UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THAIS FERES BRESSAN

**Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação
dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas
verdes (*Iguana iguana*)**

PIRASSUNUNGA, SP

2017

THAIS FERES BRESSAN

Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas verdes (*Iguana iguana*)

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro

PIRASSUNUNGA, SP

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FB8431 Feres Bressan, Thais
Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas verdes / Thais Feres Bressan ; orientador Adriano Bonfim Carregaro ; coorientador Heidge Fukumasu. -- Pirassununga, 2017.
117 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Antinocicepção . 2. Comportamento. 3. Dor. 4. Imunohistoquímica. 5. Répteis. I. Bonfim Carregaro, Adriano, orient. II. Fukumasu, Heidge, coorient. III. Título.

ATA DE DEFESA

Aluno: 74135 - 8850900 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Thais Feres Bressan no Programa: Biotecnologia Animal, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 15 dias do mês de dezembro de 2017, no(a) Sala de aula do UDCH realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Thais Feres Bressan, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas verdes (*Iguana iguana*)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Adriano Bonfim Carregaro	Presidente	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Silvia Renata Gaido Cortopassi	Titular	FMVZ - USP	<u>APROVADA</u>
Ricardo de Francisco Strefezzi	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Daniele dos Santos Martins	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Cléo Alcantara Costa Leite	Titular	UFSCar - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 15 dias do mês de dezembro de 2017.

Silvia Renata Gaido Cortopassi

Ricardo de Francisco Strefezzi

Daniele dos Santos Martins

Cléo Alcantara Costa Leite

Adriano Bonfim Carregaro
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parágrafo é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 19.12.2017 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Biotecnologia Animal.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Profª. Drª Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Aos que eu amo, obrigado por serem minha fonte diária de inspiração, dedicação e perseverança. Esse título também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Adriano Bonfim Carregaro, por toda a dedicação ao meu título de doutora durante esses quatro anos. Obrigada pela amizade, por todos os conselhos, dicas, ensinamentos transmitidos e puxões de orelha! Você me fez crescer muito como profissional e principalmente como pessoa!

Ao meu coorientador, Heidge Fukumasu, por ter me apresentado uma “nova área” na medicina veterinária, a biologia molecular. Obrigada por ter aceitado me orientar em um assunto até então desconhecido por mim! Obrigada por sua amizade e sua dedicação durante meu doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, por ter financiando o projeto e minha bolsa de doutorado (Processo nº 2014/10452-9 e 2014/09529-7). À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, FZEA/USP, por proporcionar a Pós-Graduação em Biociência Animal e ceder toda a estrutura necessária para realização do experimento.

Ao prof. Dr. Augusto Abe e ao Jacarezário da UNESP de Rio Claro, por gentilmente ceder os animais utilizados no meu experimento. Especialmente, a cada uma das iguanas que utilizei para o desenvolvimento da minha tese. Vocês são as estrelas deste projeto, e espero que esta tese ajude a melhorar a qualidade de vida das iguanas.

Aos pesquisadores e colegas do LOCT, especialmente aos meus grandes mestres da biologia molecular Pâmela e Pedro, por toda a paciência em me ensinar a ajudar a desenvolver esta etapa do meu experimento. Vocês foram fundamentais para a conclusão desta tese.

Ao VetPat, principalmente ao Dr. Felipe Sueiro, pela disponibilidade em me ajudar na realização e nas dúvidas com a técnica de imuno-histoquímica.

A todos os integrantes do NAVE durante esses quatro anos, especialmente as minhas amigas Barbara, Talita e Bruna, e aos estagiários Giuliano, Cristiano,

Mariana, Giuliana, Raíssa, Daniela, Vitor, Núbia e Milena. Obrigada pela companhia, amizade e ajuda sempre que necessária. Vocês foram fundamentais!

À Thay minha estagiária, IC, irmã mais nova e pesquisadora de iguanas. Obrigada por todas as suas doideiras que sempre me fizeram rir, e principalmente por toda sua amizade e cumplicidade! Você me ajudou a crescer muito como amiga, pessoa e orientadora.

