UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

William Petroni Leal

**Avaliações sedativa e analgésica da morfina em teiús
(*Salvator merianae*).**

Pirassununga

2015

William Petroni Leal

**Avaliações sedativa e analgésica da morfina em teiús
(*Salvator merianae*)**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

L435a Leal, William Petroni
Avaliação sedativa e analgésica da morfina em teiús
(*Salvator merianae*) / William Petroni Leal. --
Pirassununga, 2015.
62 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro.

1. *Salvator merianae* 2. Sedação 3. Analgesia
4. Morfina. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: William Petroni Leal

Título: Avaliações sedativa e analgésica da morfina em teiús (*Salvator merianae*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Data: 18 / 09 / 15

Banca Examinadora

Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani

Instituição: Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Alzira, exemplo de vida, dedicação, honestidade e moralidade, o meu muitíssimo obrigado.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força maior inexplicável, que me conduz ao melhor caminho e que me fortalece na concretização dos meus ideais.

Aos meus pais, Carlos e Alzira, meu porto seguro, pelo apoio, incentivo e paciência incondicionais, durante a realização de mais uma etapa em minha vida.

À minha irmã, Nicole, pela paciência, apoio e companheirismo durante esta etapa de minha vida.

À minha avó, Alzira, pelo apoio incondicional, ajuda e paciência.

Aos meus avós, Glória e João, pelo amor e carinho mesmo a distância.

À minha namorada, Luma, pelo apoio e paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro, pela oportunidade de continuar o aperfeiçoamento dentro da área da Anestesiologia Veterinária, além da amizade e confiança creditados a minha pessoa e ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Augusto Shinya Abe, pelo auxílio, sugestões e ensinamentos.

Aos pós-graduandos do Núcleo de Anestesiologia Veterinária (NAVE), André, Bárbara, Shayne e Thaís, grandes parceiros, que fizeram este trabalho muito mais leve, pelo comprometimento, competência e todas as aventuras vividas.

Aos pós-graduandos Paulo e Renan, amigos e parceiros, que me ajudaram em diversas ocasiões, e também pelas risadas e aventuras vividas.

Ao jacarezário mantido pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” Campus Rio Claro - SP, por disponibilizar os animais para a realização do projeto.

Ao funcionário do UDCH (Unidade Didático Clínico Hospitalar) Neimar, pela amizade, conversas e infinitas ajudas no cotidiano.

A todos meus amigos, que mesmo à distancia e correria do dia a dia, se fizeram presentes.

Aos colegas de pós-graduação da FZEA e da FMVZ pelos momentos no corredor do prédio e descontrações em nossas reuniões, festas e churrascos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos por me acolher e dar suporte no ensino e pesquisa durante a Pós-graduação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado.

À Classe Reptilia, que me fascina desde a infância.

Aos teiús que participaram deste experimento.

“Não há dia fácil, o único dia fácil foi ontem”

Filosofia dos SEALS da Marinha Norte Americana

RESUMO

LEAL, W.P. **Avaliações sedativa e analgésica da morfina em teiús (*Salvator merianae*)**. 2015 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O presente estudo objetivou avaliar a sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (*Salvator merianae*). Foram utilizados oito animais jovens, de ambos os sexos, pesando entre 300 e 1800gr, os quais foram submetidos a três tratamentos, a saber: G5 - 5mg/kg de morfina via intramuscular (IM); G10 - 10mg/kg de morfina IM e G0 – o qual recebeu 0,5mL de NaCl 0,9% IM. O presente estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa avaliou a sedação promovida pela morfina através da avaliação da atividade locomotora e através dos parâmetros comportamentais. A segunda etapa consistiu na avaliação da analgesia promovida pela morfina frente a um desafio de estímulo térmico. Em ambas as etapas, os animais foram avaliados antes do tratamento (basal) e em 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após o tratamento e os avaliadores desconheciam os tratamentos. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$. A temperatura corpórea foi avaliada durante a realização das duas etapas, e em ambas, a temperatura se manteve constante em todos os grupos em relação ao basal, com exceção do momento 12 horas. Na comparação entre grupos, G5 e G10 diferiram de G0 nos momentos 4 e 6 horas durante a primeira etapa e não apresentaram diferenças em relação a G0 durante a segunda etapa. Na avaliação da atividade locomotora, G0 manteve-se constante em todos os momentos em relação ao basal, exceto no momento 12 horas, G5 se mostrou diferente do basal nos momentos 0,5, 4 e 12h e G10 entre os momentos 0,5 hora e 12 horas. Na comparação entre grupos, G5 foi menor que G0 e igual a G10 nos momentos 0,5, 3 e 4 horas, porém foi maior que G10 e igual a G0 nos momentos 1,2 e 6h. A avaliação dos parâmetros comportamentais evidenciou diferença entre G5 e o basal nos momentos 2 e 4 horas e em G10 nos momentos 3 e 6 horas, na comparação entre grupos, G5 foi diferente de G0 nos momentos 2 e 4h, e G10 e G0 diferiram entre 1 e 6 horas. G5 e G10 foram iguais entre si em todos os momentos, com exceção do momento 6 horas. A avaliação da analgesia mostrou G0 igual ao basal em todos os momentos de avaliação, exceto em 12 horas após o tratamento, já G5 e G10 demonstraram maior tolerância ao estímulo térmico nos momentos 0,5, 1 e 12h e nos momentos 2, 3, 4, 6 e 12 horas, respectivamente. A comparação entre grupos demonstrou um maior tempo para a retirada do membro, G5 foi maior que G0 nos momentos 0,5, 1 e 4 horas e G10 a partir de 1 hora até 12 horas após o tratamento. A morfina promove redução da atividade locomotora, aumento na pontuação dos parâmetros comportamentais e aumento do tempo de retirada do membro de forma dose-dependente, sugerindo uma ação sedativa e analgésica em teiús.

Palavras chaves: *Salvator merianae*, sedação, analgesia, morfina.

Abstract

LEAL, W.P. 2015 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This study aimed to evaluate the sedation and analgesia provided by morphine in tegus (*Salvator merianae*). Eight young animals were used, of both sexes, weighing between 300 and 1800g, which underwent three treatments: G5 - 5 mg / kg of morphine intramuscularly (IM); G10 - 10 mg / kg IM and G0 morphine - which received 0.5 ml of 0.9% NaCl (IM). The study was divided into two stages. The first step sedation assessed by morphine promoted by evaluating locomotor activity and through behavioral parameters. The second step was to assess the analgesia provided by morphine facing a challenge of thermal stimulus. In both phases, animals were assessed before treatment (baseline) and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 and 24 hours after treatment and blinded to the treatments. The body temperature was evaluated during the course of the two stages, and both the temperature remained constant in all groups compared to baseline, except the moment 12 hours. In the comparison between groups, G5 and G10 differed from G0 in moments 4 and 6 hours during the first stage and showed no differences from G0 during the second stage. In the assessment of locomotor activity, G0 remained constant at all times over the baseline, except at 12 hours, G5 showed different from baseline at times 0.5, 4 and 12 hours and G10 times between 0.5 hours and 12 hours. In the comparison between groups, G5 was lower than G0 and the same as G10 at times 0.5, 3 and 4 hours, however was higher than G10 and the same as G0 in times 1, 2 and 6 hours. The behavioral parameters showed difference between G5 and baseline at times 2 and 4 hours and G10 and baseline at times 3 and 6 hours, in comparison between groups G5 and G10 were different in at 2 and 4 hours, and G10 and G0 were different at 1 to 6 hours. G5 and G10 were the same at all times, except at 6 hours after treatment. The evaluation of analgesia showed G0 equal to baseline at all times except at 12 hours after treatment, as G5 and G10 showed increased tolerance to thermal stimulus at times 0.5, 1 and 12h and at times 2, 3, 4, 6 and 12 hours, respectively. Comparison between groups showed a longer time for the withdrawal hind limb, G5 is greater than G0 at times 0.5, 1 and 4 hours and G10 from 1 hour to 12 hours after treatment. Morphine causes a reduction of locomotor activity, increased score of behavioral parameters and increased time of withdrawal hind limb in a dose-dependent manner, suggesting a sedative and analgesic action in tegus.

Key-words: *Salvator merianae*, sedation, analgesia, morphine.

Lista de figuras

- Figura 1 - Caixa de fibra para manutenção dos teiús. Destaca-se a presença de esconderijos (canos de plástico), fonte de aquecimento tipo focal (*basking*) e os pratos utilizados para a alimentação e água.....20
- Figura 2 - Leitura do microchip implantado no subcutâneo (A), mensuração da temperatura pela leitora (B).....21
- Figura 3 - Arena do teste de campo aberto, nota-se as divisões utilizadas para a avaliação da atividade locomotora.....22
- Figura 4 - Teiú acomodado na caixa plástica transparente utilizada para a avaliação dos parâmetros comportamentais.....24
- Figura 5 - Utilização do termoalquímetro em um teiú. Destaca-se a superfície plantar em contato com a fonte de calor.....25
- Figura 6 - Temperatura de teiús (n = 8) submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10) durante o período de avaliação de sedação. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....27
- Figura 7 - Temperatura de teiús (n = 8) submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10) durante o período de avaliação de analgesia. * indica diferença em relação ao basal.....27
- Figura 8 - Atividade locomotora obtida em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....28
- Figura 9 - Escores de sedação em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....30
- Figura 10 - Reflexo de retirada do membro obtido em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em média $\pm$ erro padrão. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....32

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação dos parâmetros comportamentais utilizados para a monitoração da sedação promovida pela morfina em teiús.....23

Tabela 2 - Atividade locomotora obtida em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....29

Tabela 3 - Escore de sedação em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.....31

