

ANA TADA FONSECA BRASIL ANTIRIO

**Avaliação comportamental de camundongos após administração  
de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-  
operatória**

São Paulo  
2021

ANA TADA FONSECA BRASIL ANTIRIO

**Avaliação comportamental de camundongos após administração  
de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-  
operatória**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Departamento:**  
Patologia

**Área de concentração:**  
Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**  
Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

São Paulo  
2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4065  
FMVZ

Antiorio, Ana Tada Fonseca Brasil  
Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória / Ana Tada Fonseca Brasil Antiorio. – 2021.  
108 f. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori.

1. Animais de laboratório. 2. Analgesia. 3. Opioides. 4. Agentes anti-inflamatórios não-esteroidais. 5. Comportamento animal. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos analgésicos do meloxicam e tramadol em camundongos submetidos à vasectomia e hepatectomia parcial: avaliação do comportamento e da vocalização ultrassônica", protocolada sob o CEUA nº 3582200217, sob a responsabilidade de **Cláudia Madalena Cabrera Mori e equipe; Ana Tada Fonseca Brasil Antírio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/06/2017.

We certify that the proposal "The analgesic effects of meloxicam and tramadol in mice post-vasectomy and partial hepatectomy: the assessment of ultrasonic vocalization and behaviour", utilizing 70 Isogenics mice (70 males), protocol number CEUA 3582200217, under the responsibility of **Cláudia Madalena Cabrera Mori and team; Ana Tada Fonseca Brasil Antírio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/01/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 03/2021 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade:	6 a 12 semanas	N:	70
Linhagem:	C57BL/6	Peso:	25 a 40 g				

Resumo: O presente projeto tem como objetivo avaliar a dor em camundongos machos pós vasectomia e pós hepatectomia parcial, submetidos a diferentes protocolos de analgesia. Serão administrados dois fármacos analgésicos, tramadol (opioide) e meloxicam (anti-inflamatório não esteroidal) administrados em dose única, sozinhos e em associação 30 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos. Para avaliar a possível presença de dor será verificada a vocalização ultrassônica no pós-cirúrgico imediato. Após 24 horas, serão realizados testes comportamentais para detectar alterações motoras e neurosensoriais. Os níveis de corticosterona serão avaliados antes e durante o período de ação dos fármacos.

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP

São Paulo, 02 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 15 de outubro de 2019

CEUA N 3582200217

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Cláudia Madalena Cabrera Mori  
Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "Efeitos analgésicos do meloxicam e tramadol em camundongos submetidos à vasectomia e heptectomia parcial: avaliação do comportamento e da vocalização ultrassônicaProposta para alterar o título: Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória".

**Parecer Consustanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 005239)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 12/agosto/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito a substituição do título do projeto em virtude de alterações realizadas nos protocolos experimentais para o seguinte: [Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória]; título em inglês: "Behavioral assessment of mice after administration of meloxicam and tramadol for acute postoperative pain management." As alterações nos protocolos inicialmente propostos foram necessárias em virtude dos resultados encontrados durante os primeiros dois anos do doutorado.".

Comentário da CEUA: "Alteração de título aprovada".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Cordenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 12 de agosto de 2020  
CEUA N [3582200217](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Cláudia Madalena Cabrera Mori  
Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "Efeitos analgésicos do meloxicam e tramadol em camundongos submetidos à vasectomia e hepatectomia parcial: avaliação do comportamento e da vocalização ultrassônicaProposta para alterar o título: Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória".

**Parecer Consustanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ** ([ID 006762](#))

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 12/agosto/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Justificativa: durante os primeiros dois anos do doutorado avaliei nos animais, no período pós-cirúrgico imediato, a atividade geral exploratória, distância percorrida, velocidade, grooming e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto e no labirinto em cruz elevada. Os camundongos receberam tramadol, meloxicam e lidocaína, 30 minutos antes da vasectomia. Foram utilizados 64 camundongos machos C57BL/6 divididos em grupos (n=8) da seguinte forma: controle negativo (CTR), controle tramadol 20 mg/kg (CT), controle meloxicam 20 mg/kg (CM); controle tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg (CTM); vasectomia tramadol 20 mg/kg (VT); vasectomia meloxicam 10 mg/kg (VM); vasectomia tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg (VTM) e vasectomia tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg + lidocaína 10 mg/kg (VTML). A estatística foi avaliada utilizando ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os controles tratados não operados e os camundongos tratados vasectomizados apresentaram atividade geral locomotora similar ao grupo controle negativo (CTR) e permaneceram a maior parte do tempo na periferia da arena, com exceção do grupo que recebeu meloxicam 20 mg/kg (CM). Este último apresentou reduzida atividade deambulatória, apatia, letargia e ptose palpebral. Permaneceram a maior parte do tempo na região central tanto da arena como do labirinto em cruz. A frequência de levantar-se apresentou-se reduzida nos grupos CM, CTM, VT, VM, VTM e VTML quando comparada aos grupos CTR e CT. O comportamento de grooming apresentou-se significativamente reduzido no grupo CM. O uso do tramadol associado a meloxicam e à lidocaína não interferiu na atividade geral dos animais. As alterações observadas nos animais que receberam meloxicam indicam que a dose utilizada nesse trabalho pode ter causado intoxicação nos animais. Os resultados foram apresentados à banca de qualificação e submetidos à revista *Laboratory Animals*, referência na área. Após reavaliar os resultados e as sugestões da banca e da revista, haverá a necessidade de inclusão de 5 grupos: controle positivo isoflurano, controle positivo meloxicam com três diferentes dosagens e um grupo vasectomia com lidocaína. Além do comportamento, será realizado também estudo sobre as funções renais e hepáticas desses animais. Total de 5 grupos com n=8 cada um. Resposta ao parecer encaminhada em 21/04/2020 (anexo). Resposta ao colegiado encaminhada em 26/06/2020 (anexo).".

Comentário da CEUA: "Não existem óbices para a aprovação. Todos os questionamentos foram devidamente respondidos. Lembramos que o número de animais utilizados não deve ultrapassar o acordado com esta CEUA e caso de alteração, novas emendas devem ser submetidas.".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## **FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Autor: ANTIORIO, Ana Tada Fonseca Brasil

Título: **Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr.\_\_\_\_\_

Instituição:\_\_\_\_\_ Julgamento:\_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho...

**Aos meus familiares queridos.... meu filho Guilherme, meu esposo Ricardo,  
meus pais, Mitie e Reyolando, meus irmãos, Lando e Rene...  
e minha Batiam (*in memoriam*) ...**

O amor incondicional, apoio, respeito, incentivos, sorrisos e abraços são fundamentais para que eu continue minha caminhada.... Minha família é o meu porto seguro e fonte de motivação.

**Aos meus amigos da graduação e da pós-graduação....**

Foram muitas horas de estudo que valeram a pena.

Em especial meu amigo Eduardo Deberaldini (*in memoriam*)

**Aos meus amigos bioteristas....**

Durante todos esses anos conheci pessoas notáveis que amam e respeitam a Ciência em Animais de Laboratório.

**E aos Animais de Laboratório....**

Seres indispensáveis para a Ciência. Merecedores de toda atenção e cuidados.

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço...

A Deus todos os momentos da minha vida. Ao meu Anjo da Guarda a proteção contra os perigos dessa breve caminhada que é a vida.

À Professora Claudia Mori a orientação e dedicação, minha mentora e amiga, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Modelos Animais, do Biotério do Departamento de Patologia e do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP. Em especial Jilma, Dennis, Mariana, Pedro, Luciana Cintra, Sílvia, Luciana Bandini, Nelsinho, Denise, Danilo e Marco Aurélio.

Aos professores Denise Fantoni, Stephen Hyslop, Maria Martha Bernardi e Enio Mori as considerações e sugestões que colaboraram muito com o entendimento deste trabalho.

Ao Biotério do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Em especial Dra. Sandra Regina Alexandre-Ribeiro.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

À Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP.

Aos funcionários do serviço de Pós-Graduação da FMVZ/USP.

Aos funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da FMVZ/USP.

Aos professores da banca examinadora que aceitaram avaliar meu trabalho e me ajudaram a concluir mais uma etapa importante da minha vida acadêmica.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas. Em especial Prof. Dr. Wagner José Fávaro e Ana Paula Pauloni de Freitas.

Aos médicos-veterinários e colaboradores do *Department of Comparative Medicine, University of Washington*, Seattle, EUA. Em especial Dra. Christina Pettan-Brewer, Dr. Brian Iritani, Dra. Cynthia Pekow e Dra. Thea Brabb.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. O apoio financeiro permitiu a realização do meu estágio nos biotérios do *Department of Comparative Medicine, University of Washington*, Seattle, EUA.

E a todos que não menciono aqui por serem muitos, mas que em algum momento ou de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

*“...A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional...”*

*Carlos Drummond de Andrade (1902 – 1987)*

## RESUMO

**ANTIORIO, A.T.F.B. Avaliação comportamental de camundongos após administração de meloxicam e tramadol como forma de manejo da dor aguda pós-operatória.** 2021. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O manejo adequado da dor em camundongos de laboratório atende os princípios éticos, legais e de bem-estar dos animais. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia do meloxicam e do tramadol para o controle da dor imediata pós-operatória em camundongos por meio de testes comportamentais. O estudo apresenta três seções conforme descrito a seguir: no primeiro capítulo foi avaliada a atividade geral no Campo Aberto e o comportamento associado à ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado em camundongos C57BL/6J vasectomizados após a administração dos fármacos. Os camundongos receberam meloxicam 10 mg/kg ou tramadol 20 mg/kg ou ambos pela via intraperitoneal 30 minutos antes dos procedimentos. A vasectomia foi realizada sob anestesia inalatória por isoflurano pela via escrotal. Os testes comportamentais foram realizados após o retorno completo da anestesia. O meloxicam reduziu significativamente a atividade ambulatória e a frequência de levantar. Devido às alterações no comportamento causadas pelo meloxicam, não foi possível demonstrar a eficácia analgésica deste nos animais operados. O tramadol não interferiu no comportamento espontâneo dos animais, porém nos animais operados houve redução significativa na frequência de levantar o que pode ser sugestivo da presença de dor ou algum desconforto. No segundo capítulo, o comportamento dos camundongos foi avaliado após a administração de três diferentes formulações comerciais de meloxicam 20 mg/kg, via intraperitoneal e subcutânea. O meloxicam, administrado por ambas as vias, causou redução na atividade exploratória, além de dermatite e lesão local por via subcutânea; com resultados variáveis conforme a formulação utilizada. No terceiro capítulo, uma revisão sistemática incluiu 94 artigos científicos pesquisados em plataformas eletrônicas de busca no período entre 2000 e 2020. O objetivo foi identificar e avaliar o uso do meloxicam para o controle da dor em camundongos. A revisão demonstrou baixa porcentagem de publicações que informaram as condições de alojamento, manejo, cálculo do número de animais e os critérios para o ponto final humanitário. Além disso, poucos artigos mencionaram os efeitos adversos causados pelo

meloxicam. Em síntese, os testes comportamentais permitiram identificar a eficácia analgésica e os efeitos adversos causados pelos fármacos. Doses adequadas do meloxicam e do tramadol assim como os possíveis efeitos adversos devem ser melhor investigados. As publicações científicas devem trazer informações completas e claras a fim de impulsionar o uso ético dos animais na experimentação e a reproduzibilidade dos resultados. O manejo efetivo da dor deve ser sempre praticado para a promoção do bem-estar dos camundongos no pós-operatório.

**Palavras-chave:** Animais de laboratório. Analgesia. Opioides. Agentes anti-inflamatórios não-esteroidais. Comportamento animal.

## ABSTRACT

ANTIORIO, A.T.F.B. **Behavioral assessment of mice after administration of meloxicam and tramadol for acute postoperative pain management.** 2021. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Pain management in laboratory animals is a matter of ethical, legal, and animal welfare concern. The present study aimed to evaluate the analgesic efficacy of meloxicam and tramadol to control immediate postoperative pain in mice using behavioral tests. The study is divided into three sections as described below: in the first chapter, the Open-Field test for general activity and the Elevated Plus Maze for anxiety-like behavior were applied in C57BL/6J vasectomized mice following the administration of analgesics. Mice received 10 mg/kg meloxicam, 20 mg/kg tramadol, or both intraperitoneally 30 minutes before procedures. Vasectomy was conducted via scrotal approach under isoflurane inhalation anesthesia and the behavioral tests were performed after anesthesia recovery. Meloxicam significantly reduced ambulatory activity and the frequency of rearing. Due to behavior changes caused by meloxicam, it was not possible to define whether meloxicam provided adequate analgesia. Tramadol did not interfere with the animals' spontaneous behavior. However, there was a significant reduction in the frequency of rearing in the operated animals, suggesting that they expressed potential signs of pain or discomfort. In the second chapter, the effect on mice behavior was evaluated after administration of three different meloxicam commercial brands (20 mg/kg) via intraperitoneal or subcutaneous. Meloxicam, administered by both routes, caused several effects on mouse behavior, and skin lesions at the injection site by subcutaneous route, depending on the brand of the drug. In the third chapter, a systematic review included 94 scientific articles searched on electronic databases between 2000 and 2020. The objective was to identify and evaluate the use of meloxicam for pain management in laboratory mice. The review demonstrated a low percentage of articles that reported housing, husbandry, group size calculation, and endpoint criteria. Also, few articles published the potential adverse effects of meloxicam. In conclusion, the behavioral tests identified the analgesic efficacy and the adverse effects caused by the drugs. Adequate doses of meloxicam and tramadol, as well as possible adverse effect, should be further investigated. Scientific publications should report complete and clear information to

promote the ethical use of animals in experimentation and the reproducibility of results. Effective pain management should always be aiming at mouse postoperative welfare.

**Keywords:** Laboratory Animals. Analgesia. Opioids. Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents. Animal Behavior.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO 1**

Figure 1 - Diagram showing the steps of the experimental procedures.....	49
Figure 2 - Assessment of general activity of C57BL/6J mice in the Open-Field test (OFT) following meloxicam and tramadol administration. Distance traveled cm (a); average speed cm/s (b); time spent in the periphery zone of the arena (c); time spent in the center zone of the arena (d); time moving in seconds (e); rearing frequency (f); grooming frequency (g).....	52

Figure 3 - Assessment of anxiety-like behavior of C57BL/6J mice in the Elevated Plus Maze test (EPM) following meloxicam and tramadol administration. Time spent in the closed and open arms (a); number of entries into the closed and open arms (b); rearing frequency (c); grooming frequency (d).....	53
---	----

### **CAPÍTULO 2**

Figure 1 - Assessment of general activity of C57BL/6J mice in the Open-Field test (OFT) following meloxicam administration. Distance traveled cm (a); average speed cm/s (b); time spent in the periphery zone of the arena (c); time spent in the center zone of the arena (d); time moving in seconds (e); rearing frequency (f); grooming frequency (g).....	68
---	----

Figure 2 - Photographs of mice 5 minutes after subcutaneous injection of meloxicam. Skin lesion and alopecia at the injection site, (a) and (b); abnormal position of the tail, (c); orbital tightening and ear change, (d).....	69
--	----

### **CAPÍTULO 3**

Figure 1 - PRISMA flow diagram summarizing the search strategy.....	80
Figure 2 - Information assessed from the “Materials and Methods” section. Frequency of mouse strains according to the number of studies (a); percentages of male, female, both sexes and articles that did not describe the animal sex (b); routes of administration percentages observed in the review (c).....	82

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 1**

Table 1 - Abbreviation used for each group following analgesic administration and procedure along with the number of mice per group.....	47
--	----

### **CAPÍTULO 3**

Table 1 - Percentage of extracted information from “Material and Methods” section of the reviewed articles.....	81
Table 2 - Number and percentage of articles reviewed according to type of the study, procedure, or model.....	83
Table 3 - Meloxicam administration for post procedural pain or discomfort treatment in mice according to the reviewed references.....	84

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Principais termos e definições segundo a associação internacional para o estudo da dor (IASP).....	24
Quadro 2 - Características das fibras nervosas.....	25
Quadro 3 - Principais canais iônicos e receptores nociceptivos térmicos, mecânicos e químicos encontrados em mamíferos.....	27
Quadro 4 - Principais modelos murinos utilizados para estudos dor aguda e persistente e o tipo de estímulo.....	34
Quadro 5 - Manejo farmacológico conforme a intensidade da dor.....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>TERMINOLOGIA .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>NOCICEPÇÃO E DOR.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Dor patológica .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Hipersensibilidade.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Dor inflamatória .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Dor neuropática .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>RESPOSTAS SISTÊMICAS AUTONÔMICAS E NEUROENDÓCRINAS ...</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>MODELOS MURINOS DE NOCICEPÇÃO E DOR.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>RECONHECIMENTO DA DOR EM ROEDORES .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>MANEJO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA .....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Métodos não-farmacológicos.....</b>	<b>38</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Métodos farmacológicos .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....</b>	<b>40</b>
	<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>43</b>
	<b>HIGHLIGHTS.....</b>	<b>44</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>44</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>45</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1</b>	<b>MICE HUSBANDRY .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2</b>	<b>ETHICS STATEMENT .....</b>	<b>47</b>
<b>2.3</b>	<b>EXPERIMENTAL GROUPS AND PROCEDURES .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4.</b>	<b>VASECTOMY .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5</b>	<b>BEHAVIOR TEST .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Open-Field test (OFT).....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Elevated Plus Maze test (EPM).....</b>	<b>49</b>
<b>2.6</b>	<b>EUTHANASIA.....</b>	<b>49</b>

2.7	STATISTICAL ANALYSIS.....	50
<b>3</b>	<b>RESULTS.....</b>	<b>50</b>
3.1	OPEN-FIELD TEST (OFT).....	50
3.2	ELEVATED PLUS MAZE (EPM) .....	51
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>58</b>
	<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>62</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>63</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>64</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>65</b>
	<b>RESULTS.....</b>	<b>67</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>72</b>
	<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>75</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>76</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>77</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>78</b>
	SEARCH STRATEGY.....	78
	<b>Inclusion and exclusion criteria .....</b>	<b>78</b>
	<b>Assessment of qualitative synthesis.....</b>	<b>78</b>
	STATISTICS.....	79
	<b>RESULTS.....</b>	<b>79</b>
	PRISMA STATEMENT .....	79
	INFORMATION ASSESSED FROM THE “MATERIALS AND METHODS” SECTION.....	80
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>85</b>
	<b>DECLARATIONS .....</b>	<b>89</b>

<b>REFERENCES .....</b>	<b>90</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL: LIST OF ARTICLES INCLUDED IN THE REVIEW.....</b>	<b>96</b>
<b>3 CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O manejo adequado da dor em animais de laboratório se faz necessário para atender princípios éticos, legais e de bem-estar dos animais. A dor não tratada pode causar sofrimento e distresse nos animais com impactos negativos nos resultados experimentais (JIRKOF, 2017). O tratamento da dor em animais é um grande desafio para os médicos-veterinários que atuam na medicina de animais de laboratório. Há inúmeros modelos animais, cada um com suas particularidades e finalidades. Em especial no camundongo, o desafio começa com a identificação dos sinais e a severidade da dor. Nessa espécie, há muitos estudos pré-clínicos sobre nocicepção e efeitos de fármacos analgésicos, mas poucos avaliam efetivamente o bem-estar dos animais. Além disso, a escolha do método para o manejo da dor, da droga, que não deve interferir com os objetivos da pesquisa e a avaliação da eficácia do tratamento são outros pontos a serem estudados no camundongo.

Esse trabalho apresenta uma revisão de literatura e três capítulos redigidos na forma de artigo. Na primeira parte da tese serão revisados aspectos básicos sobre anatomia e fisiologia da dor em animais, diferenças entre dor fisiológica e patológica, formas de reconhecimento da dor em roedores de laboratório, alguns pontos sobre o manejo da dor e considerações éticas.

No primeiro capítulo será tratado o projeto principal da tese na qual os efeitos de duas drogas, tramadol (opioide) e meloxicam (anti-inflamatório não esteroidal), foram avaliados em camundongos como forma de se estabelecer o manejo preemptivo da dor imediata pós-operatória. Nesse estudo foi realizada a vasectomia por ser um procedimento amplamente aplicado em centros de produção de animais geneticamente modificados. Os animais foram avaliados por meio de testes comportamentais que permitem a identificação da atividade locomotora, exploratória e do comportamento associado à ansiedade. O artigo foi submetido à revista *Applied Animal Behaviour Science*, referência na área de etologia.

No segundo capítulo será discutido um desdobramento do primeiro artigo que resultou em mais um experimento com o meloxicam. O efeito da droga foi novamente avaliado por meio do comportamento comparando formulações e vias de administração diferentes. O manuscrito foi submetido à revista *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (JAALAS).

No terceiro capítulo será apresentada uma revisão sistemática de estudos com camundongos que utilizaram o meloxicam como forma de manejo da dor causada em procedimentos experimentais. Estudos na área de medicina de animais de laboratório e pré-clínicos foram incluídos na revisão. O manuscrito está em avaliação pela revista *Veterinary Research Communications*.

Por fim, na última parte será apresentada a conclusão final com os principais pontos encontrados durante a realização desse projeto iniciado há quatro anos que trouxe um grande desenvolvimento acadêmico para mim e levantou mais questões a serem estudadas futuramente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INTRODUÇÃO

Conhecer os mecanismos envolvidos na percepção da dor e seus desdobramentos é fundamental para o médico-veterinário avaliar e designar o manejo adequado do paciente. Na medicina de animais de laboratório, os nossos “pacientes” são os animais submetidos a diferentes tipos de procedimentos experimentais com potencial de causar dor ou algum tipo de desconforto seja de forma intencional, como nos estudos específicos de dor, ou não. Proporcionar seu bem-estar por meio do manejo adequado da dor e/ou da manutenção das condições ambientais ideais para a espécie, dentre outras formas, deve ser considerado em todas as etapas da vida do animal de laboratório.

A palavra dor tem origem do latim *dolor* e do grego *algos*. Em 1979 a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) adotou a definição do termo dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal lesão” (IASP SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY, 1979). Após 40 anos a definição de dor foi revisada por uma força tarefa e aceita pelo Conselho da IASP com a seguinte redação: “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). A definição atual é relevante para a Medicina Veterinária pelo entendimento de uma de suas notas que diz “a descrição verbal é apenas um dos vários comportamentos para expressar a dor; a incapacidade de comunicação não invalida a possibilidade de um ser humano ou um animal sentir dor” (RAJA et al., 2020).

Estímulos nocivos, como cortes, esmagamentos ou queimaduras são causas de lesões ou ameaça de lesões em tecidos e ativam terminações nervosas livres especializadas chamadas de nociceptores que por sua vez deflagram respostas fisiológicas e comportamentais múltiplas processadas pelo sistema nervoso central. Porém, muitas dessas respostas podem ocorrer sem a presença de dor quando a informação nociceptiva não atinge as estruturas supraespinais como no caso de animais anestesiados ou que possuem lesões na medula espinal (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009). A dor é sempre uma experiência subjetiva e não pode ser deduzida pela atividade nas vias sensoriais (RAJA et al.,

2020). Assim, nocicepção e dor são conceitos diferentes e muitas vezes um desafio de se determinar em animais.

A dor é uma experiência complexa com dimensões sensoriais, afetivas, motivacionais e cognitivas. Possui caráter subjetivo e sofre influência de experiências prévias (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). De forma geral a dor pode ser diferenciada entre fisiológica e patológica, sendo a primeira aquela que induz respostas protetoras como o reflexo de retirada com a finalidade de interromper o estímulo nocivo, e a segunda aquela associada à inflamação ou lesão nervosa (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Quanto aos aspectos temporais, os termos utilizados na pesquisa e na clínica são diferentes. Os pesquisadores consideram que a dor aguda é aquela de duração muito curta associada a um estímulo nociceptivo, por exemplo pinçamento ou choque elétrico leve, que produz um reflexo de retirada ou vocalização. Já no aspecto clínico, a dor aguda tipicamente está associada a um procedimento ou cirurgia e pode durar alguns dias. Já a dor crônica pode durar semanas, meses ou anos e tipicamente está associada a doenças degenerativas e destrutivas por exemplo, osteoartrite e câncer (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009).

## 2.2 TERMINOLOGIA

O uso adequado da terminologia facilita o entendimento de conceitos específicos utilizados nos estudos da dor. Os principais termos estabelecidos pela IASP (2020) podem ser encontrados no quadro 1.