Aos irmãos e parceiros que ganhei em Pirassununga, Sha, Will, Nathi e Jeff. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, por tornarem minha vida aqui muito mais agradável, por estarem sempre prontos para ouvir minhas histórias, e por estarem presentes nas maiores “presepeiras” da minha vida. Esse título é de vocês também!

Aos meus amigos da sala da pós Renanzinho, Flufy, Julia, Dani e Thiago, pelo companheirismo e amizade. Ao meu amigo para todas as horas, Neymar, obrigada por todas as conversas, ajudas e dicas nesses anos! E ao Paulinho, por ser meu conselheiro e professor, você é um modelo de pós-graduando para mim!

Aos muitos residentes e amigos da Clínica de Equinos e Bovinos, obrigada pela amizade, paciência e por todas as cirurgias durante madrugada. Obrigada por sempre estarem ao meu lado!

À Alessandra e a Paula, meninas da faxina, por estarem sempre alegres sorridentes e prontas para me ajudar. Vocês fizeram os meus dias mais felizes!

Aos meus vizinhos, Miguel, Pati e prof. Bento, por estarem sempre prontos para me socorrer!

Às amigonas de Vitória, Ju, Lu, Livia e Dri, que mesmo longe sempre me apoiaram e me incentivaram para ir além!

Ao meu amigo, companheiro, professor e namorado, André. Obrigada por sempre estar ao meu lado, cuidar de mim e me incentivar a sempre ser melhor! Você é um exemplo de veterinário e pessoa! Te amo.

Aos meus companheiros de penas, pelos e cascos por estarem sempre ao meu lado sem cobrar nada em troca! Amo vocês.

Especialmente à minha família, pai, mãe, irmãos e avós. Me esforço sempre para ser motivo de orgulho para vocês! Obrigada por me apoiarem, incentivarem, financiarem e cobrarem o melhor de mim. Amo todos vocês e esse título é para vocês.

Agradeço aos meus anjos Capitu e Tia Gracinda, sei que mesmo longe vocês sempre estão ao meu lado quando preciso. Sinto muita falta de vocês!

Por fim, a Deus, por colocar cada uma dessas pessoas especiais em minha vida!

RESUMO

BRESSAN T. F. **Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas verdes (*Iguana iguana*)**. 2017. 114f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A popularização dos répteis no mercado pet e no meio científico amplia a necessidade por conhecimentos clínicos e fisiológicos mais adequados a classe o que, conseqüentemente, irá melhorar a qualidade dos atendimentos e do manejo desses animais. Destaca-se que, como cada espécie de réptil apresenta um comportamento metabólico e fisiológico distinto é necessário a realização de estudos com cada espécie em particular. Assim, buscou-se caracterizar os receptores opioides no sistema nervoso central (SNC) e os efeitos sedativo e analgésico da morfina e do butorfanol em *Iguana iguana*. Na 1ª etapa três iguanas jovens ($101 \pm 6\text{g}$) e saudáveis foram submetidas à eutanásia para colheita do SNC. Os tecidos de dois animais foram submetidos à técnica do *RNAseq* para formação de um transcriptoma *de novo*, para então obter-se as sequências de nucleotídeos dos receptores opioides. Já o tecido de um animal foi submetido à técnica de imunohistoquímica (IH). Na 2ª etapa, 10 iguanas jovens ($160 \pm 46\text{g}$) receberam cinco tratamentos, por via intramuscular e com intervalo de duas semanas entre eles: solução salina (0,3mL, CON), morfina 5 mg/kg (MOR₅) e 10 mg/kg (MOR₁₀), butorfanol 5 mg/kg (BUT₅) e 10 mg/kg (BUT₁₀). A sedação foi avaliada por meio da escala comportamental específica para iguanas e pelo teste de natação forçada, sendo este por 120 segundos. A latência do reflexo de retirada do membro (LRRM) frente ao estímulo térmico foi utilizada para avaliação antinociceptiva promovida pelos opioides. Todos os testes foram avaliados antes do tratamento (0) e com 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas pós-tratamento. Utilizou-se ANOVA e Dunnett para a comparação com o momento basal (0 minuto) e ANOVA de dois fatores e Tukey entre os grupos. As sequências gênicas compatíveis com os receptores μ (*mu*), κ (*kappa*) e δ (*delta*) foram identificadas, porém o teste de IH não revelou resultados confiáveis para as marcações dos receptores no SNC. Na escala comportamental apesar dos escores de sedação terem sido baixos, foi observado aumento significativo na pontuação entre 30 minutos e 2 horas em MOR₅ e entre 30