Tabela 4 - Comparação do tempo de retirada do membro (s) dos teiús submetidos ao teste de campo aberto e tratados com 0,5 ml de solução salina 0,9%, morfina 5 mg/kg (G5), morfina 10 mg/kg (G10) pela intramuscular no membro torácico. Valores dispostos em média $\pm$ desvio padrão. * diferença entre o momento e o seu tempo basal. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si.....33

Sumário

1 Introdução	12
2 Revisão de literatura	12
3 Objetivos	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 Material e Métodos.....	18
4.1 Avaliação da temperatura	21
4.2 Avaliação da sedação.....	21
4.2.1 Avaliação da atividade locomotora.....	21
4.2.2 Avaliação dos parâmetros comportamentais	23
4.3 Avaliação da analgesia.....	24
4.4 Análise estatística.....	25
5 Resultados	26
5.1 Temperatura	26
5.2 Sedação.....	28
5.2.1 Atividade locomotora.....	28
5.2.2 Parâmetros Comportamentais	30
5.3 Analgesia	32
6 Discussão.....	34
7 Conclusões.....	39
8 Referências Bibliográficas	40
APÊNDICE A – Pontuação individual dos animais em cada grupo durante a avaliação da atividade locomotora no teste de campo aberto.....	47
APÊNDICE B – Pontuação individual dos animais em cada grupo utilizado na avaliação dos escores comportamentais.	50
APÊNDICE C – Tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico individual dos animais em cada um dos grupos utilizados.....	53
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética CEUA/FZEA - USP.....	56
ANEXO B – Aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).....	60

1 Introdução

Os répteis são comumente mantidos em cativeiro, seja em Instituições de pesquisa e zoológicos, como também como animais de estimação por pessoas que procuram um “pet” exótico. Consequentemente ao aumento do atendimento clínico e cirúrgico, a medicina de répteis evolui a cada dia por meio da padronização de terapêuticas clínicas, técnicas cirúrgicas e protocolos anestésicos e analgésicos.

O comportamento relacionado à dor está bem estabelecido em pequenos animais. Há metodologias confiáveis de avaliação utilizando-se parâmetros fisiológicos e comportamentais a fim de avaliar a dor pós-cirúrgica em cães (MURREL et al., 2008) e gatos (BRONDANI et al., 2013). Porém a dor e analgesia em répteis ainda é pouco explorada.

Segundo Read (2004), em uma pesquisa com médicos veterinários associados à ARAV (Association of Reptile and Amphibian Veterinarians), mais de 75% desses profissionais acreditam que seus conhecimentos sobre dor e analgesia são inadequados, e menos de 40% dos entrevistados dizem utilizar analgésicos.

Existem, na literatura, alguns estudos sobre dor e analgesia em répteis, mas todos esses estudos são voltados às espécies exóticas. Os lagartos teiús são utilizados em diversas pesquisas de fisiologia comparada, sendo realizados vários procedimentos invasivos, devido a este fato se faz necessário a padronização do uso da morfina nesses animais.

2 Revisão de literatura

A Classe Reptilia apresenta mais de 6500 espécies divididas em quatro Ordens. A Ordem Chelonia é composta pelos quelônios; a Crocodylia pelos jacarés, aligatores e crocodilos; a Sphenodontida é representada por duas espécies de tuatara; a Squamata é dividida em duas Subordens: Ophidia e Sauria, sendo que a primeira é representada pelas serpentes e a segunda pelos lagartos (DIVERS, 1996).

A Classe Reptilia apresenta diversas características evolucionárias próprias, o sistema circulatório dos répteis apresenta similaridades básicas as aves e mamíferos, como a presença dos sistemas arterial, venoso e linfático (MITCHELL, 2009). No entanto, a principal diferença está na morfologia do coração reptiliano,

que pode ser classificado em tricavitário na maioria dos répteis e tetracavitário, presente nos crocodilianos.

O sistema cardiovascular dos répteis apresenta uma característica compartilhada com os peixes, anfíbios e aves, que é o sistema portarrenal. Esse sistema é composto pela veia porta cranial e pela veia porta caudal, que formam um plexo venoso, onde estão presentes válvulas que controlam o fluxo sanguíneo ao redor e dentro dos rins. As válvulas estão sobre controle do sistema simpático e parassimpático, sendo que o sangue é direcionado para os rins quando as válvulas estão fechadas (estimulação colinérgica) e direcionadas diretamente para a veia cava e fígado quando as válvulas estão abertas (estimulação adrenérgica) (HOLZ et al., 1997a).

Clinicamente, a presença do sistema portarrenal, pode influenciar na distribuição e biotransformação de fármacos administrados na porção caudal desses animais, pois os fármacos podem ser excretados antes de antigirem a circulação sistêmica. Dessa forma, os fármacos ainda poderiam causar lesões renais por serem excretados antes de sofrerem biotransformação (HOLZ et al., 1997b; SYKES; GREENACRE, 2006; SLADKY; MANS, 2012b).

Os répteis são caracteristicamente ectotérmicos ou seja, dependem da temperatura ambiente para manter a temperatura corpórea. A temperatura ótima varia conforme a espécie, idade e estação do ano (DIVERS, 1996) e, por se tratarem de animais ectotérmicos, a temperatura corpórea dos animais influencia diretamente na farmacocinética da maioria dos fármacos administrados nessa classe (MOSLEY, 2005). A hipotermia pode influenciar diretamente na biotransformação dos fármacos administrados, gerando maior período de ação e, no caso de anestésicos, influenciando diretamente no tempo de retorno anestésico desses animais (CARREGARO et al., 2009).

Os teiús são pertencentes à família Teiidae; tem ampla distribuição geográfica, desde o sul do Amazonas, abrangendo a Bolívia, o Paraguai até a Argentina, e é uma das maiores espécies de lagartos brasileiros (HARVEY; UGUETO; GUTBERLET JR, 2012). Na região Sudeste do Brasil, esses animais apresentam marcada sazonalidade. Entre os meses de Maio e Setembro (estação seca e fria), estes animais se entocam em abrigos, onde permanecem em dormência por três a quatro meses, sem ingerir água ou alimento, apresentando certo grau de depressão metabólica (MILSON et al., 2008). No final de Agosto e início de

Setembro começam progressivamente a se tornarem mais ativos e se alimentarem, apresentando alta atividade metabólica na estação quente e chuvosa (ANDRADE et al., 2004a).

Os termos nocicepção e dor são comumente utilizados quando se trata da Classe Reptilia, porém essas duas palavras possuem definição diferente. Dor é definida classicamente como uma experiência sensorial e emocional associado a um atual ou potencial dano tecidual. Já nocicepção é a capacidade de responder a um estímulo potencialmente danoso, e está associada com as estruturas neuroanatômicas e fisiológicas necessárias para identificar e transmitir o estímulo nociceptivo até o cérebro que irá interpretar a experiência dolorosa (Internactional Association for the Study of Pain, acessado dia 04 de agosto de 2015).

Como os mamíferos, os répteis possuem todas as estruturas consideradas essenciais para o reconhecimento do estímulo nociceptivo: nociceptores periféricos, estruturas apropriadas no sistema nervoso central (SNC), receptores opioides e opioides endógenos.

Os nociceptores periféricos estão presentes em diversos Filos, como nos invertebrados, peixes, anfíbios, aves e mamíferos (SNEDDON, 2004; SMITH; LEWIN, 2009). Em répteis, foram identificados a presença de nociceptores termossensíveis e mecanossensíveis em viperídeos (LIANG; TERASHIMA; ZHU, 1995). Em aligátors (*Alligator mississippiensis*) foram identificados nociceptores mecanossensíveis no nervo plantar cutâneo, sendo que alguns desses nociceptores respondem a estímulos nociceptivos térmicos (WELLEHAN et al., 2006).

Foi descrito em lagartixa-tokay (*Gekko gecko*) a presença do sistema laminar no corno posterior medular. A presença dessa estrutura sugere um possível processamento de informações já que esta estrutura, em mamíferos, opera tanto na recepção de informações provenientes das vias aferentes primárias como no processamento de informações sensitivas (DONKELAAR; BOER-VAN HUIZEN, 1987).

Os receptores opioides são bem conservados entre as diversas Ordens de vertebrados, como nos mamíferos, aves e peixes (LI; KEITH; EVANS, 1996). Em répteis, foram identificados os receptores MOR(μ) e DOR (δ) no cérebro de tartarugas de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*), sendo que os receptores DOR são mais abundantes que os receptores MOR (XIA; HADDAD, 2001).

Segundo Lindberg e White (1986), foi encontrado no cérebro de algumas espécies de tartarugas aquáticas, aligátors e lagartos (*Anolis sp*) uma grande quantidade de encefalinas endógenas, também conhecidas como endorfinas. Segundo Reiner (1987), os opiodes endógenos e seus neurotransmissores estão distribuídos de modo similar em tartarugas, quando comparados aos mamíferos.

Reconhecer dor em répteis é um grande desafio, devido a enorme diversidade de espécies na Classe Reptilia. Em muitos casos, a espécie estudada desempenha papel de presa em seu ambiente natural, de modo que isso pode mascarar possíveis comportamentos relacionados à dor, principalmente quando em contato com a presença humana (FLEMING; ROBERTSON, 2012). Ademais, o comportamento desses animais pode sofrer alterações em ambiente estranho, como a internação em uma clínica ou hospital. A confecção de etogramas espécie-específicos é a melhor forma de se avaliar o comportamento antes e depois de estímulo doloroso (SLADKY; MANS, 2012a).

A avaliação de parâmetros comportamentais e suas mudanças foram utilizadas por Kinney, Johnson e Sladky (2011) em tartarugas de orelha vermelha que foram submetidas à gonadectomia unilateral. Para tal avaliação foram utilizados alguns parâmetros comportamentais como a ingestão de alimentos, vontade de nadar e frequência respiratória. Os autores verificaram que os animais que receberam morfina retornaram mais rapidamente aos comportamentos normais observados anteriormente à cirurgia.