## 2.3 NOCICEPÇÃO E DOR

De forma simplificada as estruturas envolvidas na transdução, transmissão e modulação dos impulsos nervosos gerados a partir de um estímulo nocivo são designadas como neurônios de primeira, segunda e terceira ordem. Essas estruturas são responsáveis em conduzir a informação da periferia até o córtex cerebral (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Quadro 1 - Principais termos e definições segundo a associação internacional para o estudo da dor (IASP)

Termo	Definição
Alodinia	Dor devido a um estímulo que normalmente não causa dor
Analgesia	Ausência de dor em resposta à estimulação que normalmente seria dolorosa
Anestesia dolorosa	Dor em área ou região com privação total de sensibilidade
Causalgia	Síndrome de dor queimante, alodinia e hiperpatia após uma lesão traumática do nervo, geralmente combinada com disfunções vasomotoras e sudomotoras e alterações tróficas posteriores
Disestesia	Sensação desagradável anormal, espontânea ou provocada
Dor neuropática	Dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial
Dor neuropática central	Dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso central somatossensorial
Dor neuropática periférica	Dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso periférico somatossensorial
Dor nociceptiva	Dor que surge de uma lesão real ou potencial a um tecido não nervoso decorrente da ativação de nociceptores
Dor nociplástica	Dor que surge da nocicepção alterada sem evidência clara de uma lesão real ou potencial do tecido causando ativação do nociceptor periférico ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando dor
Estímulo nociceptivo	Evento real ou potencial de lesão a um tecido decodificado por um nociceptor
Estímulo nocivo	Um estímulo que causa lesão real ou ameaça de lesão em um tecido normal
Hiperalgesia	Aumento da resposta aos estímulos que normalmente causam dor
Hiperestesia	Aumento da sensibilidade à estimulação, exclui os cinco sentidos
Hiperpatia	Síndrome álgica caracterizada por aumento da reação a estímulos, especialmente os repetidos, assim como um aumento do limiar
Hipoalgesia	Diminuição da sensibilidade aos estímulos normalmente dolorosos
Hipoestesia	Redução da sensibilidade à estimulação, exclui os cinco sentidos
Limiar da dor	Intensidade mínima de um estímulo que é percebido como doloroso
Limiar de tolerância da dor	Limiar máximo de dor que um indivíduo considera aceitável em uma determinada situação
Neuralgia	Dor em um território bem definido de inervação de um ou mais nervos
Neurite	Inflamação de um nervo ou mais
Neuropatia	Anormalidade da função ou alteração estrutural de um ou mais nervos. Em um nervo, mononeuropatia; em mais de um nervo, mononeuropatia múltipla; se difusa e bilateral, polineuropatia
Neurônio nociceptivo	Neurônio central ou periférico do sistema nervoso somatossensorial que é capaz de decodificar o estímulo nocivo
Nocicepção	Processo neural de decodificação do estímulo nocivo
Nociceptor	Receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico que é capaz de transdução e decodificação dos estímulos nocivos
Parestesia	Sensação anormal, espontânea ou provocada
Sensibilização	Resposta aumentada dos neurônios nociceptivos a um impulso normal, e/ou recrutamento de uma resposta a impulsos normais de baixo limiar
Sensibilização central	Resposta aumentada dos neurônios nociceptivos do sistema nervoso central a Impulso aferente normal ou de baixo limiar
Sensibilização periférica	Resposta aumentada e redução do limiar dos neurônios nociceptivos periféricos a estimulação
Tratamento multimodal	Uso concorrente de intervenções terapêuticas separadas com diferentes mecanismos de ação dentro de uma disciplina objetivando diferentes mecanismos da dor. Por exemplo: uso de pregabalina e opioides para o controle da dor; uso de AINE e ortose para o controle da dor
Tratamento unimodal	Intervenção terapêutica única direcionada a um mecanismo específico da dor

Fonte: IASP (2020).

Os nociceptores são estruturas sensoriais especializadas que inervam a pele e tecidos profundos, por exemplo articulações e músculos, responsáveis pela dor somática e tecidos dos órgãos internos responsáveis pela dor visceral. O nociceptor possui quatro regiões: sensorial (região de transdução), axônio, corpo celular e terminal sináptico. Seus receptores formados por terminações nervosas livres representam a porção mais distal do neurônio aferente de primeira ordem (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; FEIN, 2011).

As fibras nervosas sensoriais (axônios) que partem da periferia e ascendem a medula espinal podem ser divididas em duas grandes categorias conforme o diâmetro axonal e mielinização: fibras A, mielinizadas, de diâmetro grande a intermediário e fibras C, não mielinizadas, de diâmetro menor. No quadro 2 estão listadas brevemente as características de cada uma.

Quadro 2 - Características das fibras nervosas

Fibra	Subtipo	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Mielinização	Sensação	Velocidade de condução (m/s)
A $\beta$	RAM; SAM	>10	Sim	Toque	30 - 100
A $\delta$	D-hair; AM	2 - 6	Leve	Toque; Nocicepção: dor aguda; pontada; termosensibilidade	2 - 10
C	C-polimodal; CM/MH/MC/H; Silenciosa*; CLT	0.4 – 1.2	Não	Nocicepção: dor difusa; queimação persistente; termosensibilidade; toque (fibras C de baixo limiar)	0.5 - 2

Fonte: ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK (2004); SMITH; LEWIN (2009).

Legenda: RAM e SAM= mecanorreceptores de adaptação rápida e lenta; D-hair= mecanorreceptores de baixo limiar; AM= A $\delta$  mecanonociceptores de alto limiar; CM= C mecanonocicpetor; MH= C mecanonociceptor sensível ao calor; MC= C mecanonociceptor sensível o frio; H= nociceptor sensível ao calor; CLT= fibras C de baixo limiar. \* As fibras silenciosas são ativadas após o processo de sensibilização.

Nos músculos e pele, as fibras A $\delta$  propagam os estímulos mecânicos, térmicos e químicos não nocivos, estímulos nocivos típicos de isquemia/hipóxia e pressão dolorosa. As fibras C também possuem características polimodais assim como as fibras A $\delta$ , porém com maior proporção para estímulos nocivos típicos de isquemia/ hipóxia e pressão nociva. Nas vísceras, os estímulos nocivos e não-nocivos são propagados pelas fibras A $\delta$  e C. A percepção se dá pela intensidade e somatização dos estímulos. A dor visceral é pouco localizada e referenciada como distante do órgão afetado (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

O estímulo sensorial causa uma alteração conformacional nos receptores o que desencadeia o processo de transdução alterando o potencial de membrana da célula. O potencial de ação do receptor deve ser convertido em uma série de potenciais de ação ao longo do axônio para conduzir o sinal até a sinapse onde os transmissores são liberados. Tais potências de ação são resultado da abertura e fechamento de proteínas de membrana chamadas canais iônicos que permitem a passagem de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Cl}^-$ . Os canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  voltagem-dependentes ( $\text{Na}_v$  e  $\text{K}_v$ ) apresentam papel importante na geração e propagação dos potenciais de ação, assim como os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem-dependentes ( $\text{Ca}_v$ ) são importantes na liberação de transmissores na região pré-sináptica (FEIN, 2011). Tais canais voltagem dependentes são alvos em potencial para o desenvolvimento de analgésicos e anestésicos. Os canais  $\text{Na}_v$  são divididos conforme sua sensibilidade em bloquear a tetrodotoxina e estão implicados na dor aguda inflamatória e neuropática. Os canais  $\text{Ca}_v$  apresentam papel importante na dor persistente e os canais  $\text{K}_v$  regulam a excitabilidade neuronal e podem levar à dor neuropática quando há atividade ectópica (DAS, 2015). No quadro 3 estão resumidos os principais canais iônicos e receptores nociceptivos térmicos, mecânicos e químicos encontrados em mamíferos.

Os corpos celulares dos neurônios sensoriais estão localizados no gânglio sensitivo dorsal. Suas extensões conduzem as informações aferentes do corpo até a medula espinal por meio do trato de Lissauer onde realizam sinapses com os neurônios das lâminas de Rexed localizadas na substância cinzenta do corno dorsal (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). A maioria das fibras nociceptivas C e A $\delta$  formam sinapses nas lâminas superficiais de Rexed I e II (substância gelatinosa), enquanto as fibras A $\beta$  e A $\delta$  de baixo limiar se projetam nas lâminas mais profundas III a V. O corno dorsal possui uma população grande de interneurônios excitatórios (75%) e inibitórios (25%), assim como em menor número neurônios de projeção que enviam as informações ao tronco encefálico e tálamo (PEIRS; SEAL, 2016). Há neurônios que respondem especificamente a estímulos nocivos e outros que respondem de forma gradativa a estímulos nocivos e não nocivos, denominados neurônios de faixa ampla dinâmica (WDR). A comunicação entre os neurônios do corno dorsal ocorre por meio de neurotransmissores excitatórios principalmente glutamato e aspartato ou inibitórios (ácido gama-aminobutírico - GABA) e neuropeptídeos tais como a substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), somatostatina e peptídeo

vasoativo intestinal (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

Quadro 3 - Principais canais iônicos e receptores nociceptivos térmicos, mecânicos e químicos encontrados em mamíferos

Classificação	Receptores/canais	Estímulo/mediador
Térmicos	TRPV 1	Capsaicina; calor (>43°C); baixo pH; bradicinina
	TRPV 2	Calor ( $\geq 52^{\circ}\text{C}$ )
	TRPV3	Calor (temperaturas inócuas entre 33 -35°C)
	TRPV4	Calor (temperaturas inócuas entre 27 -34°C); soluções hipotônicas; derivados de éster de forbol; ácido epoxieicosatriênicos
	TRPM3	Sulfato de pregnenolona; capsaicina
	ANO1	Calor ( $>44^{\circ}\text{C}$ )
	TRPA1	Componentes irritantes de semente da mostarda, wasabi, raiz forte, <i>wintergreen</i> , canela, alho, gases veiculares e lacrimogênio; bradicinina; formalina; frio ( $<17^{\circ}\text{C}$ )
	TRPM8	Mentol; frio ( $<26^{\circ}\text{C}$ )
Mecânicos	Canais Piezo 1/Piezo 2	Toque; pressão dolorosa
Químicos	5-HT	Serotonina
	B1/B2	Bradicinina
	EP	Prostaglandinas PGE <sub>2</sub>
	IP	Prostaciclina PGI <sub>2</sub>
	P2X2/P2X3	ATP; formalina
	P2Y1/P2Y2	ATP
	PAR1/PAR2/PAR4	Trombina; proteinases (triptase e tripsina); pH baixo
	Canais ASIC	pH baixo
	LPA	Ácido lisofosfatídico (plaquetas)
	Epac1	cAMP
	trkA	Fator de crescimento neural (NGF)
	Toll-like	Lesões teciduais e infecções
	GluR (AMDA; NMDA; cainato)	Glutamato
Iônicos	Nav; Kv; Cav; HCN	Despolarização

Fonte: SMITH; LEWIN (2009); FEIN (2011); DAS (2015).

A informação nociceptiva do corno dorsal é então transmitida aos centros supraespinais por meio de um dos muitos tratos ascendentes. O trato espinotalâmico recebe projeções neuronais das lâminas I, V, VI e VII que cruzam a linha média e percorrem a substância branca anterolateral até terminar no tálamo. Um grupo de axônios do trato espinotalâmico se projeta no núcleo talâmico lateral e apresentam um papel importante nos aspectos sensoriais discriminativos da dor. Outro grupo se projeta no núcleo talâmico medial e estão relacionados a dimensões afetivas e motivacionais da dor. A anatomia comparada demonstra que as espécies apresentam

fibras com densidades diferentes entre as projeções lateral e medial o que pode conferir aos animais domésticos capacidades menos refinadas quanto à caracterização e localização do estímulo nocivo, porém com respostas autonômicas e aversivas aumentadas (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000).

Os demais tratos correspondem aos seguintes: espinorreticular, espinomesencefálico, espinobraquial, espinohipotalâmico e espinocervical. Suas funções são diversificadas e dependem das estruturas e projeções neuronais envolvidas. Tais funções estão relacionadas à nocicepção, ao controle motor, aspectos afetivos-motivacionais e sensoriais-discriminativos da dor, respostas neuroendócrinas, autonômicas e modulatórias (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

As estruturas supraespinais envolvidas na nocicepção incluem o tronco encefálico (medula oblonga, ponte e mesencéfalo), diencéfalo (tálamo e hipotálamo) e córtex cerebral. O tálamo atua como um ponto subcortical de retransmissão da informação sensorial para o córtex cerebral. Os núcleos talâmicos recebem informações dos tratos espinotalâmico e trigeminal talâmico (informações sensoriais da cabeça). O sistema ativador reticular avalia todas as informações sensoriais e canaliza para o córtex e a substância cinzenta periaquedatal participa na via descendente modulatória da dor (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

As regiões corticais envolvidas na percepção da dor são as áreas somatossensoriais primária SI e secundária SII, o córtex cingulado anterior e o córtex insular. A atividade dos neurônios nociceptivos SI estão relacionados com a duração e intensidade do estímulo, assim como com a percepção deste último. Funcionalmente, a área SII pode estar envolvida em reconhecimento, aprendizado e memória de eventos dolorosos, porém em estudos com animais, poucos neurônios dessa área responderam a estímulos nocivos. A insula também pode ser relacionada com memória e aprendizado, assim como reações autonômicas. Por fim as funções da insula, podem estar relacionadas a respostas comportamentais imediatas devido a sua proximidade com outras áreas envolvidas nas respostas nociceptivas, motoras e cognitivas (SCHNITZLER; PLONER, 2000).

A percepção da dor pode ser suprimida pelo sistema inibitório descendente que envolve estruturas como a substância cinzenta periaquedatal (SCP), o locus ceruleus (LC) e o bulbo rostroventromedial (RVM). A SCP constitui um centro crítico no controle

da percepção da dor, quando ativada provoca analgesia por meio de suas projeções que enviam estímulos ao bulbo RVM ou LC. Os axônios do bulbo RVM via funículo dorsolateral liberam neurotransmissores no corno dorsal da medula espinal e modulam as informações que chegam aos neurônios de segunda ordem. Normalmente, as projeções da SCP estão inibidas pelo GABA produzido pelos interneurônios gabaérgicos ativos e em momentos de perigo ou estresse as encefalinas produzidas por outro grupo de interneurônios desinibem as projeções da SCP. A ação analgésica decorrente da ativação do LC envolve a liberação de noradrenalina. Outras substâncias endógenas também estão envolvidas no sistema descendente como a serotonina, dopamina, endocanabinoides e opioides endógenos (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000; OLIVEIRA; SILVA, 2009; FEIN, 2011).

### **2.3.1 Dor patológica**

Os conceitos apresentados nos auxiliam a entender os mecanismos gerais sobre nocicepção e dor fisiológica, porém na maioria dos eventos encontrados na prática clínica, os estímulos nocivos não são momentâneos e podem estar relacionados a inflamação tecidual e lesões nervosas. As respostas do organismo decorrentes da lesão levam a um quadro clínico de dor patológica caracterizado por desconforto contínuo e sensibilidade anormal (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). A hiperalgesia (aumento exagerado da resposta aos estímulos dolorosos) e a alodinia (resposta dolorosa a um estímulo que geralmente não causa dor) podem ser considerados mecanismos de proteção do organismo frente a lesão enquanto o processo de cicatrização acontece, porém quando tais mecanismos persistem além do esperado, a dor torna-se patológica (FEIN, 2011).

### **2.3.2 Hipersensibilidade**

Estímulos nocivos intensos que causam danos teciduais frequentemente desencadeiam sensibilidade excessiva no local. A hipersensibilidade é caracterizada por aumento da sensibilidade no local da lesão e nos tecidos próximos mediados pela sensibilização de nociceptores periféricos (primária) e sensibilização central (secundária), respectivamente. A hipersensibilidade primária envolve sensibilização a estímulos mecânicos e térmicos devido à exposição dos nociceptores aos tecidos

lesionados ou inflamados. Já a hipersensibilidade secundária é caracterizada pela sensibilidade a estímulos mecânicos somente, em decorrência de alterações nos mecanorreceptores de baixo limiar que passam a transmitir informações dolorosas (FEIN, 2011).

Diferentes mecanismos podem explicar a sensibilização central, por exemplo no corno dorsal, a hipersensibilidade é causada em parte pelo aumento das respostas dos neurônios nociceptivos específicos e dos neurônios WDR a estímulos mecânicos. Outro mecanismo que explica a hipersensibilidade central é o aumento da sensibilidade dos neurônios de projeção que levam a informação da medula espinal ao cérebro. O *wind-up* é o aumento progressivo da resposta dos neurônios do corno dorsal causado por estímulos de baixa frequência e repetitivos disparados por fibras C o que leva ao aumento da liberação de glutamato ou substância P. A ativação dos receptores AMPA e NMDA e a desinibição dos receptores mediados por glicina e GABA também participam na sensibilização central (teoria do portão) (BASBAUM et al., 2009; FEIN, 2011).

### **2.3.3 Dor inflamatória**

A inflamação é uma resposta protetora do organismo frente a um agente estranho que tem a função de eliminar a causa inicial da lesão e promover a reparação tecidual. Os sinais cardinais da inflamação são calor, rubor, tumor (edema), dor e perda da função. As primeiras respostas, calor, rubor e edema têm a função de facilitar a remoção do agente por meio do aumento do fluxo de líquidos intersticiais e migração células de defesa (neutrófilos). A dor aguda é causada pela ativação dos receptores nociceptivos que inervam o local da lesão pelos mediadores inflamatórios (FERREIRA et al., 2009; JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

Os mediadores inflamatórios são liberados de forma sequencial e podem ser divididos em intermediários, liberados no início e durante a inflamação, e os hiperalgésicos finais, responsáveis pela sensibilização dos neurônios aferentes primários. Os principais mediadores intermediários pró-inflamatórios são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-8 que por sua vez ativam os mediadores finais formados pelos eicosanoides (prostaglandinas e prostaciclinas) e aminas simpatomiméticas (noradrenalina, adrenalina e dopamina). Há também a liberação de bradicinina, fatores do complemento (C3a e C5a), leucotrienos, fator de

agregação de plaquetas, histamina e serotonina responsáveis pela hiperalgesia inflamatória (FERREIRA et al., 2009). Há uma interação entre as diferentes partes do nociceptor, desde a periferia até a medula espinal, com diferentes tipos de células, entre elas, os macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e células da glia (centrais e periféricas) entre outras. As bactérias, vírus e fungos também estão associados com a dor inflamatória tanto de forma indireta por meio da ativação dos mediadores inflamatórios como diretamente por meio de liberação de toxinas, LPS e ativação de receptores Toll-like (TLRs) (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

Quanto à dor inflamatória crônica, a neuroplasticidade é considerada o mecanismo chave para o desenvolvimento e manutenção da dor crônica. A sensibilização periférica nos nociceptores é essencial para a transição da dor aguda para a crônica e a sensibilização central regula sua cronicidade, difunde a dor para outros locais além do sítio da lesão e influencia seus aspectos emocionais e afetivos (JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016). A dor crônica está presente em diversas patologias como câncer e osteoartrite e pode estar presente em uma proporção variável de pacientes que passaram por procedimentos cirúrgicos. Alguns fatores como genética, sexo, idade e eventos predisponentes podem estar associados à instalação do quadro (MOGIL; BAILEY, 2010; MCKUNE et al., 2017). Em pacientes humanos, há incidência da transição entre dor aguda e dor operatória persistente após amputações (30-85%), toracotomias (5-67%), mastectomias (11-57%) e reparos de hérnias inguinais (0-63%) entre outros exemplos (GULUR; NELLI, 2019).

#### **2.3.4 Dor neuropática**

A dor neuropática pode ser o resultado de uma lesão do sistema nervoso periférico ou central, sendo caracterizada por sensação persistente de queimação, perda parcial ou local da sensibilidade, alodinia e hiperpatia. De uma forma simplificada, lesões nos nervos periféricos provocam diversas alterações na função e fenótipo das fibras lesionadas, porém uma propriedade importante da dor neuropática é a geração ectópica de potenciais de ação sem qualquer estímulo. Essas atividades ectópicas causam dor espontânea e plasticidade no corno dorsal e cérebro que constituem a base das características clínicas da dor neuropática como por exemplo a alodinia (DAS, 2015). Outro mecanismo envolvido na dor neuropática seria o eixo prostaciclina/IL1 $\beta$  expressos por macrófagos, demonstrado em um estudo com

camundongos *knockout* para prostaciclina, no qual esses animais apresentaram reduzido comportamento relacionado a dor após lesão no nervo ciático (SCHUH et al., 2014). Além disso, linfócitos T, micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e ativação de TLR4 contribuem para o desenvolvimento e manutenção da inflamação e dor neuropática, assim como a hiperalgesia induzida por opioides (RAGHAVENDRA; RUTKOWSKI; DELEO, 2002; JI; CHAMESSIAN; ZHANG, 2016).

## 2.4 RESPOSTAS SISTÊMICAS AUTONÔMICAS E NEUROENDÓCRINAS

A dor visceral, somática, inflamatória e outros agentes estressores ativam diferentes sistemas interligados do organismo de forma coordenada com o objetivo de manter sua integridade fisiológica. O cérebro responde imediatamente a um estressor físico por meio de mecanismos reflexos, assim como a estressores psicogênicos baseados em uma experiência anterior (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A resposta imediata é realizada pela ativação do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) que provoca alterações fisiológicas rápidas e posteriormente, pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA). De forma geral, a ativação do sistema nervoso simpático promove aumento da frequência cardíaca e da força de contração, vasoconstrição periférica e mobilização de energia. O córtex da adrenal é inervado pelo sistema simpático que regula a liberação de corticosteroides. O parassimpático também é ativado durante o estresse para modular as respostas do simpático. Do eixo HPA, em reposta ao agente estressor, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina. A liberação destes hormônios atua na pituitária com a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que por sua vez ativa a síntese e liberação de glicocorticoides (corticosterona) pela adrenal. Os glicocorticoides mobilizam a energia armazenada e potencializam os efeitos do sistema simpático (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; JAGGI et al., 2011).

Os efeitos da resposta aguda ao estresse constituem uma adaptação do organismo para restabelecer a homeostasia, entretanto quando o agente estressor persiste, os efeitos se tornam prejudiciais para o paciente (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). A exposição crônica ao estresse induz alterações na estrutura e funções das regiões do cérebro (i.e., neuroplasticidade) envolvidas no controle das respostas do sistema nervoso autônomo e do eixo HPA. As alterações incluem aumento da expressão dos hormônios CRH e vasopressina, redução da expressão

dos receptores de glicocorticoides, alterações em neurotransmissores, incluindo aumento da expressão de GABA e sensibilização do sistema simpático e do eixo HPA (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

## 2.5 MODELOS MURINOS DE NOCICEPÇÃO E DOR

Os modelos de nocicepção e dor são amplamente utilizados para o melhor entendimento da anatomia, fisiologia, mecanismos celulares, moleculares e mediadores implicados na dor aguda e persistente. O conhecimento destes mecanismos permite o desenvolvimento de estratégias farmacológicas e não farmacológicas para o manejo adequado da dor em animais e humanos. A maioria dos modelos foram desenvolvidos em ratos e camundongos e consistem em estudar as repostas a estímulos nocivos breves e repostas a estímulos nocivos persistentes (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009). Em geral, os modelos avaliam respostas motoras básicas (e.g. retirada da cauda), reações neurovegetativas (e.g. taquicardia, hipertensão arterial) ou respostas comportamentais mais complexas (e.g. fugir de estímulo aversivo, agressividade ou alterações no comportamento social) (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Nos modelos de dor aguda, o estímulo para ser adequado deve ser quantificável, reproduzível e não-invasivo. Os estímulos utilizados podem ser elétricos, térmicos, mecânicos ou químicos; podem ser pontuais ou progressivos; e devem ser aplicados mediante um limiar de tempo máximo que gere uma resposta sem causar lesões teciduais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os modelos de dor aguda são amplamente utilizados para avaliar o potencial analgésico de drogas novas. Por outro lado, os modelos de dor persistente são utilizados para atender à necessidade por métodos que induzem estados dolorosos mais clinicamente relevantes, como os modelos de dor inflamatória e neuropática (BARROT, 2012). No quadro 4, estão apresentados os principais testes e modelos murinos para avaliar ou estudar dor aguda e persistente.

Quadro 4 - Principais modelos murinos utilizados para estudos dor aguda e persistente e o tipo de estímulo

<b>Classificação (dor)</b>	<b>Teste ou modelo</b>	<b>Tipo de estímulo</b>
Dor aguda (fásica)	Teste de retirada da cauda ( <i>tail-flick</i> ); teste de retirada da pata; teste da placa quente	Térmico de curta duração (calor radiante; imersão em água quente; placa aquecida; frio)
	Teste de Randall & Selitto	Mecânico de curta duração (aumento gradual da pressão na pata posterior e na cauda antes e após injeção de substâncias irritantes)
	Teste de retirada da cauda e da pata	Elétrico de curta duração (estímulos elétricos por eletrodos subcutâneos na cauda; gaiolas com o piso eletrificado)
	Estimulação da polpa dentária	Elétrico de curta duração
	Estimulação dos membros pélvicos	Elétrico de curta duração
Dor aguda (tônica)	Injeções intradérmicas de substâncias irritantes na pata	Químico (formalina; solução salina hipertônica; ácido acético; adjuvante completo de Freund; capsaicina; veneno de abelha; carragenina)
	Dor pós-operatória	Mecânico (incisões na pele, fáscia e músculos de diferentes regiões)
	Injeção intraperitoneal de substâncias irritantes ( <i>Writhing test</i> )	Químico (acetilcolina; ácido acético; ácido hidroclórico; bradicinina; adrenalina; ATP; cloreto de potássio; triptamina; ocitocina)
	Injeção de substâncias irritantes e distensão de órgãos ocos (estômago; duodeno; jejuno; cólon; reto; pelve renal; ureter; bexiga; útero)	Químico (formalina; glicerol; capsaicina; óleo de mostarda; ácido acético; turpentina; zimosan) Mecânico (balão inflável)
Dor inflamatória crônica	Artrite reumatoide; osteoartrite	Químico (artrite induzida por colágeno; injeção de caulim/carragenina; zimosan; adjuvante completo de Freund) Mecânico (transecção ou ruptura do ligamento cruzado anterior ou do menisco)
Dor neuropática	Neuropatia (periférica ou central)	Mecânico (lesão traumática parcial ou completa dos nervos ciático, infraorbital ou trigeminal); Químico (quimioterápicos; terapia anti-HIV; estreptozotocina) Biológico (herpes vírus)
Dor persistente	Dor muscular	Químico (injeção intramuscular de substâncias irritantes)
	Dor orofacial	Químico (formalina)
	Dor de cabeça; enxaqueca	Químico (neuropeptídios) Mecânico (traumatismo)
	Câncer	Químico Biológico (células cancerígenas)

Fonte: LE BARS; GOZARIU; CADDEN (2001); VISSERS et al., (2003); Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals (2009); BARROT (2012); BURMA et al. (2017); POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN (2018); REA et al. (2018).

## 2.6 RECONHECIMENTO DA DOR EM ROEDORES

O reconhecimento da dor em animais deve ser realizado por pessoal capacitado e experiente e pode ser estimado por meio da avaliação dos sinais clínicos e comportamentais.