minutos e 3 horas em MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀. O tempo de natação foi reduzido em MOR₁₀ e BUT₅ entre 30 minutos e 2 horas e em BUT₁₀ a redução ocorreu entre 30 minutos e 12 horas. Todos os tratamentos proporcionaram sedação pelos dois testes com 12 horas de avaliação. Por outro lado no teste de termoalgiometria só foi observado aumento no tempo de LRRM em MOR₁₀, entre 2 horas e 4 horas de avaliação. Conclui-se que os receptores opioides estão presentes no SNC, porém apenas κ e δ foram evidenciados na IH. Ademais, as duas doses de butorfanol e a maior dose de morfina promovem sedação, sendo que apenas 10 mg/kg de morfina promoveu antinocicepção em iguanas no presente estudo.

Palavras-chave: antinocicepção, comportamento, dor, imuno-histoquímica, reptéis, transcriptoma

ABSTRACT

BRESSAN, T. F. **Localization of opioid receptors in the central nervous system and assessment of morphine and butorphanol analgesic and sedative effects in green iguanas (*Iguana iguana*)**. 2017. 114f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The increasing popularity of reptiles in the pet market and in the scientific studies requires appropriate clinical and physiological knowledge, which will consequently improve the quality of care and management of this classe. It is necessary to have studies with each species in particular because of every specie of reptile has different metabolic and physiological behavior. Therefore, it was aimed localization of opioid receptor in the central nervous system (CNS) and evaluated the sedative and analgesic effect of morphine and butorphanol in *Iguana iguana*. At the first stage three young (101 ± 6 g) and healthy green iguanas were submitted to euthanasia for harvesting the CNS, then the tissues of two animals were submitted to the *RNAseq* technique for the formation of *de Novo* transcriptome, so we could get the nucleotide sequences of the opioid receptors obtained. The immunohistochemistry (IH) technique was use to locate the distribution of these receptors in the CNS. In the second stage, 10 young green iguanas (160 ± 46 g) received five treatments, intramuscularly and with an interval of two weeks between them: saline solution (0.3 mL, CON), morphine 5 mg/kg (MOR₅) and 10 mg/kg (MOR₁₀), butorphanol 5 mg/kg (BUT₅) and 10 mg/kg (BUT₁₀). The sedation was estimate by behavioral scale for iguanas and forced swing test, during 120 seconds. The latency of hind limb withdrawal reflex (LWR) in front of the thermal stimulus was use for antinociceptive evaluation promoted by opioids. All the tests were evaluate before treatment (0) and at 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 6, 12 and 24 hours post-treatment. ANOVA and Dunnett were used for comparison with the baseline (0 minute) and two-way ANOVA and Tukey between the groups. We identified sequences compatible with μ (*mu*), κ (*kappa*) and δ (delta), but only κ and δ were marked in the IH of the CNS. In the behavior scale despite of low scores of sedation, it was observe a significant increase in the score between 30 minutes and 2 hour MOR₅ and between 30 minutes and 3 hours in MOR₁₀, BUT₅ and BUT₁₀. The time of swimming test was reduced in

MOR₁₀ and BUT₅ between 30 minutes and 2 hours and in BUT₁₀ the reduction occurred between 30 minutes and 12 hours. All treatment provided sedation for both tests in 12 hours of evaluation. Otherwise, the thermoalgymetry test showed increased time in LWR in MOR₁₀ between 2 hours and 4 hours of evaluation. It concluded that the opioid receptors are present in the CNS. In addition, the two doses of butorphanol and the highest dose of morphine further sedation and only 10 mg/kg of morphine promoted antinociception in iguanas in this study.