Uma alternativa ao estudo comportamental no período pós-cirúrgico é a utilização de estímulos álgicos (mecânico, térmico, químico), mimetizando situações álgicas (SLADKY; MANS, 2012a). Os estímulos álgicos são amplamente utilizados em mamíferos, a fim de se avaliar a dor e analgesia, e os resultados dos mesmos estão muito bem correlacionados com a eficácia clínica de muitos fármacos (LE BARS; GOZARIU; CADDEM, 2001).

A utilização de estímulo álgico químico em répteis foi descrita por Wambugu et al. (2009), Dahlin et al. (2012) e Makau et al. (2014), a fim de se observar os efeitos antinociceptivos dos opiodes e outros fármacos em quelônios submetidos à estímulo álgico com formalina. Em crocodilos do Nilo (*Crocodylus niloticus*) foi comparada a resposta nociceptiva perante a utilização de três tipos de estímulos álgicos: capsaicina, formalina e o teste da placa quente. Segundo Kanui, Hole e

Miaron (1990) foi possível observar respostas protetivas perante a utilização desses estímulos álgicos, como retirada do membro ou mesmo a não utilização do mesmo.

A termoalgiometria já foi utilizada na Classe Reptilia para a avaliação da eficácia analgésica dos opioides. A eficácia analgésica do butorfanol e da morfina foram testadas em tartarugas de orelha vermelha (SLADKY et al., 2007), em dragões barbados (*Pogona vitticeps*) e em cobras do milho (*Elaphe guttata*) (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008).

O uso do estímulo térmico em répteis possui diversas vantagens, como rápida aplicação, prevenindo prolongada exposição ao calor e possíveis danos teciduais, rápida quantificação e possibilidade de fuga rápida do animal perante ao estímulo (KANUI; HOLE; MIARON, 1990; MOSLEY, 2011; SLADKY; MANS, 2012a). Segundo Sladky e Mans (2012a), as espécies de répteis utilizadas em suas pesquisas respondem ao estímulo térmico da mesma forma que os mamíferos.

Os fármacos opioides são utilizados efetivamente no controle da dor, tanto em humanos como também em pequenos animais. Os efeitos dos opioides são mediados pela sua ligação com receptores específicos localizados no SNC e nos sítios supraespinhais e periféricos, e essa ligação mimetiza a ligação de opioides endógenos (SMITH; LEE, 2003).

Os receptores opioides pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Após a ligação com os receptores, os opioides, tanto endógenos como exógenos, diminuem o influxo de Ca^{++} , de modo que reduzem a liberação de substância P, impossibilitando a transmissão sináptica do estímulo nociceptivo. Como efeito pós-sináptico, ocorre um aumento do fluxo K^{+} , levando a hiperpolarização dos neurônios da medula espinhal, responsáveis pela via nociceptiva ascendente, impedindo a ativação da mesma (DHAWAN, 1996; MATHEWS et. al., 2014)

Os opioides são classificados em agonistas puros (morfina, fentanil), agonistas antagonistas (butorfanol), agonistas parciais (buprenorfina) e antagonistas (naloxona e naltrexona). A morfina é considerada o protótipo dos opioides, possuindo uma elevada potência analgésica e sendo recomendada para o tratamento da dor moderada a severa; por tal motivo todos os outros opioides são comparados a morfina (TRESCOT et al., 2008). Nas doses recomendadas para pequenos animais, a morfina atua nos receptores MOR, e em altas doses podem também atuar nos receptores KOR e DOR.

Além de promoverem analgesia, os opioides promovem efeito sedativo em algumas espécies, como em cães (MAIANTE et al., 2009). Já em outras espécies, como em equinos, os opioides promovem efeito excitatório (MAMA; PASCOE; STEFFEY, 1993). Até o presente momento, o grupo de trabalho desconhece algum estudo que comprove o efeito sedativo ou excitatório de qualquer opioide em teiús.

Uma opção para a avaliação da sedação promovida por fármacos e outros agentes é avaliação da atividade locomotora utilizando o teste de campo aberto, originalmente descrito por Hall (1934). O teste de campo aberto consiste em submeter o animal a um ambiente desconhecido, protegido contra fugas. É utilizado para testes de atividade locomotora a fim de avaliar a sedação promovida por fármacos, podendo ter diversos tamanhos, formatos, ter ou não iluminação e a presença ou não de objetos (PRUT; BELZUNG, 2003).

O teste de campo aberto mostrou-se eficiente de avaliação motora após a administração de xilazina ou romifidina em ratos e camundongos (MATAQUEIRO et al., 2000). O mesmo procedimento foi utilizado por esses autores a fim de avaliar a sedação promovida pela levomepromazina, azaperone e midazolam em outros animais de laboratório (MATAQUEIRO et al., 2004).

O teste de campo aberto também foi utilizado em três espécies de serpentes, de um mesmo Gênero, para avaliar a resposta comportamental frente a um predador (HERZOG; BURGHARDT, 1986). Foram avaliados quatro comportamentos, fuga, dardejamento agressivo da língua, bote defensivo e ataque com mordida. Os autores verificaram que existe uma grande diferença no comportamento defensivo entre as três espécies avaliadas. Adicionalmente, Brodie III e Russel (1999) avaliaram o comportamento antipredatório e da atividade locomotora de *Thamnophis ordinoides* em três diferentes temperaturas (15, 22,5 e 30°C). Os animais demonstraram redução na velocidade de resposta à presença do predador e na atividade locomotora conforme a temperatura era reduzida.

Outra opção para a avaliação da sedação é a mensuração de parâmetros comportamentais, como a habilidade de sustentar a cabeça, necessidade da realização de contenção física, grau de coordenação e resposta perante a um estímulo doloroso (pinçamento). Tal avaliação comportamental foi utilizada por Bienzle e Boyd (1992) a fim de avaliar os efeitos sedativos da cetamina, midazolam e a associação de ambos os fármacos em tartarugas mordedoras (*Chelydra serpentina*). Posteriormente, foi utilizada por Sleeman e Gaynor (2000) e por Emerey

et al. (2014) para avaliar, respectivamente, os efeitos sedativos da medetomidina em jabutis do deserto (*Gopherus agassizi*) e os efeitos sedativos do midazolam e dexmedetomidina administrados por via intranasal em duas espécies de jabutis (*Chelonoides carbonaria* e *Geochelone platynota*).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o grau de sedação e analgesia promovidos pela administração de diferentes doses de morfina por via intramuscular em lagartos da espécie teiú (*Salvator merianae*).

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer o grau de sedação promovido pela morfina nas doses de 5 mg/kg e 10mg/kg administradas por via intramuscular em teiús.
2. Avaliar a analgesia promovida pela morfina nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg administradas por via intramuscular em teiús.
3. Avaliar a utilização da atividade locomotora espontânea utilizando-se o teste de campo aberto, como metodologia para se avaliar a sedação em teiús.
4. Avaliar a utilização dos parâmetros comportamentais como metodologia para se avaliar a sedação em teiús.
5. Avaliar a utilização da termoalgiometria, como metodologia para se avaliar a analgesia promovida pela morfina em teiús.

4 Material e Métodos

Este projeto foi iniciado após a aprovação pelo Comitê de Ética CEUA/FZEA-USP sob nº. protocolo nº14.1.112.74.2 (ANEXO A), e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), conforme instrução normativa nº 154, de 1 de março de 2007, sob nº protocolo 42845 (ANEXO B).

Foram utilizados oito teiús jovens, com um ano de vida no início do experimento e com dois anos ao final do mesmo, de ambos os sexos e com peso entre 300 e 1.800 gramas, provenientes do jacarezário mantido pelo Instituto de

Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro SP. Os animais foram considerados clinicamente saudáveis após exame clínico e laboratorial (hemograma e bioquímica hepática e renal) seguindo padrões sugeridos por Diethelm e Stein (2006).

Os animais foram mantidos em uma caixa de fibra com capacidade de 750 litros contendo substrato de maravalha, dois recipientes plástico com água de tamanho suficiente para os animais se banharem e pontos de fuga (tocas, esconderijos) para os animais se esconderem (Figura 1). Como fonte de aquecimento focal (*basking*) foram utilizadas lâmpadas incandescentes de 250 watts, a fim de criar uma área com temperatura mais elevada (40 - 45°C) e outra com temperatura ambiente sendo controlada por um ar condicionado, com variação de 25°C a 30°C. Os animais receberam como alimentação coração bovino moído suplementado com cálcio¹.

¹ Repti calcium® Zoo Med Laboratories Inc. San Luis Obispo, CA.

Figura 1 - Caixa de fibra para manutenção dos teiús. Destaca-se a presença de esconderijos (canos de plástico), fonte de aquecimento tipo focal (*basking*) e os pratos utilizados para a alimentação e água.

Fonte: Própria autoria.

Durante os três meses de adaptação ao novo ambiente, os animais tiveram microchips² implantados no subcutâneo. Esses microchips, além de fornecerem uma numeração individual para os animais, também forneciam a temperatura do subcutâneo.

O projeto foi dividido em duas etapas, sendo que na primeira etapa consistiu na avaliação da sedação por meio do estudo da atividade locomotora e da avaliação de parâmetros comportamentais dos animais e a segunda etapa avaliação da analgesia por meio de um método algimétrico térmico. Em ambas as etapas, o experimento se iniciava ao meio dia e terminava no meio dia do dia seguinte ao início.

Os animais (n=8) foram submetidos a três tratamentos, a saber: administração intramuscular (IM) de 5mg/kg de morfina³ (G5), de 10mg/kg de morfina IM (G10) e administração IM de 0,5mL de NaCl 0,9%⁴ (G0). Os tratamentos foram escolhidos de modo aleatório, a fim de evitar possíveis comportamentos

² Lifechips 134kw Biotermico Allflex®. Joinville, SC.