A analogia de que determinado procedimento doloroso em humanos também poderá causar dor em animais é uma ferramenta útil a ser adotada em diferentes ocasiões na experimentação com animais, particularmente na avaliação de protocolos pelos Comitês de Ética e na rotina dos biotérios quando não é possível reconhecer se um animal está em sofrimento. Essa situação pode ocorrer nos camundongos que naturalmente evitam demonstrar alterações no comportamento quando estão com dor. Porém, deve-se atentar que a dor é sempre subjetiva e influenciada por diferentes fatores e experiências individuais (RAJA et al., 2020). Os principais fatores que podem afetar o comportamento relacionado à dor nos animais podem ser divididos em fatores internos como as particularidades da linhagem, sexo, idade e reação ao estresse e fatores externos como dieta, condições ambientais e manipulação, entre outros (VISSERS et al., 2003). Em um estudo que avaliou o consumo de analgésicos em camundongos após laparotomia demonstrou que os animais alojados em grupo e em um ambiente enriquecido consumiram menor quantidade de analgésicos do que aqueles alojados individualmente e sem enriquecimento. Segundo os autores os fatores sociais e ambientais influenciaram na necessidade do alívio da dor (PHAM et al., 2010).

Na prática, para avaliar o bem-estar em camundongos e ratos, utiliza-se indicadores baseados no comportamento, parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Os principais indicadores comportamentais são a autolimpeza (*grooming*), apetite, atividade em geral, agressividade, expressões faciais, vocalização, aparência, postura e reação ao manuseio. Os parâmetros fisiológicos mais utilizados são temperatura, pulso, respiração, perda de peso, quantificação e morfologia das células do sangue, função cardíaca e pressão sanguínea. E os bioquímicos, podem ser avaliados por meio da dosagem de corticosterona, catecolaminas, tiroxina, prolactina, endorfinas, glucagon, insulina etc. (CARSTENS; MOBERG, 2000).

Tais indicadores podem apresentar diferenças dependendo do estágio da dor em que o animal se encontra, por exemplo na dor aguda os animais demonstram aumento de determinados comportamentos como marchar de forma anormal, alongar

o corpo, lamber o ferimento, contrair os músculos e arquear as costas, cambalear, cair, contrair os músculos do abdômen e pressionar o abdômen contra o piso. Por outro lado, movimentos como levantar o corpo (*rearing*), cavar, andar (distância percorrida) e consumir água e alimentos apresentam-se reduzidos. A frequência de autolimpeza (*grooming*) pode aumentar ou permanecer igual quando comparado com animais controle, porém o comportamento apresenta-se anormal, limitado à região dolorosa (WRIGHT-WILLIAMS et al., 2007; ROUGHAN; WRIGHT-WILLIAMS; FLECKNELL, 2009; WRIGHT-WILLIAMS; FLECKNELL; ROUGHAN, 2013; WHITTAKER; HOWARTH, 2014; MILLER et al., 2016; ROUGHAN; BERTRAND; ISLES, 2016). O animal também pode vocalizar ao ser manuseado, porém a ausência desse comportamento não significa que o animal não está com dor uma vez que os roedores emitem vocalizações ultrassônicas que são inaudíveis ao ser humano (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009; HECKMAN et al., 2016). Quanto aos sinais relacionados à dor persistente, o animal pode apresentar postura anormal, aparência suja, relutância em se movimentar, padrão de sono anormal, automutilação, inapetência, isolamento social e aumento da secreção porfirínica, esta última observada somente em ratos (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009).

Além desses indicadores, pode-se avaliar o comportamento por meio das expressões faciais com o uso da escala *Grimace* adaptada para animais, na qual alterações faciais causadas pela dor podem ser observadas pela posição das orelhas, pálpebras, focinho, bochechas e bigodes (MATSUMIYA et al., 2012; MILLER; LEACH, 2014, 2015). Há muitos outros métodos que podem ser utilizados para reconhecimento da dor em roedores, por exemplo: pelo comportamento operante, no qual o animal é treinado a pressionar uma barra para receber uma recompensa ou no caso de estudos de dor, o animal recebe um analgésico; pela mensuração da atividade em discos de corrida; pelo comportamento de cavar buracos, túneis e construir ninho; por monitoramento do comportamento na própria gaiola sem interferências realizado de forma automatizada por um software; pela avaliação da marcha em condições clínicas que afetam o movimento como artrite, inflamação na pata ou dor neuropática; em câmaras de aversão e preferência condicionada utilizada para avaliar os componentes motivacionais da dor e do alívio; e pelo *grooming transfer test*, no qual uma substância fluorescente é colocada no dorso do animal para avaliar o

comportamento de autolimpeza (TAPPE-THEODOR; KING; MORGAN, 2019; TURNER; PANG; LOFGREN, 2019).

Baseados nesses indicadores pode se estabelecer escalas de dor adequadas para a espécie e para a gravidade do procedimento ou do modelo. Os métodos e indicadores podem ser agrupados em planilhas e pontuações designados de acordo com a severidade. Por exemplo, um determinado modelo pode ser avaliado com as seguintes informações: atividade em geral, aparência externa, temperamento, vocalização, alterações no consumo de água e alimentos, alterações fisiológicas e avaliação da ferida cirúrgica. O avaliador então pontua cada item e a soma total dos pontos obtidos auxilia na tomada de decisão quanto ao manejo da dor ou ponto final humanitário (STASIAK et al., 2003; RIX et al., 2020). As escalas de severidade devem incluir parâmetros de acordo com o modelo utilizado durante todo o curso do procedimento por meio do grau de dor, sofrimento, distresse ou danos permanentes que o animal pode experinciar (SMITH et al., 2018). De acordo com a diretiva europeia 2010/63/EU, as categorias de severidade são classificadas em: terminal, na qual os procedimentos são realizados sob anestesia geral e o animal não retoma a consciência; leve, na qual o procedimento possivelmente causará dor, distresse ou sofrimento leve de curta duração sem impactos significativos no bem-estar ou nas condições gerais do animal; moderado, na qual o procedimento possivelmente causará dor, distresse ou sofrimento moderado de curta duração com impactos moderados no bem-estar ou nas condições gerais do animal; e severo, na qual o procedimento possivelmente causará dor, distresse ou sofrimento severo ou moderado de longa duração com impactos severos no bem-estar ou nas condições gerais do animal (SMITH et al., 2018).

## 2.7 MANEJO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA

O manejo analgésico da dor pós-operatória em roedores deve considerar o uso combinado de métodos farmacológicos e medidas elaboradas para reduzir o estresse. O manejo adequado do animal em todas as etapas do procedimento experimental minimiza a interferência de fatores que podem afetar a gravidade da dor e seu reconhecimento, como por exemplo período de recuperação da anestesia prolongado devido a escolha do agente anestésico, hipotermia, complicações intra ou pós-operatória, estresse e medo (FLECKNELL, 2018). O uso de analgésicos após

procedimentos experimentais é geralmente aceito entre os pesquisadores, porém o uso inadequado de analgésicos é motivo de preocupação em decorrência de efeitos adversos clínicos aparentes e interações específicas entre as drogas e o modelo animal em particular envolvido no estudo (RICHARDSON; FLECKNELL, 2005). Dessa forma, o protocolo analgésico deve incluir a escolha cuidadosa das drogas anestésicas e analgésicas, dose, via de administração, frequência e tempo de tratamento, além de um esquema de monitoramento adequado para cada animal (JIRKOF, 2017).

### **2.7.1 Métodos não-farmacológicos**

As formas de intervenções não-farmacológicas incluem eletroestimulação, acupuntura, aplicação local de calor e frio, massagens e mobilização de articulações, aplicação de laser e atividades físicas. Porém, o uso dessas técnicas apresenta algumas limitações em animais de laboratório, uma vez que muitas dessas técnicas exigem treinamentos específicos, além disso a manipulação do animal pode ser mais um fator de estresse. Outras medidas podem ser consideradas para melhorar o conforto em roedores, por exemplo disponibilizar material mais macio e em maior quantidade para a cama, material para ninho e outras formas de enriquecimento, fontes de alimento alternativos, reduzir a intensidade de luz, aquecer o ambiente, música etc., assim como fluidoterapia e tratamento da ferida podem ser utilizados como medidas de suporte (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009; FLECKNELL, 2009, 2018; PHAM et al., 2010; VACHON et al., 2013; MCKUNE et al., 2017; DOERNING et al., 2018).

### **2.7.2 Métodos farmacológicos**

A abordagem farmacológica pode ser baseada na intensidade da dor conforme o quadro 5. A antecipação do potencial da dor é uma ação importante para o estabelecimento de uma abordagem adequada tanto para sua prevenção como para o manejo. A dor experienciada pelo animal pode ser reduzida por meio de uma estratégia preventiva ou terapêutica ou a combinação das duas (Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, 2009).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) possuem ação inibitória sobre as enzimas ciclooxigenases (COX), alterando a formação das prostaglandinas. Os principais AINEs sugeridos para uso em ratos e camundongos são: aspirina, carprofeno, diclofenaco, flunixina meglumina, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meloxicam e acetaminofeno. Devem ser administrados com cautela por apresentarem potencial para lesões gastrointestinais, renais e hepáticas, podem acelerar a degradação de cartilagens e possuem efeitos sobre a coagulação sanguínea (FLECKNELL, 2009; PAPICH; MESSENGER, 2017).

Quadro 5 – Manejo farmacológico conforme a intensidade da dor

<b>Intensidade da dor</b>	<b>Abordagem farmacológica</b>
Leve	Terapia unimodal é aceitável; AINEs, anestesia local infiltrativa ou opioide agonista-antagonista
Moderada	Analgesia multimodal a ser considerada; AINEs em associação com anestesia local, opioide agonista-antagonista, tramadol, $\alpha_2$ -agonista, NMDA antagonista
Severa	Analgesia multimodal recomendada; $\mu$ -opioide agonista + um ou mais das seguintes: AINEs, anestesia local, $\alpha_2$ -agonista, droga antiepileptica, NMDA antagonista; Técnicas analgésicas avançadas: administração epidural de anestésicos locais com ou sem opioides e taxa de infusão contínua

Fonte: Adaptado de Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals (2009).

Legenda: AINEs= anti-inflamatórios não esteroides.

Os opioides são substâncias lipofílicas não derivadas do ópio que atuam nos receptores opioides  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta). No sistema nervoso central possuem efeito de analgesia, sedação e antitussígeno. Os opioides podem ser classificados em agonistas  $\mu$  completos (e.g. morfina, fentanila, metadona, meperidina), agonistas parciais e agonistas-antagonistas (e.g. buprenorfina, butorfanol) e o tramadol que possui mecanismos diferentes de atuação por meio do seu metabólito M1 (KUKANICH; WIESE, 2017).

As drogas  $\alpha_2$ -agonistas atuam nos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e proporcionam sedação, analgesia e relaxamento muscular. As principais drogas  $\alpha_2$ -agonistas utilizadas em roedores são a xilazina e medetomidina. As drogas NMDA antagonistas possuem o potencial de reverter a hipersensibilização central, sendo que a cetamina é amplamente utilizada na experimentação com roedores (FLECKNELL, 2009; RANKIN, 2017).

## 2.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O uso de animais na investigação científica vem de longa data. Na Grécia antiga, Aristóteles (384 a.C.-322 a.C.) descreveu mais de 500 espécies de animais em suas obras. Muitos outros estudos sobre anatomia, fisiologia e medicina experimental foram conduzidos durante séculos, porém sem muita consideração com o bem-estar dos animais. René Descartes (1595-1650) introduziu a teoria de que os animais eram máquinas e assim justificava a prática de experimentos cruéis em animais vivos (FEIJÓ, 2005). Entretanto, os defensores antiviviseccionistas também estavam presentes em muitos momentos da história da experimentação animal. Jeremy Bentham (1748-1832) em sua obra *An Introduction to the Principles of Morals and Legislation*, colocou os animais como seres sensíveis e em condição de igualdade com outros seres passíveis de sofrimento (FEIJÓ, 2005). No século XIX, a teoria da evolução de Charles Darwin foi um marco na história da Ciência por equiparar homens e animais baseados nos seus princípios da variação, hereditariedade e da luta pela existência, logo as considerações morais reservadas somente aos homens até então, também deveriam ser aplicadas aos animais (RIVERA, 2002; FEIJÓ, 2005).

Charles Hume fundou em 1926 a sociedade londrina para o bem-estar animal (*University of London Animal Welfare Society – ULAWS*) mais tarde nomeada como *Universities Federation for Animal Welfare – UFAW*. Seu principal objetivo, que permanece até os dias atuais, foi a promoção do bem-estar dos animais por meios educacionais. Foi Hume que na década de 50 nomeou os pesquisadores Willian Russell e Rex Burch em um estudo sistemático sobre os aspectos éticos das técnicas de experimentação animal que resultou em 1954 na publicação dos princípios humanitários conhecidos como os 3Rs, do inglês, *replacement* (substituição), *reduction* (redução) e *refinement* (refinamento). O princípio dos 3Rs preconiza a substituição de animais por métodos validados; a redução do número de animais a um mínimo necessário para alcançar os objetivos científicos quando não há a possibilidade de substituição; e o refinamento das técnicas com o objetivo de promover o bem-estar dos animais. Neste último, Russell e Burch consideraram a anestesia como um dos maiores avanços na humanização das técnicas e ao mesmo tempo indispensável para o avanço da biologia experimental (CLUTTON, 2020).

Na década de 60 foram elaboradas as Cinco Liberdades com o intuito de promover o bem-estar de animais de produção por meio da avaliação de experiências

subjetivas, estado de saúde e comportamento. As Cinco Liberdades são atendidas quando o animal está livre de (1) sede, fome e mal nutrição; (2) desconforto; (3) dor, lesão e doença; (4) medo e distresse; e (5) é livre para expressar seu comportamento normal (MELLOR, 2016). Mais tarde, tais preceitos alinhados com os princípios dos 3Rs, também foram aplicados aos animais de laboratório (WELLS; NICHOLSON, 2004). Além dos conceitos das Cinco Liberdades e dos 3Rs, alguns autores sugerem que deve existir um equilíbrio entre experiências positivas e negativas de forma que o animal tenha uma vida que valha a pena ser vivida, uma vez que algumas experiências negativas são essenciais para desencadear comportamentos dos quais a sobrevivência do animal depende (MELLOR, 2016).

Quando se discute a questão ética sobre o uso de animais na pesquisa, testes pré-clínicos ou ensino e o potencial de dor ou sofrimento que determinados procedimentos causam nos animais, deve-se considerar que a dor apresenta dimensões que são percebidas de formas diferentes entre humanos e animais. A primeira dimensão sensorial-discriminativa relacionada ao entendimento do local, tipo, intensidade e duração do estímulo nocivo parece ser mais limitada em animais. Já a dimensão afetivo-motivacional relacionada às respostas de fugir do perigo parecem ser mais desenvolvidas nos animais como uma forma de compensar a limitação da primeira. Assim, como o animal aparentemente não consegue entender os riscos do perigo como os humanos, sua resposta de fuga é muito maior e consequentemente, seu sofrimento é maior quando não consegue fugir desse perigo (FEIJÓ, 2005). Além disso, a capacidade cognitiva do ser humano é tal que permite valorizar metas a longo prazo e enfrentar experiências negativas com o propósito de atingir os benefícios futuros ou possibilidades. Como isso parece não acontecer com os animais, podemos inferir que a dor pode ser muito pior nos animais, uma vez que eles não conseguem vislumbrar uma vida futura sem dor (ROLLIN, 2011). Por exemplo, um animal não consegue pesar os possíveis benefícios de um tratamento longo e doloroso para câncer ou entender que a amputação de um membro irá prevenir metástases. Para os animais importa a qualidade de vida, ou seja, se tal experiência é prazerosa ou não, se eles estão com medo ou não, com fome/sede ou não, com dor ou não etc. (ROLLIN, 2011).

Por fim, o tratamento ético dos animais de laboratório é responsabilidade do pesquisador e de todos os envolvidos no processo. Deve-se prover o manejo adequado dos animais respeitando as particularidades da espécie de forma que seu

bem-estar, alinhado com resultados de qualidade e reproduzíveis sejam as metas das pesquisas que envolvam animais.

## CAPÍTULO 1

**Assessment of general activity and anxiety-like behavior in mice following tramadol and meloxicam administration as pre-emptive analgesia for managing immediate post-operative pain**

## HIGHLIGHTS

- The Open-Field test can be used for the evaluation of analgesics in the mouse.
- The Elevated Plus Maze can be used for the evaluation of analgesics in the mouse.
- Tramadol did not interfere with locomotor and exploratory activity.
- Meloxicam reduced locomotor and exploratory activity.
- Adequate analgesia should be applied for pain management post-surgery.

## ABSTRACT

We evaluated general activity in the Open -Field and anxiety-like behavior in the Elevated Plus Maze of vasectomized mice after analgesic administration. We divided C57BL/6J male mice into eight groups: saline control, three non-operated control groups treated with analgesics, and four groups of vasectomized mice treated with the same analgesic protocol as the control groups. Mice received 10 mg/kg meloxicam, 20 mg/kg tramadol, or both intraperitoneally 30 minutes before procedures. One group of vasectomized mice received an additional 10 mg/kg lidocaine at the incision site. We conducted the vasectomy via scrotal approach under isoflurane inhalation anesthesia and performed behavioral tests after full anesthesia recovery. Non-operated mice received meloxicam and demonstrated low ambulation activity, low rearing frequency, and unresponsiveness. Mice treated with tramadol showed spontaneous behavior compared with the saline control. Vasectomized mice administered with meloxicam presented low spontaneous activity and rearing frequency. Due to behavior changes demonstrated by controls, we were unable to define whether meloxicam provided adequate analgesia. Vasectomized mice treated with tramadol showed general activity behavior similar to their control but displayed significantly less rearing, suggesting that they expressed potential signs of pain or discomfort. Briefly, the Open Field test and the Elevated Plus Maze can usefully pre-evaluate analgesic protocols to identify

possible interference caused by adverse drug effects. Meloxicam caused adverse effects on mice behavior and tramadol was not efficient for pain management post-vasectomy. For future directions, research should investigate adequate doses of meloxicam and tramadol along with multimodal analgesia for enhancing mice postoperative welfare.

**Keywords:** Animal welfare, opioids, non-steroidal anti-inflammatory agents, multimodal treatments, adverse effects.

## 1 INTRODUCTION

Pain is responsible for important physio pathological effects, which undermine animal welfare and research results. Pain management after surgeries in laboratory animals should pursue legal and ethical principles as well as replicable and reliable results (Jirkof, 2017). Therefore, it is necessary to implement effective analgesic protocols and appropriate methods to identify and evaluate pain in experimental animals (Turner et al., 2019).

Thus, we can determine pain by observing clinical and physiological parameters, such as weight loss, food intake, body posture, corticosterone levels, and facial expressions (Bourque et al., 2010; Langford et al., 2010; Roughan and Flecknell, 2003; Wright-Williams et al., 2013). Also, the Open-Field test and the Elevated Plus Maze have been used to evaluate the effects of anesthesia and analgesia protocols in mice after experimental procedures (Hankenson et al., 2011; Tubbs et al., 2011). Those tests measure exploratory behavior, different types of motor parameters in an unknown environment, and evaluates mice anxiety-like behavior based on their natural aversion for open and elevated areas (Komada et al., 2008; Lister, 1990; Seibenhener and Wooten, 2015).

Mouse-assisted reproduction is used to develop transgenic animals, rederive infected strains, and cryopreserve embryos (Ittner and Götz, 2007; Reetz et al., 1998; Wayss et al., 2005). Surgical procedures that potentially promote pain and distress, such as vasectomy, are applied for those purposes. Some authors have tested the

vasectomy in mice to assess pain, establishing analgesia protocols, and providing technical refinement (Leach et al., 2012; Miller et al., 2016, 2012).

Among the analgesic drugs, tramadol and meloxicam efficacy have been evaluated in mice (Flecknell, 2018; Rätsep et al., 2013). Tramadol is a centrally-acting mu-opioid agonist for managing moderate to severe pain in several species (KuKanich and Wiese, 2017). Tramadol associated with other drugs, as nonsteroidal anti-inflammatories (NSAIDs), is recommended to maximize its antinociceptive activity (Isiordia-Espinoza et al., 2012; Zhang et al., 2011). Meloxicam is an enolic acid-derived NSAID that preferentially inhibits cyclooxygenase-2 (COX-2), thromboxane, and prostaglandin with excellent antipyretic and analgesic activity (Noble and Balfour, 1996).

This study aimed to assess the effects of tramadol and meloxicam treatment in mice as a pre-emptive form for post-vasectomy immediate pain management. We applied the Open Field test (OFT) for general activity and the Elevated Plus Maze (EPM) for anxiety-like behavior. Adequate pain management with different drugs treatment can promote refinement in laboratory animal science. We expected that animal behavior alterations caused by painful experimental procedures could be a tool to identify animal suffering. Moreover, we observed that most pain studies described the antinociceptive effect of analgesics but disregarded how these drugs affected animals' general behavior.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 MICE HUSBANDRY

We obtained C57BL/6J male mice aging 8-12 weeks and weighing 25-30 g from the animal facility of the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. The mice were specific pathogen-free following the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) recommendations (Mähler et al., 2014). We acclimatized the mice for two weeks before starting behavioral experiments in the animal facility of the Department of Pathology, School of the Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (FMVZ/USP), Brazil. Animals were housed in groups (five per cage) in polypropylene cages (28 x 17 x 12 cm) with autoclaved corn cob (Granja RG, Suzano, SP, Brazil) as

bedding and paper towels as nesting materials. Room conditions were controlled: temperature  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , air changes 15-20/hour, and humidity  $55 \pm 5\%$ . Artificial lighting was on in a 12/12-hour light/dark cycle (lights on at 7 am). Animals had unrestricted access to filtered and autoclaved water and autoclaved commercial pellets formulated according to the AIN-93M rodent diet (Nuvilab, Quimtia, Parana, Brazil).

## 2.2 ETHICS STATEMENT

The Institutional Animal Care and Use Committee approved protocol number 3582200217 (FMVZ-USP) for the experimental study. We followed the Brazilian guidelines established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), similar to those in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council. The experiments were performed under proper laboratory practice protocols.

## 2.3 EXPERIMENTAL GROUPS AND PROCEDURES

We randomly divided sixty-four male mice into eight groups ( $n = 8$ ): saline control, three non-operated mice treated with analgesics, and four vasectomized mice treated with analgesics. Table 1 presents abbreviation and group treatments. We used the software G\*Power 3.1.9.3 to calculate sample size,  $\alpha=0.005$ , minimum detectable difference=0.5, power=0.9 (90%). Sample size ( $n$ )= 8 mice/group, number of groups=8, thus,  $N=8\times8= 64$  procedures.

Table 1 - Abbreviation used for each group following analgesic administration and procedure along with the number of mice per group

<b>Group</b>	<b>Treatment</b>	<b>n</b>
CTR	Saline control	8
T20	Non-operated treated with tramadol 20 mg/kg	8
M10	Non-operated treated with meloxicam 10 mg/kg	8
T20M10	Non-operated treated with tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg	8
VM10	Vasectomized mice treated with meloxicam 10 mg/kg	8
VT20	Vasectomized mice treated with tramadol 20 mg/kg	8
VT20M10	Vasectomized mice treated with tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg	8
VT20M10L	Vasectomized mice treated with tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg + lidocaine 10 mg/kg	8
<b>Total</b>	-	<b>64</b>

Source: ANTIORIO (2021).

## 2.4. VASECTOMY

Anesthesia was induced in an anesthetic chamber (Harvard Apparatus Anesthetic Vaporizer, Cambourne, UK) with 4% isoflurane (Isoforine® 100% solution, Cristalia, Itapira, Sao Paulo, Brazil) in oxygen (4 L/min) and maintained using a facemask with 2% oxygen (1 L/min). Preoperative skin preparation was performed using 1% povidone-iodine solution (Riodeine Degermante, Rioquimica, Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil). Mice were shaved with a razor. Surgery began after the loss of the pedal reflex. The VTML group received lidocaine hydrochloride (Xylestesin® 2% injectable solution, Cristalia, Itapira, Sao Paulo, Brazil) by subcutaneous injection immediately before the incision in the scrotum skin. Vasectomy was performed according to Nagy et al. (2003). Briefly, we made a small incision (1 cm) in the scrotal sac and cauterized a section of approximately 2 mm of each vas deferens using heated fine forceps. The skin was stitched with nylon 4-0 (Brasuture Ind. Com. Imp. Exp. Ltda, Sao Sebastiao da Grama, Sao Paulo, Brazil). During surgery, we covered the eyes with sterile saline. The same veterinary surgeon performed all procedures and reported no intraoperative complications. The surgery lasted approximately 15 minutes per animal. Mice recovered from anesthesia in their home cage with bedding material to minimize body temperature loss. Behavior tests underwent 30 minutes after recovery.

## 2.5 BEHAVIOR TEST

The same operator performed the behavioral tests in a quiet room with indirect artificial lighting between 10:00 and 12:00. Mice from different groups were tested interspersed throughout the trials in sequence: Open-Field followed by the Elevated Plus Maze. The apparatuses were cleaned with a 5% alcohol/water solution before placing the animals and before subsequent tests to minimize odor cues left by the previous mouse. Testing was recorded by a high-definition video camera (JVC Everio HDD, JVC Kenwood do Brasil Comercio de Eletronicos Ltda, Brazil) controlled by a remote device.