Keyword: antinociception, behavior, immunohistochemistry, pain, reptile, transcriptome

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema ilustrativo de um receptor opioide (μ) acoplado a proteína G.....25
- Figura 2 – BLASTp da sequência de aminoácidos referentes aos μ de diferentes vertebrados. Nesta imagem observa-se a região que abrange os aminoácidos 390 até 400, a qual é altamente conservada entre os vertebrados.....27
- Figura 3 – Caixa de fibra para alojamento dos animais. Destaca-se a presença de animais nos galhos, sob o *basking* e animais nos galhos fora do *basking*. Destaca-se ainda a presença da lâmpada UV e o fornecimento de alimento e água.....38
- Figura 4 – Foto obtidas durante a colocação do microchip nas iguanas. A – aplicação de anestésico local (0,1 mL de Lidocaína 2%); B – Inserção do aplicador do microchip no subcutâneo da região escapular.....39
- Figura 5 – Desenho esquemático da anatomia macroscópica do sistema nervoso central de lagartos.....40
- Figura 6 – Imagens obtidas durante a colheita do Sistema Nervoso Central (SNC) de uma iguana. A – administração intracardíaca de cloreto de potássio, após obtenção de plano profundo de anestesia; B – abertura longitudinal do crânio com exposição do SNC; C – fragmentos do SNC após colheita.....41
- Figura 7 – Imagens obtidas durante a extração do RNA utilizando a técnica do Trizol. A – Fragmentos do Sistema Nervoso Central embebidos em Trizol; B – estratificação do RNA, DNA e proteínas após algumas etapas de extração; C – observação das bandas de RNA formadas após a extração.....42
- Figura 8 – Parte do BLAST entre a sequência de aminoácidos do receptor μ humano (Query) e de iguana (Sbjct).....45
- Figura 9 – Sequência completa de aminoácidos referentes ao receptor μ humano (em preto) sobreposta pela sequência de aminoácidos referentes ao receptor μ de iguana (em vermelho). Destacado em verde a sequência de aminoácidos ao qual o anticorpo se liga.....45
- Figura 10 – *Iguana iguana* submetida ao teste de natação forçada.....52
- Figura 11 – Aplicação de teste álgico, com auxílio do termoalgímetro, em *Iguana iguana*.....53
- Figura 12 – Resultados obtidos após a análise de qualidade da extração do RNA pelo teste Agilent 2100 Bioanalyzer. A – resultados obtidos para a amostra I1; B – resultados obtidos para a amostra I2.....57
- Figura 13- *Gene ontology* dos transcriptos de iguanas evidenciado as principais categorias e funções celulares de cada transcripto.....60
- Figura 14 – Fotomicrografia do sistema nervoso central (SNC) de iguana. A - SNC, especificamente o córtex cerebral, marcado para DOR em marrom (região do núcleo celular) (aumento de 20x). B – SNC, especificamente o córtex cerebral, marcado para KOR em marrom

(região do núcleo celular) (aumento de 20x). C - SNC com ausência de marcação para μ nos neurônios (aumento de 20x).....62

Figura 15 – Avaliação da sedação em *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (mediana e intervalo interquartil). * indica diferença em relação ao basal.....64

Figura 16 – Tempo de natação (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média $\pm$ erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....67

Figura 17 – Diferença entre os tempos de natação dos momentos com o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (SAL) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média $\pm$ erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....70

Figura 18 – Latência do reflexo de retirada do membro (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média $\pm$ erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....73

Figura 19 – Diferença na latência do reflexo de retirada do membro entre os momento e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....76

Figura 20 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas aos testes de sedação (escala comportamental e natação forçada) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....78

Figura 21 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de pontuação baseado em quatro parâmetros comportamentais, utilizado para avaliar o grau de sedação em *Iguana iguana*.....50

Tabela 2 – Dados dos receptores opioides obtidos ao submeter os transcriptos sequenciados pela técnica de RNAseq ao software Trinity.....61

Tabela 3 – Sedação baseada na escala comportamental de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (mediana e intervalo interquartil). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.....66