³ Dimorf® Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP.

⁴ Cloreto de Sódio, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE.

condicionados, os avaliadores de ambas as etapas desconheciam os tratamentos administrados aos animais. Foi utilizado um intervalo mínimo de 15 dias entre a realização dos tratamentos. Entre as etapas foi realizado um intervalo de quatro meses.

4.1 Avaliação da temperatura

A temperatura do subcutâneo dos animais foi avaliada nas duas etapas, antes da administração do tratamento (basal), em 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração do tratamento. Para a realização desta etapa, foi utilizado o valor da temperatura obtido por meio da leitura do microchip⁵ implantado no subcutâneo dos animais (Figura 2).

Figura 2 - Leitura do microchip implantado no subcutâneo (A), mensuração da temperatura pela leitora (B).

Fonte: Própria autoria

4.2 Avaliação da sedação

A primeira etapa consistiu na avaliação da sedação promovida pela morfina nesses animais, determinada por meio da atividade locomotora em teste de campo aberto e da utilização da avaliação de parâmetros comportamentais.

4.2.1 Avaliação da atividade locomotora

Para a realização do teste de campo aberto foi construída uma arena circular de um 1,2 m de diâmetro, feita de compensado naval e revestida com 40 cm de altura com fórmica branca para evitar fugas, conforme Mataqueiro et al. (2004). A

⁵ Leitora Pocket reader Allflex®. Joinville, SC.

arena foi dividida em três partes por círculos concêntricos que por sua vez foram divididos em partes iguais por retas (Figura 3).

Figura 3 - Arena do teste de campo aberto, nota-se as divisões utilizadas para a avaliação da atividade locomotora.

Fonte: Própria autoria

Para a mensuração da atividade locomotora, os animais passaram por um período de 30 minutos para adaptação à arena. Após isso, foi avaliada a atividade locomotora antes do tratamento (basal), em 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração dos tratamentos, sendo que cada avaliação teve uma duração de 15 minutos. Em cada momento de avaliação o animal foi colocado no centro da arena do teste de campo aberto e, para cada ultrapassagem do animal das divisões da arena, com os quatro membros, foi assinalado um ponto. Todas as avaliações foram registradas por uma câmera de vídeo⁶ instalada em um tripé modo a evitar que a presença de um avaliador interfira na atividade locomotora do animal.

⁶ Sony Handycam HDR – XR550, Tokyo, Japão.

4.2.2 Avaliação dos parâmetros comportamentais

Concomitante à avaliação da atividade locomotora, foram avaliados os parâmetros comportamentais dos animais. Para isso foi adaptado à proposta de Bienzle e Boyd (1992), a qual foi utilizada para sedação em quelônios.

Foram avaliados os seguintes comportamentos: necessidade de contenção física, capacidade de manter-se elevação da cabeça, capacidade de endireitamento dos membros, capacidade de endireitamento do corpo e resposta a um estímulo doloroso (pinçamento), sendo utilizado uma pontuação de zero a três para cada um dos comportamentos avaliados, conforme Tabela 1.

TABELA 1 – Classificação dos parâmetros comportamentais utilizados para a monitoração da sedação promovida pela morfina em teiús.

Parâmetro	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Contenção física	Necessidade de contenção (animal alerta)	Contenção moderada (animal tranquilo)	Contenção diminuída (animal sedado)	Sem necessidade de contenção
Relaxamento da cabeça	Sustenta cabeça acima do corpo	Sustenta a cabeça ao nível do corpo	Leve queda da cabeça	Incapacidade de sustentar a cabeça
Endireitamento dos membros	Resposta imediata	Resposta diminuída < 2s	Resposta lenta > 2s	Incapacidade de retornar o membro à posição natural
Endireitamento do corpo	Resposta imediata	Resposta diminuída < 2s	Resposta lenta > 2s	Incapacidade de retornar à posição quadrupedal
Estímulo doloroso	Resposta imediata	Resposta diminuída > 1s < 2s	Resposta lenta > 2s	Sem resposta

Para a realização desta avaliação comportamental os animais foram acomodados em um recipiente plástico transparente (Figura 4) e foram avaliados antes do tratamento (basal), em 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração dos tratamentos.

Figura 4 - Teiú acomodado na caixa plástica transparente utilizada para a avaliação dos parâmetros comportamentais.

Fonte: Própria autoria

Durante esta avaliação os animais podiam receber uma pontuação máxima de 15 pontos. Após as avaliações, os pontos foram somados e foi considerado sem efeito sedativo para os animais que somaram de 0 a 4 pontos, sedação moderada para aqueles que somaram de 5 a 10 pontos, e sedação intensa aqueles animais que somaram de 10 a 15 pontos.

4.3 Avaliação da analgesia

Para essa etapa foi utilizado um estímulo térmico produzido por um termoalgímetro⁷. A temperatura utilizada do estímulo foi entre 45°C e 47°C e com uma duração máxima de 30 segundos (informação pessoal)⁸ a fim de prevenir uma exposição muito prolongada ao calor e danos teciduais. O tempo de permanência da superfície plantar sobre o estímulo foi avaliado por um cronômetro automático presente no termoalgímetro, onde o mesmo automaticamente parava com a retirada do membro.

⁷ Modelo 37370, Ugo Basile Co, Varese, Itália.

⁸ SLADKY, K.K., Maximum duration of 30 seconds. Mensagem recebida por carregaro@usp.br em 04 de abr. 2015.

Os animais foram alojados em um cubo de plástico transparente, próprio para a realização do teste, com 10 minutos de antecedência do início do experimento para adaptação. Após esse período, o termoalquímetro foi posicionado sob o compartimento plástico, de modo que o estímulo fosse aplicado sob a superfície plantar do membro posterior (Figura 5).

Figura 5 – Utilização do termoalquímetro em um teiú. Destaca-se a superfície plantar em contato com a fonte de calor.

Fonte: Própria autoria.

Foram avaliados os tempos de retirada do membro do animal frente ao estímulo térmico antes do tratamento (basal), após 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após o tratamento. Em cada momento foram realizadas duas avaliações com um intervalo de dois minutos entre elas. Se a diferença entre essas duas avaliações fosse maior que 2s, era realizada uma terceira avaliação.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do Software GraphPad Prism 6. Os dados de ambas as etapas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis paramétricas temperatura e analgesia

utilizou-se análise de variância (ANOVA) para amostras pareadas, com posterior correção de Bonferroni para comparações das médias dentro de cada grupo em relação ao momento basal. Para as variáveis não-paramétricas atividade locomotora e escores comportamentais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para as comparações entre grupos, em cada momento, realizou-se ANOVA de dois fatores, seguido do teste de Tukey.

Todos os resultados paramétricos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão para as tabelas e média $\pm$ erro padrão para as figuras. Por outro lado, as variáveis não paramétricas foram expressas em mediana e [intervalo interquartil] nas tabelas e os gráficos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. Para todos os testes as diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Temperatura

Durante a primeira etapa de avaliação (sedação), todos os grupos diferiram em relação ao referente basal apenas em 12 horas. Ademais G5 e G10 diferiram do G0 nos momentos de avaliação 4 e 6 horas. G5 foi 8,7% e 9,3% maior nos momentos 4 e 6 horas, respectivamente. Assim como G10 foi maior 9,3 % e 10% nos momentos 4 e 6 horas respectivamente (Figura 6).

As temperaturas mensuradas durante a avaliação da analgesia apresentaram resultados similares aos observados na primeira etapa. Assim, também foi observada redução significativa da temperatura em todos os grupos em 12 horas após os tratamentos, em todos os grupos. Na comparação entre grupos não houve diferença estatística em nenhum dos momentos de avaliação (Figura 7).

Figura 6 – Temperatura de teiús (n = 8) submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10) durante o período de avaliação de sedação. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

Figura 7 – Temperatura de teiús (n = 8) submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10) durante o período de avaliação de analgesia. * indica diferença em relação ao basal.

5.2 Sedação

5.2.1 Atividade locomotora

Todos os grupos apresentaram atividade locomotora similares no momento basal, ultrapassando $63,5 \pm 6,52$ divisões. O G0 apresentou atividade constante durante todos os momentos avaliados, exceto às 12 horas após tratamento. G5 apresentou diferença significativa em relação ao basal entre 30 minutos e 4 horas, além de 12 horas pós-tratamento. Já em G10 essa diferença perdurou até 12 horas. Na comparação entre os grupos G5 foi menor que G0 e igual a G10 nos momentos 0,5, 3, e 4 horas após o tratamento, porém foi maior que G10 e igual a G0 nos momentos 1, 2 e 6 horas (Figura 8 e Tabela 2).

Figura 8 – Atividade locomotora obtida em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

Tabela 2 - Atividade locomotora obtida em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana e [intervalo interquartil]. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

	Momentos (horas)								
	Basal	0,5	1	2	3	4	6	12	24
G0	63 [44 -81]	36 [3 – 63] ^a	42 [22 -48] ^a	26 [5 – 58] ^a	39 [27 – 82] ^a	47 [10 – 90] ^a	27 [9 – 47] ^a	4 [2 -36]*	42 [18 – 64]
G5	77 [47 – 87]	4 [1 – 52] ^b	5 [2 – 46] *	14 [1 – 20] ^{*ab}	16 [0 – 42] ^{*b}	8 [0 – 13] ^{*b}	50 [0 – 73] ^a	8 [3 – 12]*	38 [25 – 74]
G10	54 [37 – 83]	1 [0 – 6] ^{*b}	3 [0 – 11] ^{*b}	2 [0 – 8] ^{* b}	0 [0 – 1] ^{* b}	0 [0 – 0] ^{* b}	5 [0 – 12] ^{* b}	3 [2 – 16]*	25 [2 – 74]

5.2.2 Parâmetros Comportamentais

Todos os grupos apresentaram pontuação inicial igual à zero, demonstrando-se alertas. A soma dos parâmetros comportamentais evidenciou diferença significativa em relação ao basal entre 2 e 4 horas após o tratamento no G5, e entre 3 e 6 horas no G10. Durante esses momentos, os animais foram classificados como moderadamente sedados, sendo que os valores obtidos no G5 foram 7 [5,5 – 10,5] e 7 [5,7 – 9,0] em 3 e 4 horas, respectivamente. Em G10 os valores obtidos foram 8,5 [6 -10,25], 8,5 [6,7 – 11,25] e 8,5 [6,7 – 10,25] em 3, 4 e 6 horas, respectivamente (Figura 9 e Tabela 3).

