 164 estímulos que coincidiram para os dois observadores, ou seja, os mesmos estímulos aplicados nos mesmos animais, 147 foram identificados como verdadeiros ou falsos corretamente por ambos, o que caracterizou uma concordância de 90% ($\kappa = 0,69$; 95% IC: 0,56 – 0,82), dos quais 92% (75 de 82 estímulos coincidentes) ($\kappa = 0,72$; 95% IC: 0,53 – 0,91) na fase 1 e 88% (72 de 82 estímulos coincidentes) ($\kappa = 0,66$; 95% IC: 0,48 – 0,85) na fase 2, sem diferença entre as fases ($p = 0,69$).

A concordância entre os observadores não foi homogênea entre os estímulos ($p = 0,018$). O estímulo mecânico foi o único que apresentou 100% de concordância (44 estímulos coincidentes) entre os observadores ($\kappa = 1$), seguido do térmico no membro, com 97% de concordância (39 de 40 estímulos coincidentes; $\kappa = 0,88$; 95% IC: 0,63 – 1). Para o elétrico a concordância foi de 84% (37 de 44 estímulos coincidentes; $\kappa = 0,53$; 95% IC: 0,22 – 0,83) e o estímulo que obteve menor concordância foi o térmico torácico, de 75% (27 de 36 estímulos coincidentes; $\kappa = 0,50$; 95% IC: 0,22 – 0,77).

Quando avaliaram-se os dados por fase, a proporção de respostas positivas entre os observadores também não foi diferente entre as etapas do estudo ($p = 0,44$). O observador 1 identificou corretamente como respostas positivas 73% (93 de 128 estímulos) e 65% (83 de 128 estímulos) e como negativas 27% (35 de 128 estímulos) e 35% (45 de 128 estímulos) nas fases 1 e 2, respectivamente. O observador 2 identificou 70% (89 de 128 estímulos) e 68% (87 de 128 estímulos) como respostas positivas e 31% (39 de 128 estímulos) e 32% (41 de 128 estímulos) como negativas, nas fases 1 e 2, respectivamente.

Ao se agrupar os dados de todos os estímulos e dos dois observadores, na fase 1, 71% (182 de 256 estímulos) das respostas foram positivas e 29% (74 de 256 estímulos) foram negativas. Na fase 2, a percentagem de respostas positivas reduziu significativamente ($p < 0,0001$), para 66% (170 de 256 estímulos) de respostas positivas e 34% (86 de 256 estímulos) de negativas.

O número e a percentagem de respostas positivas e negativas em cada fase e nas duas fases agrupadas, para cada estímulo nociceptivo, estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2 – Número e percentagem de respostas positivas e negativas identificadas pelos dois observadores, para os estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico aplicados em cavalos, em cada fase e nas duas fases agrupadas

Tipo de estímulo (n = 64 em cada)						
Fase	Observador	Resposta	Elétrico	Mecânico	Térmico no membro	Térmico torácico
1	1 e 2	Positiva	46 (72%)	49 (77%)	50 (78%)	37 (58%)
		Negativa	18 (28%)	15 (23%)	14 (22%)	27 (42%)
2		Positiva	43 (67%)	48 (75%)	47 (73%)	32 (50%)
		Negativa	21 (33%)	16 (25%)	17 (27%)	32 (50%)
1 e 2	1	Positiva	44 (69%)	49 (77%)	46 (72%)	37 (58%)
		Negativa	20 (31%)	15 (23%)	18 (28%)	27 (42%)
	2	Positiva	45 (70%)	48 (75%)	51 (80%)	32 (50%)
		Negativa	19 (30%)	16 (25%)	13 (20%)	32 (50%)

A sensibilidade foi de 89%, ou seja, dos 384 estímulos verdadeiros, 342 foram corretamente identificados como tal pelos dois observadores. Dos 128 falsos, 118 foram corretamente identificados pelos observadores, o que correspondeu a uma especificidade geral de 92%. A Tabela 3 apresenta os dados referentes à sensibilidade e especificidade para cada estímulo, em cada fase do estudo ou quando os dados das duas fases e dos dois observadores foram agrupados.

Tabela 3 – Sensibilidade e especificidade para os estímulos nociceptivos elétrico, mecânico, térmico no membro e térmico torácico aplicados em cavalos, em cada fase do estudo ou nas duas fases agrupadas, pelos dois observadores agrupados

	Fases	Sensibilidade	Especificidade
Elétrico	1	92% (44/48)	87% (14/16)
	2	85% (41/48)	87% (14/16)
	1 e 2	89% (85/96)	87% (28/32)
Mecânico	1	100% (48/48)	94% (15/16)
	2	100% (48/48)	100% (16/16)
	1 e 2	100% (96/96)	97% (31/32)
Térmico no membro	1	100% (48/48)	87% (14/16)
	2	96% (46/48)	94% (15/16)
	1 e 2	98% (94/96)	91% (29/32)
Térmico torácico	1	77% (37/48)	100% (16/16)
	2	62% (30/48)	87% (14/16)
	1 e 2	70% (67/96)	94% (30/32)

Observaram-se algumas lesões superficiais nos locais de aplicação dos testes térmicos, principalmente na região torácica dos animais. Tais lesões desapareceram 48 horas após as avaliações, sem deixar cicatriz. Os outros testes nociceptivos não causaram nenhuma lesão local.

5.2. Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos

Na etapa 2, observaram-se sinais clássicos de sedação por agonistas α_2 -adrenérgicos, tais como abaixamento de cabeça, ataxia, abertura do quadrilátero de apoio, sialorréia, sudorese e ptose labial e palpebral nos animais do grupo MD. Já os animais do grupo MA apresentaram sinais menos acentuados, com menor grau de abaixamento de cabeça e ataxia, sem apresentar sudorese e sialorréia.

O tratamento C não produziu efeitos antinociceptivos nos cavalos ao longo do tempo. O único estímulo que não apresentou diferenças significativas em relação ao valor basal para o grupo controle foi mecânico (Tabela 4 e Figura 5).

Os limiares nociceptivos mecânicos aumentaram dos 15 aos 45 minutos em MD e dos 15 aos 90 min em MA em relação ao basal (Tabela 4 e Figura 5). Este estímulo foi aparentemente o mais sensível para diferenciar os efeitos analgésicos dos fármacos. Dos 15 aos 30 minutos de avaliação, todos os grupos diferiram entre si; onde o tratamento MD apresentou valores maiores que o MA, que por sua vez apresentou valores maiores que o C. Dos 45 aos 60 minutos, os valores de MD e MA foram maiores que o C.

Tabela 4 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico (Newtons) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Tempo (minutos)	Tratamentos		
	C	MA	MD
0	3,5 $\pm$ 2,7	2,4 $\pm$ 1,9	2,5 $\pm$ 1,1
15	2,4 $\pm$ 1,8c	9,9 $\pm$ 5,4b*	18,8 $\pm$ 4,3a*
30	2,2 $\pm$ 1,3c	9,8 $\pm$ 5,8b*	18,8 $\pm$ 4,3a*
45	2,3 $\pm$ 0,9	8,3 $\pm$ 6a*	14 $\pm$ 6,1a*
60	2,1 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 3,2a*	9,4 $\pm$ 8,4a
75	2,7 $\pm$ 1,6	6,5 $\pm$ 5,5*	7,3 $\pm$ 7,6
90	2,9 $\pm$ 2,5	7,2 $\pm$ 4,4*	7,1 $\pm$ 5,7
105	2 $\pm$ 1b	5 $\pm$ 3a	3,8 $\pm$ 3,4ab
120	2,1 $\pm$ 1,1b	5,7 $\pm$ 3,3a	5,8 $\pm$ 3,8ab
150	3,1 $\pm$ 2,6	5,2 $\pm$ 2,9	4,4 $\pm$ 4,5

*Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$).

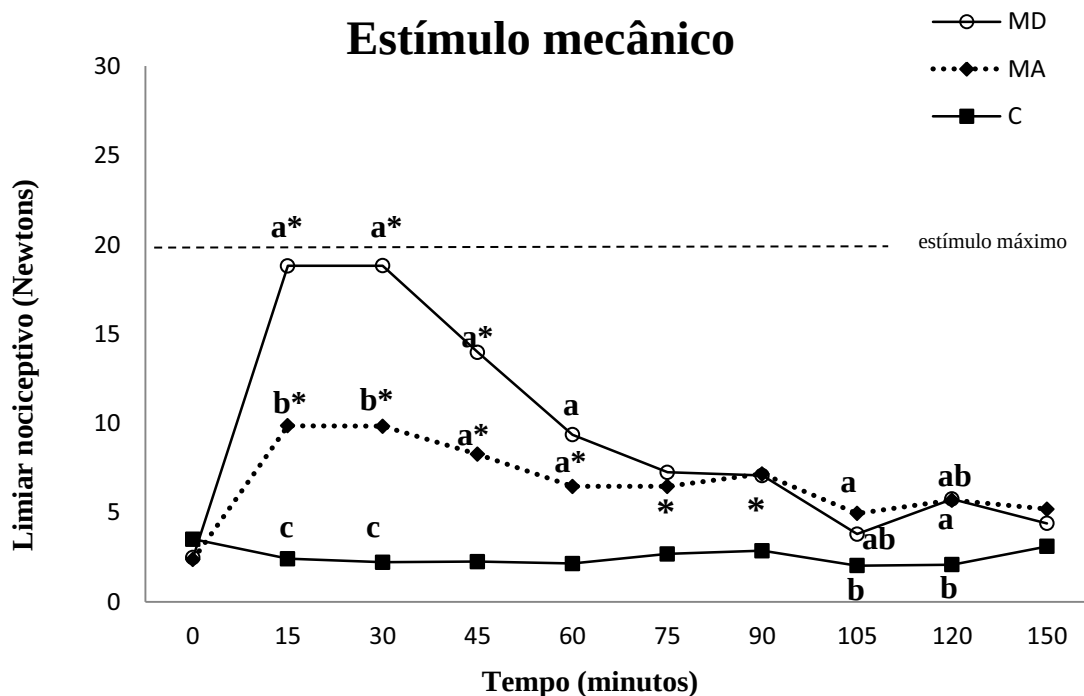


Figura 5 - Valores médios do limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico (Newtons) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$)

No estímulo elétrico, o limiar aumentou aos 15 minutos em MD e em C ocorreu uma redução aos 45 minutos, em relação aos valores basais. O tratamento MD produziu maior limiar que o C dos 15 aos 45 minutos (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo elétrico (Volts) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 μ g/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Tempo (minutos)	Tratamentos		
	C	MA	MD
0	20,7 $\pm$ 14,6	30 $\pm$ 15,7	16,2 $\pm$ 10,8
15	16 $\pm$ 12,9b	32,5 $\pm$ 12,3ab	36,3 $\pm$ 5,2a*
30	12,5 $\pm$ 12b	24,9 $\pm$ 15,1ab	26,4 $\pm$ 11,6a
45	6,9 $\pm$ 4,5b*	20,2 $\pm$ 17,7ab	21,6 $\pm$ 12,9a
60	13,4 $\pm$ 14,2	21,8 $\pm$ 16,5	18,7 $\pm$ 14,2
75	14 $\pm$ 12,6	23,7 $\pm$ 15,4	17,9 $\pm$ 15,4
90	15,2 $\pm$ 15,7	24,8 $\pm$ 15,3	15,6 $\pm$ 15,5
105	13,8 $\pm$ 14,1	20,9 $\pm$ 17,7	12,2 $\pm$ 12,3
120	12,2 $\pm$ 12	20,7 $\pm$ 15,5	14,1 $\pm$ 16,1
150	10,7 $\pm$ 12,3	18,4 $\pm$ 15,2	11,8 $\pm$ 12

*Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$).

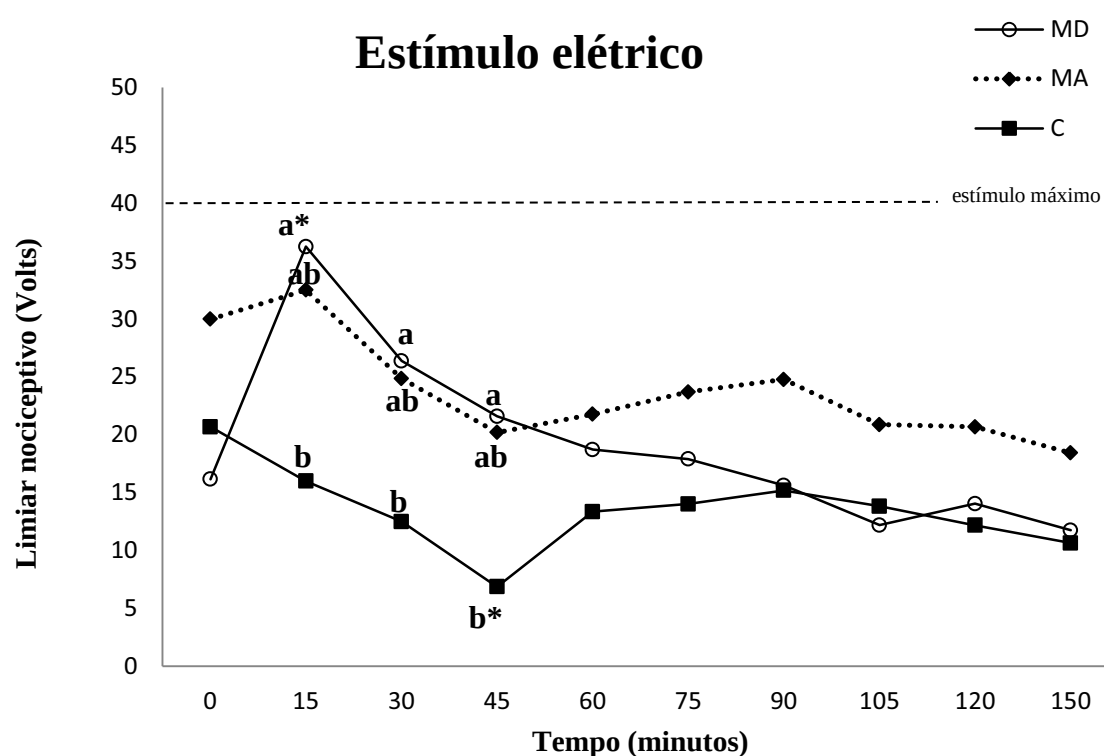


Figura 6 - Valores médios do limiar nociceptivo frente ao estímulo elétrico (Volts) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$)

Para o estímulo térmico no membro, ocorreu um aumento em relação ao basal, aos 45 minutos em MD e uma redução aos 30 minutos em C e aos 150 minutos em MA (Tabela 6 e Figura 7). Os limiares em MA e MD foram maiores que em C aos 30 minutos e aos 15, 45, 75 e 105 minutos MD apresentou valores superiores a C (Tabela 6 e Figura 7).