Tabela 4 – Tempo de natação (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.....69

Tabela 5 – Diferença nos tempos de natação entre os momentos e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.....72

Tabela 6 – Latência do reflexo de retirada do membro (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± erro padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.....75

Tabela 7 – Diferença na latência do reflexo de retirada do membro entre os momentos e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (SAL) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam semelhança entre os grupos.....77

Tabela 8 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas aos testes de sedação (escala comportamental e natação forçada) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão).....79

Tabela 9 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão).....81

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
Lista de figuras	13
Lista de tabelas.....	16
Introdução.....	18
REVISÃO DE LITERATURA	20
Répteis	20
Fisiopatologia da dor.....	24
Estudo da dor em répteis	29
HIPÓTESES.....	37
OBJETIVO DA PESQUISA	38
Objetivo geral	38
Objetivos específicos	38
MATERIAL E MÉTODOS	39
Etapa 1 - Caracterização dos receptores opioides	41
Determinação da sequência dos receptores opioides.....	43
Imuno-histoquímica dos receptores opioides no SNC	45
Etapa 2 - Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas	49
Análise Estatística	56
RESULTADOS	58
Etapa 1 - Caracterização dos receptores opioides	58
<i>Avaliação da qualidade dos RNA extraídos.....</i>	58
Etapa 2 – Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas	66
Avaliação sedativa	66
DISCUSSÃO	84
Etapa 1 – Caracterização dos receptores opioides	85
Etapa 2 – Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas	89
CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
anexo A.....	113
Anexo b	115

INTRODUÇÃO

A popularização dos répteis tanto como animais de estimação, como em coleções de zoológicos e Instituições de pesquisa é uma realidade nos dias de hoje. Em 2008, no Reino Unido, foi estimado que 8 milhões de répteis fossem criados como animais pet contra 6 milhões de cães e gatos criados na mesma condição (informações retiradas do jornal Telegraph, de novembro de 2008). Outrossim, os répteis vêm sendo utilizados como modelos experimentais em diferentes áreas, como em estudos ecológicos (MOURA et al., 2015), biológicos (SCHNEIDER et al., 2013; TATTERSALL et al., 2016), na medicina (SANTOS et al., 2012), além dos estudos na medicina veterinária (SLADKY; MANS, 2012).

Essa nova realidade nos faz pensar que, assim como ocorre com os pets convencionais, os répteis passaram a frequentar cada vez mais os hospitais e clínicas veterinárias. Entretanto, apesar dos estudos já publicados com a classe, pouco se sabe como a fisiologia e metabolismo destes animais interfere na evolução clínica, na resposta farmacológica e nos benefícios dos tratamentos nos mesmos. E esta lacuna influencia, diretamente, a evolução dos tratamentos clínicos, cirúrgicos, anestésicos e analgésicos.

No âmbito da anestesia e analgesia veterinária, os mecanismos de mensuração e tratamento da dor dos *pets* convencionais, principalmente cães e gatos, já estão bem determinados e normalmente envolvem escalas de comportamentos voltados para a dor (MURREL et al., 2008; BRONDANI et al., 2011). Por outro lado, determinar a dor em répteis ainda é um desafio possivelmente pelo pouco conhecimento dos comportamentos desses animais. Recentemente, uma escala de dor foi proposta para toda a classe, porém os sinais utilizados são inespecíficos e serve apenas para nortear o clínico durante o tratamento (AYERS, 2016). Experimentalmente a dor em répteis é avaliada de acordo com a resposta frente a estímulos algícos como o térmico ou químico (SLADKY; MANS, 2012).

Toda essa dificuldade em avaliar a dor nos répteis somado ao fato de acreditarem que, por sua evolução genética, esses animais não são capazes

de sentir, faz com que as terapias analgésicas ainda sejam pouco exploradas para classe. Porém, assim como os mamíferos, os répteis também são capazes de perceber e manifestar a dor. O que deve ser levado em consideração é a diversidade de espécies dentro da classe reptiliana, gerando diversos comportamentos e diferentes respostas fisiológicas, farmacológicas e analgésicas às terapias empregadas (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008; MOSLEY, 2011).