A comparação entre os grupos revelou diferença entre G0 e G5 entre 2 e 4 horas e entre G0 e G10 entre 1 e 6 horas. Os grupos tratados com morfina foram iguais em todos os momentos, exceto às 6 horas pós-tratamento (Figura 9 e Tabela 3).

Figura 9 - Escores de sedação em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana $\pm$ intervalo interquartil. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

Tabela 3 – Escore de sedação em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em mediana e [intervalo interquartil]. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

	Momentos (horas)								
	Basal	0,5	1	2	3	4	6	12	24
G0	0 [0 -0,5]	0,5 [0 – 2,5]	0,5[0 – 2,5] ^b	0 [0 – 2,25] ^b	0 [0 – 2,5] ^b	0 [0 – 0,5] ^b	1,5 [0 -4,25] ^b	2 [0 – 3,5]	0 [0 – 0,75]
G5	0 [0 – 1,5]	1 [0,75 – 3,5]	3 [1,75 – 4,5] ^{ab}	6,5 [5 – 9] ^{* a}	7 [5,5 -10,5] ^{* a}	7 [5,7 – 9] ^{* a}	4 [1,5 – 5,5] ^b	2 [0,75 – 4]	0 [0 – 3,25]
G10	0 [0 – 0,25]	1 [0 – 3,25]	3 [2 – 6,5] ^a	5,5 [2 – 7] ^a	8,5 [6 – 10,2] ^{*a}	8,5 [6,7 -11,2] ^{*a}	8,5 [6,7 – 10,2] ^{*a}	3,5 [1 – 5,2]	0,5 [0 -3,5]

5.3 Analgesia

Todos os grupos apresentaram valores similares para o reflexo de retirada do membro no momento basal, sendo ao redor de $8,3 \pm 1,86$ segundos. A resposta ao estímulo álgico no G0 foi padrão durante todos os momentos avaliados, exceto às 12 horas pós-tratamento. Nos outros grupos, os animais demonstraram maior tolerância ao estímulo térmico entre 0,5 e 1 hora e também as 12 horas no G5, e entre 2 e 12 horas no G10 (Figura 10 e Tabela 4).

A avaliação entre grupos evidenciou maior tempo para a retirada do membro nos grupos G5 e G10. G5 foi significativamente maior que G0 entre 0,5, 1 e 4 horas e G10 foi maior que G0 a partir de 1 hora até o momento 12 horas (Figura 10 e Tabela 4).

Figura 10 – Reflexo de retirada do membro obtido em teiús submetidos à administração intramuscular de 0,5 mL de NaCl 0,9% (G0), 5 mg/kg de morfina (G5) ou 10mg/kg de morfina (G10). Valores dispostos em média $\pm$ erro padrão. * indica diferença em relação ao basal. Letras diferentes em cada momento indicam diferenças entre os grupos.

Tabela 4 - Comparação do tempo de retirada do membro (s) dos teiús submetidos ao estímulo térmico e tratados com 0,5 ml de solução salina 0,9%, morfina 5 mg/kg (G5), morfina 10 mg/kg (G10) pela intramuscular no membro torácico. Valores dispostos em média $\pm$ desvio padrão. * diferença entre o momento e o seu tempo basal. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si.

	Momentos (horas)								
	Basal	0,5	1	2	3	4	6	12	24
G0	10,3 $\pm$ 3,2	10,63 $\pm$ 7,3 ^b	9,6 $\pm$ 2,5 ^b	8 $\pm$ 2 ^b	8,5 $\pm$ 1,5 ^b	8,8 $\pm$ 2,3 ^b	10,3 $\pm$ 5,9 ^b	15,5 $\pm$ 4,1 ^{*b}	9,1 $\pm$ 4
G5	6,5 $\pm$ 1,5	20 $\pm$ 8,2 ^{*a}	19,5 $\pm$ 10,8 ^{*a}	18,1 $\pm$ 9,8 ^{ab}	17 $\pm$ 8,5 ^{ab}	18,7 $\pm$ 9,8 ^a	14,7 $\pm$ 5,7 ^{*b}	20,3 $\pm$ 6,4 ^{*b}	9,8 $\pm$ 3,7
G10	8,1 $\pm$ 3,3	13,6 $\pm$ 5,6 ^{ab}	19 $\pm$ 9,3 ^a	21,5 $\pm$ 9,4 ^{*a}	20,8 $\pm$ 10 ^{*a}	23,3 $\pm$ 8,5 ^{*a}	23,4 $\pm$ 7,7 ^{*a}	26 $\pm$ 6,3 ^{*a}	12,7 $\pm$ 3,8

6 Discussão

A escolha da espécie *Salvator merinae* ocorreu pois ela é frequentemente utilizada em estudos de fisiologia experimental e comparada (KLEIN et al. 2003; ANDRADE et al., 2004b; SKOVGARD et al., 2005). Todavia, nota-se que os estudos que envolvem procedimentos algícos negligenciam o tratamento analgésico trans e pós-operatório.

O correto tratamento da dor minimiza as alterações fisiológicas desencadeadas pelo estímulo algíco, como também diminui a morbidade e mortalidade associadas ao trauma e cirurgia (SLADKY; MANS, 2012a). Apesar de a literatura citar o uso da morfina em algumas espécies de répteis (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008), não existe um consenso sobre a dose ideal. Isso se deve, principalmente, à grande diversidade de espécies na Classe Reptilia e suas diversas adaptações fisiológicas.

No presente estudo foi realizado um estudo-piloto utilizando as doses de 10 e 20 mg/kg de morfina, sendo essas extrapoladas de Sladky; Kinney e Johnson (2008) com dragões barbados (*Pogona Vitticeps*). Durante a realização do estudo piloto, o animal em que foi administrado 20 mg/kg de morfina apresentou intensa depressão respiratória, ausência de reflexo de endireitamento e de atividade locomotora. Infelizmente o animal veio a óbito 24 horas após o término das avaliações. Assim, decidiu-se pela exclusão da dose de 20 mg/kg, sendo substituída pela dose de 5 mg/kg de morfina.

Diante das particularidades fisiológicas dos répteis, principalmente devido à característica ectotérmica, todo o estudo foi realizado em ambiente com a temperatura controlada, impedindo grandes variações da temperatura, principalmente pela influência ambiental externa. Todos os grupos apresentaram redução na temperatura corpórea 12 horas após o tratamento, em ambas as etapas deste estudo. Destaca-se que esse momento de avaliação coincidia com o período noturno (meia noite); momento em que as luzes do lagartário e os aquecimentos focais permaneciam desligados, mantendo-se apenas o aquecimento do ambiente ligado.

A utilização de aquecimento focal na manutenção desses animais deve-se ao hábito de emergirem de suas tocas, onde passaram a noite, com o incremento da temperatura ambiente proporcionado pelo amanhecer (ANDRADE et al., 2004a).

Durante o verão, no período noturno, os teiús apresentam a temperatura corpórea entre os 20°C e 22°C, sendo que ao amanhecer a temperatura corpórea começa a elevar até o auge (35°C e 40°C) ao redor do meio dia, em que há intensa atividade locomotora devido ao hábito de forrageamento (ABE, 1983). Segundo o mesmo autor, a temperatura corpórea volta a diminuir no meio da tarde (16:00), quando os animais já começam a se recolherem em seus esconderijos. Assim, a própria variação fisiológica poderia explicar a diminuição de temperatura 12 horas após os tratamentos.

A gradual e natural diminuição da temperatura no período vespertino fica bem evidenciada na avaliação da temperatura durante a primeira etapa, em que os animais de G0 apresentaram gradual decréscimo da temperatura a partir de 4 horas pós-tratamento, correspondente a 16:00 horas. Sendo que os grupos G5 e G10 continuaram mantendo a temperatura mais elevada em relação a G0, nos momentos de avaliação 4 e 6 horas. Essa manutenção da temperatura mais elevada sugere um possível efeito da morfina no centro termorregulador dos teiús, os opioides afetam o centro termorregulador de modo espécie-específico, como em gatos a hipertermia está associada à utilização de hidromorfona (WEGNER; ROBERTSON, 2003).

Toda via essa diferença na temperatura corpórea não ocorreu entre nenhum dos grupos durante realização da segunda etapa, sugere-se que o aumento observado durante a primeira etapa nos animais tratados com morfina possa estar ligado a um maior tempo de exposição ao aquecimento focal.

Os opioides promovem sedação dose-dependente, entretanto, em gatos e cavalos existem relatos de efeito excitatório associados à administração de altas doses (MAMA; PASCOE; STEFFEY, 1993; WEGNER; ROBERTSON, 2003).

Em répteis, a sedação é utilizada para a realização de exame físico e clínico, colheita de material e realização de procedimentos pouco invasivos. Comumente são utilizados fármacos agonistas alfa-2 adrenérgicos, benzodiazepínicos e até mesmo baixas doses de anestésicos dissociativos (EMERY et al., 2014). Nesse caso, os fármacos opioides são associados para promoverem analgesia (READ, 2004). Até o presente momento é de desconhecimento do grupo a avaliação sedativa dos opioides em lagartos.