Tabela 6 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico no membro ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Tempo (minutos)	Tratamentos		
	C	MA	MD
0	20,9 $\pm$ 4,3	23,3 $\pm$ 7,3	23,1 $\pm$ 5,7
15	18,3 $\pm$ 7b	25,3 $\pm$ 7,3ab	28,8 $\pm$ 4,5a
30	16,3 $\pm$ 3,7*	23,9 $\pm$ 6,1a	28,6 $\pm$ 1,6a
45	17,3 $\pm$ 5,7b	23,4 $\pm$ 5,1ab	27,9 $\pm$ 4,4a*
60	18,3 $\pm$ 4,1	19,9 $\pm$ 7,4	24,7 $\pm$ 7,2
75	16,5 $\pm$ 4,5b	21,2 $\pm$ 5,8ab	25,6 $\pm$ 6,4a
90	15,4 $\pm$ 4,2	20,6 $\pm$ 6,8	22,6 $\pm$ 8,8
105	13,6 $\pm$ 4,2b	20,1 $\pm$ 6,6ab	23 $\pm$ 6,8a
120	17,7 $\pm$ 3,9	19,3 $\pm$ 6,1	22,6 $\pm$ 6,3
150	15,2 $\pm$ 5,8	15,1 $\pm$ 5*	21,6 $\pm$ 7,6

*Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$).

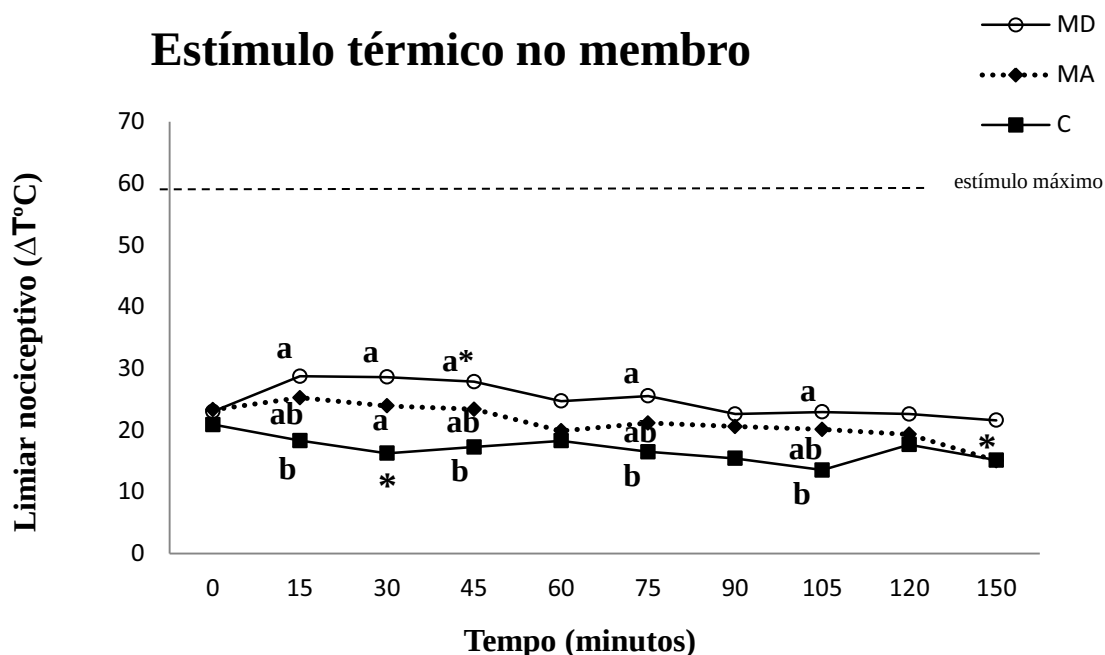


Figura 7 - Valores médios do limiar nociceptivo ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) frente ao estímulo térmico no membro de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$)

O limiar nociceptivo térmico torácico aumentou em relação ao basal aos 90 minutos em MD e reduziu aos 75 e 120 e aos 150 minutos em C e MA, respectivamente (Tabela 7 e Figura 8). Os limiares foram maiores em MD e MA em comparação ao C aos 15, 45, 90 e 120 minutos e 30, 45, 60 e 75 minutos, respectivamente (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico torácico ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Tempo (minutos)	Tratamentos		
	C	MA	MD
0	22,8 $\pm$ 1,9	23,3 $\pm$ 5,2	22,1 $\pm$ 4,8
15	20,4 $\pm$ 4,2b	23,8 $\pm$ 3,1ab	24,7 $\pm$ 1,3a
30	20,1 $\pm$ 5,3b	23,8 $\pm$ 2,6a	24,2 $\pm$ 1,5ab
45	15,6 $\pm$ 7,1	24 $\pm$ 1,4a	24,7 $\pm$ 1,2a
60	18,9 $\pm$ 5,9b	24,5 $\pm$ 0,5a	23,5 $\pm$ 3,1ab
75	17,2 $\pm$ 6,3b*	24,6 $\pm$ 0,6a	23,5 $\pm$ 4,2ab
90	19,6 $\pm$ 6,4b	24 $\pm$ 1,1ab	25,2 $\pm$ 1,8a*
105	19,4 $\pm$ 5,2	22,3 $\pm$ 4,7	23,9 $\pm$ 3,2
120	16,6 $\pm$ 6,4b*	21,9 $\pm$ 6ab	23,5 $\pm$ 4,4a
150	20 $\pm$ 5,1	20,3 $\pm$ 5,9*	21,6 $\pm$ 5,2

*Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$).

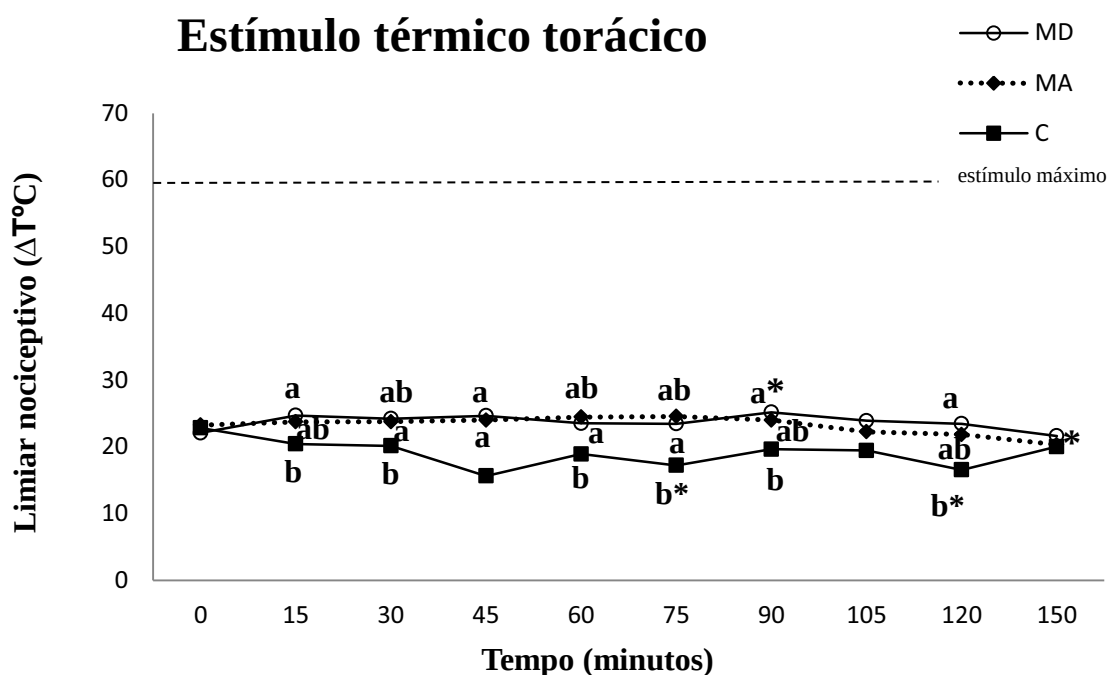


Figura 8 - Valores médios do limiar nociceptivo ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) frente ao estímulo térmico torácico de equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV. *Diferença significativa em relação ao momento basal (tempo 0). Letras diferentes expressam diferença significativa entre os grupos em cada momento ($p < 0,05$)

Observaram-se algumas lesões superficiais nos locais de aplicação dos testes térmicos, principalmente na região torácica dos animais. Tais lesões desapareceram 48 horas após as avaliações, sem deixar cicatriz. Os outros testes nociceptivos não causaram nenhuma lesão local.

6. Discussão

6.1. *Etapa 1: Validação dos métodos nociceptivos mecânico, elétrico e térmico em equinos*

Este estudo valida estímulos mecânicos, elétricos e térmicos para testes de limiares nociceptivos em cavalos. A escolha da modalidade de qualquer estudo futuro vai depender das características da investigação. Os estímulos mecânicos e elétricos são menos propensos a causar lesões na pele, no entanto, o elétrico apresenta a desvantagem de ser um estímulo não fisiológico e, por ativar as fibras nervosas indistintamente e não apenas as nociceptivas, pode dificultar a extrapolação dos resultados para situações clínicas.

A concordância entre observadores, para os diferentes estímulos nociceptivos, variou de excelente a regular.⁽⁷²⁾ O estímulo mecânico apresentou maior concordância e sensibilidade, seguido do térmico no membro, elétrico e térmico torácico. A especificidade foi maior para o estímulo mecânico, seguido do térmico torácico, térmico no membro e, por fim, o elétrico. Exceto a sensibilidade do estímulo térmico torácico, o restante dos dados de concordância, sensibilidade e especificidade, encontram-se próximos ou acima de 90%, demonstrando a validade dos estímulos nociceptivos mecânico, térmico no membro e elétrico.

A validação de um instrumento define a capacidade em realmente mensurar aquilo que se propõe.⁽²⁸⁾ Os estímulos aqui estudados se enquadram próximo das características ideais de um teste nociceptivo.^(49, 52, 53) As mudanças comportamentais frente aos estímulos nociceptivos foram transitórias e as respostas aversivas foram consistentes, muito similares e aparentemente de fácil identificação pelos animais e observadores, para todos os estímulos nos membros, cujas respostas aversivas mais características foram o movimento de levantar ou bater o membro no chão, observadas em 80 a 90% dos animais. Os estímulos são de fácil aplicação, particularmente o mecânico e térmico, que funcionam por controle remoto, minimizando o comportamento condicionado. Todos os estímulos tiveram um ponto de corte definido para se evitar lesões e somente o estímulo térmico torácico produziu lesão local, prontamente restabelecida após 48 horas.

A escolha de uma resposta comportamental para interrupção do estímulo nociceptivo deve levar em conta as diferentes espécies e suas variabilidades individuais.⁽⁴⁹⁾

Em cavalos, a localização do estímulo nociceptivo nos membros, pode ser um problema potencial para detectar o ponto de corte, já que a movimentação do animal desvinculada de uma resposta aversiva pode ser considerada como ponto de corte para interrupção do estímulo. No nosso estudo, o número de falso positivos foi muito pequeno e não se observou este problema. Por outro lado, em se tratando da administração de alguns analgésicos, como os opioides, pode ocorrer estimulação motora e má interpretação na detecção do movimento de retirada do membro.⁽⁵¹⁾ O oposto ocorre quando se utilizam α_2 -agonistas, os quais causam sedação e ataxia e aumentam a probabilidade de falso negativos.⁽⁵⁰⁾ No caso do tórax, em ambientes com insetos, os testes na cernelha podem desencadear uma falsa resposta, quando se considera a contração da pele como ponto de corte.⁽⁴⁹⁾ Neste estudo, tomou-se o cuidado de usar repelentes e uma capa nos animais, a fim de minimizar a interferência das moscas nos resultados; porém, mesmo assim os dados foram menos consistentes do que os obtidos com o estímulo térmico no membro.

Em equinos, como se realiza a maioria dos estudos analgesiométricos nas baias, pode ocorrer estresse pelo ambiente estranho e interrupção dos laços sociais.⁽⁴⁹⁾ Neste estudo, os animais adaptaram-se previamente à baia e aos equipamentos, pelo fato que já havia sido realizado um estudo anterior com metodologia semelhante.

Com o objetivo de minimizar a interferência relacionada ao sexo, optou-se em utilizar somente machos, já que em roedores⁽⁷³⁾ e no homem,⁽⁷⁴⁾ há diferenças nas respostas nociceptivas relacionadas ao gênero.

Como se utilizam vários métodos nociceptivos mecânicos em equinos,^(23, 44, 48) em decorrência da variabilidade desses dispositivos, realizou-se um estudo prévio no qual testaram-se quatro pinos distintos, quando selecionou-se o pino de 1 mm por apresentar limiares nociceptivos menores e menos variáveis.⁽⁷⁵⁾

Os limiares nociceptivos elétricos foram similares⁽¹⁹⁾ ou superiores⁽²⁵⁾ aos reportados pela literatura, que observaram valores de $2,9 \pm 0,4$ V para o mesmo estímulo e local. Embora o estímulo tenha sido mensurado pela voltagem em vez de corrente elétrica, a distância entre os eletrodos foi a mesma em todos os casos. Além disso, utilizaram-se os mesmos animais, o que garante a mesma impedância. Para o estímulo mecânico os valores foram similares ao reportado previamente,⁽⁴³⁾ mas para o térmico torácico a média dos limiares máximos atingidos foram maiores que os reportados pela literatura⁽²⁶⁾

(aproximadamente 56 *versus* 46 °C). Tal fato pode estar relacionado à maior temperatura ambiente no presente estudo. A tranquilidade dos animais aliada à utilização de cavalos de raças variadas e que estavam bem acostumados ao manuseio, pode ter contribuído para o aumento nos limiares, quando comparado a cavalos de sangue quente, como o puro-sangue inglês.