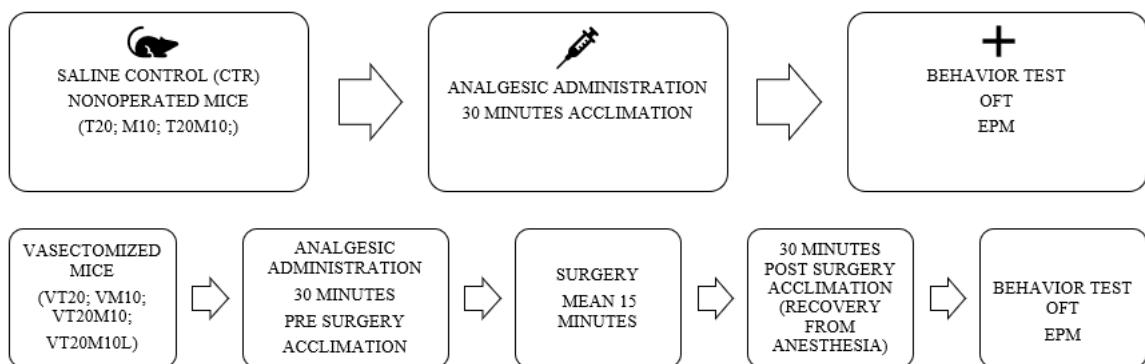
### 2.5.1 Open-Field test (OFT)

The apparatus used consisted of a round white arena, boarded with an opaque metal wall and with an open-top (40 cm diameter x 31 cm height). We placed one mouse at a time in the arena center for evaluation and recorded videos for five minutes. Later, they were evaluated using the Ethovision XT version 15.0.1416 video tracking system

(Noldus Information Technology bv, The Netherlands) to measure distance traveled (cm), movement time, and average speed (cm/s). Frequencies of rearing and grooming, number of fecal pellets, and urine puddles deposited in the arena were scored manually by an observer.

### 2.5.2 Elevated Plus Maze test (EPM)

For this test was used an apparatus that consisted of a plus-shaped platform elevated 50 cm from the floor, with two open arms (30 x 5 cm) across from each other, and perpendicular to those, two walled arms referred to as closed arms (30 x 5 x 15 cm). We placed one mouse at a time in the maze center facing one of the closed arms. Behaviors were scored manually by an observer for five minutes, including the number of entries into each arm, the time spent in each of them, frequencies of rearing and grooming. Figure 1 presents a diagram showing the steps of the procedures.



**Figure 1.** Diagram showing the steps of the experimental procedures. CTR = saline control, M10mg = non-operated meloxicam 10 mg/kg; T20mg = non-operated tramadol 20 mg/kg; T20mgM10mg = non-operated tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VM10mg = vasectomized mice meloxicam 10 mg/kg; VT20mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg; VT20mgM10mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VT20mgM10mgL = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg + lidocaine 10 mg/kg; OFT = Open-Field test; EPM = Elevated Plus Maze. Source: ANTIRIO (2021).

### 2.6 EUTHANASIA

Mice were used only once and euthanized in a CO<sub>2</sub> euthanasia chamber (Red Industria e Comercio de Equipamentos Hospitalares e Laboratoriais, Caieiras, SP, Brazil) after completion of behavior tests. Without pre-charging the chamber, animals were placed in it, and 100% carbon dioxide was introduced (fill rate of 30% of the chamber volume per minute). Cardiac and respiratory arrest confirmed the death.

## 2.7 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was completed with GraphPad Prism version 9.0.0, GraphPad Software, San Diego, California, USA. Mean with SEM was calculated for all parameters. Ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was employed to compare the control group with treated ones. Outliers were identified and removed by ROUT method ( $Q = 1\%$ ). The results were significant at  $p < 0.05$ .

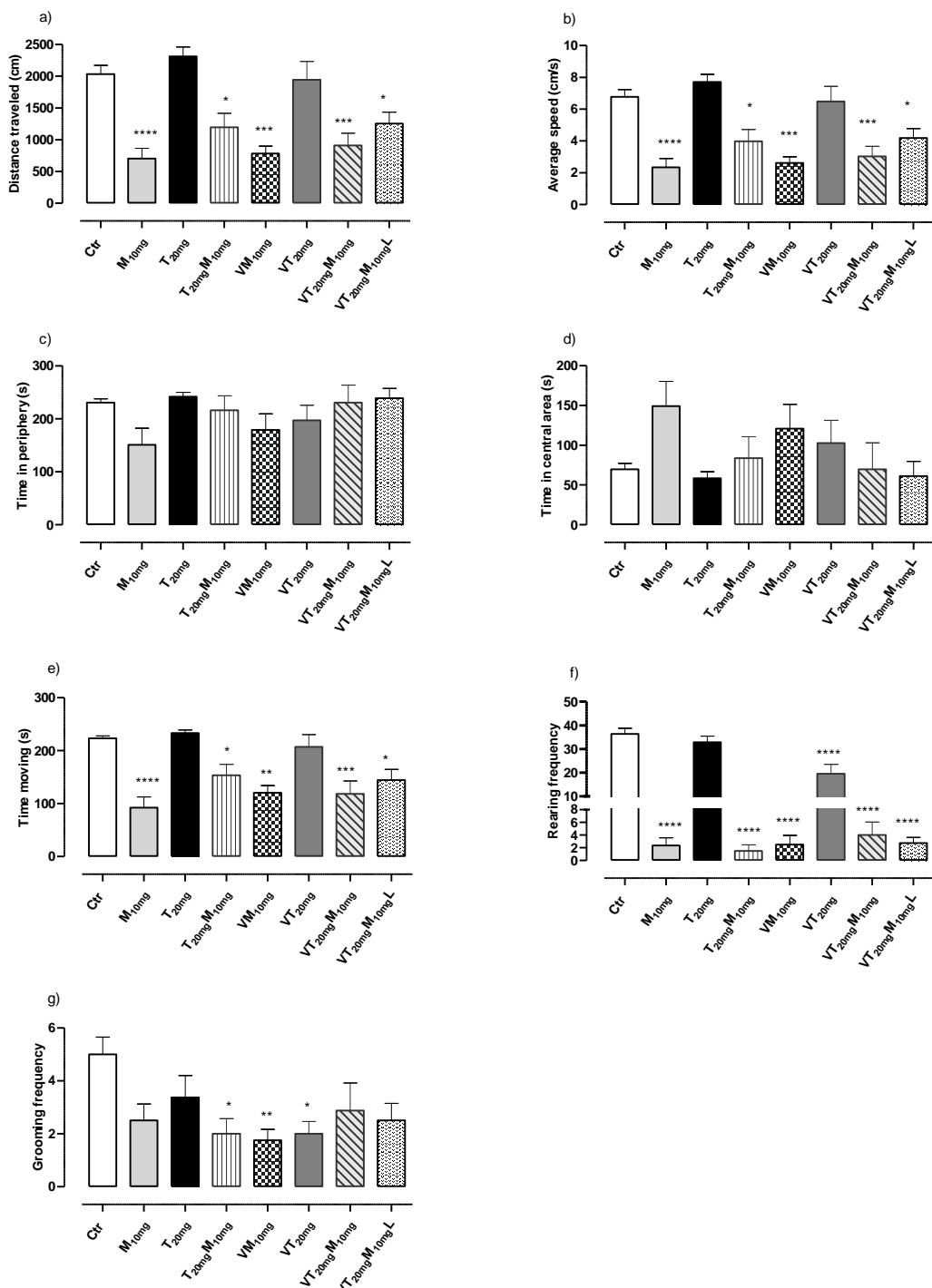
## 3 RESULTS

### 3.1 OPEN-FIELD TEST (OFT)

We found significant differences in distance traveled (figure 2a,  $F(7, 56) = 10.98$ ,  $p < 0.0001$ ) and average speed (figure 2b,  $F(7, 56) = 10.99$ ,  $p < 0.0001$ ) between CTR, T20, and VT20 when compared to M10, T20M10, VM10, VT20M10, and VT20M10L. CTR, T20, and VT20 moved longer distances and presented higher speed compared to the other groups. We did not verify differences concerning the time spent in the periphery and center zones of the arena between groups (figures 2c,  $F(7, 56) = 1.660$ ,  $p = 0.1380$ , and 2d,  $F(7, 56) = 1.658$ ,  $p = 0.1384$ ). Animals spent most of the time exploring the periphery (wall-following behavior) of the Open-Field arena. Regarding time moving, we verified significant differences between CTR, T20, and VT20 compared to the other treatments (figure 2e,  $F(7, 56) = 8.498$ ,  $p < 0.0001$ ). Those animals explored the arena for a longer time in comparison to the other groups. We noticed significant differences in the rearing frequency between CTR and T20 in comparison to M10, T20M10, VM10, VT20, VT20M10, and VT20M10L (figure 2f,  $F(7, 56) = 46.51$ ,  $p < 0.0001$ ). Control treated with meloxicam (M10) and surgery groups displayed fewer rearing frequency than control saline and control treated with tramadol (T20). Regarding grooming frequency, we observed significant differences between T20M10, VM10, and VT20 contrasting to control group (figure 2g,  $F(7, 56) = 2.372$ ,  $p = 0.0339$ ). CTR presented the highest frequency of grooming. The mean number of fecal pellets and urine puddles was not significant. Overall, we observed that animals treated with tramadol (T20 and VT20) showed similar locomotion behavior as the saline control group. On the other hand, meloxicam, alone or associated, significantly reduced locomotion and exploration.

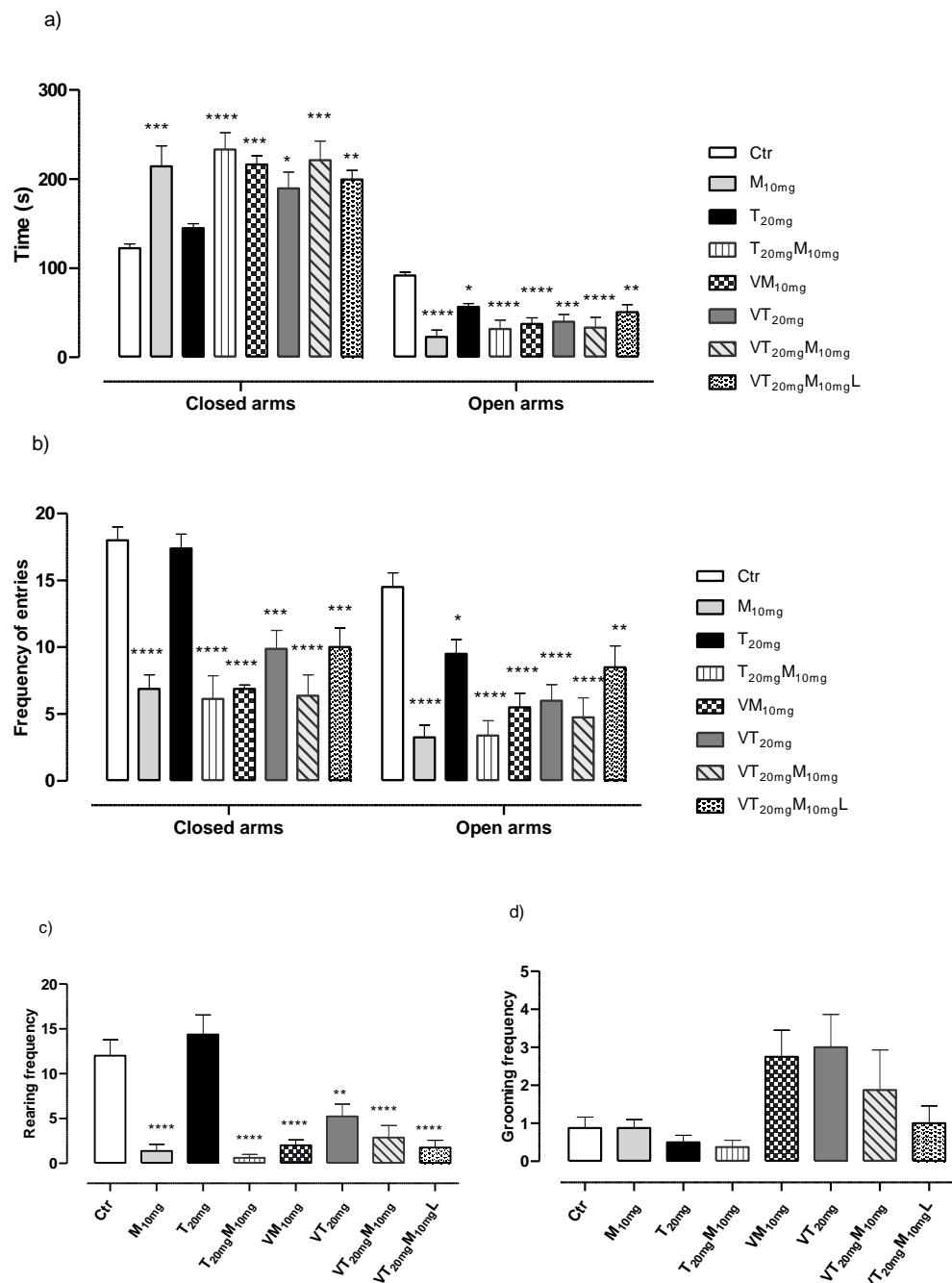
### 3.2 ELEVATED PLUS MAZE (EPM)

Time spent in the closed arms presented significant differences between CTR and T20 in comparison to the other groups (figure 3a,  $F(7, 55) = 6.687$ ,  $p < 0.0001$ ); in the open arms, T20M10, VM10, and VT20M10 spent less time than CTR, M10, T20, VT20, and VT20M10L (figure 3a,  $F(7, 55) = 7.384$ ,  $p < 0.0001$ ). The number of entries into the closed arms presented: no differences between CTR and T20; a significant reduction related to M10, T20M10, VM10, VT20, VT20M10, and VT20M10L groups (figure 3b,  $F(7, 56) = 14.71$ ,  $p < 0.0001$ ). On the other hand, the treated groups showed significant differences in the number of entries into the open arms, (figure 3b,  $F(7, 56) = 9.854$ ,  $p < 0.0001$ ); these animals presented a smaller number than CTR. Regarding rearing frequency, we observed a significant reduction in M10, T20M10, VM10, VT20, VT20M10, and VT20M10L groups in comparison to CTR and T20 (figure 3c,  $F(7, 56) = 16.46$ ,  $p < 0.0001$ ). We did not identify differences in the grooming frequency among groups (figure 3d,  $F(7, 56) = 2.946$ ,  $p = 0.0107$ ). In summary, all treated animals demonstrated a lower frequency of activity and preferably spent more time in the closed arms except for the T20 group. The meloxicam-treated groups showed low rearing frequency.



**Figure 2.** Assessment of general activity of C57BL/6J mice in the Open-Field test (OFT) following meloxicam and tramadol administration. Distance traveled cm (a); average speed cm/s (b); time spent in the periphery zone of the arena (c); time spent in the center zone of the arena (d); time moving in seconds (e); rearing frequency (f); grooming frequency (g). N = 8/group. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was employed to compare control group with treated ones. CTR = saline control, M10mg = non-operated meloxicam 10 mg/kg; T20mg = non-operated tramadol 20 mg/kg; T20mgM10mg = non-operated tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VM10mg = vasectomized mice meloxicam 10 mg/kg; VT20mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg; VT20mgM10mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VT20mgM10gL = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg + lidocaine 10 mg/kg. \*p<0.05 (significant); \*\*p<0.01 (very significant); \*\*\*p<0.001(extremely significant).

Source: ANTIRIO (2021).



**Figure 3.** Assessment of anxiety-like behavior of C57BL/6J mice in the Elevated Plus Maze test (EPM) following meloxicam and tramadol administration. Time spent in the closed and open arms (a); number of entries into the closed and open arms (b); rearing frequency (c); grooming frequency (d). N= 8/group. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test were used to evaluate differences between groups in frequency of entries and time spent in the closed and open arms. ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was employed to evaluate rearing and grooming differences between groups. CTR = saline control, M10mg = non-operated meloxicam 10 mg/kg; T20mg = non-operated tramadol 20 mg/kg; T20mgM10mg = non-operated tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VM10mg = vasectomized mice meloxicam 10 mg/kg; VT20mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg; VT20mgM10mg = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg; VT20mgM10mgL = vasectomized mice tramadol 20 mg/kg + meloxicam 10 mg/kg + lidocaine 10 mg/kg. \*p<0.05 (significant); \*\*p<0.01 (very significant); \*\*\*p<0.001(extremely significant).

Source: ANTIRIO (2021).

## 4 DISCUSSION

We presented in this study the results of general activity and anxiety-like-behavior of mice in the Open-Field Test (OFT) and Elevated Plus Maze (EPM) following pre-emptive tramadol and meloxicam treatment for immediate post-operative pain management. The purpose of this study was to identify the potential effects of these drugs on mouse behavior and implement adequate pain management of vasectomized mice. The impacts of unrelieved pain and analgesia on laboratory animals must not be neglected by researchers due to the potential of biased experimental outcomes and animal suffering (Peterson et al., 2017).

First, we evaluated potential behavior changes associated with administering tramadol and meloxicam in the absence of a surgical procedure. The tramadol-treated group (T20) presented similar general activity as the control group (CTR) in the OFT, characterized by active exploratory behavior and the tendency to primarily explore the peripheral zone of the arena (i.e., thigmotaxis). In the EPM, the T20 group also presented behavior similar to CTR, preferably spending more time in the closed arms and avoiding entries into the open ones. This behavior is natural in mice and might indicate open space-induced anxiety (Komada et al., 2008). CTR and T20 groups exhibited grooming and rearing. Grooming is considered a complex behavior and sensitive to experimental manipulations (Kalueff et al., 2016). Thus, the grooming evaluation associated with the other behaviors mentioned demonstrated that 20 mg/kg tramadol did not interfere with animal behavior. Literature shows that tramadol has an anti-depressant-like effect in mice, likely mediated by the noradrenergic system and NMDA receptor signaling (Ostadhadi et al., 2017; Rojas-Corrales et al., 1998).

On the other hand, meloxicam-treated animals (M10 and T20M10) showed apathy and reduced general activity, affecting other parameters in the OFT and the EPM. These adverse effects of meloxicam interfered in our analysis of the analgesic efficacy of the drug post vasectomy. We also observed similar events even when associated with tramadol. Some authors indicate higher doses of meloxicam for mouse pain management after surgery: 20 mg/kg for vasectomy and laparotomy, and 60 mg/kg for splenectomy (Haile et al., 2016; Leach et al., 2012; Roughan et al., 2016; Wright-Williams et al., 2007). Higher doses of meloxicam might cause several known side-effects of most NSAIDs - gastrointestinal ulceration, renal and hepatic lesions (Papich and Messenger, 2017). NSAIDs effects of NSAIDs result from reversible

inhibition of cyclo-oxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) and subsequent reduction of prostaglandins (Hunter et al., 2011). In our study, meloxicam 10 mg/kg caused behavior alterations. To our knowledge, this is the first report of meloxicam causing adverse effects on mouse behavior. We hypothesized that it might be related to the pharmaceutical formulation of this specific meloxicam brand not clinically approved for the laboratory mouse. Besides that, other variables might have interfered, for example, phenotype differences between mouse strains (Rogers, 2018; Zurita et al., 2011).

The vasectomized groups VM10, VT20M10, and VT20M10L presented lower general activity through shorter distances with lower average speed compared with the CTR group, except for the VT20 group that demonstrated high locomotion and exploration behavior, similar to the controls. We observed a preference for thigmotaxis in the OFT and reduced time spent in closed arms in the EPM. The vasectomized groups exhibited significantly reduced rearing behavior. Only VM10 and VT20 showed reduced grooming behavior which was a limiting finding. Thus, considering those measures could indicate pain or discomfort after the surgical procedure (Miller et al., 2016, 2012). However, our study presented a limitation caused by the adverse effects of meloxicam. We chose it because of its anti-inflammatory and analgesic properties (Papich and Messenger, 2017). Also, meloxicam pharmacokinetics demonstrated an elimination half-life of 8-12 hours (Busch et al., 1998; Chen et al., 2016; Ingrao et al., 2013). Tramadol has a half-life shorter than 2 hours; therefore, repeated, and stressful injections are needed to maintain adequate active plasma levels (Evangelista Vaz et al., 2018). Repeatedly administrating tramadol produced antinociceptive tolerance in Swiss mice (Dai et al., 2008). Moreover, combining meloxicam and tramadol presents potential dose-dependent antinociceptive effects synergism probably reducing doses of both drugs and minimizing the side effects of higher doses (Isiordia-Espinoza et al., 2012). In this manner, the combination of meloxicam and tramadol could provide beneficial effects on mice.

Several studies in the literature reported distinct conclusions about tramadol efficacy in laboratory animals. For example, analgesic protocols using tramadol alone presented efficiency in a rat model for ureteral calculus and a rabbit for post-gastrotomy (Affaitati et al., 2002; Udegbunam et al., 2015). Associating tramadol with other analgesic drugs – as N-palmitoylethanamide (an endogenous fatty acid amide) and paracetamol – enhanced its antinociceptive efficacy in mice submitted to different experimental protocols, such as embryo transfer, formalin, and tail-flick test (Déciga-

Campos et al., 2015; Jirkof et al., 2018; Zhang et al., 2011). Also, tramadol was considered ineffective in C57BL/6 male mice post laparotomy (Wolfe et al., 2015). Our results indicated no efficient analgesia of tramadol treatment in post-operated animals. VT20 presented low rearing and grooming frequencies in the OFT and anxiety-like behavior in the EPM, demonstrated by closed arms preference. In our understanding, these behavior alterations might be associated with pain or discomfort caused by the procedure. Thus, a multimodal therapy would be indicated for post-vasectomy pain management in C57BL/6 mice. However, meloxicam was the source of bias in our experiments due to its potential for spontaneous behavioral changes, and these adverse effects require additional studies.

Finally, it is noteworthy to mention that our initial proposal to the Institutional Animal Care and Use Committee included a vasectomized control group with no analgesic treatment. Though it seemed necessary, we decided to eliminate this group for humane reasons. In the literature, some authors using surgery controls with no analgesia have already inferred pain-related behavior in mice caused by the procedure. Similar vasectomy models described differences such as time moving, abnormal walking, rearing, posture, grooming, and facial pain score in animals following surgery without analgesia (Leach et al., 2012; Miller et al., 2016; Wright-Williams et al., 2013, 2007). Moreover, we decided not to perform an isoflurane control group to reduce the number of animals. As mentioned before, we based our decision on literature that anesthesia by isoflurane had no significant effects on animal's behavior that could compromise our methods for pain assessment (Haile et al., 2016; Miller et al., 2015; Tubbs et al., 2011; Wright-Williams et al., 2013). The results presented by Wright-Williams et al. (2007) indicated that vasectomy was the primary factor responsible for the endocrine stress response and not a reaction caused by anesthesia or mice handling.

## 5 CONCLUSIONS

In conclusion, behavioral tests, such as OFT and EPM, can have a practical application for the pre-evaluation of analgesic protocols to identify possible interferences caused by adverse drug effects. The present was the first to report changes in animal behavior caused by 10 mg/kg meloxicam, interfering in our evaluation of its analgesic effects for immediate post-operative pain management. The

collateral effects of meloxicam in mice justify further investigation. 20 mg/kg tramadol did not affect mice's behavior, but this dose was not adequate for this model either. For future directions, research should test different meloxicam formulations to identify potential adverse effects in this mouse strain. Also, suitable range doses of meloxicam and tramadol should be investigated along with multimodal analgesia for enhancing mice welfare post vasectomy.

### **Acknowledgements**

The authors thank animal technicians of the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ/USP), and Dra. Sandra Regina Alexandre-Ribeiro from the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences (ICB/USP). This manuscript is based upon work supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

**Declarations of interest:** none.

## REFERENCES

- Affaitati, G., Giamberardino, M.A., Lerza, R., Lapenna, D., De Laurentis, S., Vecchiet, L., 2002. Effects of tramadol on behavioural indicators of colic pain in a rat model of ureteral calculus. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **16**, 2002.00068.x  
<https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2002.00068.x>
- Bourque, S.L., Adams, M.A., Nakatsu, K., Winterborn, A., 2010. Comparison of Buprenorphine and Meloxicam for Postsurgical Analgesia in Rats: Effects on Body Weight, Locomotor Activity, and Hemodynamic Parameters. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **49**, 617–622.
- Busch, U., Schmid, J., Heinzel, G., Schmaus, H., Baierl, J., Huber, C., Roth, W., 1998. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2003.12.589>
- Chen, P.H., Boyd, K.L., Fickle, E.K., Locuson, C.W., 2016. Subcutaneous meloxicam suspension pharmacokinetics in mice and dose considerations for postoperative analgesia. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **39**, 356–362.  
<https://doi.org/10.1111/jvp.12297>
- Dai, X., Brunson, C.D., Rockhold, R.W., Loh, H.H., Ho, I.K., Ma, T., 2008. Gender differences in the antinociceptive effect of tramadol, alone or in combination with gabapentin, in mice. *J. Biomed. Sci.* **15**, 645–651.  
<https://doi.org/10.1007/s11373-008-9252-0>
- Déciga-Campos, M., Ramírez-Marín, P.M. oncerrat, López-Muñoz, F.J. avier, 2015. Synergistic antinociceptive interaction between palmitoylethanolamide and tramadol in the mouse formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* **765**, 68–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.025>
- Evangelista Vaz, R., Draganov, D.I., Rapp, C., Avenel, F., Steiner, G., Arras, M., Bergadano, A., 2018. Preliminary pharmacokinetics of tramadol hydrochloride after administration via different routes in male and female B6 mice. *Vet. Anaesth. Analg.* **45**. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2016.09.007>
- Flecknell, P., 2018. Rodent analgesia: Assessment and therapeutics. *Vet. J.* **205**, 2017.12.017  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.017>
- Haile, M., Boutajangout, A., Chung, K., Chan, J., Stolper, T., Vincent, N., Batchan, M., D'Urso, J., Lin, Y., Kline, R., Yaghmoor, F., Jahfal, S., Kamal, R., Aljohani, W., Blanck, T., Bekker, A., Wisniewski, T., 2016. The Cox-2 Inhibitor Meloxicam Ameliorates Neuroinflammation and Depressive Behavior in Adult Mice after Splenectomy. *J. Neurophysiol. Neurol. Disord.* **3**.
- Hankenson, F.C., Braden-Weiss, G.C., Blendy, J. a, 2011. Behavioral and activity assessment of laboratory mice (*Mus musculus*) after tail biopsy under isoflurane anesthesia. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **50**, 686–94.
- Hunter, L.J., Wood, D.M., Dargan, P.I., 2011. The patterns of toxicity and management of acute nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) overdose.