A avaliação da atividade locomotora por meio do teste de campo aberto mostrou ser uma excelente ferramenta para a avaliação da sedação em teiús. Esses

animais possuem elevada atividade locomotora durante o dia, devido ao fato de realizarem busca ativa de alimentos em seu ambiente natural (ANDRADE, et al., 2004a). Durante realização de estudo-piloto, comprovou-se que os animais apresentavam esse comportamento ao meio dia, sendo esse horário utilizado como avaliação basal.

Os animais de G0 apresentaram redução significativa (82%) na atividade locomotora no momento de avaliação 12 horas (meia noite), quando comparados ao basal. Essa redução possivelmente está associada à fisiologia e comportamento da espécie (ANDRADE et al., 2004a), como descrito anteriormente. Os animais de G5 apresentaram redução na atividade locomotora já em 30 minutos pós-tratamento, com redução de 70% em relação ao basal e de 17%, permanecendo diferente do grupo Controle até 4 horas pós-tratamento. Já em G10, observou-se redução de 100% em relação ao basal no momento 4 horas, permanecendo diferente até 12 horas pós-tratamento.

A adaptação da avaliação de parâmetros comportamentais utilizada por Bienzle e Boyd (1992) em quelônios, mostrou-se de fácil aplicabilidade, avaliação e uma ótima ferramenta para a mensuração da sedação em teiús. Durante a soma da pontuação dos parâmetros comportamentais, G0 mostrou um aumento de 40% na pontuação no momento de avaliação 12 horas (meia noite) quando comparado ao momento basal, esse aumento está possivelmente ligado ao hábito diurno dos teiús (ANDRADE et al., 2004a), como o ocorrido com a avaliação da atividade locomotora.

Já G5 e G10 apresentaram-se iguais ao basal e a G0 no momento 0,5h, e no momento 1h, G5 apresentou um aumento de 52% em relação ao basal e de 73% em comparação a G0 e G10 aumentou em 74% em relação ao basal e de 63% em comparação a G0 no momento 4 h. No momento 6h de avaliação, G10 foi apresentou um aumento de 49% em relação ao basal e de 58% em comparação a G0, G5 se mostrou estatisticamente igual a G0.

Em ambas as avaliações, os animais começaram apresentar redução da atividade locomotora e aumento na soma da pontuação dos parâmetros comportamentais entre os momentos de avaliação 0,5h e 1h, tal fato pode evidenciar um início de ação sedativa promovida pela morfina administrada pela via intramuscular.

A associação de cetamina e midazolam, utilizado por Bienzle e Boyd (1992) em tartarugas mordedoras, onde os animais apresentaram sedação cinco minutos após a administração intramuscular do protocolo, e com os resultados obtidos com o uso da medetomidina em jabutis do deserto por Sleeman e Gaynor (2000), que em 20 minutos após administração intramuscular do fármaco, os animais se apresentavam sedados. Quando comparamos o efeito desses fármacos utilizados em quelônios com o possível efeito sedativo da morfina obtido no presente estudo, evidência um possível maior período de latência da morfina.

A utilização da associação cetamina e midazolam apresentou sedação apropriada durante 25 minutos e um tempo de recuperação de três horas em tartarugas mordedoras (BIENZLE; BOYD, 1992). Em jabutis do deserto, Sleeman e Gaynor (2000) avaliaram a sedação por duas horas após a administração, sendo que os animais que não foram tratados com o antagonista (atipamezole), ainda apresentavam sinais de sedação ao fim das avaliações. O uso da morfina sugere um período de ação dos efeitos sedativos ao redor de 4 e 6 horas após a administração por via intramuscular.

A utilização do termoalgímetro, como estímulo nociceptivo, em répteis é questionada por se tratar de animais ectotérmicos, o fato de existirem diversos relatos de répteis cativos que se queimaram nas fontes de aquecimento utilizadas e não demonstraram nenhuma reação de fuga, répteis que possuem ambientes extremos (desertos) como ambiente natural, poderiam ter desenvolvido uma maior tolerância ao calor (MOSLEY, 2011). Segundo Sladky; Mans, 2012, todas as espécies utilizadas em seus estudos, identificam e respondem ao estímulo nociceptivo térmico da mesma maneira que os mamíferos, ainda segundo os mesmo autores, o conhecimento sobre as queimaduras em répteis está equivocado.

Entretanto, Sladky; Kinney; Johnson (2008) notaram que em dragões barbados, ocorreu somente um pequeno acréscimo no tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico, os autores sugerem que a adaptabilidade dessa espécie a ambientes extremos (temperaturas superiores a 35°C) em seu habitat natural, pode ter influenciado a resposta perante o estímulo nociceptivo térmico. Já em tartarugas de orelha vermelha ocorreu um grande acréscimo no tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico, que segundo Sladky et al.(2007) se deve ao

fato de serem animais aquáticos e a água possuir uma temperatura máxima de 30°C.

Devido aos motivos apresentados, foi realizado um estudo piloto, utilizando-se intensidade de 80 miliwatt (mW) por um período máximo de 35 segundos (s), durante a realização deste estudo piloto, um dos animais apresentou uma lesão na superfície plantar do membro posterior onde foi aplicado o estímulo térmico. Devido a tal fato, foi discutido com o grupo de trabalho e ficou decidido pela redução da intensidade para 70 mW e da redução do tempo máximo de exposição ao estímulo para 30s.

Foi observado no presente estudo, que ao se manter os animais em sua temperatura ótima, a identificação e resposta perante o estímulo nociceptivo térmico ocorrem de forma rápida e evidente. Essa observação fica muito mais evidenciada no G0, onde o tempo de retirada do membro perante o estímulo manteve-se estável durante todos os momentos de avaliação, com exceção do momento 12 horas, onde nota-se uma queda da temperatura corpórea dos animais.

O grupo G5 mostrou um aumento de 95% e 96%, respectivamente nos momentos 0,5h e 1h em relação ao basal, essa diferença estatística só se repetiu novamente no momento de avaliação 12 horas, onde apresentou 90% de aumento no tempo de retirada do membro, em relação e possivelmente está ligada com a queda da temperatura corpórea. Já em G10 ocorreu o aumento do tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico em relação ao basal e a G0, em todos os momentos de avaliação, sendo que os maiores aumentos foram nos momentos de avaliação 4 e 6 horas, 92% e 93% respectivamente.

Em G5, só ocorreu aumento do tempo de retirada do membro nos momentos 0,5h e 1h, sendo que nos outros momentos não ocorreram aumentos, Sladky; Kinney, Johnson (2008) também observaram que não ocorreu o aumento do tempo de retirada do membro nos momentos 2, 4 e 8 horas após administração de pequenas doses de morfina (2 - 5mg/kg) em seu estudo sobre o efeito analgésico da morfina em dragões barbados.

Segundo esses autores, o aumento observado nos momentos anteriores pode estar ligado à intensidade do estímulo térmico utilizada, em intensidades maiores foi observado nenhum aumento do tempo de retirada do membro, a resposta foi estatisticamente igual ao grupo controle por eles utilizado. Já em tartarugas de

orelha vermelha tanto doses baixas como doses elevadas (2 – 20mg/kg) promoveram aumento do tempo de retirada do membro (SLADKY et al., 2007).

O aumento do tempo de retirada do membro proporcionado pelo G10, sugere um período de ação entre 6 e 12 horas após a administração da morfina por via intramuscular, o aumento observado no momento 12 horas pode estar também correlacionado com a diminuição da temperatura corpórea dos animais.

A morfina mostrou ser uma opção viável para a promoção de efeitos sedativos e analgésicos quando administrada por via intramuscular, em teiús mantidos em temperatura controlada.

7 Conclusões

De acordo com a metodologia utilizada conclui-se que:

1. A associação da avaliação da atividade locomotora, utilizando o teste de campo aberto, e a avaliação dos parâmetros comportamentais se mostrou uma alternativa na avaliação da sedação promovida pela morfina em teiús.

2. A termoalgiometria se mostra uma metodologia rápida e de fácil aplicabilidade para a avaliação da resposta nociceptiva em teiús mantidos em temperatura controlada.

3. A morfina promove de forma dose-dependente a redução da atividade locomotora e a alteração dos parâmetros comportamentais em teiús, indicando uma possível sedação nos animais frente à administração deste opioide por via intramuscular.

4. A morfina promove de forma dose-dependente o aumento do tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico em teiús, indicando um efeito analgésico nos animais frente à administração deste opioide por via intramuscular.

8 Referências Bibliográficas

ABE, A. S. Observations on dormancy in tegu, *Tupinambis teguixin* (Reptilia, Teiidae). **Naturalia**, v. 8, p. 135 – 139, 1983.

ANDRADE, D .V. et al. Overwintering in tegu lizards. **Biological Papers of the University of Alaska**, n.27, 2004a.

ANDRADE, D.V. et al. Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 140, p. 197 – 208, 2004b.

Bienzle, D.; Boyd, C.J. Sedative effects of ketamine and midazolam in snapping turtles (*Chelydra serpentina*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n.2, p.201 -204, 1992.

BRODIE III, E. D.; RUSSELL, N. H. The consistency of individual differences in behaviour: temperature effects on antipredator behaviour in garter snakes. **Animal Behaviour**, v. 57, n. 2, p. 445-451, 1999.

BRONDANI, Juliana T ; MAMA, KHURSHEED R ; LUNA, STELIO P L ; WRIGHT, BONNIE D ; NIYOM, SIRIRAT ; AMBROSIO, JENNIFER ; VOGEL, PAMELA R ; PADOVANI, CARLOS R . Validation of the English version of the UNESP-Botucatu multidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cats. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 143, 2013.

CARREGARO, A.B. et al. Influência da temperatura corporal de cascavéis (*Crotalus durissus*) submetidas à anestesia com cetamina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n. 12, p. 969 -973, 2009.