A literatura reporta diversos métodos para teste nociceptivo elétrico em equinos, mas não há padronização da corrente elétrica e localização dos eletrodos, como implantação de eletrodos na polpa dentária⁽⁴¹⁾ ou fixação dos mesmos na banda coronária^(23, 43) ou no nervo digital palmar.^(21, 76) Neste estudo, dentre os estímulos aplicados no membro, o estímulo elétrico foi o que apresentou o maior número de falso negativos. Uma opção para melhorar a sensibilidade seria aumentar o limiar máximo para interrupção do estímulo.^(19, 20)

Pode-se realizar os estímulos térmicos com auxílio de lâmpadas de projeção de calor focadas na banda coronária^(18, 25) ou na cernelha.⁽¹⁸⁾ Em ambos os casos, mesmo ao se utilizar uma lâmpada fria como estímulo falso, pode haver uma resposta condicionada do animal. Dentre todos os estímulos nociceptivos, o térmico torácico apresentou o maior número de falso negativos e, portanto, a mais baixa sensibilidade, o que se deve levar em conta em estudos futuros, pela possibilidade de interpretação errônea do efeito antinociceptivo de um fármaco.

A interpretação dos critérios de concordância entre observadores foi baseada na avaliação do coeficiente kappa,⁽⁷²⁾ que considera a concordância excelente, boa, regular e pobre quando kappa é maior que 0,75; entre 0,59 e 0,74; entre 0,40 e 0,58 e abaixo de 0,40 respectivamente. A partir deste critério, as concordâncias geral e de cada fase foram consideradas boas, mesmo com a redução da mesma na fase 2, o que demonstra uma boa reprodutibilidade ou confiabilidade (inter-observadores) e repetibilidade (intra-observadores), o que isenta da necessidade de mais de um observador em estudos futuros que adotem estes modelos nociceptivos.

Por outro lado, a concordância não foi homogênea quando avaliou-se cada estímulo separadamente. Enquanto para os estímulos mecânico e o térmico no membro as concordâncias foram excelentes, para o elétrico e o térmico torácico foram regulares, o que evidencia que os animais demonstraram mais claramente a resposta de aversão nos primeiros, o que facilitou a interpretação dos observadores.

A menor proporção de respostas positivas corretamente identificadas na fase 2 em relação a fase 1, quando agruparam-se os dados dos dois observadores pode se dever a má interpretação por parte do(s) observador(es) dos sinais em resposta ao estímulo nociceptivo e/ou a variação das respostas dos animais de acordo com a experiência cognitiva. A experiência do operador, dada a maior familiaridade com o equipamento e os animais, deveria melhorar a interpretação das respostas aversivas;^(49, 77) porém, observou-se resultados opostos neste estudo, oriundo das interpretações do observador 1 (redução de 7,8% na detecção de respostas positivas, *versus* 1,6% para o observador 2), provavelmente pela falsa sensação de aprendizado.

Após testes prolongados, os cavalos podem aprender a responder a um estímulo antes que se torne aversivo.^(78, 79) Neste estudo, como relatado anteriormente, observou-se o contrário e a menor responsividade poderia estar relacionada à adaptação dos animais frente aos estímulos.

O estudo apresentou algumas limitações. Observou-se grande número de respostas falso negativas no estímulo térmico torácico. Contrariamente ao estímulo elétrico, em que se poderia aumentar o ponto de corte,^(19, 20) para o estímulo térmico torácico, não se sugere esse aumento, em função das lesões superficiais observadas nos locais de aplicação do estímulo. O estímulo térmico torácico não foi devidamente detectado por cavalos de montaria, o que indica que os resultados dos testes nociceptivos térmicos aplicados no tórax devem ser interpretados com cautela em animais que são submetidos a exercícios regulares, pois o contato permanente da sela pode reduzir a sensibilidade.

6.2. Etapa 2: Efeitos antinociceptivos da metadona associada à detomidina ou acepromazina em equinos

Neste modelo de estudo experimental, observou-se que a associação de metadona à acepromazina promoveu efeito antinociceptivo, entretanto menos acentuado, quando comparada a associação com detomidina; porém, com efeitos menores adversos, o que confirma a hipótese inicial da pesquisa.

O estudo prévio de validação dos estímulos nociceptivos (primeira etapa do estudo), serviu para conhecimento do comportamento individual dos equinos nas condições experimentais, o que facilitou a identificação de alterações comportamentais e características

específicas de cada animal na detecção de cada estímulo nociceptivo. Durante a realização dos testes nociceptivos, era oferecido rapadura aos animais, a fim de distrair os mesmos e reduzir o estresse e agitação que ocasionalmente ocorriam em decorrência do tempo de avaliação. Tal atitude favoreceu a interação dos animais com os observadores, facilitando a realização dos testes. A administração de opioides pode acarretar excitação, quando administrados IV;^(19, 24) porém, neste estudo nenhuma das associações utilizadas promoveu sinais evidentes de excitação, dado ao uso de acepromazina e detomidina.

De acordo com os critérios de avaliação, os dados obtidos na primeira etapa do estudo demonstraram boa reprodutibilidade e repetibilidade, dispensando a utilização de dois observadores durante os testes nociceptivos. Logo, optou-se em utilizar somente um observador oculto aos tratamentos, na segunda etapa do projeto. Além disso, utilizou-se como valor basal a média aritmética dos três valores anteriores ao tratamento, para maior fidedignidade do padrão normal de cada animal e identificação das alterações promovidas pelos fármacos.

Optou-se em utilizar os quatro diferentes estímulos nociceptivos com o intuito de garantir a estimulação de vias nociceptivas distintas, uma vez que o uso de mais de um estímulo proporciona informações mais relevantes referentes à avaliação da dor, quando comparado a uma única modalidade.⁽⁷⁾ Dentre os diferentes estímulos utilizados, o mecânico foi o que detectou de forma mais aparente os efeitos analgésicos proporcionais dos fármacos, corroborando com os dados da primeira etapa deste estudo, quando se observou uma alta sensibilidade e especificidade, de 100% e 97%, respectivamente. As respostas foram claras e bem definidas e previamente descritas na etapa 1. Com base nos dados obtidos neste teste, verificou-se que a associação MD ocasionou efeito antinociceptivo mais potente e com menor duração (45 minutos). Em contrapartida, o grupo MA promoveu efeito antinociceptivo menos potente e mais prolongado (90 minutos).

Cada estímulo ativa diferentes fibras envolvidas na nocicepção. Os estímulos elétricos aparentemente ativam de forma inespecífica as fibras periféricas,⁽³⁷⁾ atuando tanto em fibras A β , como em A δ e C.⁽⁸⁰⁾ Por outro lado, os estímulos nociceptivos mecânicos ativam fibras A δ e C e os térmicos, ativam preferencialmente as fibras C e A δ .⁽⁸⁰⁾ A taxa de aquecimento pode influenciar na ativação das fibras, pois em ratos demonstrou-se que quando a taxa é rápida, ou seja, 6,5°C/s ocorre ativação das fibras A δ , enquanto a resposta é mediada pelas fibras C, durante o aquecimento lento, a uma taxa de 0,9°C/s.⁽⁸¹⁾ Desta forma, espera-se

que neste estudo, que o estímulo térmico tenha tido ação predominante em fibras C, uma vez que a taxa de aquecimento foi lenta, de 0,8°C/s, para ambos os locais de aplicação.

Alguns estudos utilizaram estímulos mecânicos para avaliar a nocicepção em equinos;^(23, 48) porém, não há uma padronização para o uso desses estímulos nessa espécie, já que há estudos cuja pressão foi expressa em Newtons^(16, 43) e em outros, em KPa,⁽²³⁾ além das diferenças estruturais dos diferentes equipamentos utilizados. Nos estudos em que a pressão foi expressa em Newtons, observaram-se que os dados referentes aos nossos limiares nociceptivos basais foram similares à literatura reportada previamente;^(16, 43) entretanto, apenas em um estudo observou-se aumento nos limiares semelhantes ao nosso, com valores próximos ao ponto de corte estabelecido para o estímulo após administração de diferentes doses de xilazina em jumentos e equinos.⁽¹⁶⁾

O estímulo elétrico não apresentou dados homogêneos referentes aos limiares nociceptivos basais. Tal fato deve-se provavelmente a sua não especificidade em ativar as fibras periféricas,⁽³⁷⁾ o que pode ter dificultado o reconhecimento da nocicepção por parte dos animais. Neste estudo, utilizou-se metodologia semelhante às reportadas na literatura consultada,^(24, 25) com incremento na voltagem no decorrer do tempo. Porém, os limiares nociceptivos basais foram heterogêneos e superiores aos observados pelos referidos autores, de nosso grupo de pesquisa. Esse mesmo estímulo foi utilizado por alguns autores na banda coronária^(21, 23, 43) e nervo digital palmar de equinos,⁽²¹⁾ com a diferença que a variável do método foi o incremento da corrente elétrica. Este estímulo não detectou a presença dos fármacos de maneira precisa. De acordo com os dados da primeira etapa deste estudo, o estímulo elétrico foi o que apresentou maior número de falso negativos, dentre os estímulos aplicados no membro, o que está de acordo aos nossos resultados.

Alguns estudos utilizaram estímulos térmicos por meio do uso de lâmpadas de projeção de calor focadas na banda coronária^(18, 24, 25) ou na cernelha dos animais.⁽¹⁸⁾ Como não há um padrão em relação ao melhor lugar de aplicação do estímulo térmico, optou-se em aplicar tal estímulo nos dois lugares mais utilizados, uma vez que cada local visa atingir um objetivo específico. Neste estudo, tanto o estímulo térmico no membro, como o térmico torácico, ocasionaram limiares nociceptivos basais homogêneos e resultados semelhantes; porém, ambos não foram capazes de reconhecer de forma clara, a presença dos fármacos. O estímulo térmico torácico, além de não diferenciar os diferentes tratamentos, ocasionou algumas lesões superficiais no local de aplicação do estímulo, uma vez que na maioria das

vezes, o estímulo máximo foi atingido, pois os animais não reconheciam o estímulo como nociceptivo. Tal fato corrobora com os dados da primeira etapa deste estudo, onde observaram-se que o estímulo térmico torácico foi o menos sensível, com sensibilidade correspondendo a 70%.

As lesões observadas nos locais de aplicação do estímulo térmico torácico, neste estudo, não foram verificadas quando o mesmo estímulo foi aplicado no mesmo local a uma taxa de 0,6°C/s. Por outro lado, verificou-se leve inchaço, sem dor à palpação quando os equinos foram tratados com acepromazina associada à buprenorfina e o estímulo térmico foi aplicado dorsal a narina, a uma taxa de 0,8°C/s.⁽³⁴⁾ Desta forma pode-se sugerir que a melhor taxa de aquecimento que evite lesões locais é a de 0,6°C/s. Variações na espessura da pele, do fluxo sanguíneo e pigmentação da epiderme, além da distribuição de nociceptores podem influenciar na percepção periférica do estímulo utilizado.^(82, 83)

Como os equinos possuem maior densidade de receptores μ no córtex cerebral e no cerebelo, são mais sensíveis à ação dos opioides quando comparados ao rato e a cobaia.⁽⁶⁴⁾ A administração de pequenas doses de tranquilizantes ou sedativos é uma das formas de reduzir os efeitos indesejáveis do uso dos opioides.⁽⁶⁵⁾ Além disso, pode-se utilizar esses agentes em associação com outros fármacos, como agonistas α_2 -adrenérgicos, com o intuito de melhorar a qualidade da sedação e da analgesia.⁽²³⁾ Por esta razão, neste estudo, optou-se em associar a metadona com a detomidina ou com a acepromazina, a fim de se avaliar os efeitos antinociceptivos das diferentes associações de fármacos, em equinos adultos.

Por ser um estudo experimental, este estudo pode apresentar algumas diferenças quando comparado a estudos clínicos, uma vez que o modelo nociceptivo utilizado pode não expressar de maneira fidedigna a nocicepção desejada. As diferenças observadas com relação aos diferentes testes nociceptivos, podem ser devido às diferentes fibras envolvidas em cada estímulo.⁽⁸⁰⁾ Neste estudo, o estímulo que melhor reconheceu a presença dos fármacos foi o mecânico na etapa 2, além de ser o mais sensível e específico e com melhor concordância entre observadores, na etapa 1.

A detomidina é um fármaco que produz sedação e analgesia em equinos.⁽³²⁾ Os sinais clássicos de sedação, observados nos animais do grupo MD correlacionam-se ao uso da detomidina e os sinais menos acentuados, em MA correlacionam-se ao uso da acepromazina, ambos corroborados por dados da literatura,⁽⁶⁸⁾ onde observaram-se sedação adequada e mais

intensa em equinos tratados com agonistas α_2 -adrenérgicos quando comparados à acepromazina. A menor sedação observada no grupo MA, aliada aos menores limiares nociceptivos quando comparado ao grupo MD, demonstra que essa associação não ocasionou sedação intensa, bem como ocasionou atividade antinociceptiva mais discreta, porém mais prolongada, o que poderia ser uma vantagem.

A ataxia, frequentemente observada após o uso de agonistas α_2 -adrenérgicos,⁽⁶⁶⁾ associada à sedação intensa, pode constituir um fator de confusão, quando os estímulos nociceptivos são aplicados nos membros, uma vez que a incoordenação poderá limitar a resposta de aversão ao estímulo nociceptivo. Tal fato pode acarretar aumento da probabilidade de erros na interpretação por parte dos observadores e aumentar o número de respostas falso negativas, ou seja, pode haver ausência de resposta do animal, mesmo com presença de dor. Por outro lado, a acepromazina não ocasiona sedação intensa e causa nenhum ou pequeno efeito antinociceptivo isoladamente^(26, 34) e pode reduzir a atividade locomotora induzida pelos opioides,⁽³³⁾ o que minimiza o número de possíveis respostas falso positivas pelo uso de opioides. Tais fatos podem explicar a grande variação nos efeitos dos fármacos, bem como as discrepâncias entre as propriedades analgésicas dos opioides identificadas em estudos experimentais, em comparação com situações clínicas.⁽⁸⁴⁾

Mesmo diante desses fatores de confusão que podem interferir nos resultados do estudo, os estímulos aplicados nos membros apresentaram dados mais consistentes quando comparados à estimulação térmica na cernelha, o que demonstra que esses testes nociceptivos foram capazes de reconhecer qualitativamente a presença dos diferentes protocolos utilizados neste estudo. Como a sedação e ataxia podem aumentar o número de respostas falso negativas, propiciando uma falsa sensação de analgesia e estes efeitos estão diretamente relacionados ao uso de opioides associados à detomidina,^(23, 24) os efeitos antinociceptivos da associação acepromazina e opioides, observados aqui e em outros estudos,^(26, 34) poderiam ser mais fidedignos e realmente interpretados como antinocicepção.