Open Access Emerg. Med. <https://doi.org/10.2147/OAEM.S22795>

- Ingrao, J.C., Johnson, R., Tor, E., Gu, Y., Litman, M., Turner, P. V., 2013. Aqueous Stability and Oral Pharmacokinetics of Meloxicam and Carprofen in Male C57BL/6 Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52, 553–559.
- Isiordia-Espinoza, M.A., Terán-Rosales, F., Reyes-García, G., Granados-Soto, V., 2012. Synergism between tramadol and meloxicam in the formalin test involves both opioidergic and serotonergic pathways. *Drug Dev. Res.* 73, 43–50. <https://doi.org/10.1002/ddr.20461>
- Ittner, L.M., Götz, J., 2007. Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat. Protoc.* 2, 1206–1215. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.145>
- Jirkof, P., 2017. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. *Lab Anim. (NY)*. 46, 123–128. <https://doi.org/10.1038/laban.1216>
- Jirkof, P., Arras, M., Cesarovic, N., 2018. Tramadol:Paracetamol in drinking water for treatment of post-surgical pain in laboratory mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.09.021>
- Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Song, C., Berridge, K.C., Graybiel, A.M., Fentress, J.C., 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Komada, M., Takao, K., Miyakawa, T., 2008. Elevated Plus Maze for Mice. *J. Vis. Exp. JoVE*, 22, 1–4. <https://doi.org/10.3791/1088>
- KuKanich, B., Wiese, A.J., 2017. Opioids, in: *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 207–226. <https://doi.org/10.1002/9781119421375.ch11>
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D., Mogil, J.S., 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 7, 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Leach, M.C., Klaus, K., Miller, A.L., Scotto di Perrotolo, M., Sotocinal, S.G., Flecknell, P. a., 2012. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 7, e35656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656>
- Lister, R.G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. & Therapeutics* 46, 321–340.
- Mähler, M., Berar, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., Raspa, M., 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 48, 178–192. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>

- Miller, A., Kitson, G., Skalkoyannis, B., Leach, M., 2015. The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 172, 58–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.038>
- Miller, A.L., Kitson, G.L., Skalkoyannis, B., Flecknell, P.A., Leach, M.C., 2016. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 181, 160–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.05.020>
- Miller, A.L., Wright-Williams, S.L., Flecknell, P.A., Roughan, J. V., 2012. A comparison of abdominal and scrotal approach methods of vasectomy and the influence of analgesic treatment in laboratory mice. *Lab. Anim.* 46, 304–310.  
<https://doi.org/10.1258/la.2012.012078>
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R., 2003. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, Third Edit. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Noble, S., Balfour, J.A., 1996. Meloxicam. *Drugs* 51, 424–430.  
<https://doi.org/10.2165/00003495-199651030-00007>
- Ostadhadi, S., Norouzi-Javidan, A., Chamanara, M., Akbarian, R., Imran-Khan, M., Ghasemi, M., Dehpour, A.-R., 2017. Involvement of NMDA receptors in the anti-depressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test. *Brain Res. Bull.* 134, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.016>
- Papich, M.G., Messenger, K., 2017. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, in: Veterinary Anesthesia and Analgesia. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 227–243. <https://doi.org/10.1002/9781119421375.ch12>
- Peterson, N.C., Nunemaker, E.A., Turner, P. V., 2017. To treat or not to treat: The effects of pain on experimental parameters. *Comp. Med.*
- Rätsep, M.T., Barrette, V.F., Winterborn, A., Adams, M. a, Croy, B.A., 2013. Hemodynamic and behavioral differences after administration of meloxicam, buprenorphine, or tramadol as analgesics for telemeter implantation in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52, 560–6.
- Reetz, I.C., Wullenweber-Schmidt, M., Kraft, V., Hedrich, H.-J., 1998. Rederivation of inbred strains of mice by means of embryo. *Lab. Anim. Sci.* 38, 696–700.
- Rogers, A.B., 2018. Stress of strains: Inbred mice in liver research. *Gene Expr.* 19, 61–67. <https://doi.org/10.3727/105221618X15337408678723>
- Rojas-Corrales, M.O., Gibert-Rahola, J., Micó, J.A., 1998. Tramadol induces antidepressant-type effects in mice. *Life Sci.* 63, 175–180.  
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00369-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00369-5)
- Roughan, J.V., Bertrand, H.G.M.J., Isles, H.M., 2016. Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. *Eur. J. Pain* 20, 231–240. <https://doi.org/10.1002/ejp.712>

- Roughan, J. V., Flecknell, P.A., 2003. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. *Eur. J. Pain* 7, 397–406.  
[https://doi.org/10.1016/S1090-3801\(02\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1090-3801(02)00140-4)
- Seibenhener, M.L., Wooten, M.C., 2015. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J. Vis. Exp.* 1–6.  
<https://doi.org/10.3791/52434>
- Tubbs, J.T., Kissling, G.E., Travlos, G.S., Goulding, D.R., Clark, J. a, King-Herbert, A.P., Blankenship-Paris, T.L., 2011. Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50, 185–91.
- Turner, P. V., Pang, D.S., Lofgren, J.L., 2019. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. *Comp. Med.* 69, 451–467.  
<https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000042>
- Udegbunam, R.I., Onuba, A.C., Okorie-Kanu, C., Udegbunam, S.O., Anyanwu, M.U., Ifeanyi, O.L., 2015. Effects of two doses of tramadol on pain and some biochemical parameters in rabbits post-gastrotomy. *Comp. Clin. Path.* 24, 783–790. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1982-y>
- Wayss, K., Klefenz, M., Schenkel, J., 2005. Cryopreservation of transgenic mouse embryos—an eight years' experience. *J. Exp. Anim. Sci.* 43, 69–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.jeas.2004.09.001>
- Wolfe, A.M., Kennedy, L.H., Na, J.J., Nemzek-Hamlin, J.A., 2015. Efficacy of Tramadol as a Sole Analgesic for Postoperative Pain in Male and Female Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 411–419.
- Wright-Williams, S., Flecknell, P.A., Roughan, J. V., 2013. Comparative Effects of Vasectomy Surgery and Buprenorphine Treatment on Faecal Corticosterone Concentrations and Behaviour Assessed by Manual and Automated Analysis Methods in C57 and C3H Mice. *PLoS One* 8, e75948.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075948>
- Wright-Williams, S.L., Courade, J.-P., Richardson, C.A., Roughan, J. V., Flecknell, P.A., 2007. Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 130, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.003>
- Zhang, Y., Du, L., Pan, H., Li, L., Su, X., 2011. Enhanced analgesic effects of propacetamol and tramadol combination in rats and mice. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 349–353.
- Zurita, E., Chagoyen, M., Cantero, M., Alonso, R., González-Neira, A., López-Jiménez, A., López-Moreno, J.A., Landel, C.P., Benítez, J., Pazos, F., Montoliu, L., 2011. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.* 20, 481–489. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9403-8>

**CAPÍTULO 2**

## Differences found in mouse behavior after meloxicam administration assessed in the Open-Field test

Effects of meloxicam on mouse behavior

### ABSTRACT

Several analgesics are suggested for pain management in mice. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as meloxicam can be administered for the treatment of inflammatory and acute pain; however, it can cause several side effects which include gastrointestinal ulceration, renal, and hepatic toxicity. Previously in our laboratory, we performed a pilot study to test the anti-nociceptive activity of meloxicam in mice, but behavior changes were observed in un-operated control animals. These results indicated further investigations. One hypothesis was the potential variables in formulation between commercial brands of meloxicam. Thus, this study aimed to evaluate the effects of three different commercial brands of meloxicam (20 mg/kg) in the general activity of mice using the Open-Field test. Results: meloxicam caused several effects on mouse behavior and skin lesions at the injection site, depending on the brand of the drug. The most significant adverse effect observed was decreased exploratory activity. The grooming frequency was reduced in all groups. These adverse effects might be related to the quality of the drugs because meloxicam formulations can present crystal polymorphisms that affect drug quality and efficacy. This study points out the importance of drug quality variables used in animal experimentation that can compromise the outcome of behavior studies.

**Abbreviations:** NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug

COX – 2, cyclooxygenase 2

FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations

## INTRODUCTION

Pain management in laboratory animals is a matter of ethical, legal, and animal welfare concern. Untreated pain has several negative effects in animals, such as hyperalgesia, allodynia, impairment of tissue healing process, changes in hormone secretion, and abnormal behavior, among others.<sup>7</sup> Thus, pain should be managed by using efficient analgesia protocols to minimize suffering and distress in animals. Particularly in laboratory animals, the choice of analgesics should consider not only the impact of side-effects of drugs on animal welfare but also the potential to affect scientific results and increase the variability of data.<sup>7</sup>

Meloxicam is an enolic acid-derived nonsteroidal anti-inflammatory drug, a preferential COX-2 inhibitor, indicated for the treatment of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and for pain management in several species.<sup>14,15</sup> In the laboratory mouse, this drug has been used for the treatment of acute postoperative inflammation and pain.<sup>19,22,24</sup> Similar to other NSAIDs, meloxicam causes several side effects depending on the dose, frequency, and duration of treatment, which include gastrointestinal ulceration, renal, and hepatic toxicity.<sup>15</sup> Also, NSAIDs acute overdose is related to central nervous system toxicity with sequelae such as ataxia, vertigo, dizziness, disorientation, etc.<sup>1,5</sup> Thus, meloxicam can be used to manage pain in laboratory animals; nonetheless, it also can potentially interfere with scientific results, due to the side-effects.

In a previous experiment in our laboratory (unpublished), we aimed to determine the potential anti-nociceptive activity of the drug using a suggested dose by other authors to treat postoperative pain in mice.<sup>10,18,24</sup> However, meloxicam significantly affected animal's behavior of un-operated controls which led us to investigate this adverse effect. Animals demonstrated significant reduction in exploratory activity, rearing, and locomotion. One hypothesis was that formulation variables of the drug could interfere with the results. Thus, this study aims to assess the effect of meloxicam in mouse behavior using the Open-Field test. We compared three commercial brands of meloxicam to identify potential interferences of different formulations.

## MATERIALS AND METHODS

Fifty-five C57BL/6 male mice from the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil (FMVZ/USP), age 8-10 weeks, weight  $25.11 \pm 2.997$  g, free of specific pathogens according to the FELASA Guidelines <sup>11</sup>, were used in this study. Mice were acclimatized two weeks before the experiments.

Animals were housed in groups (up to five per cage) in polypropylene cages (28 x 17 x 12 cm) with autoclaved wood shavings (Granja RG, Suzano, SP, Brazil) and paper towels for nesting material. Room was controlled for temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , air changes 15-20/hour, humidity  $55 \pm 5\%$ , and artificial light cycle 12/12h. Animals had unrestricted access to filtered and autoclaved water and irradiated commercial pellets AIN-93M rodent diet (Nuvilab CR1, Quimtia, Paraná, Brazil).

The protocol for the experimental study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, number 3582200217 - FMVZ/USP. We followed the Brazilian guidelines for animal experimentation which are like those in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Research Council.

Meloxicam solution for parental injection was obtained from different suppliers in the concentrations of 2 mg/L and 10 mg/mL. Samples were encoded as M1, M2, and M3, and were diluted to the same final concentration of 2 mg/mL in sterile saline. M1 and M2 were indicated for animal use, and M3 for human use. The pH of the formulations was measured using a pH meter (Gehaka PG 1800, São Paulo, Brazil).

Mice were previously weighed on the morning of the experiments and randomly assigned into seven different groups. Meloxicam 20 mg/kg was injected in M1<sub>IP</sub>, M2<sub>IP</sub>, and M3<sub>IP</sub> groups, and 10 mL/kg of sterile saline in the control group (Ctr), via intraperitoneal. The identical dose of meloxicam was injected in the subcutaneous of neck in M1<sub>sc</sub>, M2<sub>sc</sub>, and M3<sub>sc</sub> groups.

Animals were acclimatized for 30 minutes in a quiet room after injections. Behavior testing was performed between 10:00 h and noon by the same observer. The Open-Field arena (40 cm diameter x 31 cm height, white background) was placed in a soundproof room with an indirect artificial light source. The arena was cleaned

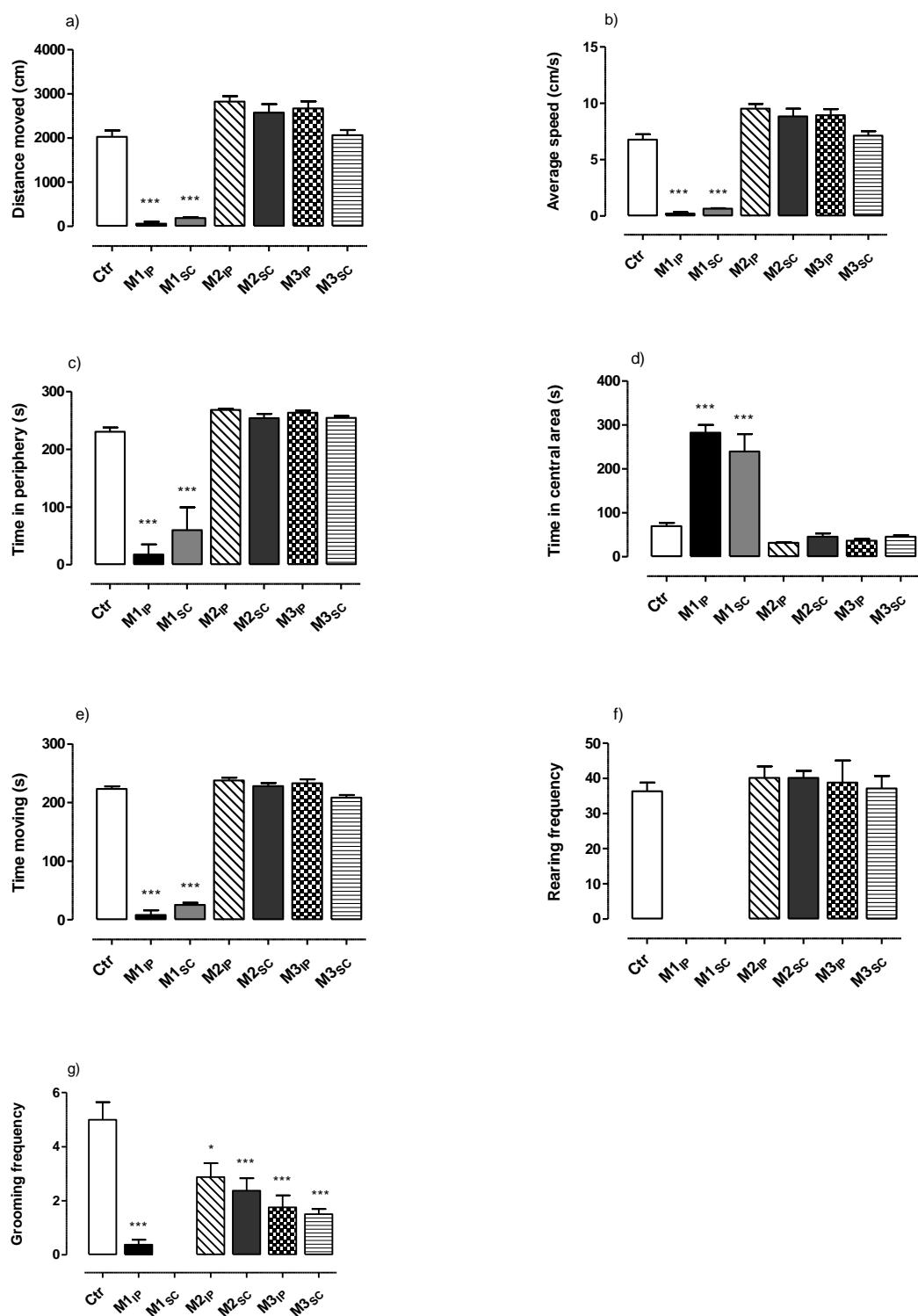
thoroughly with a 5% alcohol/water solution between each animal to minimize odor cues. Mice from different groups were tested interspersed throughout the trials. One mouse at a time was placed in the center of the arena and spontaneous behavior was recorded for five minutes (high-definition video camera, JVC Everio HDD, JVC Kenwood do Brasil Comercio de Eletronicos Ltda, Brazil). Later, the videos were evaluated by using Ethovision XT version 15.0.1416 video tracking system (Noldus Information Technology bv, The Netherlands) to measure the distance moved (cm), average speed (cm/s), time moving (seconds), and time spent in the periphery/center of the arena. Data of rearing, grooming, and fecal pellet frequencies were scored manually. After the trials, animals were sent back to their home cage and observed for 24 hours. Subsequently, animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> gas euthanasia induction chamber (Red Industria e Comercio de Equipamentos Hospitalares e Laboratoriais, Caieiras, SP, Brazil) according to the American Veterinary Medical Association guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. After euthanasia, animals were submitted to macroscopic examination post-mortem.

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 9.0.0 software (GraphPad Software, Inc., USA). D'Agostino and Pearson was used for normality test,  $\alpha = 0.05$ . One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was applied to evaluate differences between treatments. The results were considered significant at  $p < 0.05$ . Data are presented as mean with SEM.

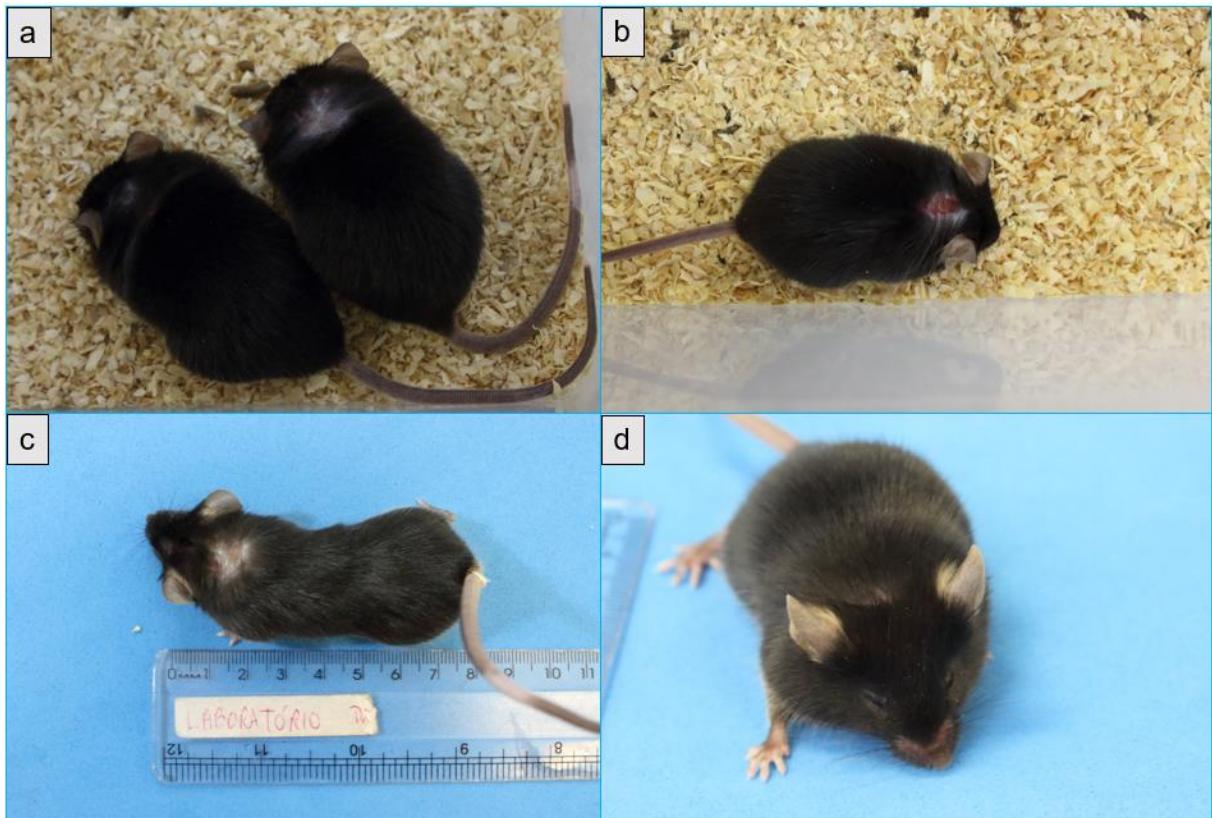
## RESULTS

We observed significant differences in distance moved ( $F (6, 48) = 145.4$ ,  $p<0.0001$ ) and average speed ( $F (6, 48) = 147.0$ ,  $p<0.0001$ ) between M1<sub>IP</sub> and M1<sub>sc</sub> and all other groups (figures 1a and 1b). There were significant differences between groups in time spent in the periphery of the arena ( $F (6, 48) = 46.75$ ,  $p<0.0001$ , figure 1c) and time spent in the center ( $F (6, 48) = 46.76$ ,  $p<0.0001$ , figure 1d). Both M1<sub>IP</sub> and M1<sub>sc</sub> presented the lowest time moving ( $F (6, 45) = 39.91$ ,  $p<0.0001$ ) and frequency of rearing ( $F (6, 48) = 31.69$ ,  $p<0.0001$ , figures 1e and 1f). Regarding grooming frequency, control presented the highest mean compared to the other groups ( $F (6, 48) = 15.83$ ,  $p<0.0001$ , figure 1g.) Overall, M1<sub>IP</sub> and M1<sub>sc</sub> groups moved lesser and presented lower average speed than the others. M1<sub>IP</sub> and M1<sub>sc</sub> spent most of their time in the same place they were initially positioned in the center of the arena. The mean number of fecal pellets was not significant between groups (data not shown).

Clinically, M1<sub>IP</sub> and M1<sub>sc</sub> mice presented lethargy, abnormal gait, low ambulation activity, orbital tightening, ear change, and abnormal tail position. Moreover, we observed skin lesions at the site of injection in M1<sub>sc</sub> mice, figures 2a - d. In the macroscopic examination postmortem, hemorrhage and edema were presented in the subcutaneous. There were no skin lesions in the other groups that received meloxicam M2 and M3. Meloxicam M1 presented a high pH of 9.35, M2 and M3 presented 8.53 and 7.91, respectively.



**Figure 1.** Assessment of general activity of C57BL/6J mice in the Open-Field test (OFT) following meloxicam administration. Distance traveled cm (a); average speed cm/s (b); time spent in the periphery zone of the arena (c); time spent in the center zone of the arena (d); time moving in seconds (e); rearing frequency (f); grooming frequency (g). Data are presented as the means  $\pm$  SEM. ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was employed to compare differences between groups. CTR = control saline 10 mL/kg; M1; M2, and M3 = encoded samples of three different commercial brands of meloxicam; dose administered = 20 mg/kg; IP = via intraperitoneal; SC = via subcutaneous. \*\*\* $p<0.001$ (extremely significant). Source: ANTIORIO (2021).



**Figure 2.** Photographs of mice 5 minutes after subcutaneous injection of meloxicam. Skin lesion and alopecia at the injection site, (a) and (b); abnormal position of the tail, (c); orbital tightening and ear change, (d). Source: ANTIORIO (2021).

## DISCUSSION

We identified in this study that meloxicam administration caused different effects on mouse behavior and skin lesion (inflammation) at the injection site, depending on the brand of the drug. We applied two brands of meloxicam for veterinary use only, indicated for dogs and cats (M1 and M2) and one brand for human use (M3). All these brands affected the behavior to some degree, but M1 caused the most severe alterations. The most significant adverse effect observed was decreased exploratory activity and lethargy resembling heavy sedation. Grooming frequency was reduced in all groups. In rodents, grooming behavior is sensitive to stress, experimental manipulation, and the use of drugs.<sup>8,9</sup>

Meloxicam is an enolic acid drug derived from oxicam, characterized by low solubility in water and slightly solubility in inorganic acids. Meloxicam has five crystalline forms (I, II, III, IV, and V) which are associated with solubility and dissolution rate.<sup>6</sup> The crystal form I is indicated for the preparation of pharmaceutical products;

however, polymorphic contamination and interconversion between forms may occur in raw materials. In consequence, the occurrence of polymorphism in active pharmaceutical ingredients may compromise the bioavailability and therapeutic efficacy of medicines. In a study by Jacon Freitas et al. (2017) a mixture of forms I and III was identified in a commercially available raw material meloxicam which affected the solubility, intrinsic dissolution, and rate of dissolution of meloxicam tablets.<sup>6</sup> In another study, the authors verified two polymorphs of meloxicam in samples from different compounding pharmacies. Also, the authors observed more anti-inflammatory efficacy of polymorph I than polymorph III in a model of paw edema induced by carrageenan.<sup>17</sup>

The adverse effects on behavior observed in our study were not described by other authors who applied similar or higher doses of meloxicam. Studies that assessed mouse behavior following meloxicam administration did not verify significant differences in rearing and locomotion.<sup>10,18,24</sup> In a study that used even a higher dose (60 mg/kg), meloxicam treatment attenuated anhedonia (i.e., diminished response to pleasure) in mice associated with splenectomy.<sup>3</sup> We hypothesized that behavior changes observed in our study might be related to pain or discomfort. These drugs are not clinically approved for pain treatment in mice, thus, considerable variation in response may be observed in this species, besides other variables, such as strain phenotype<sup>16,25</sup> and sex differences.<sup>12,13,21</sup> It is noteworthy to mention that these adverse effects can be misunderstood by researchers as a confounding effect with their experimental design and not because of the use of the analgesic itself.