DAHLIN, J.; et al. The Suspended Formalin Test: A Method Designed for Studying Formalin-Induced Behaviour in the Speke's Hingeback Tortoise (*Kinixys spekii*). **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 39, n. 1, 2012.

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacol Review**, v.48, n.4, p.567-592,1996.

DIETHELM, G.; STEIN, G. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. In Mader: **Reptile medicine and surgery**, 2^aed, p. 1103-1118. Saunders Elsevier, St. Louis, MO.

DIVERS, S. Basic reptile husbandry, history taking and clinical examination. **In Practice**, v. 18, n. 2, p. 51-65, 1996.

DONKELAAR, H. J.; BOER-VAN, H.R. A possible pain control system in a nonmammalian vertebrate (a lizard, *Gekko gecko*). **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 65 – 70, 1987.

EMERY, I. et al. Sedative effects of intranasal midazolam and dexmedetomidine in 2 species of tortoises (*Chelonoides carbonaria* and *Geochelone platynota*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 23, p. 380 – 383, 2014.

FLEMING, G.J.; ROBERTSON, S.A. Assessments of thermal antinociceptive effects of butorphanol and human observer effect on quantitative evaluation of analgesia in green iguanas (*Iguana iguana*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 10, p. 1507 – 1511, 2012.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HARVEY, M.B.; UGUETO, G.N.; GUTBERLET JR, R.L. Review of teiid morphology with revised taxonomy and phylogeny of the teiidae (Lepidosauria: Squamata). **ZOOTAXA**, v. 3459, p.1-156, 2012.

HERZOG, H. A.; BURGHARDT, G. M. Development of antipredator responses in snakes: I. Defensive and open-field behaviors in newborns and adults of three species of garter snakes (*Thamnophis melanogaster*, *T. sirtalis*, *T. butleri*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 4, p. 372 -379, 1986.

HOLZ, P. et al. The Anatomy and Perfusion of the Renal Portal System in the Red-Eared Slider (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 378-385, 1997a.

HOLZ, P. et al. The effect of the renal portal system on pharmacokinetic parameters in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n.4, p. 386-393, 1997b.

KANUI, T.I.; HOLE, K.; MIARON, J.O. Nociception in crocodiles: Capsaicin instillation, Formalin and Hote Plate test. **Zoological Science**, v. 7, p. 537 – 540, 1990

KINNEY, M.E.; JOHNSON, S.M.; SLADKY, K.K. Behavioral Evaluation of Red-eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*) Administered Either Morphine or Butorphanol Following Unilateral Gonadectomy. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 21, n. 2-3, p. 54 – 62, 2011.

KLEIN,W. et al. Struture of the posthepatic septum and its influence on visceral topology in the tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae: Reptilia). **Journal of Morphology**, v. 258, p.151 – 157, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597 – 652, 2001.

LIANG, Y.F.; TERASHIMA, S.; ZHU, A.Q. Distinct morphological characteristics of touch, temperature, and mechanical nociceptive neurons in the crotaline trigeminal ganglia. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 60, p. 621 – 633, 1995.

LI, X.; KEITH, D.E.; EVANS, C.J. Multiple opioid receptor-like genes are identified in diverse vertebrate phyla. **FEBS letters**, v. 397, p. 25 – 29, 1996.

LINDBERG, I.; WHITE, L. Reptilian enkephalins: implications for the evolution of proenkephalin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.245, n. 1, p. 1 – 7, 1986.

MAKAU, C.M. et al. Intrathecal administration of clonidine or yohimbine decreases the nociceptive behavior caused by formalin injection in the marsh terrapin (*Pelomedusa subrufa*). **Brain and Behavior**, v. 4, n. 6, p. 850 – 857, 2014

MAMA, K.R.; PASCOE, P.J.; STEFFEY, E.P. Evaluation of the interaction of mu and kappa opioid agonist on locomotor behavior in the horse. **Canadian Journal of Veterinary research**, v. 57, n. 2, p. 106 – 109, 1993.

MAIANTE, A. A.; et al. Comparison of the cardio-respiratory effects of methadone and morphine in conscious dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 4, p. 31-328, 2009.

MATAQUEIRO, M.I.; et al. Estudo comparativo dos efeitos sedativos e antinociceptivos da xilazina e romifidina em ratos e camundongos. **ARS Veterinaria**, v.16, n.3, p.165-170, 2000.

MATAQUEIRO, M.I.; et al. Comparative study of the sedative and antinociceptive effects of levomepromazine, azaperone and midazolam in laboratory animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n., p. 340-345, 2004.

MATHEWS, K. et al. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. **Journal of Small Animal Practice WSAVA**, p.1-59, 2014.

MILSOM, W.K. et al. Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17°C) and dark. **Physiological and Biochemistry Zoology**, v.81, n.2, p.165-175, 2008.

MITCHELL, M.A. Reptile Cardiology. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 65 – 79, 2009.

MOSLEY, C. A. E. Anesthesia and Analgesia in Reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 14, n. 4, p. 243-262, 2005.

MOSLEY, C.A.E. Pain and Nociception in Reptiles. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v.14, p. 45 – 60, 2011.

MURRELL, J. C.;et al. Application of a modified form of the Glasgow pain scale in a veterinary teaching centre in the Netherlands. **Veterinary Record**, v. 162, n. 13, p. 403-408, 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3-33, 2003.

READ, M.R. Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 4, p. 547 – 552, 2004.

REINER, A. The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. **The Journal of Comparative Neurology**, v.259, p. 65 – 9, 1987.

SKOVGAARD, N. et al. The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.142, p. 142 – 205, 2005.

SLADKY, K. K.; et al. Analgesic efficacy and respiratory effects of butorphanol and morphine in turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 9, p. 1356-1362, 2007.

SLADKY, K. K.; KINNEY, M. E.; JOHNSON, S. M. Analgesic efficacy of butorphanol and morphine in bearded dragons and corn snakes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 2, p. 267-273, 2008.

SLADKY, K. K.; MANS, C. Clinical Analgesia in Reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n. 2, p. 158-167, 2012a.

SLADKY, K.K; MANS, C. Clinical Anesthesia in Reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, n.1, p. 17 – 31, 2012b.

SLEEMAN, J. M.; GAYNOR, J. Sedative and cardiopulmonary effects of medetomidine and reversal with atipamezole in desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **Journal of Zoo and Wildlife medicine**, v.31, n. 1, p. 28 – 35, 2000.

SMITH, A. P.; LEE, N. M. Opioid receptor interactions: local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional. *Life Sciences*, v. 73, p.1873 – 1893, 2003.

SMITH, E.S.J.; LEWIN, G.R. Nociceptors: a phylogenetic view. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 195, p. 1089 – 1106, 2009.

SNEDDON, E.S.J. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 123 – 130, 2004.

SYKES, J. M.; GREENACRE, C.B. Techniques for drug delivery in reptiles and amphibians. **Journal of exotic pet medicine**, v.15, n. 3, p. 210 – 217, 2006.

TRESCOT, A.M, et al. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, p. S133 – S153, 2008.

WAMBUGU, S.N., et al. Effects of opioids in the formalin test in the Speke's hinged tortoise (*Kinixys spekii*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, p. 347 – 351, 2010.

WEGNER, K.; ROBERTSON, S.A. Evaluation of the side-effects and thermal nociceptive effects of intravenous hydromorphone in cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 30, p. 95 – 119, 2003.

WELLEHAN, J.F.X.; GUNKEL, C.I.; KLEDZIK, D.; ROBERTSON, S. A.; HEARD, D.J. Use of nerve locator to facilitate administration of mandibular nerve blocks in crocodilians. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 3, p. 405 – 408, 2006.

XIA, Y.; HADDAD, G.G. Major difference in the expression of delta and mu-opioid receptors between turtle and rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 436, p. 202 – 210, 2001.

APÊNDICE A – Pontuação individual dos animais em cada grupo durante a avaliação da atividade locomotora no teste de campo aberto.

animal	Grupo G0								
	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
887	68	63	42	26	54	90	92	36	46
974	49	3	22	4	27	3	40	4	2
881	13	0	42	14	8	10	10	8	18
992	83	64	14	96	82	92	8	4	42
882	63	26	48	58	36	43	9	0	64
993	81	50	47	26	39	47	47	2	41
009	44	36	80	5	96	84	27	39	89
mediana	63	36	42	26	39	47	27	4	42
quartil 25%	46,5	14,5	32	9,5	31,5	26,5	9,5	3	29,5
quartil 75%	74,5	56,5	47,5	42	68	87	43,5	22	55

Grupo G5									
animal	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
887	77	20	10	14	42	11	73	12	82
974	87	70	49	46	42	55	67	3	40
881	53	1	0	20	25	0	6	3	38
992	83	4	2	1	0	13	50	8	25
882	30	52	46	18	16	8	0	9	6
993	47	1	5	0	0	0	0	0	34
009	115	4	5	6	4	3	82	62	74
mediana	77	4	5	14	16	8	50	8	38
cuartil 25%	50	2,5	3,5	3,5	2	1,5	3	3	29,5
cuartil 75%	85	36	28	19	33,5	12	70	10,5	57

Grupo G10									
animal	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
887	54	0	0	4	0	0	5	16	25
974	51	1	5	8	2	0	0	2	1
881	61	1	0	0	0	0	16	3	14
992	83	0	0	0	0	0	0	3	80
882	37	34	14	0	0	0	12	2	2
993	34	1	11	27	0	0	0	1	31
009	120	6	3	2	1	0	11	47	74
mediana	54	1	3	2	0	0	5	3	25
cuartil 25%	44	0,5	0	0	0	0	0	2	8
cuartil 75%	72	3,5	8	6	0,5	0	11,5	9,5	52,5

APÊNDICE B – Pontuação individual dos animais em cada grupo utilizado na avaliação dos escores comportamentais.