7. Conclusões

Os estímulos mecânico, elétrico e térmico no membro são adequados para avaliar a nocicepção em equinos conscientes, uma vez que foram de fácil aplicação e identificação, com respostas consistentes e fáceis de interpretar, bem como foram confiáveis, sensíveis e específicos, o que pode indicar suas validades para uso em futuras pesquisas. Em ordem decrescente os melhores resultados foram observados para o estímulo mecânico, térmico e elétrico no membro e por fim, o estímulo térmico torácico, que foi o menos confiável.

Conclui-se que a associação de metadona e detomidina promoveu efeito antinociceptivo mecânico mais acentuado; entretanto, resultou em mais efeitos adversos como salivação, sudorese e ataxia, quando comparada à metadona e acepromazina.

O único estímulo sensível para detectar as diferenças entre as associações de acepromazina ou detomidina com a metadona foi o mecânico.

Referências Bibliográficas

1. Bussi res G, Jacques C, Lainay O, Beauchamp G, Leblond A, Cador  JL. et al. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Res Vet Sci.* 2008;85(2):294-306.
2. Lorena SERS, Luna SPL, Lascelles BDX, Corrente JE. Attitude of Brazilian veterinarians in the recognition and treatment of pain in horses and cattle. *Vet Anaesth Analg.* 2013;40(4):410-8.
3. Dixon MJ, Robertson SA, Taylor PM. A thermal threshold testing device for evaluation of analgesics in cats. *Res Vet Sci.* 2002;72(3):205-10.
4. Dixon MJ, Taylor PM, Steagall PVM, Brondani JT, Luna SPL. Development of a pressure nociceptive threshold testing device for evaluation of analgesics in cats. *Res Vet Sci.* 2007;82(1):85-92.
5. Taylor PM, Robertson SA, Dixon MJ. Evaluation of the use of thermal thresholds to investigate NSAID analgesia in a model of inflammatory pain in cats. *J Feline Med Surg.* 2007;9(4):313-8.
6. Steagall PVM, Taylor PM, Brondani JT, Luna SPL, Dixon MJ, Ferreira TH. Effects of buprenorphine, carprofen and saline on thermal and mechanical nociceptive thresholds in cats. *Vet Anaesth Analg.* 2007;34:344-50.
7. Steagall PVM, Taylor PM, Brondani JT, Luna SPL, Dixon MJ. Antinociceptive effects of tramadol and acepromazine in cats. *J Feline Med Surg.* 2008;10(1):24-31.
8. Steagall PVM, Millette V, Mantovani FB, Gilbert P, Luna SPL, Duke-Novakovski T. Antinociceptive effects of epidural buprenorphine or medetomidine, or the combination, in conscious cats. *J Vet Pharmacol Therap.* 2009;32:477-84.
9. Ambros B, Duke T. Effect of low dose rate ketamine infusions on thermal and mechanical thresholds in conscious cats. *Vet Anaesth Analg.* 2013;40:e76-e82.
10. Millette VM, Steagall PVM, Duke-Novakovski T, Livingston AJ. Effects of meperidine or saline on thermal, mechanical and electrical nociceptive thresholds in cats. *Vet Anaesth Analg.* 2008;35:543-7.
11. Wegner K, Horais KA, Tozier NA, Rathbun ML, Shtaerman Y, Yaksh TL. Development of a canine nociceptive thermal escape model. *J Neurosci Meth.* 2008;168(1):88-97.
12. Pieper K, Schuster T, Levionnois O, Matis U, Bergadano A. Antinociceptive efficacy and plasma concentrations of transdermal buprenorphine in dogs. *Vet J.* 2011;187(3):335-41.

13. Hoffmann MV, Kastner SBR, Kietzmann M, Kramer S. Contact heat thermal threshold testing in beagle dogs: baseline reproducibility and the effect of acepromazine, levomethadone and fentanyl. *BMC Vet Res.* 2012;8(206):1-7.
14. Nolan A, Waterman AE, Livingston A. The correlation of the thermal and mechanical antinociceptive activity of pethidine hydrochloride with plasma concentrations of the drug in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 1988;11(1):94-102.
15. Whay HR, Waterman AE, Webster AJF, O'Brien JK. The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *Vet J.* 1998;156:23-9.
16. Lizarraga I, Beths T. A comparative study of xylazine-induced mechanical hypoalgesia in donkeys and horses. *Vet Anaesth Analg.* 2012;39:533-8.
17. Di Giminiani P, Petersen LJ, Herskin MS. Nociceptive responses to thermal and mechanical stimulations in awake pigs. *Eur J Pain.* 2013;17(5):638-48.
18. Carregaro AB, Luna SP, Mataqueiro MI, Queiroz-Neto A. Effects of buprenorphine on nociception and spontaneous locomotor activity in horses. *Am J Vet Res.* 2007;68(3):246-50.
19. Natalini CC, Robinson EP. Evaluation of the analgesic effects of epidurally administered morphine, alfentanil, butorphanol, tramadol, and U50488H in horses. *Am J Vet Res.* 2000;61(12):1579-86.
20. Natalini CC, Polydoro AS, Linardi RL. Analgesic effects of subarachnoidally administered hyperbaric opioids in horses. *Am J Vet Res.* 2006;67(6):941-6.
21. Spadavecchia C, Arendt-Nielsen L, Spadavecchia L, Mosing M, Auer U, Van Den Hoven R. Effects of butorphanol on the withdrawal reflex using threshold, suprathreshold and repeated subthreshold electrical stimuli in conscious horses. *Vet Anaesth Analg.* 2007;34:48-58.
22. Rohrbach H, Korpivaara T, Schatzmann U, Spadavecchia C. Comparison of the effects of the alpha-2 agonists detomidine, romifidine and xylazine on nociceptive withdrawal reflex and temporal summation in horses. *Vet Anaesth Analg.* 2009;36(4):384-95.
23. Schatzmann U, Armbruster S, Stucki F, Busato A, Kohler I. Analgesic effect of butorphanol and levomethadone in detomidine sedated horses. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2001;48(6):337-42.
24. Oliveira FA, Pignaton W, Teixeira-Neto FJ, Queiroz-Neto A, Puoli-Filho JNP, Scognamillo MVR. et al. Antinociceptive and behavioral effects of methadone alone or in combination with detomidine in conscious horses. *J Equine Vet Sci.* 2013; XX:1-7.
25. Santi Milaré A, Oliveira FA, Luna SPL, Scognamillo MVR, Queiroz-Neto A. Intravenous tramadol injection has no antinociceptive effect in horses undergoing electrical and thermal stimuli. *J Equine Vet Sci.* 2013; XX:1-4.

26. Love EJ, Taylor PM, Murrell J, Whay HR. Effects of acepromazine, butorphanol and buprenorphine on thermal and mechanical nociceptive thresholds in horses. *Equine Vet J.* 2012;44(2):221-5.
27. Sousa FF, Silva JA. The metric of pain: theoretical and methodological issues. *Rev Dor.* 2005;6(1):469-513.
28. Hoppen N, Lapointe L, Moreau E. Um guia para a avaliação de artigos de pesquisa em sistemas de informação. *REAd Rev Eletrôn Adm.* 1996;2(2):1-34.
29. Raekallio M, Heinonen KM, Kuussaari J, Vainio O. Pain alleviation in animals: attitudes and practices of Finnish veterinarians. *Vet J.* 2003;165:131-5.
30. Mama KR, Pascoe PJ, Steffey EP. Evaluation of the interaction of mu and kappa opioid agonists on locomotor behavior in the horse. *Can J Vet Res.* 1993;57:106-9.
31. Boscan P, Van Hoogmoed LM, Farver TB, Snyder JR. Evaluation of the effects of the opioid agonist morphine on gastrointestinal tract function in horses. *Am J Vet Res.* 2006;67(6):992-7.
32. England GC, Clarke KW. Alpha 2 adrenoceptor agonists in the horse--a review. *Br Vet J.* 1996;152:641-57.
33. Combie J, Shults T, Nugent EC, Dougherty J, Tobin T. Pharmacology of narcotic analgesics in the horse: selective blockade of narcotic-induced locomotor activity. *Am J Vet Res.* 1981;42(5):716-21.
34. Poller C, Hopster K, Rohn K, Kastner SBR. Nociceptive thermal threshold testing in horses -- effect of neuroleptic sedation and neuroleptanalgesia at different stimulation sites. *BMC Vet Res.* 2013;9:135.
35. Neddermeyer TJ, Flühr K, Lötsch J. Principle components analysis of pain thresholds to thermal, electrical, and mechanical stimuli suggests a predominant common source of variance. *Pain.* 2008;138(2):286-91.
36. Jöchle W, Hamm D. Sedation and analgesia with Domosedan (detomidine hydrochloride) in horses: dose response studies on efficacy and its duration. *Acta Vet Scand Suppl.* 1986;82:69-84.
37. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597-652.
38. Lawson SN. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol.* 2002;87(2):239-44.
39. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413:203-10.
40. Hunt JR, Grint NJ, Taylor PM, Murrell JC. Sedative and analgesic effects of buprenorphine, combined with either acepromazine or dexmedetomidine, for premedication prior to elective surgery in cats and dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2013;40:297-307.

41. Brunson DB, Majors LJ. Comparative analgesia of xylazine, xylazine/morphine, xylazine/butorphanol, and xylazine/nalbuphine in the horse, using dental dolorimetry. *Am J Vet Res.* 1987;48(7):1087-91.
42. Stenberg D, Sandström M, Pyyhtiä AM, Kuussaari J. Sedative and analgesic action of detomidine in horses as evaluated from evoked potentials. *Acta Vet Scand Suppl.* 1986;82:97-109.
43. Moens Y, Lanz F, Doherr MG, Schatzmann U. A comparison of the antinociceptive effects of xylazine, detomidine and romifidine on experimental pain in horses. *Vet Anaesth Analg.* 2003;30(3):183-90.
44. Pippi NL, Lumb WV. Objective tests of analgesic drugs in ponies. *Am J Vet Res.* 1979;40(8):1082-6.
45. Merritt AM, Xie H, Lester GD, Burrow JA, Lorenzo-Figueras M, Mahfoud Z. Evaluation of a method to experimentally induce colic in horses and the effects of acupuncture applied at the Guan-yuan-shu (similar to BL-21) acupoint. *Am J vet Res.* 2002;63(7):1006-11.
46. Skarda RT, Muir WW. Comparison of electroacupuncture and butorphanol on respiratory and cardiovascular effects and rectal pain threshold after controlled rectal distention in mares. *Am J Vet Res.* 2003;64(2):137-44.
47. Sanchez LC, Merritt AM. Colorectal distention in the horse: visceral sensitivity, rectal compliance and effect of i.v. xylazine or intrarectal lidocaine. *Equine Vet Journal.* 2005;37(1):70-4.
48. Chambers JP, Livingston A, Waterman AE. A device for testing nociceptive thresholds in horses. *Vet Anaesth Analg.* 1990;17(1):42-4.
49. Love EJ, Murrell J, Whay HR. Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. *Vet Anaesth Analg.* 2011;38(1):3-14.
50. Kamerling SG, Cravens WM, Bagwell CA. Objective assessment of detomidine-induced analgesia and sedation in the horse. *Eur J Pharmacol.* 1988;151:1-8.
51. Combie J, Dougherty J, Nugent E, Tobin T. The pharmacology of narcotic analgesics in the horse. IV. Dose and time response relationships for behavioral responses to morphine, meperidine, pentazocine, anileridine, methadone, and hydromorphone. *J Equine Med Surg.* 1979;3:377-85.
52. Beecher HK. The measurement of pain; prototype for the quantitative study of subjective responses. *Pharmacol Rev.* 1957;9(1):59-209.
53. Chapman CR, Syrjala KL. Measurement of pain. In: Loeser JD, Bonica JJ. *Bonica's Management of Pain.* 3rd edn. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p.311-28.
54. Menezes PR. Validade e confiabilidade das escalas de avaliação em psiquiatria. *Rev Psiquiatr Clín.* 1998;25:214-6.

55. Shaiova L. The role of methadone in the treatment of moderate to severe cancer pain. *Support Cancer Ther.* 2005;2(3):176-80.
56. Davis MP, Walsh D. Methadone for relief of cancer pain: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug interactions and protocols of administration. *Support Care Cancer.* 2001;9(2):73-83.
57. Codd EE, P. SR, Schupsky JJ, Raffa RB. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;274(3):1263-70.
58. Hewitt DJ. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *Clin J Pain.* 2000;16(2 Suppl):s73-9.
59. Brown R, Kraus C, Fleming M, Reddy S. Methadone: applied pharmacology and use as adjunctive treatment in chronic pain. *Postgrad Med J.* 2004;80:654-9.
60. Linardi RL, Stokes AM, Barker SA, Short C, Hosgood G, Natalini CC. Pharmacokinetics of the injectable formulation of methadone hydrochloride administered orally in horses. *J Vet Pharmacol Therap.* 2009;32:492-7.
61. Olbrich VH, Mosing M. A comparison of the analgesic effects of caudal epidural methadone and lidocaine in the horse. *Vet Anaesth Analg.* 2003;30:156-64.
62. Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(14):1153-93.
63. Lugo RA, Satterfield KL, Kern SE. Pharmacokinetics of methadone. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2005;19(4):13-24.
64. Thomasy SM, Moeller BC, Stanley SD. Comparison of opioid receptor binding in horse, guinea pig, and rat cerebral cortex and cerebellum. *Vet Anaesth Analg.* 2007;34(5):351-8.
65. Muir WW. Standing chemical restraint in horses. In: Muir WW, Hubbell JAE. *Equine Anesthesia, Monitoring and Emergency Therapy.* St. Louis; 1991. p.247-80.
66. Valverde A. Alpha-2 agonists as pain therapy in horses. *Vet Clin Equine.* 2010;26:515-32.
67. Chou CC, Chen CL, Rice BL, Colahan PT. Reduced resident time and pharmacodynamic effects of acepromazine after subclinical multiple dosage in exercised thoroughbreds. *J Vet Pharmacol Ther.* 2002;25(5):379-82.
68. Fantoni DT, Futema F, Cortopassi SRG, Silva LCLCd, Verenguer M, Mirandola R. et al. Avaliação comparativa entre acepromazina, detomidina e romifidina em eqüinos. *Cienc Rural.* 1999;29:45-50.
69. SAS Institute S. *SAS/STAT User's Guide, Version 9.2.* Cary, NC2009.

70. Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. 2nd. Belmont, California: Duxbury Press; 2000.
71. Kleinbaum DG, Kupper LL, Nizam A, Muller KE. Applied regression analysis and multivariable methods. Belmont, California: Duxbury Press; 2007.
72. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
73. Mogil JS, Sternberg WF, Kest B, Marek P, Liebeskind JC. Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*. 1993;53(1):17-25.
74. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 2009;10(5):447-85.
75. Taylor PM, Crosignani N, Dixon MJ, Lopes C, Rosa AC, Luna SPL. et al. Mechanical nociceptive thresholds using four different probe configurations in horses. *Vet Anaesth Analg*. 2012; 40:1.
76. Spadavecchia C, Spadavecchia L, Andersen OK, Arendt-Nielsen L, Leandri M, Schatzmann U. Quantitative assessment of nociception in horses by use of the nociceptive withdrawal reflex evoked by transcutaneous electrical stimulation. *Am J Vet Res*. 2002;63(11):1551-6.
77. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(8):907-23.
78. Kamerling SG, Weckman TJ, DeQuick DJ, Tobin T. A method for studying cutaneous pain perception and analgesia in horses. *J Pharmacol Methods*. 1985;13(3):267-74.
79. Chambers JP, Waterman AE, Livingston A. Further development of equipment to measure nociceptive thresholds in large animals. *Vet Anaesth Analg*. 1994;21(2):66-72.
80. Svensson P, Baad-Hansen L, Pigg M, List T, Eliav E, Ettlin D. et al. Guidelines and recommendations for assessment of somatosensory function in oro-facial pain conditions – a taskforce report. *J Oral Rehabil*. 2011;38:366-94.
81. Yeomans DC, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain*. 1996;68:141-50.
82. Monteiro-Riviere NA, Bristol DG, Manning TO, Rogers RA, Riviere JE. Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. *J Invest Dermatol*. 1990;95(5):582-6.

83. Pringle J, Roberts C, Kohl M, Lekeux P. Near infrared spectroscopy in large animals: optical pathlength and influence of hair covering and epidermal pigmentation. *Vet J.* 1999;158(1):48-52.
84. Clutton RE. Opioid analgesia in horses. *Vet Clin Equine.* 2010;26:493-514.

Apêndices

APÊNDICE A – Valores individuais do limiar nociceptivo frente ao estímulo mecânico (Newtons) de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
<i>Controle</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	9	6,4	4,5	3,2	2,7	3,6	4,6	4,3	3,8	5
Animal 2	1,1	0,9	1,8	3,2	1,4	4,8	7,7	1,2	2,5	8,6
Animal 3	5,1	1,4	1,9	1,4	1,5	1	0,9	2,1	2,1	1,3
Animal 4	3,9	3	1,4	1,4	5,1	2,6	4,2	2,1	0,5	2,6
Animal 5	1	0,8	0,5	1,5	1,3	1	0,9	0,9	2,7	1,1
Animal 6	4,2	1,7	1,6	1,8	1,8	1,7	2,5	1,8	2,7	3,1
Animal 7	1,7	2,1	3,5	1,9	2,5	4,8	1	2,1	0,6	0,4
Animal 8	2,1	3	2,5	3,6	0,8	1,9	1,1	1,7	1,7	2,7
<i>MD</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	3,9	16,8	17,3	16	6,6	11,6	13,1	2,1	7,6	4,4
Animal 2	1,9	20,3	9,8	3,1	1,9	1,3	2,5	0,8	1,5	0,6
Animal 3	2,4	20,2	20,2	19,9	3,4	2,2	2,5	1,4	5,6	1,3
Animal 4	1,2	7,8	16,8	20	16,3	2,8	7,6	5,7	11,5	4,2
Animal 5	1,8	21,7	23,7	6,4	1,6	1,1	0,8	0,6	1,4	0,8
Animal 6	2,2	21,5	22,5	13,6	21,4	20,3	15,1	8,6	7	14,4
Animal 7	2,2	22,4	20,3	16,1	3,9	2,8	2,7	2,3	2,1	3,8
Animal 8	4	19,8	20	16,7	19,8	15,9	12,3	8,8	9,3	5,6
<i>MA</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	6,5	15,5	21,2	19,9	6,1	16,1	13,3	2,4	4	4,9
Animal 2	0,6	6,6	1,5	9,8	6,5	0,8	7,4	6,9	10,3	8,9
Animal 3	2,1	4,3	10	4,5	4,7	3,1	5,9	2,4	2,6	4
Animal 4	3,1	9,8	9	3,2	6,7	5,9	7	5,5	4,9	3,6
Animal 5	0,9	7,9	11,8	5	4,5	2,6	1,4	2	2,4	0,5
Animal 6	1,1	20,4	7,8	5,2	6,7	8,8	6,6	8	5,7	6,4
Animal 7	2,3	7	4,9	4	2,9	2,2	2,4	2,8	4,4	3,8
Animal 8	2,3	7,4	12,5	14,5	13,6	12,2	13,3	9,6	11,2	9,4

APÊNDICE B – Valores individuais do limiar nociceptivo frente ao estímulo elétrico (Volts) de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos		Tempo (minutos)								
<i>Controle</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	40	40	18	16	30	40	40	40	40	40
Animal 2	39,3	30	40	6	40	22,2	40	32	14	12
Animal 3	20	16	7	9	4	4	9	9	14	4
Animal 4	10	12	9	7	5	12	14	6	8	8
Animal 5	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2
Animal 6	31,3	14	6	3,6	3,8	18	5,4	4	5,4	8,4
Animal 7	7,6	4	10	3	5	5	3	8	5	3
Animal 8	15,3	10	8	8,4	16	9	7,2	9,6	9	7,8
<i>MD</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	26	40	22	28	22	26	6	7	4	8
Animal 2	8	30	9	8,8	7,8	7,6	6	5,8	5	5,4
Animal 3	8,7	30	18	8	7,4	4	3	4	5	4,8
Animal 4	23,3	40	40	40	40	40	40	20	40	16
Animal 5	20,7	40	22	16	4,6	3,6	4	4,4	4,4	3,8
Animal 6	3,7	30	22	16	14	14	14	7,4	5	7
Animal 7	32,6	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Animal 8	6,3	40	38	16	14	8	12	9	9	9
<i>MA</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	40	40	40	40	40	40	40	40	28	40
Animal 2	40	40	40	24	9,4	16	28	5,8	3	4
Animal 3	39,3	40	34	3	40	40	40	28	40	24
Animal 4	40	40	10	40	40	40	40	40	40	40
Animal 5	3,7	6	6,8	4,6	5	3,8	5	3,6	3,4	3,4
Animal 6	6,3	24	18	4	8,4	16	8,4	4,8	16	10
Animal 7	31,3	30	10	6	5,4	5,8	8,8	4,8	7	6
Animal 8	39,3	40	40	40	26	28	28	40	28	20

APÊNDICE C – Valores individuais da temperatura da pele (T°C) antes da mensuração do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico no membro de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
Controle	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	33,0	33,5	33,8	33,4	33,4	33,4	33,7	33,8	33,9	33,7
Animal 2	32,7	32,9	32,6	33,2	33,2	33,1	32,7	32,1	33,0	33,2
Animal 3	32,8	32,8	32,8	32,7	32,9	33,2	33,2	33,5	33,6	34,3
Animal 4	30,5	31,6	32,1	32,3	32,4	32,0	32,1	32,7	32,4	34,2
Animal 5	31,5	32,2	32,8	33,3	33,5	33,5	33,7	33,7	34,2	33,9
Animal 6	33,3	33,6	33,8	33,5	34,1	34,1	34,3	34,3	34,2	34,4
Animal 7	33,7	34,3	34,0	34,9	34,9	35,1	35,1	35,0	35,0	35,1
Animal 8	32,4	32,7	32,2	32,7	33,0	32,7	32,9	32,0	32,7	33,2
MD	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	33,5	32,1	33,5	34,4	33,5	33,6	33,3	33,0	33,1	32,3
Animal 2	32,0	30,7	31,1	31,6	31,6	31,3	31,2	30,9	29,9	29,1
Animal 3	32,5	31,0	31,7	32,1	32,4	31,4	31,6	31,9	32,1	31,7
Animal 4	21,0	20,3	23,2	23,5	23,5	23,4	23,2	22,8	22,7	22,4
Animal 5	22,5	25,2	29,4	30,4	29,5	28,5	26,9	27,3	27,4	28,5
Animal 6	30,5	29,5	29,7	30,1	30,6	30,3	30,6	30,9	30,9	31,7
Animal 7	32,0	32,3	33,0	33,3	33,1	33,0	32,7	33,1	33,1	33,5
Animal 8	33,1	32,8	33,7	33,9	33,8	33,2	32,0	31,5	31,5	30,6
MA	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	32,4	33,0	33,6	33,4	32,8	33,3	33,6	33,5	33,4	33,4
Animal 2	30,7	31,9	32,0	32,2	32,3	32,5	32,6	32,5	32,8	32,8
Animal 3	21,5	21,4	25,2	28,4	29,0	30,4	30,9	31,1	31,6	31,9
Animal 4	31,9	32,6	33,2	33,5	33,4	33,3	33,2	33,1	33,2	32,8
Animal 5	28,5	31,4	32,3	32,4	32,8	32,6	32,7	32,8	33,0	33,5
Animal 6	31,7	32,9	33,5	33,4	33,4	33,3	33,7	33,0	33,4	33,5
Animal 7	29,9	31,7	32,4	32,6	32,0	32,9	32,3	32,4	32,6	33,1
Animal 8	31,2	32,5	32,9	33,0	33,2	33,0	33,2	33,2	33,4	33,5

APÊNDICE D – Valores individuais da temperatura atingida (T°C) após a mensuração do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico no membro de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
<i>Controle</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	58,9	56,7	54,5	58,8	56,5	52,3	48,4	45,6	55,8	50,1
Animal 2	50,6	49,4	52,8	54,6	58,4	57,5	56,9	54,5	56,7	56,5
Animal 3	60,3	53,8	44,7	47,8	50,9	50,1	50,0	42,5	53,5	46,2
Animal 4	47,8	45,4	45,1	43,5	44,8	45,5	44,1	44,9	45,1	40,6
Animal 5	48,7	36,2	44,2	44,9	49,2	45,7	45,3	46,9	49,0	45,4
Animal 6	54,6	56,7	52,1	58,2	52,9	50,5	46,2	44,8	50,4	54,9
Animal 7	50,6	60,1	50,3	49,6	51,4	55,0	52,4	51,6	53,2	55,1
Animal 8	55,7	51,8	50,6	46,9	49,7	42,9	47,9	44,7	46,7	44,4
<i>MD</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	52,5	60,7	60,7	58,8	58,8	60,7	50,1	50,8	51,4	45,3
Animal 2	45,7	60,5	60,7	54,6	47,7	48,5	50,1	49,2	47,9	45,4
Animal 3	57,6	60,6	59,6	56,1	52,8	54,4	53,0	50,3	47,7	49,3
Animal 4	51,1	39,4	50,6	59,9	59,7	59,3	57,9	58,6	56,7	57,5
Animal 5	44,5	60,4	60,4	60,6	44,6	45,7	33,6	48,1	49,1	43,4
Animal 6	60,6	60,7	60,6	60,6	60,6	60,6	60,6	60,8	58,3	60,2
Animal 7	56,7	60,8	60,8	60,8	60,8	60,8	60,8	50,4	52,0	55,3
Animal 8	52,8	60,8	60,8	60,8	60,8	59,2	56,6	56,8	58,6	56,3
<i>MA</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	58,7	60,6	60,5	60,4	42,2	54,6	45,4	48,9	55,3	45,9
Animal 2	55,0	60,6	60,1	60,5	44,3	50,4	55,6	57,8	58,6	46,3
Animal 3	60,2	60,7	60,6	59,9	59,6	56,1	60,7	59,2	41,8	53,6
Animal 4	46,7	53,6	54,9	54,0	53,4	50,8	50,9	52,6	48,2	45,1
Animal 5	46,2	47,3	48,1	48,8	48,1	44,0	44,5	42,8	45,7	43,4
Animal 6	56,1	60,6	56,5	54,8	59,0	59,8	60,7	59,8	59,6	55,4
Animal 7	49,1	55,3	52,1	52,3	51,7	54,8	58,0	45,9	56,5	42,8
Animal 8	52,6	50,9	53,8	55,4	59,8	55,5	51,2	55,6	52,4	52,4

APÊNDICE E – Valores individuais do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico no membro ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
Controle	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	25,8	23,2	20,7	25,4	23,1	18,9	14,7	11,8	21,9	16,4
Animal 2	17,9	16,5	20,2	21,4	25,2	24,0	24,2	22,4	23,7	23,3
Animal 3	27,6	21,0	11,9	15,1	18,0	16,9	16,8	9,0	19,9	11,9
Animal 4	17,3	13,8	13,0	11,2	12,4	13,5	12,0	12,2	12,7	6,4
Animal 5	17,2	4,0	11,4	11,6	15,7	12,2	11,6	13,2	14,8	11,5
Animal 6	21,3	23,1	18,3	24,7	18,8	16,4	11,9	10,5	16,2	20,5
Animal 7	16,9	25,8	16,3	14,7	16,5	19,9	17,3	16,6	18,2	20,0
Animal 8	23,3	19,1	18,4	14,2	16,7	10,2	15,0	12,7	14,0	11,2
MD	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	18,9	28,6	27,2	24,4	25,3	27,1	16,8	17,8	18,3	13,0
Animal 2	13,7	29,8	29,6	23,0	16,1	17,2	18,9	18,3	18,0	16,3
Animal 3	25,1	29,6	27,9	24,0	20,4	23,0	21,4	18,4	15,6	17,6
Animal 4	30,2	19,1	27,4	36,4	36,2	35,9	34,7	35,8	34,0	35,1
Animal 5	22,0	35,2	31,0	30,2	15,1	17,2	6,4	20,8	21,7	14,9
Animal 6	30,1	31,2	30,9	30,5	30,0	30,3	30,0	29,9	27,4	28,5
Animal 7	24,7	28,5	27,8	27,5	27,7	27,8	28,1	17,3	18,9	21,8
Animal 8	19,7	28,0	27,1	26,9	27,0	26,0	24,6	25,3	27,1	25,7
MA	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	26,3	27,6	26,9	27,0	9,4	21,3	11,8	15,4	21,9	12,5
Animal 2	24,3	28,7	28,1	28,3	12,0	17,9	23,0	25,3	25,8	13,5
Animal 3	38,7	39,3	35,4	31,5	30,6	30,3	29,8	28,1	10,2	21,7
Animal 4	14,7	21,0	21,7	20,5	20,0	17,5	17,7	19,5	15,0	12,3
Animal 5	17,7	15,9	15,8	16,4	15,3	11,4	11,8	10,0	12,7	9,9
Animal 6	24,5	27,7	23,0	21,4	25,6	26,5	27,0	26,8	26,2	21,9
Animal 7	19,2	23,6	19,7	19,7	19,7	21,9	25,7	13,5	23,9	9,7
Animal 8	21,3	18,4	20,9	22,4	26,6	22,5	18,0	22,4	19,0	18,9