Moreover, the high pH observed in two veterinary samples of meloxicam was one more variable in our study and might be related to the chemical purity of the substance used for their formulations. The range of pH acceptable for most administration routes should be between 4.5 and 8.0.<sup>4</sup> The intraperitoneal route is commonly used in the mouse because it is simple to execute, requires minimal restraint, and can be used to administer large volumes. However, irritating, and non-physiological pH substances are not recommended for this route for inducing pain, peritoneal irritation, and peritonitis.<sup>2,4,23</sup>

Besides the behavioral changes, skin lesions at the site of injection could be observed after M1 administration related to scratching and itching. These behaviors were probably triggered by the irritating characteristic of M1 substance. In a study by

Sarfaty et al. (2019) skin ulceration in C57BL/6N mice was caused by 20 mg/kg meloxicam injection (brand for animal use) possibly related to the drug concentration (5 mg/mL).<sup>20</sup> The lesions were less severe after meloxicam was diluted to 1 mg/mL in sterile saline; nonetheless, the authors suggested more investigations to determine a safer dose and route of administration of meloxicam.

In summary, our study points out the importance of drug quality variables used in animal experimentation that can compromise the outcome of behavior studies, pain assessment and, pain management in consequence of potential adverse and side-effects of the drugs. In our experience, there were clinical and behavioral differences between groups of mice that received distinct commercial brands of meloxicam. For future directions, a complete physicochemical characterization of meloxicam should be evaluated to identify potential polymorphic contamination of these samples. Although meloxicam caused adverse effects in mice used in this pilot study, it should not be rejected for pain management. Additional drug safety studies should be investigated for the proper use of meloxicam in the laboratory mouse.

## Acknowledgements

The authors thank the animal technicians of the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ/USP).

## Funding

This manuscript is based upon work supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

**Declarations of interest:** None declared.

## REFERENCES

1. **Auriel E, Regev K, Korczyn AD.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. 1st ed. Elsevier B.V.; 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-4086-3.00038-2>
2. **Davis JN, Courtney CL, Superak H, Taylor DK.** Behavioral, clinical and pathological effects of multiple daily intraperitoneal injections on female mice. *Lab Animal*. 2014;**43**:;131–139.
3. **Haile M, Boutajangout A, Chung K, Chan J, Stolper T, Vincent N, Batchan M, D'Urso J, Lin Y, Kline R, et al.** The Cox-2 Inhibitor Meloxicam Ameliorates Neuroinflammation and Depressive Behavior in Adult Mice after Splenectomy. *Journal of neurophysiology and neurological disorders [Internet]*. 2016;**3**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.library.vanderbilt.edu/pmc/articles/PMC5380921/pdf/nihms809487.pdf>
4. **Hirota J, Shimizu S.** Routes of Administration. In: *The Laboratory Mouse*. Second. Elsevier; 2012. pp. 709–725. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00030-1>
5. **Hunter LJ, Wood DM, Dargan PI.** The patterns of toxicity and management of acute nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) overdose. *Open Access Emergency Medicine*. 2011;**3**;:39-48. Available from: <https://doi.org/10.2147/OAEM.S22795>
6. **Jacon Freitas JT, Santos Viana OMM, Bonfilio R, Doriguetto AC, Araújo MB de.** Analysis of polymorphic contamination in meloxicam raw materials and its effects on the physicochemical quality of drug product. *European Journal of Pharmaceutical Sciences [Internet]*. 2017 November;**109**;:347–358. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098717304736>
7. **Jirkof P.** Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. *Lab Animal [Internet]*. 2017 April 1;**46**;:123–128. Available from: <http://www.nature.com/articles/laban.1216>
8. **Kalueff A V., Tuohimaa P.** Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology*. 2005;**508**;:147–153.
9. **Kalueff A V, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC.** Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience [Internet]*. 2016;**17**;:45–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2015.8%5Cnhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn.2015.8>
10. **Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell P a.** The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale Le W, editor. *PLoS ONE [Internet]*. 2012 April 25;**7**;:e35656. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035656>
11. **Mähler M, Berar M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M.** FELASA recommendations for the health monitoring of

mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* [Internet]. 2014 July 4;48::178–192. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677213516312>

12. **Miller LR, Marks C, Becker JB, Hurn PD, Chen W, Woodruff T, McCarthy MM, Sohrabji F, Schiebinger L, Wetherington CL, et al.** Considering sex as a biological variable in preclinical research. *The FASEB Journal* [Internet]. 2017 January 28;31::29–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201600781r>
13. **Mogil JS, Bailey AL.** Sex and gender differences in pain and analgesia. In: *Progress in Brain Research*. Vol. 186. Elsevier B.V.; 2010. pp. 140–157. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00009-9>
14. **Noble S, Balfour JA.** Meloxicam. *Drugs* [Internet]. 1996 March;51::424–430. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-199651030-00007>
15. **Papich MG, Messenger K.** Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. In: *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. pp. 227–243. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119421375.ch12>
16. **Rogers AB.** Stress of strains: Inbred mice in liver research. *Gene Expression*. 2018;19::61–67.
17. **Romani LFA, Yoshida MI, Gomes ECL, Machado RR, Rodrigues FF, Coelho MM, Oliveira MA, Freitas-Marques MB, San Gil RAS, Mussel WN.** Physicochemical characterization, the Hirshfeld surface, and biological evaluation of two meloxicam compounding pharmacy samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [Internet]. 2018 April;8::103–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.12.006>
18. **Roughan JV, Wright-Williams SL, Flecknell P a.** Automated analysis of postoperative behaviour: assessment of HomeCageScan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Laboratory Animals* [Internet]. 2009 January;43::17–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/la.2008.007156>
19. **Roughan JV, Bertrand HGMJ, Isles HM.** Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. *European Journal of Pain* [Internet]. 2016 February;20::231–240. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejp.712>
20. **Sarfaty AE, Zeiss CJ, Willis AD, Harris JM, Smith PC.** Concentration-dependent Toxicity after Subcutaneous Administration of Meloxicam to C57BL/6N Mice ( *Mus musculus* ). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* [Internet]. 2019 November 1;58::802–809. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000037>
21. **Smith JC.** A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. *Comparative Medicine* [Internet]. 2019 December 1;69::490–500. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.30802/AALAS-CM-19-000066>
22. **Tubbs JT, Kissling GE, Travlos GS, Goulding DR, Clark J a, King-Herbert AP, Blankenship-Paris TL.** Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin

meglumine as postoperative analgesia in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* [Internet]. 2011 March;50::185–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439211>

23. **Turner P V., Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA.** Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50::600–613.

24. **Wright-Williams SL, Courade J-P, Richardson CA, Roughan J V., Flecknell PA.** Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* [Internet]. 2007 July;130::108–118. Available from: <http://journals.lww.com/00006396-200707000-00015>

25. **Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, González-Neira A, López-Jiménez A, López-Moreno JA, Landel CP, Benítez J, Pazos F, et al.** Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Research* [Internet]. 2011 June 27;20::481–489. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11248-010-9403-8>

**CAPÍTULO 3**

## MELOXICAM ADMINISTRATION FOR THE IMPROVEMENT OF MOUSE WELLBEING IN RESEARCH: A SYSTEMATIC REVIEW

### ABSTRACT

Painful conditions during animal experimentation should be avoided or minimized using adequate analgesic protocols and nonpharmacological approaches to assure animal welfare. Several analgesics may be administered to laboratory mice, such as meloxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug. Although approved in dogs and cats to treat inflammatory and postoperative pain, meloxicam has not been established in mice yet. For this reason, there is no analgesic dose considered efficient to manage pain in mice during experimental procedures. This review included 94 articles from 2000 to 2020 to qualitatively analyze the data extracted from the methodology and results sections. The objective was to identify and evaluate the use of meloxicam for pain management as an analgesic protocol in laboratory mice. In summary, housing, husbandry, group size calculation, and endpoint criteria were poorly described. Few articles have published adverse effects of meloxicam. Specific pain studies and stereotaxic surgeries were the most frequent procedures. Meloxicam was applied to treat inflammatory conditions and acute pain. No effective dose could be identified due to the diversity of rates. This review demonstrates that a more careful and detailed description of the methodology and study design in articles is needed. Moreover, there are still potential applications of meloxicam for improving mouse welfare needing to be studied.

**Keywords:** NSAIDs. Analgesia. Laboratory Animal Models. Animal welfare. Experimental Medicine. Mice.

## INTRODUCTION

Pain definition was revised by the International Association for the Study of Pain (2020) as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage” (Raja et al. 2020). Laboratory animals may experience pain due to the objectives of the research in specific pain studies or other factors related to the research procedures, such as inadequate protocols for analgesia, husbandry, poor study design, and others. Pain should be alleviated or eliminated as part of the practical strategy for refinement in animal experimentation (2009).

Pharmacologic approaches, single-agent therapy, or multimodal analgesia, according to pain intensity can minimize painful conditions resulting from invasive experimental procedures (2009). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as meloxicam can be administered alone or combined with other analgesics. Meloxicam is a cyclo-oxygenase inhibitor with relative COX-2 selectivity involved in the inflammatory reaction and indicated for clinically treating rheumatoid arthritis, osteoarthritis in humans and dogs, and controlling postoperative pain in cats (Noble and Balfour 1996; Lascelles et al. 2007; Innes et al. 2010). Meloxicam is an alternative for pain management in laboratory mice; however, doses should be estimated, and each animal evaluated for attempting analgesic efficacy of the drug (Flecknell 2018).

This review aimed to identify and evaluate the use of meloxicam for pain management following experimental procedures in laboratory mice. We assessed data from published articles for qualitative analysis focusing on the methodology and potential efficacy of meloxicam in mice.

## MATERIALS AND METHODS

### SEARCH STRATEGY

The literature review was on articles published from 2000 to 2020. We used electronic databases as MEDLINE (PubMed), Scopus (Elsevier), and CABI to perform the online search. The MeSH terms used were: "(mice OR animals, laboratory OR models, animal) AND (meloxicam)." We fitted the indexed terms according to the database.

### Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were as follows:

- Population: laboratory mouse (*Mus musculus*).
- Setting of interest: the use of meloxicam for pain management.
- Issue of interest: positive and negative outcomes or side effects of meloxicam administration.
- Original articles published in English.
- Studies published between 2000 and 2020 to sample studies using meloxicam since its approval by the Food & Drug Administration Agency (FDA) for manufacturing.
- Studies that included momentary and persistent painful procedures such as writhing tests, formalin and glutamate tests, neuropathy models, invasive surgeries, tumor models, implants, and other inflammatory models.

The exclusion criteria were as follows:

- Models *in vitro*.
- Review articles, commentaries, and short communications.
- Pharmacokinetics studies.
- Administration of meloxicam for other research purposes such as, toxicity, tumor treatment, immunology, and neurology.

### Assessment of qualitative synthesis

The study assessments focused on the Materials and Methods section to identify ethical statements, housing, and husbandry conditions, strain, sex, study

design, procedures, dose, route of administration of meloxicam, and clear identification of drugs. This section was evaluated according to a 3-level score defined as 0 for *not informed*, 1 for *information unclear or incomplete*, and 2 for *information clear*. The Results section was assessed for the outcome of the treatments and side effects.

## STATISTICS

Data were expressed in tables and graphics according to the total number of studies reviewed and percentage. Qualitative data were extracted from the studies and synthesized. We used GraphPad Prism version 9.0.0, GraphPad Software, San Diego, California, USA to create graphics.

## RESULTS

### PRISMA STATEMENT

We used Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis in this review for conducting article identification, screening, eligibility, and quality inclusion (Moher et al. 2009). We initially identified a total of 1,243 articles from the database search. From those, we assessed 203 full texts for eligibility and, after a comprehensive review, excluded 109 studies for the following reasons: 4 evaluated survival after irradiation; 12, tumor growth; 2, toxicity and 91, other purposes but analgesia. Finally, we included 94 studies in the quality analysis (Fig. 1).

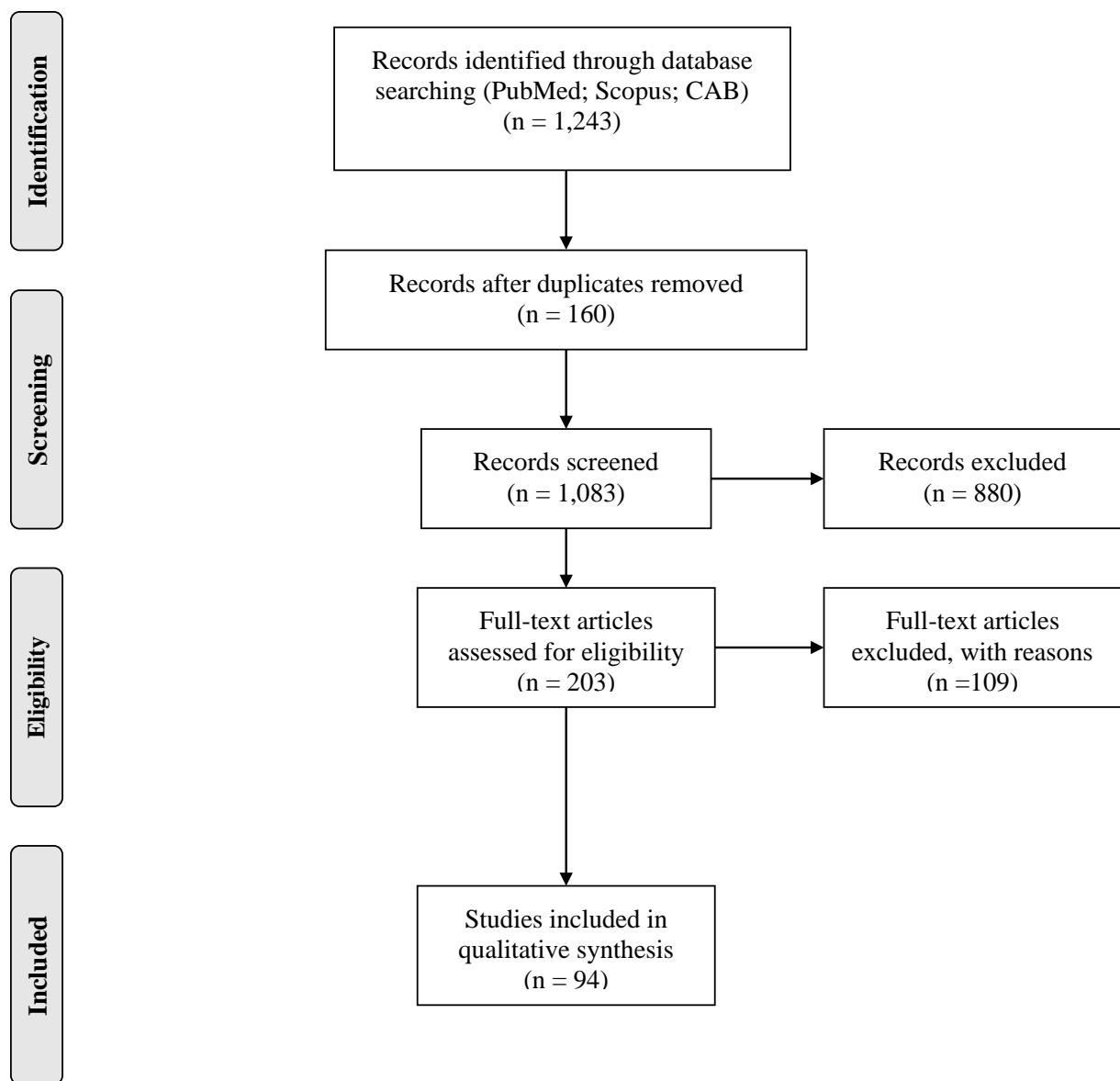


Fig 1 PRISMA flow diagram summarizing the search strategy  
Source: ANTIORIO (2021).

#### INFORMATION ASSESSED FROM THE “MATERIALS AND METHODS” SECTION

Table 1 shows the information categorized in the Materials and Methods section. The data extracted from the reviewed articles were the most clearly described subsections were the ethical statement, strain designation, sex, route of administration, and statistical analysis. On the other hand, the subsections about animals, housing and husbandry, group size calculation, blind and random studies, and humane

endpoint criteria were classified among the lowest percentage on clear information. The humane endpoint criterion was rated as unclear or incomplete if the authors only mentioned euthanasia at the end of the experiment without further considerations.

Table 1 - Percentage of extracted information from Material and Methods section of the reviewed articles

<b>Section</b>	<b>Subsection</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Materials and Methods	Ethical approval	5.32%	0	94.68%
	Animals; housing and husbandry description	22.34%	71.28%	6.38%
	Group size	2.13%	24.47%	73.40%
	Group size determination	93.62%	0	6.38%
	Strain designation	4.63%	0	95.37%
	Sex	11.70%	0	88.30%
	Drug description (trade name or source)	31.91%	0	68.08%
	Route of administration	10%	0	90%
	Study blinded; randomized	43.62%	31.91%	24.47%
	Humane endpoint criteria	44.68%	41.49%	13.83%
Statistical analysis		0	9.57%	90.43%

0 = not informed; 1 = information unclear or incomplete; 2 = information clear

Source: ANTIORIO (2021).

Regarding the frequency of mouse strains, the most used strain was C57BL/6 followed by genetically modified animals (GMAs) that were summarized into one category [Fig. 2a]. Information on sex demonstrated that most of the experiments were performed on males [Fig. 2b]. The subcutaneous route presented the highest percentage followed by the oral and intraperitoneal. Few articles failed to inform the administration route [Fig. 2c]. Meloxicam was administered pre-procedure in 69.15% and post-procedure in 28.72%. Moreover, meloxicam was used alone in 68.09% and in association with other analgesics in 31.91%, such as morphine, buprenorphine, butorphanol, and tramadol. Doses ranged between 0.04 and 300 mg/kg, the most frequent being 5 mg/kg (20.34%).

Table 2 presents the percentage of procedures and models of pain. Momentary pain models, such as writhing test, tail-flick, and hot-plate, were identified in 37.23% of the studies. Among the studies that induced persistent pain, the most cited inflammatory pain models were formalin, glutamate, complete Freund's adjuvant (CFA), and carrageenan injection in the hind paw. Regarding incisional models, stereotaxic surgery was frequently reported.

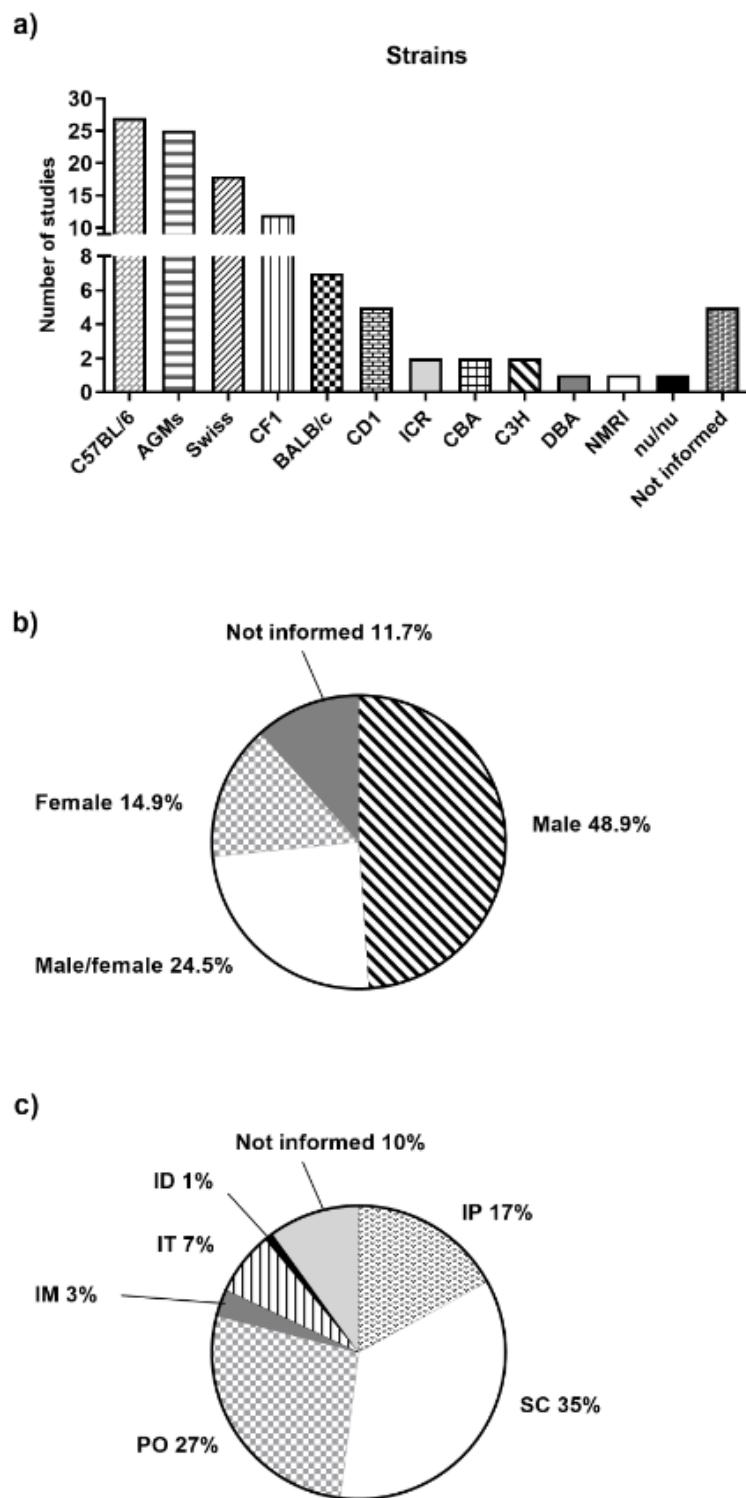


Fig 2 Information assessed from the Materials and Methods section. Frequency of mouse strains according to the number of studies (a); percentages of male, female, both sexes and articles that did not describe the animal sex (b); routes of administration percentages observed in the review (c)  
Source: ANTIORIO (2021).

Table 2 - Number and percentage of articles reviewed according to type of the study, procedure, or model

<b>Duration of pain</b>	<b>Type of study; procedure; model</b>	<b>Number of studies</b>	<b>% of studies</b>
Momentary	Writhing test (acetic acid)	24	25.53
	Tail-flick; tail-immersion; hot-plate tests	11	11.70
	Formalin; glutamate; Complete Freund's Adjuvant; carrageenan (paw); carrageenan (tail edema)	14	14.89
	Formalin test (orofacial)	2	2.13
	Ear edema (croton oil)	4	4.26
	Neuropathy model	5	5.32
	Stereotaxic surgery	14	14.89
	Brain hemorrhage; migraine model; stroke model	3	3.19
	Laparotomy; cecostomy; bariatric surgery; splenectomy; partial hepatectomy; thoracotomy	8	8.51
	Vasectomy	5	5.32
Persistent	Gonadectomy; ovary transplantation	2	2.13
	Lipectomy	1	1.06
	Implants (subcutaneous; muscular; jugular vein)	5	5.32
	Tumor models	4	4.26
	Dysmenorrhea; cystitis	2	2.13
	Pleurisy	1	1.06
	Vaccination	2	2.13
	Skin wound model; burn pain model	2	2.13
	Retina injury	1	1.06

Source: ANTIORIO (2021).

With respect to the results, 54.26% of the studies demonstrated that meloxicam treatment showed some efficacy, 12.77% did not recommend the use of meloxicam, and 32.98% did not inform whether meloxicam was adequate for pain management in mice. Solely 3.19% of the studies included side effects, while the other 96.81% did not report any side effects.

Concerning the results, 54.26% of the studies demonstrated that meloxicam treatment showed some efficacy, 12.77% did not recommend meloxicam, and 32.98% did not inform if meloxicam was adequate for pain management in mice. Solely 3.19% of the studies included collateral effects, whereas the other 96.81% did not report any side effects.

Table 3 summarizes some pain models, doses, and routes of administration of meloxicam. Pain models related to diseases and injuries observed in clinical situations, for example, surgeries and tumor models were considered in this list. Common tests of nociception used in pharmacology and articles that did not inform on the treatment

outcome were not included. Incisional models that may involve similar pain mechanisms, for example, partial hepatectomy and splenectomy procedures, different doses of meloxicam were applied by the authors. On the other hand, the same procedure, and doses, such as in vasectomies and stereotaxic surgeries, presented different outcomes.

Table 3 - Meloxicam administration for post procedural pain or discomfort treatment in mice according to the reviewed references

Procedure/study/model	Dose (mg/kg)	Via	Frequency	Is this treatment effective?	References
Acute arthritis model	1.5	PO	SID	Yes	(Vargas-Ruiz et al. 2020)
Telemeter implantation	2	*	SID	Yes	(Rätsep et al. 2013)
Partial hepatectomy	2	SC	SID	Yes	(Tubbs et al. 2011)
Sciatic nerve injury	2	SC	BID	Yes	(Schuh et al. 2014)
Vaccination	2	SC	SID	Yes	(Kolstad et al. 2012)
Ovary transplantation	5	IP	BID	Yes	(Le et al. 2014)
Stereotaxic surgery	5	SC	BID	Yes	(Cho et al. 2019)
Dysmenorrhea model	5	PO	SID	Yes	(Ding et al. 2016)
Pleurisy model	5 <sup>a</sup>	PO	SID	Yes	(Rodrigues Ianiski et al. 2016)
Orthotopic tumor model	5; 10	IP; SC	BID; SID	Yes	(Husmann et al. 2015; Lofgren et al. 2018)
Vasectomy	5-20	SC	SID	Yes	(Wright-Williams et al. 2007; Leach et al. 2012)
Splenectomy	60	IP	SID	Yes	(Haile et al. 2016)
Brain hemorrhage	1	SC	SID	No	(Staib-Lasarzik et al. 2019)
Migraine model	2	IP	SID	No	(Rea et al. 2018)
Vaccination	2	SC	SID	No	(Culbreth et al. 2019)
Stroke model	5	SC	SID	No	(Jacobsen et al. 2013)
Vasectomy	5-20	SC	SID	No	(Roughan et al. 2009; Miller et al. 2012 <sup>b</sup> , 2016 <sup>c</sup> )
Burn pain model	5	IP	SID	Partial <sup>d</sup>	(Yin et al. 2016)
Neuropathy model	5	IP	SID	No	(Starobova et al. 2019)
Laparotomy	20	SC	SID	No	(Roughan et al. 2016)

IP = intraperitoneal; SC = subcutaneous; PO = oral; SID = once daily; BID = twice daily; \* unclear information; <sup>a</sup> sustained released drug; <sup>b</sup> in combination with paracetamol; <sup>c</sup> 24h post procedure; <sup>d</sup> only mechanical allodynia. Source: ANTIORIO (2021).