animal	Grupo G0								
	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	0	0	0	0	0	0	0	0	0
993	0	0	0	0	0	0	1	4	0
009	2	4	4	2	4	2	5	5	3
992	0	2	2	0	0	0	2	3	0
887	0	1	1	3	2	0	4	2	0
989	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mediana	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	1,5	2	0,0
quartil 25%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,5	0,0
quartil 75%	0,0	1,8	1,8	1,5	1,5	0,0	3,5	2,8	0,0

Grupo G5									
animal	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	3	8	3	6	6	6	7	4	3
993	0	2	4	6	12	9	2	0	0
009	0	0	3	12	6	9	4	3	0
992	1	1	2	2	4	5	0	1	4
887	0	1	6	7	8	6	4	4	0
989	0	1	1	8	10	8	5	1	0
mediana	0	1	3	6,5	7	7	4	2	0
cuartil 25%	0	1	2,25	6	6	6	2,5	1	0
cuartil 75%	0,75	1,75	3,75	7,75	9,5	8,75	4,75	3,75	2,25

Grupo G10									
M10	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	0	0	2	2	3	6	6	5	0
993	1	4	6	4	9	12	10	6	3
009	0	2	8	7	11	10	11	4	0
992	0	0	2	7	7	7	7	1	5
887	0	0	4	2	8	7	8	1	1
989	0	3	2	7	10	11	9	3	0
mediana	0	1	3	5,5	8,5	8,5	8,5	3,5	0,5
cuartil 25%	0	0	2	2,5	7,25	7	7,25	1,5	0
cuartil 75%	0	2,75	5,5	7	9,75	10,75	9,75	4,75	2,5

APÊNDICE C – Tempo de retirada do membro perante o estímulo térmico individual dos animais em cada um dos grupos utilizados.

animal	Grupo G0								
	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	6,35	7,4	9	6,85	7,7	6,95	6,5	13,45	9,6
993	8	4,6	7,95	6,4	9,6	5,35	4,4	10,7	7,4
009	12,2	7,3	7,35	10,6	6,1	8,3	9,7	14,25	15,05
992	10,8	13,55	8,1	5,75	9,65	10,65	20,85	22,1	7,2
887	15,35	24,05	13,5	9,9	7,7	10,85	8	14	3,65
989	9,05	6,85	11,7	8,25	10,15	10,65	12,7	18,45	11,5
Média	10,3	10,6	9,6	8,0	8,5	8,8	10,4	15,5	9,1
Desvio padrão	3,2	7,2	2,5	2,0	1,6	2,3	5,9	4,1	3,9

Grupo G5									
animal	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	6,5	18,35	9,25	12,35	12,7	7,8	16,55	22,55	13,5
993	3,95	13,85	9,75	8,45	9	7,5	8,05	15,7	5,3
009	8,3	16,9	28,15	30,1	11,05	16,9	16,1	18,15	8,65
992	7,8	30,1	29,8	17,65	30,1	30,1	24,45	30,1	11,7
887	6	30,1	30,1	30,1	25	28,85	11,85	23,45	6,05
989	6,9	10,9	9,95	10,1	14,05	20,85	11,05	12	13,85
média	6,6	20,0	19,5	18,1	17,0	18,7	14,7	20,3	9,8
desvio padrão	1,5	8,2	10,8	9,8	8,5	9,8	5,8	6,4	3,7

Grupo G10									
animal	Basal	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
882	9,8	6,5	30,1	20,5	9,6	12,3	12,2	30,1	13
993	14	10,2	8,95	13,9	9,4	12,9	18,25	17,15	10,7
009	5,85	19,2	30,1	30,1	30,1	24,35	30,1	30,1	16,15
992	7,9	20,55	13,15	27,55	28,1	30,1	19,65	30,1	15,75
887	5,9	15,5	20,15	30,1	30,1	30,1	30,1	30,1	15,1
989	5,15	9,95	11,3	7,1	17,55	30,1	30,1	18,6	6
média	8,1	13,7	19,0	21,5	20,8	23,3	23,4	26,0	12,8
desvio padrão	3,4	5,6	9,4	9,5	9,9	8,6	7,8	6,3	3,9

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética CEUA/FZEA - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

FORMULÁRIO PARA PARECER ÉTICO – ÁREA: ANIMAL PARECER CONSUBSTANCIADO PARA PROJETO DE PESQUISA /TREINAMENTO OU PRÁTICA DE ENSINO

USO EXCLUSIVO DO CEP-FZEA
PROTOCOLO Nº 14.1.112.74.2
RECEBIDO EM: 12/03/2014

TÍTULO: Avaliação da sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (*Salvator merianae*)

RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro

1. ASPECTOS METODOLÓGICOS:

Objetivos	☒ Adequado	☐ Inadequado	
Justificativa	☒ Adequado	☐ Inadequado	
Cronograma para execução	☒ Adequado	☐ Inadequado	☐ Inexistente

Comentários:

2. O PROJETO DE PESQUISA E/OU AULA ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE, LEI FEDERAL 11794, DE 08 DE OUTUBRO DE 2008 E À LEI ESTADUAL 11977, DE 25 DE AGOSTO DE 2008 (Vide http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm.)

☒ Adequado ☐ Inadequado

Justifique aqui caso o projeto não esteja adequado

Existe alternativa ao uso de animais que possa ser utilizada?

☐ Sim ☒ Não

Justifique: O projeto de pesquisa apresenta o objetivo de estudar o efeito da morfina (sedação e analgesia) especificamente em lagartos teiús (*Salvator merianae*).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

3. Informações relativas aos animais:

3.1. Número total de animais solicitados: 10

A quantidade, espécie, sexo e idade dos animais solicitada é:

☒ Adequada ☐ Insuficiente ☐ Excessiva

A quantidade está adequada (10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas), diante dos objetivos propostos.

3.2. Os procedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais?

☐ Não ☒ Sim

Em caso afirmativo serão empregados métodos para alívio destas condições?

☐ Não ☒ Sim

Os lagartos serão submetidos a um estímulo térmico (de até 32 s), produzido por um termoalgimetro, com a temperatura entre 45°C e 47°C, mas antes disto, já terão recebido uma aplicação de morfina (analgésico opioide). Certamente, os pesquisadores envolvidos certificaram-se que a temperatura e o tempo do estímulo são adequados para os lagartos teiús.

Em caso negativo existem justificativas para tal fato?

☐ Não ☐ Sim

Você considera essas justificativas válidas e/ou pertinentes?

☐ Não ☐ Sim

Justifique

3.3. Substituição de Metodologia:

☒ Não ☐ Sim

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

3.4. Necessita de detalhamento Metodológico: ☒ Não ☐ Sim

3.5. Acomodação e manutenção dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada, cite as melhorias necessárias

3.6. Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada, cite as melhorias necessárias

3.7. Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Este projeto avaliará se o uso da morfina como analgésico será adequado para os lagartos teiús.

3.8. Anestesia dos animais (se aplicável) ☐ Adequada ☐ Inadequada

3.9. Eutanásia/Abate dos animais (se aplicável): ☐ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta

3.10. Descarte dos animais (se aplicável): ☐ Adequado ☐ Inadequado

3.11. Local de realização da pesquisa e/ou aula (se aplicável): ☒ Adequado ☐ Inadequado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

4. COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE O PROJETO:

O projeto avaliará o efeito analgésico e sedativo da morfina em lagartos teiús. A morfina é um opioide muito utilizado na clínica médica-cirúrgica de cães e gatos, mas pouco se conhece sobre seus efeitos em espécies exóticas. Portanto, julgo que os objetivos deste projeto são relevantes e que a metodologia está adequada.

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.112.74.2

Projeto: Avaliação da sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (*Salvator merianae*)

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Pelo Comitê de Ética:

☒ Referendada a aprovação.

☐ Não aprovado.

☐ Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.

☐ Retirado de pauta.

Pirassununga, 18 de 03 de 2014

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA

ANEXO B – Aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42845-1	Data da Emissão: 13/03/2014 15:17	Data para Revalidação*: 12/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: William Petroni Leal	CPF: 328.384.068-76
Título do Projeto: Avaliação da sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (Salvator merianae)	
Nome da Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	será avaliado a sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús	04/2014	09/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1)Esta Autorização não contempla coleta de exemplares de teiús(Salvator merianae)na natureza,posto que os exemplares a serem usados no estudo serão cedidos pelo jacarezário mantido pelo IB/UNESP-Rio Claro,coordenado pelo Prof.Dr. Augusto Shinya Abe.2)Os resultados serão realmente úteis no contexto atual,em que se verifica um aumento no atendimento clínico-cirurgico de répteis em hospitais veterinários.Como a morfina é um opióide de amplo uso na clínica de cães e gatos, torna-se bastante desejável e oportuno o conhecimento dos efeitos sedativos e analgésicos dessa substância em animais silvestres.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Adriano Bonfim Carregaro	Orientador	195.077.148-20	1346111 SSP-DF	Brasileira
2	André Nicolai Elias da Silva	Colaborador	294.811.178-12	30193777-1 SSP-SP	Brasileira
3	Augusto Shinya Abe	Pesquisador associado	593.380.328-68	3444543 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PIRASSUNUNGA	SP	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69883288

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42845-1	Data da Emissão: 13/03/2014 15:17	Data para Revalidação*: 12/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: William Petroni Leal	CPF: 328.384.068-76
Título do Projeto: Avaliação da sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (Salvator merianae)	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69883288

Página 3/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42845-1	Data da Emissão: 13/03/2014 15:17	Data para Revalidação*: 12/04/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: William Petroni Leal	CPF: 328.384.068-76
Título do Projeto: Avaliação da sedação e analgesia promovida pela morfina em teiús (Salvator merianae)	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Salvator merianae

Material e métodos

1	Método de marcação (Répteis)	Microchip
---	------------------------------	-----------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 69883288

Página 2/3