APÊNDICE F – Valores individuais da temperatura da pele (T°C) antes da mensuração do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico torácico de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
<i>Controle</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	37,5	37,4	37,4	37,2	37,3	37,4	36,9	37,5	37,6	37,3
Animal 2	36,9	36,8	37,1	36,9	36,9	37,1	36,8	36,4	36,8	36,9
Animal 3	37,2	37,0	37,0	37,1	37,1	37,4	37,2	37,4	37,9	37,6
Animal 4	35,8	35,5	35,6	36,0	36,0	36,2	36,2	36,8	36,7	36,6
Animal 5	36,2	36,5	36,7	36,5	36,9	36,9	37,0	36,8	36,8	36,9
Animal 6	36,9	37,0	37,1	37,0	37,2	37,2	37,4	36,9	37,1	37,0
Animal 7	37,9	38,0	38,0	38,1	35,9	38,0	38,0	38,0	37,9	38,0
Animal 8	36,5	36,8	36,5	36,7	36,8	36,7	36,7	36,5	36,9	37,0
<i>MD</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	37,1	37,0	37,2	37,0	36,9	36,7	36,8	36,8	36,6	36,4
Animal 2	36,0	36,1	36,4	36,1	35,4	35,2	35,2	35,3	35,3	35,3
Animal 3	36,8	36,8	36,7	36,5	36,4	36,3	36,4	36,4	36,2	36,3
Animal 4	32,5	32,5	33,3	33,2	32,3	32,0	31,5	32,0	32,5	33,3
Animal 5	34,4	34,8	35,2	35,1	34,5	34,5	34,6	34,6	34,4	35,7
Animal 6	35,9	36,6	37,0	36,7	36,6	34,8	36,0	36,1	36,1	35,9
Animal 7	36,5	37,0	37,0	37,1	37,0	36,8	36,9	37,0	37,0	36,4
Animal 8	36,6	37,0	37,1	36,8	36,7	36,5	36,4	36,5	36,3	36,5
<i>MA</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	36,5	36,4	36,6	36,6	36,5	36	36,6	36,6	34,2	36,9
Animal 2	35,1	35,5	35,7	35,9	35,9	35,7	36,0	36,2	36,2	36,3
Animal 3	34,2	35,4	35,3	35,5	35,4	35,3	35,7	35,4	35,4	35,7
Animal 4	36,3	36,3	36,0	36,0	36,1	36,3	36,4	36,5	36,6	36,7
Animal 5	35,1	35,4	35,5	35,7	36,0	36,2	36,2	36,5	36,6	36,9
Animal 6	35,7	36,4	36,5	36,7	36,6	36,8	36,9	36,7	36,8	36,8
Animal 7	36,8	36,9	36,9	36,9	36,9	36,9	36,8	36,9	36,9	36,9
Animal 8	36,1	36,4	36,5	36,5	36,2	36,4	36,4	36,7	36,7	36,7

APÊNDICE G – Valores individuais da temperatura atingida (T°C) após a mensuração do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico torácico de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 µg/kg) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
Controle	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	60,8	60,8	60,8	60,8	60,7	60,8	60,8	60,8	60,8	60,8
Animal 2	60,4	55,7	58,1	60,3	60,4	60,4	60,4	58,7	57,7	60,5
Animal 3	60,9	59,9	60,9	49,6	49,5	46,8	47,1	60,8	47,5	60,7
Animal 4	60,6	60,7	58,5	50,1	50,4	54,6	60,7	57,5	52,4	51,8
Animal 5	59,7	55,1	59,2	43,4	47,0	56,0	60,6	54,3	57,2	60,7
Animal 6	61,0	60,9	61,1	61,2	61,1	60,7	60,9	61,0	61,0	60,9
Animal 7	57,3	50,7	50,4	50,1	60,6	48,5	47,3	47,9	48,7	50,1
Animal 8	57,1	54,4	47,5	45,3	55,7	46,8	55,5	50,6	44,8	51,6
MD	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	60,8	60,8	60,7	60,8	54,0	60,9	60,7	60,7	60,7	60,8
Animal 2	60,7	60,7	60,5	60,6	60,6	60,5	60,6	60,8	60,7	60,5
Animal 3	60,7	60,7	60,6	60,7	60,6	60,6	60,5	60,8	60,7	60,5
Animal 4	60,9	60,1	60,7	60,6	60,6	60,7	60,7	60,7	60,7	60,6
Animal 5	56,2	60,5	60,4	60,5	57,3	60,4	60,5	60,6	58,8	53,6
Animal 6	60,8	60,9	60,6	60,6	60,6	60,6	60,6	60,2	60,6	60,7
Animal 7	50,9	60,8	60,9	60,9	60,9	51,3	60,8	58,8	60,9	53,0
Animal 8	52,0	60,9	59,2	61,0	59,3	57,5	60,7	54,2	49,4	49,1
MA	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	60,9	60,9	60,5	60,5	60,6	60,7	60,5	60,5	60,6	60,5
Animal 2	60,7	60,7	60,8	60,7	60,7	61,2	60,7	60,5	60,6	60,5
Animal 3	58,6	60,9	60,6	60,7	60,7	60,6	60,9	60,9	60,7	45,9
Animal 4	60,7	61,0	60,7	60,8	60,8	60,8	60,9	61,0	60,8	60,7
Animal 5	60,8	60,7	60,7	60,4	60,7	60,6	57,8	60,7	60,7	60,9
Animal 6	60,9	60,8	61	60,8	60,4	60,8	61,1	61,0	60,9	60,7
Animal 7	47,7	53,1	54,4	57,7	60,9	60,9	60,7	48,4	45,3	48,4
Animal 8	59,5	60,6	60,4	60,2	60,5	60,4	60,4	56,6	54,6	57,8

APÊNDICE H – Valores individuais do limiar nociceptivo frente ao estímulo térmico torácico ($\Delta T^{\circ}\text{C}$) de 8 equinos tratados com solução salina (C), metadona (0,2 mg/kg) associada à detomidina (10 $\mu\text{g/kg}$) (MD) e metadona (0,2 mg/kg) associada à acepromazina (0,05 mg/kg) (MA) IV

Grupos	Tempo (minutos)									
<i>Controle</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	23,2	23,4	23,4	23,6	23,4	23,4	23,9	23,5	23,2	23,5
Animal 2	23,5	18,9	21,0	23,4	23,5	23,3	23,6	22,3	20,9	23,9
Animal 3	23,7	22,9	23,9	12,5	12,4	9,4	9,9	23,4	9,6	23,1
Animal 4	24,8	25,2	22,9	14,1	14,4	18,4	24,5	20,7	15,7	15,2
Animal 5	23,5	18,6	22,5	6,9	10,1	19,1	23,6	17,5	20,4	23,8
Animal 6	24,1	24,1	24,0	24,2	23,9	23,5	23,5	24,1	23,9	23,9
Animal 7	19,3	12,7	12,4	12,0	24,7	10,5	9,3	9,9	10,8	12,1
Animal 8	20,6	17,6	11,0	8,3	18,9	10,1	18,8	14,1	7,9	14,6
<i>MD</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	23,3	23,8	23,5	23,8	17,1	24,2	23,9	23,2	24,1	24,4
Animal 2	24,7	24,6	24,1	24,5	25,2	25,3	25,4	25,4	25,2	25,2
Animal 3	23,9	23,9	23,9	24,2	24,2	24,3	24,1	24,4	24,3	24,2
Animal 4	28,4	27,6	27,4	27,4	28,3	28,7	29,2	28,7	28,2	27,3
Animal 5	21,8	25,7	25,2	25,4	22,8	25,9	25,9	26,0	24,4	17,9
Animal 6	24,8	24,3	23,6	23,9	24,0	23,8	24,8	24,1	24,5	24,8
Animal 7	14,4	23,8	23,9	23,8	23,9	14,5	23,9	21,8	23,9	16,6
Animal 8	15,3	23,9	22,1	24,2	22,6	21,0	24,3	17,7	13,1	12,6
<i>MA</i>	Basal	15	30	45	60	75	90	105	120	150
Animal 1	24,3	24,5	23,9	23,9	24,1	24,7	23,9	23,9	26,4	23,6
Animal 2	27,8	25,2	25,1	24,8	24,8	25,5	24,7	24,3	24,4	24,2
Animal 3	24,3	25,5	25,3	25,2	25,3	25,3	25,2	25,5	25,3	10,2
Animal 4	24,4	24,7	24,7	24,8	24,7	24,5	24,5	24,5	24,2	24,0
Animal 5	25,8	25,3	25,2	24,7	24,7	24,4	21,6	24,2	24,1	24,0
Animal 6	25,2	24,4	24,5	24,1	23,8	24,0	24,2	24,3	24,1	23,9
Animal 7	10,9	16,2	17,5	20,8	24,0	24,0	23,9	11,5	8,4	11,5
Animal 8	23,4	24,2	23,9	23,7	24,3	24,0	24,0	19,9	17,9	21,1

Trabalho Científico

Trabalho enviado para a revista Equine Veterinary Journal

Validation of mechanical, electrical and thermal nociceptive stimulation methods in horses

Luna, S.P.L.¹; Lopes, C.²; Rosa, A.C.²; Oliveira, F.A.²; Crosignani, N.²; Taylor, P.M.³; Pantoja, J.C.⁴

1- Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, 18618-970, Brazil. Email: stelio@fmvz.unesp.br

2 - Department of Anesthesiology, Faculty of Medicine, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, 18618-970, Brazil.

3 - Taylor Monroe, Ely, Cambridgeshire, UK.

4 - Department of Veterinary Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, 18618-970, Brazil.

Summary

Reasons for performing study: To validate a model for investigating efficacy and duration of analgesia in horses.

Objectives: To investigate repeatability, sensitivity and specificity of nociceptive tests.

Methods: Mechanical (M), thermal (TL) and electrical (E) stimuli were applied to the dorsal metacarpus and coronary band of the left thoracic limb and a thermal stimulus (TT) was

applied caudal to the withers in 8 horses (405 ± 43 kg). Stimuli intensities were increased until a clear avoidance response was detected without exceeding 20 N, 60 °C and 15 V respectively. For each set of tests, three real and one sham stimuli were applied (32 per animal) using a blinded, randomized, crossover design repeated after 6 months. A distribution frequency was produced for descriptive statistics. For each stimulus Chi-square and McNemar tests compared both the proportion of positive responses detected by two observers and the two phases of the study. Kappa coefficients estimated inter-observer agreement in determining endpoints. Differences were significant when $p < 0.05$. Sensitivity (384 tests) and specificity (128 tests) were evaluated for each nociceptive stimulus to assess the evaluators' accuracy in detecting real and sham stimuli.

Results: Nociceptive thresholds were 3.1 ± 2 N (M), 8.1 ± 3.8 V (E), 51.4 ± 5.5 °C (TL) and 55.2 ± 5.3 °C (TT). Level of agreement (%) after all tests, M, E, TL or TT were 90, 100, 84, 98 and 75 respectively. Sensitivity (%) was 89, 100, 89, 98 and 70 and specificity (%) was 92, 97, 88, 91 and 94 respectively.

Conclusions: The high inter-observer agreement, sensitivity and specificity suggest that M, E and TL tests are valid for pain studies in horses.

Potential relevance: The M, E and TL tests performed on the limbs are suitable tools for investigating antinociceptive effects of analgesics in horses.

Keywords: validation; horses; mechanical stimulus; electrical stimulus; thermal stimulus; thresholds.

Introduction

Sparse information on validated methods to assess nociception, and limited availability of species-specific pain assessment scales [1] contribute to the inappropriate

treatment of pain in horses. This exacerbates difficulties encountered recognising both signs of pain and adverse effects of analgesic drugs [2]. Development of species-specific scales and validation of nociceptive tests are essential for both research and clinical treatment. No validation of nociceptive tests in horses has been published. Such information is crucial to define the behavioural responses to standardized noxious stimuli.

The most commonly used nociceptive tests are electrical, mechanical and thermal [3-6]. Electrical stimuli activate nonspecific peripheral fibres, including large diameter fibres not directly involved in nociception [7]. Mechanical stimuli generate action potentials due to ionic influx in channels activated by stretch, and thermal stimuli involve membrane proteins or intracellular effector molecules of high temperature coefficient [8].

Numerous studies in nociception have been used and validated in cats [4; 5; 6; 9-13]. In horses, thermal [14], electrical [15-18] and mechanical [19] stimuli were apparently effective for the study of nociception. However, only mechanical and electrical [20], electrical and thermal [21; 22] or thermal and mechanical stimuli [19] have been combined. No correlation or validation of the three nociceptive stimuli together have been undertaken in this species.

Validation of nociceptive tests is necessary to enable their results to be applied in a clinical setting. Validation of any instrument is based on accumulation of evidence supporting the inferences made from results generated by use of this instrument [23]. The validity of a device is related to the degree of certainty that the measures actually represent concepts [24]. Reliability is the property ensuring that similar results are obtained when the measurement is repeated [24; 25].

A valid instrument for demonstrating pain should produce a consistent response, good correlation between stimulus intensity and pain, be easily interpreted by the patient and observer, cause no tissue damage, be easy to apply and have a clear cut-off point [26-28].

This study aimed to develop a valid model for accurate assessment of analgesic efficacy and duration of effect. To this end, the objective was to evaluate the feasibility, reliability, sensitivity and specificity of three different nociceptive tests in conscious horses.

Material and methods

The study was approved by the Institutional Ethics Committee on Animal Research, protocol number 238/2011. We studied eight adult horses (10.4 ± 3.5 years), of different breeds, weighing 405 ± 43 kg and considered healthy after clinical and laboratory examinations (complete blood count and biochemical profile).