## DISCUSSION

Pain in laboratory animals is a concern for animal welfare. Untreated pain may change the physiology and individual and social behavior of the animals. The pain must be controlled for ethical reasons and to reduce potential variables in research. The choice of appropriate analgesic protocol, such as adequate drug, dose, administration route, and frequency, is an essential part of study design and should consider species, pain characteristics, and the influence on experimental results. (Jirkof 2017).

Data from the methodology section showed that most of the articles presented information on ethical statements, strain designations, sex, administration routes, and statistics. On the other hand, the studies poorly described animal husbandry and housing, group size calculation, blinding, randomization, and endpoint criteria. Such information is necessary for reproducibility and, therefore, the quality of the results. A review performed by Kilkenny et al. (2009) assessed the quality of research design of the mouse, rat, and primate models, including information on the statistical method and the species or strains of the animals. They observed that 74% of the articles reported sex, 12% randomization, 14% blinding, and did not identify sample size calculation in any. Another review on quality of adherence to the ARRIVE guidelines in pig models detected inadequacies in several categories related to animals' welfare, particularly on anesthesia and analgesia protocols, sample size, housing, and husbandry (Alemán-Laporte et al. 2019). Due to the lack of precise information on methodology, the ARRIVE guidelines were developed to enhance the research reports using live animals. The document draws up a 21-item checklist that includes the basic information all scientific research should include: aspects of the species used, housing, husbandry, study design, and statistics (Percie du Sert et al. 2020).

The reviewed articles poorly described the humane endpoint criteria. It configures the specific moment in which pain or distress must be avoided, terminated, or alleviated in laboratory animals and should substitute the experimental endpoint that terminates in unmitigated pain or distress and even death (National Research Council 2011). In a review of 684 surgical interventions in rodents, the authors found 45% of the procedures did not report any humane endpoint criterion, which could be related either to inadequate expertise or indifference about animal welfare and research outcome quality (Herrmann and Flecknell 2018). Score sheet systems according to the expected severity of each disease model help to achieve humane endpoint practices. Bodyweight, temperature,

physical appearance, food, and water intake, and behavior observations are examples of parameters to design score sheets (Lloyd and Wolfensohn 1999; Morton 2000; Mei 2019). Humane endpoints provide refinement in animal experimentation and should never be neglected because of researcher inexperience or indifference about animal life.

More than 60% of the articles identified inbred mouse strains and genetically modified animals. Articles also mentioned outbred stocks. Unfortunately, few studies did not point out any strain designation, solely classifying the animals as “albino mice.” C57BL/6 is considered the classic inbred strain and the most widely used in biomedical research. It can be applied for general purposes and as the genetic background for genetically modified strains (Lutz et al. 2012). There are multiple C57BL/6 substrains that genetically and phenotypically differ from each other (Bryant et al. 2008; Mekada et al. 2009; Zurita et al. 2011). Toxicology, pharmacology, and genetic studies commonly use outbred stocks for general purposes (Chia et al. 2005). Researchers should carefully design their models to align research purpose and the correct designation of the strain due to the great diversity of strains, stocks, and genetically modified mice. “Albino mice” should no longer be accepted scientific publications.

Regarding sex, males were reported in higher numbers than females. The preference for male rodents in biological research and preclinical studies has been observed in several surveys (Beery 2018). Preclinical research should consider sex variables to reduce male and female bias factors, such as hormones, sex chromosomes, and behavior (Miller et al. 2017). Sex variables can be demonstrated among mouse strain differences considering pain or analgesic sensitivity (Mogil et al. 1997; Mogil and Bailey 2010; Smith 2019). The National Institutes of Health (NIH) notice NOT-OD-15-102 points for considering using both male and female animals and humans for health and medical research; otherwise, the application proposal should argue why to study only one sex (2015).

In this review, we identified six different administration routes. This diversity relates to the study objectives in some cases; for instance, specific pain studies used the intrathecal route, and others usually concerned veterinary care recommendations. Veterinary formularies commonly recommend oral or subcutaneous administration of meloxicam (Flecknell 2009; Mayer and Mans 2018). Also, to choose the administration route should consider the chemical and physical characteristics of the drug - absorption, bioavailability, and metabolism (Hirota and Shimizu 2012). Sarfaty et al. (2019)

demonstrated that meloxicam 5mg/ml at 20mg/kg, via subcutaneous, caused skin lesions in C57BL/6N mice on the injection site. These lesions were milder at a lower concentration. We observed similar injuries in C57BL/6J mice following subcutaneous injection of meloxicam 2mg/ml at the same dose (data not published). Also, we noticed adverse effects concerning behavior changes in the open field, such as low exploratory and rearing activities (data not published). It is noteworthy to consider that these effects might be related to drug concentration and polymorphisms. For example, Romani et al. (2018) found differences in biological activities between two meloxicam compounding pharmacy samples due to the presence of two different polymorphs of the same material.

This review identified several models of momentary and persistent pain. Particular pain studies, including assays on acute, inflammatory, and neuropathic pain, assessed meloxicam analgesic effects. The use of animals as models for specific pain studies is controversial among researchers, not only for ethical reasons but also for technical and translational issues. The last relates to adverse effects, drug inefficiency, poor clinical trial design, and insufficiently sensitive toxicity screen (Mogil 2009). Although controversial, studying pain using animal models has several applications, for example, comprehension of pain mechanisms, the discovery of new analgesics, and their mechanisms of action. A meta-trend analysis performed to describe the articles published in the journal "Pain" for over 32 years indicated that research with animal models has become significantly more common over time, especially in those related to the role of individual proteins or small molecules (Mogil et al. 2009).

The most common acute pain models, such as the tail-flick, hot-plate, formalin, and writhing test, were identified in this review. In these models, a nociceptive stimulus (thermal, electrical, chemical, or mechanical) is applied to a site of the animal's body, and behavioral parameters are quantified. The behavior models of nociception should have specificity, sensibility, validity, reliability, and reproducibility. No nociception test presents all these characteristics; for example, the writhing test has a low specificity. In this, the abdominal contractions observed after administering irritant agents intraperitoneally are considered a model of visceral pain. However, it is more likely that the pain may not be visceral but a consequence of peritonitis. Besides, not only analgesics produce analgesia. Other substances have the same effect, meaning the results might not be related to the drug analgesic properties (Le Bars et al. 2001). Over 25% of the articles used the writhing test. Since it lacks specificity, researchers should

immediately consider replacing this model. The choice should also acknowledge animal welfare concerns due to severe and inevitable pain.

The mechanism of action of meloxicam is based mainly on the selective inhibition of cyclooxygenase 2. However, the analgesic properties of meloxicam may be related to more than just its anti-inflammatory activity. Other mechanisms might also include central nociceptive transmission. For instance, some authors described a significant increase in the tail-flick response latency induced by several nonsteroidal anti-inflammatories (NSAIDs) (Miranda et al. 2019a). The tail-flick test is a phasic pain model in which the reaction time for tail withdrawal is measured immediately after applying a heat source. This test is commonly accepted to assess the activities of opioids administrated alone (Le Bars et al. 2001). In other experiments, NSAIDs injected intrathecally exhibited more effective potency than systemic administration, and NSAIDs demonstrated distinct potencies in the tail-flick test (Miranda et al. 2001, 2019b). Moreover, serotonergic, and cholinergic pathways may be involved in the analgesic action of NSAIDs (Pinardi et al. 2003; Miranda et al. 2003).

Studies administered different doses according to the procedure; however, meloxicam treatment did not follow standard rates. They used a range of different doses in painful conditions, such as splenectomy (60 mg/kg) and partial hepatectomy (2 mg/kg). Authors compared several parameters between baseline and treated groups: locomotor testing, body weight, food and water intake, corticosterone, liver biomarkers, among others. Few of these parameters could be compared between works; authors observed comparable fluid intake and running wheel testing (Tubbs et al. 2011; Haile et al. 2016). Results differed in other situations that similar doses and procedures were applied, as vasectomies. Meloxicam ranged from 5 to 20 mg/kg in studies, but not all considered it effective. We did not draw any specific conclusion due to the wide range of doses, administration routes, and procedures. It is vital to consider differences in the study design, mouse strain, and surgery approach. Therefore, more studies are needed to establish adequate meloxicam doses in mice according to the procedure severity.

Concluding, the relevance of this review was to identify potential applications of meloxicam for improving mouse welfare. Meloxicam may be advantageous to treat both inflammatory and acute pain. Adequate doses, administration routes, and frequency need to be established in mice to improve veterinary care. Commercial drugs are not recommended for laboratory mice. Therefore, laboratory animal veterinarians should carefully observe potential adverse effects or even lack of analgesic efficacy. Also,

researchers should consider achieving improvements by implementing behavioral measurements of pain, transgenics models, better specimen choices related to strain, sex and age, and humane endpoints. Housing, husbandry, handling, and social behavior, among other parameters, should be considered in the study design (Mogil 2009). At last, authors should follow the ARRIVE guidelines aiming to reproducibility for better scientific quality.

## DECLARATIONS

**Funding** - This manuscript is based upon work supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

**Conflicts of interest** - The Authors declare that there is no conflict of interest.

**Availability of data and material** - The datasets are available from the author for correspondence on reasonable request.

**Code availability** - Not applicable.

**Author's contributions** – All authors designed the study. ATFBA, JAL, and CMCM performed literature search and data analysis. ATFBA wrote the manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

**Ethics approval** - Not applicable.

**Consent to participate** - Not applicable.

**Consent for publication** - Not applicable.

**Acknowledgements** - The authors thank the Virginie Buff D'Ápice librarians and the Experimental and Comparative Pathology Graduate Program – FMVZ/USP.

## REFERENCES

- Alemán-Laporte J, Alvarado G, Garcia-Gomes MSA, et al (2019) Quality of adherence to the ARRIVE guidelines in the material and methods section in studies where swine were used as surgical biomodels: A systematic review (2013–2018). *Animals* 9:. <https://doi.org/10.3390/ani9110947>
- Beery AK (2018) Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Curr Opin Behav Sci* 23:143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.016>
- Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, et al (2008) Behavioral Differences among C57BL/6 Substrains: Implications for Transgenic and Knockout Studies. *J Neurogenet* 22:315–331. <https://doi.org/10.1080/01677060802357388>
- Chia R, Achilli F, Festing MFW, Fisher EMC (2005) The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet* 37:1181–1186. <https://doi.org/10.1038/ng1665>
- Cho C, Michailidis V, Lecker I, et al (2019) Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale. *Sci Rep* 9:359. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36897-w>
- Culbreth MJ, Biryukov SS, Shoe JL, et al (2019) The Use of Analgesics during Vaccination with a Live Attenuated Yersinia pestis Vaccine Alters the Resulting Immune Response in Mice. *Vaccines* 7:205. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040205>
- Ding X, Sun Y, Wang Q, et al (2016) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycyrrhetic acid with Paeoniflorin after transdermal administration in dysmenorrhea model mice. *Phytomedicine* 23:864–871. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.05.005>
- Flecknell P (2018) Analgesics in Small Mammals. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 21:83–103
- Flecknell P (2009) Laboratory animal anesthesia, Third. Academic Press, London
- Haile M, Boutajangout A, Chung K, et al (2016) The Cox-2 Inhibitor Meloxicam Ameliorates Neuroinflammation and Depressive Behavior in Adult Mice after Splenectomy. *J Neurophysiol Neurol Disord* 3:1-24
- Herrmann K, Flecknell P (2018) The Application of Humane Endpoints and Humane Killing Methods in Animal Research Proposals: A Retrospective Review. *Altern to Lab Anim* 46:317–333. <https://doi.org/10.1177/026119291804600606>
- Hirota J, Shimizu S (2012) Routes of Administration. In: *The Laboratory Mouse*, Second. Elsevier, pp 709–725
- Husmann K, Arlt MJE, Jirkof P, et al (2015) Primary tumour growth in an orthotopic

- osteosarcoma mouse model is not influenced by analgesic treatment with buprenorphine and meloxicam. *Lab Anim* 49:284–293.  
<https://doi.org/10.1177/0023677215570989>
- Innes JF, Clayton J, Lascelles BDX (2010) Review of the safety and efficacy of long-term NSAID use in the treatment of canine osteoarthritis. *Vet Rec* 166:226–230.  
<https://doi.org/10.1136/vr.c97>
- Jacobsen KR, Fauerby N, Raida Z, et al (2013) Effects of buprenorphine and meloxicam analgesia on induced cerebral ischemia in C57BL/6 male mice. *Comp Med* 63:105–13.
- Jirkof P (2017) Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. *Lab Anim (NY)* 46:123–128. <https://doi.org/10.1038/laban.1216>
- Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, et al (2009) Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. *PLoS One* 4:e7824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007824>
- Kolstad AM, Rodriguez RM, Kim CJ, Hale LP (2012) Effect of pain management on immunization efficacy in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51:448–57
- Lascelles BDX, Court MH, Hardie EM, Robertson SA (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cats: a review. *Vet Anaesth Analg* 34:228–250.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2006.00322.x>
- Le AH, Bonachea LA, Cargill SL (2014) Meloxicam and buprenorphine treatment after ovarian transplantation does not affect estrous cyclicity and follicular integrity in aged CBA/J mice. *PLoS One* 9:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106013>
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev* 53:597–652
- Leach MC, Klaus K, Miller AL, et al (2012) The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 7:e35656.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656>
- Lloyd MH, Wolfensohn SE (1999) Practical use of distress scoring systems in the application of humane endpoints. In: Hendrickson C, Steen B, Cussler K, Morton D (eds) *Humane endpoints in animal experiments for biomedical research*. Royal Society of Medicine Press, Zeist, The Netherlands, pp 48–53
- Lofgren J, Miller AL, Lee CCS, et al (2018) Analgesics promote welfare and sustain tumour growth in orthotopic 4T1 and B16 mouse cancer models. *Lab Anim* 52:351–364. <https://doi.org/10.1177/0023677217739934>
- Lutz CM, Linder CC, Davisson MT (2012) Strains, Stocks and Mutant Mice. In: *The Laboratory Mouse*, Second. Elsevier, pp 37–56

- Mayer J, Mans C (2018) Rodents. In: Exotic Animal Formulary, Fifth. Elsevier, pp 459–493
- Mei J (2019) Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. ALTEX 36:555–571. <https://doi.org/10.14573/altex.1812231>
- Mekada K, Abe K, Murakami A, et al (2009) Genetic Differences among C57BL/6 Substrains. Exp Anim 58:141–149. <https://doi.org/10.1538/expanim.58.141>
- Miller AL, Kitson GL, Skalkoyannis B, et al (2016) Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. Appl Anim Behav Sci 181:160–165. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.05.020>
- Miller AL, Wright-Williams SL, Flecknell PA, Roughan J V (2012) A comparison of abdominal and scrotal approach methods of vasectomy and the influence of analgesic treatment in laboratory mice. Lab Anim 46:304–310. <https://doi.org/10.1258/la.2012.012078>
- Miller LR, Marks C, Becker JB, et al (2017) Considering sex as a biological variable in preclinical research. FASEB J 31:29–34. <https://doi.org/10.1096/fj.201600781r>
- Miranda H, Lopez J, Sierralta F, et al (2001) NSAID Antinociception Measured in a Chemical and a Thermal Assay in Mice. Pain Res Manag 6:190–196. <https://doi.org/10.1155/2001/701427>
- Miranda HF, Lemus I, Pinardi G (2003) Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Brain Res Bull 61:417–425. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00144-8)
- Miranda HF, Noriega V, Sierralta F, et al (2019a) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Tonic, Phasic and Inflammatory Mouse Models. Drug Res (Stuttg) 69:572–578. <https://doi.org/10.1055/a-0956-673>
- Miranda HF, Noriega V, Sierralta F, et al (2019b) Nitric Oxide and Opioids Involvement in Isobolographic Nsaids Antinociception. Drug Res (Stuttg) 69:688–694. <https://doi.org/10.1055/a-0983-1402>
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. Nat Rev Neurosci 10:283–294. <https://doi.org/10.1038/nrn2606>
- Mogil JS, Bailey AL (2010) Sex and gender differences in pain and analgesia. In: Progress in Brain Research. Elsevier B.V., pp 140–157
- Mogil JS, Richards SP, O'Toole LA, et al (1997) Genetic sensitivity to hot-plate nociception in DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains: possible sex-specific mediation by δ2-opioid receptors. Pain 70:267–277. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(97\)03333-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(97)03333-2)
- Mogil JS, Simmonds K, Simmonds MJ (2009) Pain research from 1975 to 2007: A

categorical and bibliometric meta-trend analysis of every Research Paper published in the journal, Pain. Pain 142:48–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.11.012>

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2009) Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6:e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>

Morton DB (2000) A Systematic Approach for Establishing Humane Endpoints. ILAR J 41:80–86. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.80>

National Research Council (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edn. National Academies Press, Washington, D.C.

Noble S, Balfour JA (1996) Meloxicam. Drugs 51:424–430.  
<https://doi.org/10.2165/00003495-199651030-00007>

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al (2020) The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLOS Biol 18:e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Pinardi G, Sierralta F, Miranda H. (2003) Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. Pharmacol Biochem Behav 74:603–608. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)01046-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)01046-8)

Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al (2020) The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. Pain 161:1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>

Rätsep MT, Barrette VF, Winterborn A, et al (2013) Hemodynamic and behavioral differences after administration of meloxicam, buprenorphine, or tramadol as analgesics for telemeter implantation in mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 52:560–6

Rea BJ, Wattiez A, Waite JS, et al (2018) Peripherally administered calcitonin gene-related peptide induces spontaneous pain in mice. Pain 159:2306–2317.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001337>

Rodrigues Ianiski F, da Silva FD, Antunes Wilhelm E, et al (2016) Enhanced anti-inflammatory benefits of meloxicam-loaded lipid-core nanocapsules in a mouse pleurisy model: A comparative study with a free form drug. J Appl Biomed 14:105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.006>

Romani LFA, Yoshida MI, Gomes ECL, et al (2018) Physicochemical characterization, the Hirshfeld surface, and biological evaluation of two meloxicam compounding pharmacy samples. J Pharm Anal 8:103–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.12.006>

Roughan JV, Bertrand HGMJ, Isles HM (2016) Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. Eur J Pain

- 20:231–240. <https://doi.org/10.1002/ejp.712>
- Roughan J V, Wright-Williams SL, Flecknell P a (2009) Automated analysis of postoperative behaviour: assessment of HomeCageScan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Lab Anim* 43:17–26. <https://doi.org/10.1258/la.2008.007156>
- Sarfaty AE, Zeiss CJ, Willis AD, et al (2019) Concentration-dependent Toxicity after Subcutaneous Administration of Meloxicam to C57BL/6N Mice ( *Mus musculus* ). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 58:802–809. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000037>
- Schuh CD, Pierre S, Weigert A, et al (2014) Prostacyclin mediates neuropathic pain through interleukin 1 $\beta$ -expressing resident macrophages. *Pain* 155:545–555. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.006>
- Smith JC (2019) A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. *Comp Med* 69:490–500. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000066>
- Staib-Lasarzik I, Nagel N, Sebastiani A, et al (2019) Analgesic treatment limits surrogate parameters for early stress and pain response after experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci* 20:49. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0531-7>
- Starobova H, Mueller A, Allavena R, et al (2019) Minocycline Prevents the Development of Mechanical Allodynia in Mouse Models of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Neurosci* 13:1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00653>
- Tubbs JT, Kissling GE, Travlos GS, et al (2011) Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50:185–91
- Vargas-Ruiz R, Montiel-Ruiz RM, Herrera-Ruiz M, et al (2020) Effect of phenolic compounds from *Oenothera rosea* on the kaolin-carrageenan induced arthritis model in mice. *J Ethnopharmacol* 253:112711. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112711>
- Wright-Williams SL, Courade J-P, Richardson CA, et al (2007) Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 130:108–118. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.003>
- Yin K, Deuis JR, Lewis RJ, Vetter I (2016) Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystokinin 2 receptor as an analgesic target. *Mol Pain* 12:174480691666536. <https://doi.org/10.1177/1744806916665366>
- Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, et al (2011) Genetic polymorphisms among

C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* 20:481–489.  
<https://doi.org/10.1007/s11248-010-9403-8>

(2009) Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Academies Press, Washington, D.C.

(2015) NIH Guide Notice NOT-OD-15-102. 4–6

## SUPPLEMENTARY MATERIAL: LIST OF ARTICLES INCLUDED IN THE REVIEW

### References

1. Lofgren J, Miller AL, Lee CCS, et al. Analgesics promote welfare and sustain tumour growth in orthotopic 4T1 and B16 mouse cancer models. *Lab Anim* 2018; 52: 351–364.
2. Fikry EM, Hasan WA, Mohamed EG. Rutin and meloxicam attenuate paw inflammation in mice: Affecting sorbitol dehydrogenase activity. *J Biochem Mol Toxicol*; 32. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1002/jbt.22029.
3. Rätsep MT, Barrette VF, Winterborn A, et al. Hemodynamic and behavioral differences after administration of meloxicam, buprenorphine, or tramadol as analgesics for telemeter implantation in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013; 52: 560–6.
4. Haile M, Boutajangout A, Chung K, et al. The Cox-2 Inhibitor Meloxicam Ameliorates Neuroinflammation and Depressive Behavior in Adult Mice after Splenectomy. *J Neurophysiol Neurol Disord*; 3, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.library.vanderbilt.edu/pmc/articles/PMC5380921/pdf/nihms809487.pdf> (2016).
5. Le AH, Bonachea LA, Cargill SL. Meloxicam and buprenorphine treatment after ovarian transplantation does not affect estrous cyclicity and follicular integrity in aged CBA/J mice. *PLoS One*; 9. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0106013.
6. Miranda HF, Noriega V, Sierralta F, et al. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Tonic, Phasic and Inflammatory Mouse Models. *Drug Res (Stuttg)* 2019; 69: 572–578.
7. Rea BJ, Wattiez A, Waite JS, et al. Peripherally administered calcitonin gene-related peptide induces spontaneous pain in mice. *Pain* 2018; 159: 2306–2317.
8. Husmann K, Arlt MJE, Jirkof P, et al. Primary tumour growth in an orthotopic osteosarcoma mouse model is not influenced by analgesic treatment with buprenorphine and meloxicam. *Lab Anim* 2015; 49: 284–293.
9. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Kumar D, et al. Synergistic interaction between meloxicam and aminoguanidine in formalin-induced nociception in mice. *Eur J Pain* 2008; 12: 321–328.
10. Cho C, Michailidis V, Lecker I, et al. Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale. *Sci Rep* 2019; 9: 359.
11. Janovský M, Doležal T, Procházková M, et al. Influence on analgesic activity and serum levels after meloxicam complexation with beta-cyclodextrin in mice and rats. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res* 2010; 60: 320–323.
12. Villalba BT, Ianiski FR, Wilhelm EA, et al. Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. *Life Sci* 2014; 115: 36–43.
13. Wright-Williams SL, Courade J-P, Richardson CA, et al. Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 2007; 130: 108–118.
14. Jacobsen KR, Fauerby N, Raida Z, et al. Effects of buprenorphine and meloxicam analgesia on induced cerebral ischemia in C57BL/6 male mice. *Comp Med* 2013; 63: 105–13.

15. Tubbs JT, Kissling GE, Travlos GS, et al. Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50: 185–91.
16. Roughan JV, Bertrand HGMJ, Isles HM. Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. *Eur J Pain* 2016; 20: 231–240.
17. Staib-Lasarzik I, Nagel N, Sebastiani A, et al. Analgesic treatment limits surrogate parameters for early stress and pain response after experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci* 2019; 20: 49.
18. Chen J, Huang W, Huang Z, et al. Fabrication of Tip-Dissolving Microneedles for Transdermal Drug Delivery of Meloxicam. *AAPS PharmSciTech* 2018; 19: 1141–1151.
19. Kim CH, Romberg C, Hvoslef-Eide M, et al. Trial-unique, delayed nonmatching-to-location (TUNL) touchscreen testing for mice: Sensitivity to dorsal hippocampal dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 2015; 232: 3935–3945.
20. Miranda HF, Noriega V, Sierralta F, et al. Nitric Oxide and Opioids Involvement in Isobolographic Nsaids Antinociception. *Drug Res (Stuttg)* 2019; 69: 688–694.
21. Ding X, Sun Y, Wang Q, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycyrrhetic acid with Paeoniflorin after transdermal administration in dysmenorrhea model mice. *Phytomedicine* 2016; 23: 864–871.
22. Leach MC, Klaus K, Miller AL, et al. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 2012; 7: e35656.
23. Miller AL, Wright-Williams SL, Flecknell PA, et al. A comparison of abdominal and scrotal approach methods of vasectomy and the influence of analgesic treatment in laboratory mice. *Lab Anim* 2012; 46: 304–310.
24. Pinz MP, Reis AS, de Oliveira RL, et al. 7-Chloro-4-phenylsulfonyl quinoline, a new antinociceptive and anti-inflammatory molecule: Structural improvement of a quinoline derivate with pharmacological activity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017; 90: 72–77.
25. Wilhelm EA, Soares PS, Reis AS, et al. Se - [(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl] 4-chlorobenzoselenolate reduces the nociceptive and edematogenic response by chemical noxious stimuli in mice: Implications of multi-target actions. *Pharmacol Reports* 2019; 71: 1201–1209.
26. Sousa FSS, Anversa RG, Birnmann PT, et al. Contribution of dopaminergic and noradrenergic systems in the antinociceptive effect of  $\alpha$ -(phenylalanyl) acetophenone. *Pharmacol Reports* 2017; 69: 871–877.
27. Miller AL, Kitson GL, Skalkoyannis B, et al. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl Anim Behav Sci* 2016; 181: 160–165.
28. Gonzalez C, Zegpi C, Noriega V, et al. Synergism between dexketoprofen and meloxicam in an orofacial formalin test was not modified by opioid antagonists. *Pharmacol Reports* 2011; 63: 433–440.
29. Hasan WA. Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation ; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. 2017; 1–8.
30. Romani LFA, Yoshida MI, Gomes ECL, et al. Physicochemical characterization, the Hirshfeld surface, and biological evaluation of two meloxicam compounding pharmacy samples. *J Pharm Anal* 2018; 8: 103–108.

31. Roughan J V, Wright-Williams SL, Flecknell P a. Automated analysis of postoperative behaviour: assessment of HomeCageScan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Lab Anim* 2009; 43: 17–26.
32. Yin K, Deuis JR, Lewis RJ, et al. Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystokinin 2 receptor as an analgesic target. *Mol Pain* 2016; 12: 174480691666536.
33. Culbreth MJ, Biryukov SS, Shoe JL, et al. The Use of Analgesics during Vaccination with a Live Attenuated Yersinia pestis Vaccine Alters the Resulting Immune Response in Mice. *Vaccines* 2019; 7: 205.
34. Schuh CD, Pierre S, Weigert A, et al. Prostacyclin mediates neuropathic pain through interleukin 1 $\beta$ -expressing resident macrophages. *Pain* 2014; 155: 545–555.
35. Pinz M, Reis AS, Duarte V, et al. 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline , a new quinoline derivative containing selenium , has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *Eur J Pharmacol* 2016; 780: 122–128.
36. Kolstad AM, Rodriguez RM, Kim CJ, et al. Effect of pain management on immunization efficacy in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 448–57.
37. Miranda HF, Sierralta F, Pinardi G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 1591–1597.
38. Tachibana M, Inoue N, Yoshida E, et al. Anti-inflammatory effect and low ulcerogenic activity of etodolac, a cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drug, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharmacology* 2003; 68: 96–104.
39. Pinardi G, Prieto JC, Miranda HF. Analgesic synergism between intrathecal morphine and cyclooxygenase-2 inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82: 120–124.
40. Jain NK, Kulkarni SK, Singh A. Modulation of NSAID-induced antinociceptive and anti-inflammatory effects by  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonists with gastroprotective effects. *Life Sci* 2002; 70: 2857–2869.
41. Miranda HF, Silva E, Pinardi G. Synergy between the antinociceptive effects of morphine and NSAIDs. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 331–338.
42. Miranda HF, Pinardi G. Lack of effect of naltrindole on the spinal synergism of morphine and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS). *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 71–6.
43. Pinardi G, Sierralta F, Miranda H. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74: 603–608.
44. Mishra DN, Vijaya Kumar SG. Investigations on analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic potential of meloxicam solid dispersion prepared with skimmed milk. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 495–498.
45. Reker AN, Chen S, Etter K, et al. The operant plantar thermal assay: A novel device for assessing thermal pain tolerance in mice. *eNeuro*; 7. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1523/ENEURO.0210-19.2020.
46. Miranda HF, Pinardi G. Lack of effect of naltrexone on the spinal synergism between morphine and non steroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacol Reports* 2009; 61: 268–274.
47. Hirate K, Uchida A, Ogawa Y, et al. Zaltoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits bradykinin-induced pain responses without blocking bradykinin receptors. *Neurosci Res* 2006; 54: 288–294.
48. Fenzl T, Romanowski CPN, Flachskamm C, et al. Wake-promoting effects of

- orexin: Its independent actions against the background of an impaired corticotropine-releasing hormone receptor system. *Behav Brain Res* 2011; 222: 43–50.
- 49. Miranda HF, Puig MM, Prieto JC, et al. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain* 2006; 121: 22–28.
  - 50. Starobova H, Mueller A, Allavena R, et al. Minocycline Prevents the Development of Mechanical Allodynia in Mouse Models of Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Neurosci* 2019; 13: 1–10.
  - 51. Angom B, Lalmuanthanga C, Mohan P. Analgesic and anti-inflammatory effect of an aqueous extract of dendrocnide sinuata (blume) chew. *Explor Anim Med Res* 2015; 5: 133–141.
  - 52. Miranda H, Lopez J, Sierralta F, et al. NSAID Antinociception Measured in a Chemical and a Thermal Assay in Mice. *Pain Res Manag* 2001; 6: 190–196.
  - 53. Kumar SGV, Mishra DN. Analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic studies of meloxicam solid dispersion in rodents. *Iran J Pharmacol Ther* 2006; 5: 77–79.
  - 54. Miranda HF, Lemus I, Pinardi G. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res Bull* 2003; 61: 417–425.
  - 55. Isiordia-Espinoza MA, Terán-Rosales F, Reyes-García G, et al. Synergism between tramadol and meloxicam in the formalin test involves both opioidergic and serotonergic pathways. *Drug Dev Res* 2012; 73: 43–50.
  - 56. Juliachs M, Vidal A, del Muro XG, et al. Effectivity of pazopanib treatment in orthotopic models of human testicular germ cell tumors. *BMC Cancer* 2013; 13: 10.
  - 57. Hazarika S, Mohan P, Borah P. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous extract of Clerodendrum colebrookianum in experimental animals. *Pharmacologyonline* 2012; 1: 44–50.
  - 58. Bandarkar FS, Vavia PR. Physico-chemical characterization and in vivo pharmacodynamic evaluation of lyophilized meloxicam: β-cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5: 159–165.
  - 59. Frikke-Schmidt H, Pedersen TÅ, Fledelius C, et al. Adipose Weight Gain during Chronic Insulin Treatment of Mice Results from Changes in Lipid Storage without Affecting De Novo Synthesis of Palmitate. *PLoS One* 2013; 8: 1–7.
  - 60. Heiney SA, Kim J, Augustine GJ, et al. Precise control of movement kinematics by optogenetic inhibition of Purkinje cell activity. *J Neurosci* 2014; 34: 2321–2330.
  - 61. Farid M, El-Setouhy DA, El-Nabarawi MA, et al. Recrystallized agglomerated meloxicam: Evaluation of anti-nociceptive effect. *J Drug Deliv Sci Technol* 2014; 24: 645–652.
  - 62. Leivas CL, Nascimento LF, Barros WM, et al. Substituted galacturonan from starfruit: Chemical structure and antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Int J Biol Macromol* 2016; 84: 295–300.
  - 63. Elahy M, Doschak MR, Hughes JD, et al. Alginate Bead-Encapsulated PEDF Induces Ectopic Bone Formation In Vivo in the Absence of Co-Administered Mesenchymal Stem Cells. *Curr Drug Targets* 2015; 19: 467–478.
  - 64. Yadav M, Parle M. A simple laboratory model for inducing and measuring pain in small experimental animals. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016; 8: 156–162.
  - 65. Bocchio M, Fisher SP, Unal G, et al. Sleep and serotonin modulate

- paracapsular nitric oxide synthase expressing neurons of the Amygdala. *eNeuro*; 3. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1523/ENEURO.0177-16.2016.
- 66. Du K, Zheng S, Zhang Q, et al. Pten deletion promotes regrowth of corticospinal tract axons 1 year after spinal cord injury. *J Neurosci* 2015; 35: 9754–9763.
  - 67. Chen W, Lu N, Ding Y, et al. Rapamycin-resistant mTOR activity is required for sensory axon regeneration induced by a conditioning lesion. *eNeuro*; 3. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1523/ENEURO.0358-16.2016.
  - 68. Rodrigues Ianiski F, da Silva FD, Antunes Wilhelm E, et al. Enhanced anti-inflammatory benefits of meloxicam-loaded lipid-core nanocapsules in a mouse pleurisy model: A comparative study with a free form drug. *J Appl Biomed* 2016; 14: 105–112.
  - 69. Tanimura A, Lim SAO, Buendia J de JA, et al. Cholinergic interneurons amplify corticostriatal synaptic responses in the Q175 model of huntington's disease. *Front Syst Neurosci* 2016; 10: 1–11.
  - 70. Narayanan A, Muyyarkandy MS, Mooyottu S, et al. Oral supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces uropathogenic Escherichia coli colonization in a mouse model. *Lett Appl Microbiol* 2017; 64: 192–197.
  - 71. Al-Remawi M, Ali AMA, Khames A, et al. Meloxicam-Paracetamol Binary Solid Dispersion Systems with Enhanced Solubility and Dissolution Rate: Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation. *J Pharm Innov* 2017; 12: 206–215.
  - 72. Ciarlillo D, Celeste C, Carmeliet P, et al. A hypoxia response element in the Vegfa promoter is required for basal Vegfa expression in skin and for optimal granulation tissue formation during wound healing in mice. *PLoS One* 2017; 12: 1–14.
  - 73. Ianiski FR, Bassaco MM, Vogt AG, et al. Antinociceptive property of vinyl sulfides in spite of their weak antioxidant activity. *Med Chem Res* 2018; 27: 46–51.
  - 74. Augustin M, Wechdorn M, Pfeiffenberger U, et al. In vivo characterization of spontaneous retinal neovascularization in the mouse eye by multifunctional optical coherence tomography. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59: 2054–2068.
  - 75. Li R, Wang M, Yao J, et al. Two-photon functional imaging of the auditory cortex in behaving mice: from neural networks to single spines. *Front Neural Circuits*; 12. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3389/fncir.2018.00033.
  - 76. Neumann JE, Wefers AK, Lambo S, et al. A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of Sonic-hedgehog inhibitors. *Nat Med* 2017; 23: 1191–1202.
  - 77. Shapiro MC, Tang T, Dasgupta A, et al. In Vitro and In Vivo Characterization of a Preclinical Irradiation-Adapted Model for Ewing Sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018; 101: 118–127.
  - 78. Anversa RG, Sousa FSS, Birnmann PT, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of 1,2-bis-(4 methoxyphenylselanyl) styrene in mice: involvement of the serotonergic system. *J Pharm Pharmacol* 2018; 70: 901–909.
  - 79. Doerning CM, Burlingame LA, Lewis AG, et al. Refinement of perioperative feeding in a mouse model of vertical sleeve gastrectomy. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2018; 57: 295–301.
  - 80. Kramer DJ, Risso D, Kosillo P, et al. Combinatorial expression of Grp and

- Neurod6 defines dopamine neuron populations with distinct projection patterns and disease vulnerability. *eNeuro*; 5. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1523/ENEURO.0152-18.2018.
- 81. Booth AD, Magnuson AM, Fouts J, et al. Subcutaneous adipose tissue accumulation protects systemic glucose tolerance and muscle metabolism. *Adipocyte* 2018; 7: 261–272.
  - 82. Park AY, Plotsky PM, Pham TD, et al. Blood collection in unstressed, conscious, and freely moving mice through implantation of catheters in the jugular vein: a new simplified protocol. *Physiol Rep* 2018; 6: 1–12.
  - 83. Bribian A, Pérez-Cerdá F, Matute C, et al. Clonal glial response in a multiple sclerosis mouse model. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 1–11.
  - 84. Commisso B, Ding L, Varadi K, et al. Stage-dependent remodeling of projections to motor cortex in ALS mouse model revealed by a new variant retrograde-AAV9. *Elife* 2018; 7: 1–34.
  - 85. Guo T, Bian Z, Trocki K, et al. Optical recording reveals topological distribution of functionally classified colorectal afferent neurons in intact lumbosacral DRG. *Physiol Rep*; 7. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.14814/phy2.14097.
  - 86. Fukui K, Uki H, Minami M, et al. Effect of gonadal steroid hormone levels during pubertal development on social behavior of adult mice toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci Lett* 2019; 708: 134357.
  - 87. Beugeling M, Amssoms K, Cox F, et al. Development of a stable respiratory syncytial virus pre-fusion protein powder suitable for a core-shell implant with a delayed release in mice: A proof of concept study. *Pharmaceutics*; 11. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11100510.
  - 88. Kim YR, Kim CE, Yoon H, et al. S1 employs feature-dependent differential selectivity of single cells and distributed patterns of populations to encode mechanosensations. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 1–11.
  - 89. Guo B, Ludlow A V., Brightwell AS, et al. Impairment of PD-L2 positive B1a cells enhances susceptibility to sepsis in RasGRP1-deficient mice. *Cell Immunol* 2019; 346: 103993.
  - 90. Cho IK, Hunter CE, Ye S, et al. Combination of stem cell and gene therapy ameliorates symptoms in Huntington's disease mice. *npj Regen Med* 2019; 4: 1–9.
  - 91. Cheng M, Yang J, Zhao X, et al. Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nat Commun*; 10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-08895-7.
  - 92. Engström Ruud L, Pereira MMA, de Solis AJ, et al. NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP neurons. *Nat Commun* 2020; 11: 1–12.
  - 93. Vargas-Ruiz R, Montiel-Ruiz RM, Herrera-Ruiz M, et al. Effect of phenolic compounds from Oenothera rosea on the kaolin-carrageenan induced arthritis model in mice. *J Ethnopharmacol* 2020; 253: 112711.
  - 94. Hyland L, Park S Bin, Abdelaziz Y, et al. Ghrelin infused into the dorsomedial hypothalamus of male mice increases food intake and adiposity. *Physiol Behav* 2020; 220: 112882.

### 3 CONCLUSÕES

A avaliação do comportamento por meio do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado permitiu a identificação da eficácia analgésica e do efeito adverso das drogas utilizadas nesse estudo. No capítulo 1, os animais que receberam meloxicam apresentaram baixa atividade geral o que afetou o comportamento tanto nos controles como nos animais operados. Consequentemente, o efeito adverso observado prejudicou a avaliação da eficácia analgésica da droga. O tramadol não interferiu no comportamento dos animais. Porém, a dose utilizada não foi adequada para controlar todos os parâmetros observados o que sugere a presença de dor ou algum desconforto. Não foi possível avaliar a eficácia das duas drogas utilizadas em combinação devido ao efeito do meloxicam. Mais estudos quanto aos efeitos adversos do meloxicam no comportamento devem ser realizados. Além disso, a eficácia analgésica tanto do meloxicam quanto do tramadol aplicando-se diferentes doses deve ser avaliada futuramente.

No capítulo dois identificou-se variações nos efeitos do meloxicam em camundongos dependendo da marca comercial utilizada. Em uma das marcas de uso veterinário foi observado redução da atividade locomotora e exploratória do camundongo, além de causar edema e hemorragia subcutânea no local de aplicação. As características físico-químicas e as formulações das diferentes marcas do meloxicam podem ser a causa dos efeitos observados e devem ser investigadas.

A revisão apresentada no terceiro capítulo aponta algumas falhas por parte dos autores na descrição de materiais e métodos, como por exemplo condições de alojamento, manejo, cálculo amostral e critérios para o ponto final humanitário o que pode prejudicar a reproduzibilidade dos experimentos com animais. Com a finalidade de minimizar tais falhas, as recomendações internacionais do ARRIVE deveriam ser seguidas nas publicações. O uso do meloxicam foi identificado em diferentes modelos para o manejo da dor aguda e inflamatória, porém ainda deve-se estabelecer dose, via de administração e frequência de tratamento adequadas para o camundongo.

Por fim, o estudo apontou a importância da avaliação do comportamento diante do uso de analgésicos para o manejo da dor em camundongos. As drogas podem apresentar efeitos adversos que devem ser considerados na sua escolha. Tais resultados indicam a necessidade de mais estudos aplicados ao bem-estar dos camundongos utilizados nas pesquisas biomédicas e veterinárias.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent Pain Pathways: A Neuroanatomical Review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, Mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899304001052>>. Acesso em: 13 out. 2020.
- BARROT, M. Tests and Models of Nociception and Pain in Rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, Jun. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>>. Acesso em: 21 out. 2020.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, Oct. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409012434>>. Acesso em: 13 out. 2020.
- BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, Oct. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1042368014000576>>. Acesso em: 13 out. 2020.
- BURMA, N. E. et al. Animal Models of Chronic Pain: Advances and Challenges for Clinical Translation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p. 1242–1256, 2017.
- CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 62–71, 2000.
- CLUTTON, R. E. An Anglocentric History of Anaesthetics and Analgesics in the Refinement of Animal Experiments. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1933, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/10/1933>>. Acesso em: 09 nov. 2020.
- DAS, V. An Introduction to Pain Pathways and Pain “Targets.” In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. 131p. 1–30.
- DOERNING, C. M. et al. Refinement of Perioperative Feeding in a Mouse Model of Vertical Sleeve Gastrectomy. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 57, n. 3, p. 295–301, 2018.
- FEIJÓ, A. G. dos S. **Utilização de animais na investigação e docência: uma reflexão ética necessária**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005.
- FEIN, A. **Nociceptors and the Perception of Pain**. Farmington, University of Connecticut, 2014. Disponível em: <https://health.uconn.edu/cell-biology/wp-content/uploads/sites/115/2017/10/Revised-Book-2014.pdf>. Acesso em: 10 set. 2020.

FERREIRA, S. H. et al. Dor Inflamatória. In: NETO, O. A. et al. (Ed.). **Dor: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 265–279.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anesthesia**. Third ed. London: Academic Press, 2009.

FLECKNELL, P. Rodent analgesia: Assessment and therapeutics. **The Veterinary Journal**, v. 232, p. 70-77, 2018.

GULUR, P.; NELLI, A. Persistent Postoperative Pain. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 32, n. 5, p. 668–673, 2019. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00001503-201910000-00022>>. Acesso em: 13 out. 2020.

HECKMAN, J. et al. Determinants of the Mouse Ultrasonic Vocal Structure and Repertoire. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 313–325, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.029>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

IASP, 2020. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>. Acesso em: 22/10/2020.

IASP SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY. Pain Terms: A List with Definitions and Notes on Usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 249–52, 1979.

JAGGI, A. S. et al. A Review on Animal Models for Screening Potential Anti-Stress Agents. **Neurological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 993–1005, 2011.

JI, R.-R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y.-Q. Pain Regulation by Non-Neuronal Cells and Inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572–577, 4 Nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaf8924>>. Acesso em: 20 out. 2020.

JIRKOF, P. Side Effects of Pain and Analgesia in Animal Experimentation. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 123–128, 1 Apr. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/laban.1216>>. Acesso em: 23 out. 2020.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KUKANICH, B.; WIESE, A. J. Opioids. In: **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 207–226.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703–728, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(08\)70003-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(08)70003-2)>. Acesso em: 22 out. 2020.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception.

**Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001. Disponível em: <<https://pharmrev.aspetjournals.org/content/53/4/597>>. Acesso em: 18 mai. 2020

MATSUMIYA, L. C. et al. Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 51, n. 1, p. 42–9, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3276965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MCKUNE, C. M. et al. Nociception and Pain. In: **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 584–623.

MELLOR, D. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living.” **Animals**, v. 6, n. 3, p. 21, 14 Mar. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-2615/6/3/21>>. Acesso em: 22 out. 2020.

MILLER, A. L. et al. Using the Mouse Grimace Scale and Behaviour to Assess Pain in CBA Mice Following Vasectomy. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 181, p. 160–165, Aug. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159116301472>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–10, 2015.

MILLER, A.; LEACH, M. Using the Mouse Grimace Scale to Assess Pain Associated with Routine Ear Notching and the Effect of Analgesia in Laboratory Mice. **Laboratory animals**, p. 7–10, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378137>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MOGIL, J. S.; BAILEY, A. L. Sex and gender differences in pain and analgesia. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.] Elsevier B.V., 2010. 186p. 140–157.

OLIVEIRA, L. M.; SILVA, L. F. S. Mecanismos neurais e modulação da dor. In: NETO, O. A. et al. (Ed.). **Dor: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 235–246.

PAPICH, M. G.; MESSENGER, K. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. In: **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 227–243.

PEIRS, C.; SEAL, R. P. Neural Circuits for Pain: Recent Advances and Current Views. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 578–584, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaf8933>>. Acesso em: 22 out. 2020.

PHAM, T. M. et al. Housing Environment Influences the Need for Pain Relief during Post-Operative Recovery in Mice. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 5, p. 663–668, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.038>>. Acesso

em: 22 out. 2020.

POGATZKI-ZAHN, E.; SEGELCKE, D.; ZAHN, P. Mechanisms of Acute and Chronic Pain after Surgery: Update from Findings in Experimental Animal Models. **Current opinion in anaesthesiology**, v. 31, n. 5, p. 575–585, 2018.

RAGHAVENDRA, V.; RUTKOWSKI, M. D.; DELEO, J. A. The Role of Spinal Neuroimmune Activation in Morphine Tolerance/Hyperalgesia in Neuropathic and Sham-Operated Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 9980–9989, 2002.

RAJA, S. N. et al. The Revised International Association for the Study of Pain Definition of Pain: Concepts, Challenges, and Compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, Sep. 2020. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/j.pain.0000000000001939>>. Acesso em: 22 out. 2020.

RANKIN, D. C. Sedatives and Tranquilizers. In: **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 196–206.

REA, B. J. et al. Peripherally Administered Calcitonin Gene–Related Peptide Induces Spontaneous Pain in Mice. **PAIN**, v. 159, n. 11, p. 2306–2317, Nov. 2018. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006396-201811000-00018>>. Acesso em: 04 mai. 2020.

**Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2009.

RICHARDSON, C. A.; FLECKNELL, P. A. Anaesthesia and Post-Operative Analgesia Following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are We Making Progress? **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 33, n. 2, p. 119–127, 2005. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16180987&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/3115FB88-1C63-4513-915E-E3888D6674AE>>. Acesso em: 22 out. 2020.

RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal Etica na Experimentação Animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Ed.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 25–28.

RIX, A. et al. Performance of Severity Parameters to Detect Chemotherapy-Induced Pain and Distress in Mice. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 5, p. 452–460, 2020. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677219883327>>. Acesso em: 06 nov. 2020.

ROLLIN, B. E. Animal Pain: What It Is and Why It Matters. **The Journal of Ethics**, v. 15, n. 4, p. 425–437, 10 Dec. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10892-010-9090-y>>. Acesso em: 22 out. 2020.

ROUGHAN, J. V.; BERTRAND, H. G. M. J.; ISLES, H. M. Meloxicam Prevents COX-2-Mediated Post-Surgical Inflammation but Not Pain Following Laparotomy in Mice.

**European Journal of Pain**, v. 20, n. 2, p. 231–240, Feb. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejp.712>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

ROUGHAN, J. V.; WRIGHT-WILLIAMS, S. L.; FLECKNELL, P. a. Automated Analysis of Postoperative Behaviour: Assessment of HomeCageScan as a Novel Method to Rapidly Identify Pain and Analgesic Effects in Mice. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 1, p. 17–26, Jan. 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/la.2008.007156>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

SCHNITZLER, A.; PLONER, M. Neurophysiology and Functional Neuroanatomy of Pain Perception. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 17, n. 6, p. 592–603, 2000. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00004691-200011000-00005>>. Acesso em: 13 out. 2020.

SCHUH, C. D. et al. Prostacyclin Mediates Neuropathic Pain through Interleukin 1 $\beta$ -Expressing Resident Macrophages. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 545–555, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.006>>. Acesso em: 08 mai. 2020.

SMITH, D. et al. Classification and Reporting of Severity Experienced by Animals Used in Scientific Procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group Report. **Laboratory Animals**, v. 52, n. 1\_suppl, p. 5–57, 23 Feb. 2018. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0023677217744587>>. Acesso em: 06 nov. 2020.

SMITH, E. S. J.; LEWIN, G. R. Nociceptors: A Phylogenetic View. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 195, n. 12, p. 1089–1106, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00359-009-0482-z>>. Acesso em: 20 out. 2020.

STASIAK, K. L. et al. Species-Specific Assessment of Pain in Laboratory Animals. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 42, n. 4, p. 13–20, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906396>>. Acesso em: 22 out. 2020.

TAPPE-THEODOR, A.; KING, T.; MORGAN, M. M. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 100, n. December 2018, p. 335–343, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.009>>. Acesso em: 22 out. 2020.

TURNER, P. V.; PANG, D. S.; LOFGREN, J. L. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. **Comparative medicine**, v. 69, n. 6, p. 451–467, 2019.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009. VACHON, P. et al. Alleviation of Chronic Neuropathic Pain by Environmental Enrichment in Mice Well after the Establishment of Chronic Pain. **Behavioral and Brain Functions**, v. 9, n. 1, p. 22, 2013. Disponível em: <<http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-9-22>>. Acesso em: 04 nov. 2020.

VISSENS, K. et al. Internal and External Factors Affecting the Development of Neuropathic Pain in Rodents. Is It All About Pain? **Pain Practice**, v. 3, n. 4, p. 326–342, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1530-7085.2003.03037.x>>. Acesso em: 22 out. 2020.

WELLS, N.; NICHOLSON, J. Five plus Three: Legislating for the Five Freedoms and the Three Rs-Animal Welfare Act 1999 (New Zealand). **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 32 Suppl 1, p. 417–21, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23581111>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

WHITTAKER, A. L.; HOWARTH, G. S. Use of Spontaneous Behaviour Measures to Assess Pain in Laboratory Rats and Mice: How Are We Progressinga. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 151, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2013.11.001>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

WRIGHT-WILLIAMS, S.; FLECKNELL, P. A.; ROUGHAN, J. V. Comparative Effects of Vasectomy Surgery and Buprenorphine Treatment on Faecal Corticosterone Concentrations and Behaviour Assessed by Manual and Automated Analysis Methods in C57 and C3H Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75948, 2013.

WRIGHT-WILLIAMS, S. L. et al. Effects of Vasectomy Surgery and Meloxicam Treatment on Faecal Corticosterone Levels and Behaviour in Two Strains of Laboratory Mouse. **Pain**, v. 130, n. 1, p. 108–118, Jul. 2007. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006396-200707000-00015>>. Acesso em: 06 nov. 2016.