On the day of the study, the left coronary band and bilateral dorsal metacarpal region of the forelimbs and the left withers, between the dorsal insertion of the tenth and fifteenth ribs, were shaved for placement of nociceptive equipment. Animals were left alone in a stall with a loose head collar rope during testing.

Mechanical and thermal stimuli

A limb withdrawal response to mechanical and thermal stimuli was considered positive when the animal lifted its foot, pawed the ground, stamped, flexed the limb or walked to avoid the stimulus. Mechanical and thermal nociceptive thresholds were evaluated using control units fixed on the horses' back^a, operated remotely by infrared control, which activated and recorded the force in Newtons (N) and temperature in degrees Celsius (°C) respectively.

The devices which applied the mechanical and thermal stimuli were fixed with elasticated bands on the shaved dorsal aspect of the left and right metacarpus, respectively. A hemispherical ended pin of 1 mm diameter supplied the mechanical stimulus. The pin was pressed against the skin surface at a rate of 0.8 N/s by means of a pneumatic actuator [29],

until the animal responded as described previously or if the cut-off of 20 N was reached. For thermal stimulation, a 5 gm probe housing heater and temperature sensor was applied to the limb and allowed five minutes to equilibrate with body temperature. The stimulus was applied with a temperature increase of 0.8 °C/s, until an avoidance response was observed or the 60 °C cut out was reached. Both stimuli were stopped as soon as the horse responded or the cut out was reached. The force and temperature at the point of response were recorded as mechanical and thermal nociceptive threshold respectively. Values were automatically recorded on the control units' digital display.

To evaluate the TT nociceptive threshold, a second probe was placed on the shaved thoracic region, caudal to the withers [19]. The probe was adjusted with a strap around the thorax and held consistently against the skin using a bladder inflated to between 60 and 80 mmHg. The mode of operation was the same as for the leg, but the avoidance response was characterized by a skin twitch or the horse turning its head to look back towards the stimulus. The probe was repositioned whenever three consecutive thermal stimuli reached the 60 °C cut out in order to prevent sensitization of the receptors and/or tissue damage.

Electrical stimulus

Electrical stimulation was supplied using a nerve stimulator^b. Two adhesive electrodes^c were fixed seven centimetres apart, on the shaved coronary band of the left forelimb, previously washed with soap and water [3]. The stimulus applied was an alternating current square wave, 50 Hz and 10 ms duration, starting at 1 V and increased by 1 V every 5 seconds until the withdrawal response was observed or the maximum 15 V was reached. Responses were as described for thermal and mechanical stimuli.

Experimental design

Two blinded observers applied sets of four nociceptive tests: each of the three stimulus modalities and one sham stimulus, in random order, with a 10 minute interval between each set. For each stimulus 96 were real and 32 were sham, but as the type and sequence of stimulus were randomly distributed among horses and observers, not necessarily the number of real and sham stimulus was equally distributed between observers and horses. In phase 1, each horse underwent 8 sets of tests, so 32 stimuli were applied to each animal, each observer applying 16 stimuli.

Sham stimuli (25% of all stimuli) were supplied by switching off the control units unbeknown to the observer, so that no stimulus was applied, and “cut out” should be reached. Repeatability was assessed by using the same sets of stimuli in phase 2, 6 months later. Hence, in eight horses, 256 stimuli were applied in each phase making 512 in total.

Statistical analysis

Descriptive statistics and the distribution frequency were generated to validate the data. The chi-square test was used to compare the proportion of positive responses recorded by each observer in each phase of the study separately and combined. The McNemar test was used to compare the proportion of positive responses between the phases of the study for each observer and for each stimulus.

The diagnostic accuracy of observers to classify the stimuli correctly as real or sham was evaluated by tests for sensitivity and specificity, assessed by combining all data (observer, phase and stimuli) and for each variable separately.

The kappa coefficient was estimated to assess inter-observer agreement in the two phases with the stimuli grouped. Homogeneity of the Kappa coefficients was evaluated to test inter-observer agreement for the phase of the study and the different stimuli. Analyses were performed with the statistical package PROC FREQ [30].

Differences between thresholds reported in the two phases were evaluated using a paired t test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Testing lasted 1.5 hours and was well tolerated by all horses. From a total of 512 stimuli over the two phases, 384 (75%) were real and 128 (25%) sham. Each observer performed 256 stimuli (50%). Table 1 shows the number and percentage of individual aversion responses and the number and percentage of false negative and false positive responses detected in the 512 nociceptive tests performed during phases 1 and 2.

The only difference in thresholds between phases was in TL where phase 2 values were significantly higher than in phase 1 ($p = 0.0001$) (Figure 1).

Of the 164 duplicate stimuli for both observers, i.e. when the same stimuli were applied to the same animals, 147 were correctly identified as real or sham by both observers, showing an agreement of 90% ($\kappa = 0.69$; 95 % CI: 0.56 to 0.82), of which 92% (75 of 82 stimuli) ($\kappa = 0.72$, 95% CI: 0.53 to 0.91) were in phase 1 and 88 % (72 of 82 stimuli) ($\kappa = 0.66$, 95% CI: 0.48 to 0.85) in phase 2, with no difference between the phases ($p = 0.69$).

The inter-observer agreement was not homogeneous across the stimuli ($p = 0.018$). Mechanical stimulus was the only one to show 100% inter-observer agreement (44 duplicate stimuli for both observers) ($\kappa = 1$), followed by TL, with 98% agreement (39 of 40 stimuli; $\kappa = 0.88$; 95% CI: 0.63 – 1, minimum and maximum respectively). For E, agreement was 84% (37 of 44 stimuli; $\kappa = 0.53$, 95% CI: 0.22 - 0.83) and the stimulus that showed the lowest agreement was TT, at 75% (27 of 36 stimuli; $\kappa = 0.50$, 95% CI: 0.22 - 0.77).

There was no difference in the identification of positive and negative responses by each observer in phases 1 & 2 ($p = 0.44$). The proportion of correctly identified positive responses by observer 1 was 73% (93 of 128 stimuli) and 65% (83 of 128 stimuli) in phases 1 & 2 respectively. The proportion of correctly identified negative responses was 27% (35 of 128 stimuli) and 35% (45 of 128 stimuli) in phases 1 & 2 respectively. Observer 2 identified 70% (89 of 128 stimuli) and 68% (87 of 128 stimuli) as positive and 31% (39 of 128 stimuli) and 32% (41 of 128 stimuli) as negative responses in phases 1 and 2 respectively (Table 2).

When data from all the stimuli and both observers were grouped, in phase 1, 71% (182 of 256 stimuli) of responses were positive and 29% (74 of 256 stimuli) were negative. In phase 2, the percentage of positive responses was significantly reduced ($p < 0.0001$) to 66% (170 of 256 stimuli) and negative increased to 34% (86 of 256 stimuli) (Table 2).

The sensitivity and specificity data are presented in Table 3.

There were superficial lesions at the sites of application of some thermal stimuli, especially in the thoracic region. These disappeared 48 hours after testing without leaving scars. The other nociceptive stimuli caused no visible lesions.

Discussion

This investigation validates mechanical, thermal and electrical stimuli for nociceptive threshold testing in horses. The choice of modality for any future study will depend on the characteristics of the investigation. Mechanical and electrical stimulation are less likely to cause even minor skin lesions; however, electrical stimulus has the disadvantage of being an unphysiological noxious stimulus, as all fibres, not only nociceptors, are activated, making translation to clinical conditions somewhat tenuous.

Inter-observer agreement ranged from excellent to adequate [31]. The mechanical stimulus showed the greatest agreement and sensitivity, followed by TL, E and TT.

Specificity was in descending order M, TT, TL and E. All sensitivity and specificity data were close to or above 90% except for TT sensitivity. Such values demonstrate the validity of mechanical, limb thermal and electrical nociceptive tests.

Validation of an instrument defines the ability to actually measure what it is intended to measure [24]. The stimuli studied here encompass the ideal characteristics of a nociceptive test. The behavioural changes due to nociceptive stimuli were transient. Aversive responses to all limb stimuli were consistent, very similar, and apparently easily identified by both by animals and observers (Table 1). The stimuli were easy to apply, particularly the thermal and mechanical stimuli as these were operated by remote control, minimizing any conditioned behaviour. All stimuli were limited by a defined cut-off point to prevent injury, and only the thoracic thermal stimulus produced local lesions; these were mild, and promptly healed within 48 hours [26-28].

In horses, nociceptive stimulation in the limbs may limit the ability to detect the response, since movement of the animal unrelated to an aversive response, may be mistaken as the threshold response at which the stimulus is stopped. In our study this was rarely observed, as there were very few false positives. On the other hand, increased locomotor activity may be observed after administration of some drugs, such as opioids, making limb movement more likely to be misinterpreted [32]. The opposite may occur when drugs such as the α_2 -adrenoceptor agonists are used, as the sedation and ataxia increase the likelihood of false negatives [33]. In the case of the thorax, stimuli at the withers avoid interference from increased locomotor activity, but skin twitch in response to innocuous stimuli such as flies may interfere [28]. In this study, although we took care to minimize interference from flies by using fly repellent, and as fly sheets to cover the animals, the data were less consistent than from the limbs.

Testing horses, alone, in a strange laboratory environment might be expected to disrupt social bonds and elicit a stress response, thereby altering responses to the stimuli [28]. In this study, animals had already become accustomed to the testing stall and the equipment as they had previously taken part a similar research protocol.

A number of mechanical nociceptive threshold testing methods have been reported, and a variety of probes have been employed in horses [20; 34; 35]. We tested four different probes in a preliminary study, and selected the 1 mm probe for the present study since this resulted in the lowest and least variable thresholds [36].

Electrical nociceptive thresholds reported in this study were similar to [15] or higher than those observed previously [22], where values of 2.9 ± 0.4 V were reported for the same site and stimulus. Although the stimulus was measured in voltage rather than electric current, the distance between the electrodes was the same in all cases, and the same animals were used, guaranteeing the same electrical resistance. For M, values were similar to previously reported data [37], but for TT the average thresholds were higher than those described previously (approximately 56 *versus* 46 °C) [19]. This may be related to the higher environment temperature in the present investigation. Calm, mixed breed horses such as those used here, which were well accustomed to handling, may also exhibit higher thresholds than excitable Thoroughbreds.

The literature reports several methods for electrical nociceptive testing in horses, but there is no standardization of current and electrode location. Electrodes have been implanted in the tooth pulp [38], fixed to the coronary band [20; 37] or to the digital palmar nerve [17; 39]. In our study E produced the most false negatives of stimuli applied to the limb. A higher cut-off point might be used to improve electrical testing sensitivity [15; 16].

A number of methods have been used to produce thermal stimulation, for example by heat projection lamps focused on the coronary band [14; 22] or withers [14]. In both cases,

even when a cold lamp is used as a sham stimulus, there may be a conditioned response. Among all the stimuli used in the present study TT produced the most false negative and therefore the lowest sensitivity; this should be taken into account in designing studies to assess analgesic efficacy as it may lead to misinterpretation of drug effect.

Interpretation of the inter-observer agreement criteria was based on the Kappa coefficient [31], where agreement is deemed excellent, good, fair and poor when Kappa is greater than 0.75, 0.59 - 0.74, 0.40 - 0.58 or below 0.40, respectively. On this basis, both overall and between-phase agreement of the tests was good, even though decreased in phase 2. This indicates that intra observer repeatability as well as inter observer reproducibility and reliability of the tests were good, thereby suggesting that only one observer is necessary for any study using these nociceptive models.

When data from both observers were grouped, the smallest proportion of correctly identified positive responses occurred in phase 2. Incorrect identification may have been a result of misinterpretation of the response to the stimuli and/or variation in the horses' responses. This was surprising, as observer experience would be expected to improve interpretation of aversive responses [28; 40]. Observer 1 appeared to misinterpret phase 2 responses the most, correctly recording positive responses 7.8% less than in phase 1, whereas observer 2 decreased by only 1.6%, probably due to a false sense of learning. After prolonged testing, horses may learn to anticipate a stimulus and respond before it becomes aversive [41; 42]. The opposite occurred here; the lower responsiveness might be related to adaptation to the stimuli.

The study had some limitations. Numerous false negative responses occurred with TT. In contrast to E, where the cut-off point may easily be increased [15; 16], for TT, increasing the cut-off is inadvisable, as, even at 60°C, superficial skin lesions developed in some animals at the testing site. It is conceivable that the thoracic stimulus was not adequately detected by

these riding horses, indicating that results from thermal nociceptive testing at a thoracic site should be interpreted with caution in animals that are in regular ridden exercise, since prolonged contact with a saddle may reduce sensitivity.

Conclusions

Mechanical, electrical and thermal stimuli applied to the limbs appear to be appropriate for assessing nociception in conscious horses; they were easy to apply, aversive responses were consistent and easy to interpret, and all tests were reliable, sensitive, and specific, indicating their validity for use in research. A thermal stimulus applied to the thorax was less reliable. The best results, in descending order, were from mechanical, thermal and electrical stimulation on a limb, and finally a thoracic thermal stimulus.

Competing interests

PMT holds the rank of the nociceptive equipments (Topcat metrology), but was not involved in data gathering and analysis. PMT helped in study design and in preparing and English editing the final draft of the manuscript.

Source of Funding

São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support (Process 2011/21927-0).

Acknowledgements.

São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support.

Manufacturers' addresses

^aWTT2 & WMT1; Topcat Metrology Ltd, Little Downham, UK

^b GRASS-S 48; Astro-Med Inc, West Warwick, Rhode Island, USA

^c Eletrodo Medi-trace 200; Kendall, Graphic Control – Canada

297

298 **References**

- 299 [1] Bussi res, G., Jacques, C., Lainay, O., Beauchamp, G., Leblond, A., Cadore, J.L.,
300 Desmaizieres, L.M., Cuvelliez, S.G. and Troncy, E. (2008) Development of a
301 composite orthopaedic pain scale in horses. *Res Vet Sci* **85**, 294-306.
302
- 303 [2] Lorena, S.E.R.S., Luna, S.P.L., Lascelles, B.D.X. and Corrente, J.E. (2013) Attitude
304 of Brazilian veterinarians in the recognition and treatment of pain in horses and cattle.
305 *Vet Anaesth Analg* **40**, 410-418.
306
- 307 [3] J chle, W. and Hamm, D. (1986) Sedation and analgesia with Domosedan
308 (detomidine hydrochloride) in horses: dose response studies on efficacy and its
309 duration. *Acta Vet Scand Suppl* **82**, 69-84.
310
- 311 [4] Dixon, M.J., Robertson, S.A. and Taylor, P.M. (2002) A thermal threshold testing
312 device for evaluation of analgesics in cats. *Res Vet Sci* **72**, 205-210.
313
- 314 [5] Dixon, M.J., Taylor, P.M., Steagall, P.V.M., Brondani, J.T. and Luna, S.P.L. (2007)
315 Development of a pressure nociceptive threshold testing device for evaluation of
316 analgesics in cats. *Res Vet Sci* **82**, 85-92.
317
- 318 [6] Steagall, P.V.M., Taylor, P.M., Brondani, J.T., Luna, S.P.L. and Dixon, M.J. (2008)
319 Antinociceptive effects of tramadol and acepromazine in cats. *J Feline Med Surg* **10**,
320 24-31.
321
- 322 [7] Le Bars, D., Gozariu, M. and Cadden, S.W. (2001) Animal Models of Nociception.
323 *Pharmacol Rev* **53**, 597-652.
324
- 325 [8] Neddermeyer, T.J., Fl hr, K. and L tsch, J. (2008) Principle components analysis of
326 pain thresholds to thermal, electrical, and mechanical stimuli suggests a predominant
327 common source of variance. *Pain* **138**, 286-291.
328
- 329 [9] Taylor, P.M., Robertson, S.A. and Dixon, M.J. (2007) Evaluation of the use of thermal
330 thresholds to investigate NSAID analgesia in a model of inflammatory pain in cats. *J*
331 *Feline Med Surg* **9**, 313-318.
332
- 333 [10] Steagall, P.V.M., Taylor, P.M., Brondani, J.T., Luna, S.P.L., Dixon, M.J. and Ferreira,
334 T.H. (2007) Effects of buprenorphine, carprofen and saline on thermal and mechanical
335 nociceptive thresholds in cats. *Vet Anaesth Analg* **34**, 344-350.
336
- 337 [11] Steagall, P.V.M., Millette, V., Mantovani, F.B., Gilbert, P., Luna, S.P.L. and Duke-
338 Novakowski, T. (2009) Antinociceptive effects of epidural buprenorphine or
339 medetomidine, or the combination, in conscious cats. *J Vet Pharmacol Therap* **32**,
340 477-484.

- [12] Ambros, B. and Duke, T. (2013) Effect of low dose rate ketamine infusions on thermal and mechanical thresholds in conscious cats. *Vet Anaesth Analg* **40**, e76-e82.
- [13] Millette, V.M., Steagall, P.V.M., Duke-Novakovski, T. and Livingston, A.J. (2008) Effects of meperidine or saline on thermal, mechanical and electrical nociceptive thresholds in cats. *Vet Anaesth Analg* **35**, 543-547.
- [14] Carregaro, A.B., Luna, S.P., Mataqueiro, M.I. and Queiroz-Neto, A. (2007) Effects of buprenorphine on nociception and spontaneous locomotor activity in horses. *Am J Vet Res* **68**, 246-250.
- [15] Natalini, C.C. and Robinson, E.P. (2000) Evaluation of the analgesic effects of epidurally administered morphine, alfentanil, butorphanol, tramadol, and U50488H in horses. *Am J Vet Res* **61**, 1579-1586.
- [16] Natalini, C.C., Polydoro, A.S. and Linardi, R.L. (2006) Analgesic effects of subarachnoidally administered hyperbaric opioids in horses. *Am J Vet Res* **67**, 941-946.
- [17] Spadavecchia, C., Arendt-Nielsen, L., Spadavecchia, L., Mosing, M., Auer, U. and Van Den Hoven, R. (2007) Effects of butorphanol on the withdrawal reflex using threshold, suprathreshold and repeated subthreshold electrical stimuli in conscious horses. *Vet Anaesth Analg* **34**, 48-58.
- [18] Rohrbach, H., Korpivaara, T., Schatzmann, U. and Spadavecchia, C. (2009) Comparison of the effects of the alpha-2 agonists detomidine, romifidine and xylazine on nociceptive withdrawal reflex and temporal summation in horses. *Vet Anaesth Analg* **36**, 384-395.
- [19] Love, E.J., Taylor, P.M., Murrell, J. and Whay, H.R. (2012) Effects of acepromazine, butorphanol and buprenorphine on thermal and mechanical nociceptive thresholds in horses. *Equine Vet J* **44**, 221-225.
- [20] Schatzmann, U., Armbruster, S., Stucki, F., Busato, A. and Kohler, I. (2001) Analgesic Effect of Butorphanol and Levomethadone in Detomidine Sedated Horses. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **48**, 337-342.
- [21] Oliveira, F.A., Pignaton, W., Teixeira-Neto, F.J., de Queiroz-Neto, A., Puoli-Filho, J.N.P., Scognamillo, M.V.R., Viveiros, B.M. and Luna, S.P.L. (2013) Antinociceptive and Behavioral Effects of Methadone Alone or in Combination with Detomidine in Conscious Horses. *J Equine Vet Sci* **XX**, 1-7.
- [22] Santi Milaré, A., de Oliveira, F.A., Pacca Loureiro Luna, S., Rizzo Scognamillo, M.V. and de Queiroz-Neto, A. (2013) Intravenous Tramadol Injection has no Antinociceptive Effect in Horses Undergoing Electrical and Thermal Stimuli. *J Equine Vet Sci*, 1-4.
- [23] Sousa, F.F. and Silva, J.A. (2005) The metric of pain: theroretical and methodological issues. *Rev Dor* **6**, 469-513.

- [24] Hoppen, N., Lapointe, L. and Moreau, E. (1996) A guide for research evaluation in information systems. *REAd Rev eletrôn adm* **2**, 1-34.
- [25] Menezes, P.R. (1998) Validity and confiability of psychiatric evaluation scales. *Rev Psiquiatr Clin* **25**, 214-216.
- [26] Beecher, H.K. (1957) The measurement of pain; prototype for the quantitative study of subjective responses. *Pharmacol Rev* **9**, 59-209.
- [27] Chapman, C.R. and Syrjala, K.L. (2001) Measurement of pain. In: *Bonica's Management of Pain*, 3rd edn., Eds: J.D. Loeser and J.J. Bonica, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 311-328.
- [28] Love, E.J., Murrell, J. and Whay, H.R. (2011) Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. *Vet Anaesth Analg* **38**, 3-14.
- [29] Dixon, M.J., Taylor, P.M., Slingsby, L., Hoffmann, M.V., Kästner, S.B.R. and Murrell, J. (2010) A small, silent, low friction, linear actuator for mechanical nociceptive testing in veterinary research. *Lab Anim* **44**, 247-253.
- [30] SAS Institute, S. (2009) *SAS/STAT User's Guide, Version 9.2*, Cary, NC.
- [31] Landis, J.R. and Koch, G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159-174.
- [32] Combie, J., Dougherty, J., Nugent, E. and Tobin, T. (1979) The pharmacology of narcotic analgesics in the horse. IV. Dose and time response relationships for behavioral responses to morphine, meperidine, pentazocine, anileridine, methadone, and hydromorphone. *J Equine Med Surg* **3**.
- [33] Kamerling, S.G., Cravens, W.M. and Bagwell, C.A. (1988) Objective assessment of detomidine-induced analgesia and sedation in the horse. *Eur J Pharmacol* **151**, 1-8.
- [34] Pippi, N.L. and Lumb, W.V. (1979) Objective tests of analgesic drugs in ponies. *Am J Vet Res* **40**, 1082-1086.
- [35] Chambers, J.P., Livingston, A. and Waterman, A.E. (1990) A device for testing nociceptive thresholds in horses. *Vet Anaesth Analg* **17**, 42-44.
- [36] Taylor, P.M., Crosignani, N., Dixon, M.J., Lopes, C., Rosa, A.C., Luna, S.P.L. and Puoli Filho, J.N.P. (2012) Mechanical nociceptive thresholds using four different probe configurations in horses. *Vet Anaesth Analg* **40**, 1.
- [37] Moens, Y., Lanz, F., Doherr, M.G. and Schatzmann, U. (2003) A comparison of the antinociceptive effects of xylazine, detomidine and romifidine on experimental pain in horses. *Vet Anaesth Analg* **30**, 183-190.

- [38] Brunson, D.B. and Majors, L.J. (1987) Comparative analgesia of xylazine, xylazine/morphine, xylazine/butorphanol, and xylazine/nalbuphine in the horse, using dental dolorimetry. *Am J Vet Res* **48**, 1087-1091.
- [39] Spadavecchia, C., Spadavecchia, L., Andersen, O.K., Arendt-Nielsen, L., Leandri, M. and Schatzmann, U. (2002) Quantitative assessment of nociception in horses by use of the nociceptive withdrawal reflex evoked by transcutaneous electrical stimulation. *Am J Vet Res* **63**, 1551-1556.
- [40] Chesler, E.J., Wilson, S.G., Lariviere, W.R., Rodriguez-Zas, S.L. and Mogil, J.S. (2002) Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 907-923.
- [41] Kamerling, S.G., DeQuick, D.J., Weckman, T.J. and Tobin, T. (1985) Dose-related effects of fentanyl on autonomic and behavioral responses in performance horses. *Gen Pharmacol-Vasc S* **16**, 253-258.
- [42] Chambers, J.P., Waterman, A.E. and Livingston, A. (1994) Further development of equipment to measure nociceptive thresholds in large animals. *Vet Anaesth Analg* **21**, 66-72.

Tables

TABLE 1: Number and percentage of individual aversion responses and the number and percentage of false negative and false positive tests shown by horses after 512 nociceptive stimuli performed in two phases at 6 months interval

Type of stimulus	Aversion response	Number	%	Number and % of false negatives	Number and % of false positives
Electrical	Lifted the foot	66	52		2 (6%)
	No reaction	39	30	11 (11%)	
	Stamped or scraped with foot	16	12		1 (3%)
	Moved	3	2		1 (3%)
	Twitched the limb	2	2		
	Looked towards the device	2	2		
	Total	128	100	11	4
Mechanical	Lifted the foot	65	51		1 (3%)
	No reaction	31	24	0	
	Stamped or scraped with foot	25	20		
	Twitched the limb	5	4		
	Moved	2	2		
	Total	128	100	0	1
Thermal in the limb	Lifted the foot	75	59		2 (6%)
	No reaction	31	24	2 (2%)	
	Stamped or scraped with foot	11	9		
	Moved	8	6		1 (3%)
	Twitched the limb	3	2		
	Total	128	100	2	3
Thorax thermal	No reaction	59	46	29 (30%)	
	Twitched the withers	45	35		
	Looked towards the device	21	16		1 (3%)
	Moved	2	2		1 (3%)
	Lifted the neck up & back	1	1		
	Total	128	100	29	2

TABLE 2: Number and percentage of positive and negative responses, identified by two observers, to electrical, mechanical and thermal nociceptive stimuli, applied to 8 horses in two equal phases at six months' interval

Type of stimulus (n = 64 each stimulus)						
Phase	Observer	Response	Electrical	Mechanical	Thermal in the limb	Thorax thermal
1	1 & 2	Positive	46 (72%)	49 (77%)	50 (78%)	37 (58%)
		Negative	18 (28%)	15 (23%)	14 (22%)	27 (42%)
2		Positive	43 (67%)	48 (75%)	47 (73%)	32 (50%)
Negative		21 (33%)	16 (25%)	17 (27%)	32 (50%)	
1 & 2	1	Positive	44 (69%)	49 (77%)	46 (72%)	37 (58%)
		Negative	20 (31%)	15 (23%)	18 (28%)	27 (42%)
	2	Positive	45 (70%)	48 (75%)	51 (80%)	32 (50%)
		Negative	19 (30%)	16 (25%)	13 (20%)	32 (50%)

TABLE 3: Sensitivity and specificity for electrical mechanical and thermal nociceptive stimuli, applied to horses in each phase of the study or both phases together according to the evaluation of the two observers grouped

	Phases	Sensitivity	Specificity
Electrical	1	92% (44/48)	87% (14/16)
	2	85% (41/48)	87% (14/16)
	1 & 2	89% (85/96)	87% (28/32)
Mechanical	1	100% (48/48)	94% (15/16)
	2	100% (48/48)	100% (16/16)
	1 & 2	100% (96/96)	97% (31/32)
Thermal in the limb	1	100% (48/48)	87% (14/16)
	2	96% (46/48)	94% (15/16)
	1 & 2	98% (94/96)	91% (29/32)
Thorax thermal	1	77% (37/48)	100% (16/16)
	2	62% (30/48)	87% (14/16)
	1 & 2	70% (67/96)	94% (30/32)

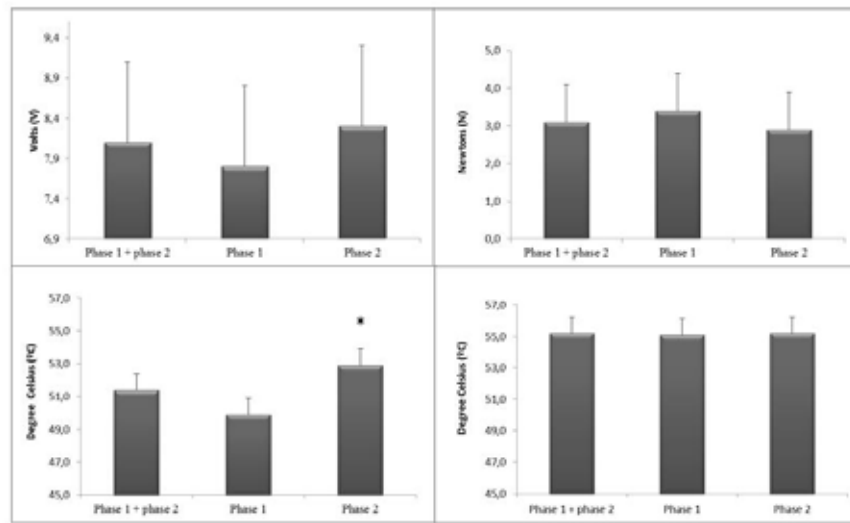


FIGURE 1: (a) Electrical (Volts), (b) mechanical (Newtons) and thermal nociceptive thresholds ($^{\circ}\text{C}$) in (c) the limb and (d) the thorax in each phase six months apart. *denotes significant difference between phases $p < 0.05$