Este estudo pretende esclarecer algumas dúvidas a respeito do tratamento da dor em iguanas verdes propondo, inicialmente, caracterizar os receptores opioides existentes nesta espécie. Posteriormente, visa estabelecer o tratamento mais indicado e, dessa maneira, evitar o uso empírico dos opioides em iguanas.

REVISÃO DE LITERATURA

Répteis

A classe Reptilia é composta por aproximadamente 9546 espécies, divididas em quatro ordens: Chelonia, Crocodylia, Sphenodontia e Squamata (PINCHEIRA-DANOSO et al., 2013). A ordem Chelonia é composta por animais que apresentam plastrão e carapaça envolvendo o corpo como os cágados, jabutis e tartarugas, marinhas e de água doce. A ordem Crocodylia é composta por crocodilos, aligatores e gaviais. A ordem Sphenodontia compreende apenas um único gênero vivo atualmente, conhecido como tuatara. E por último, a ordem Squamata, a qual é composta pelas cobras e lagartos.

A grande variedade de espécies, terrestres e aquáticas, torna a classe uma importante peça na manutenção e na monitoração da qualidade do ecossistema. O Brasil está situado em uma posição geográfica favorável para o desenvolvimento e criação de répteis (CORTÉZ-GOMÉZ; AGUDELO; AGUILAR, 2015). As condições climáticas do Brasil, predominantemente tropical, favorece a manutenção da temperatura corpórea e consequentemente o mantém o metabolismo constante destes animais (VALENZUELA-CABALLOS et al., 2015).

A fisiologia dos répteis difere em alguns pontos dos demais vertebrados, como por exemplo, a impermeabilidade da pele, a qual é seca e composta por placas queratinizadas conhecidas como escamas; possuem uma única cavidade, conhecida como cavidade celomática; o coração é basicamente dividido em dois átrios e um ventrículo, exceto os crocodilianos que possuem quatro câmaras cardíacas; a grande maioria das espécies possui o sistema porta renal ativo e apresentam uma grande capacidade de conservar água no organismo (MITCHELL, 2009).

A principal característica dos répteis é o fato de serem ectotérmicos, ou seja, a temperatura corporal varia de acordo com a variação ambiental. Assim como os animais endotérmicos, os répteis dependem da manutenção da

temperatura corporal ótima para desenvolver as atividades metabólicas. Entretanto, a manutenção térmica dos animais desta classe depende de fatores externos, como o contato com superfícies em diferentes temperaturas ou exposição aos raios solares, para aquecer ou resfriar seu organismo (ROCHA et al., 2009).

A temperatura de manutenção dos répteis apresenta uma grande variação de acordo com o período do dia, do ano e das atividades dos animais (MARTIN-JIMENEZ; HERNANDEZ-DIVERS, 2007). Sendo assim, deve-se considerar que para a manutenção e manejo ideal da Classe deve-se respeitar uma faixa de temperatura de conforto que possibilite o desenvolvimento de cada atividade diária, frequentemente descrita como POTZ (*preferred optimal temperature zone*) nos estudos científicos.

Além de permitir o desenvolvimento correto dos répteis, o controle da temperatura é determinante para o metabolismo dos fármacos. Ao reduzir a temperatura corporal de cascavéis (*Crotalus durissus*), Carregaro et al. (2009) relataram aumento no tempo da recuperação anestésica. Logo, pode-se concluir que a biotransformação e excreção dos fármacos depende da manutenção da temperatura corporal.

Apesar de existir uma grande variação no valor da temperatura ótima para criação das diferentes espécies de répteis, alguns autores indicam que a POTZ para manutenção da grande maioria dos répteis está entre 25 e 35°C (ROSSI, 2005; MARTIN-JIMENEZ; HERNANDEZ-DIVERS, 2007). Ainda, faz-se necessário o estabelecimento do fotoperíodo e da qualidade da luz para promover a absorção de nutrientes como o cálcio, por exemplo.

Outra importante característica observada na classe Reptilia está na fisiologia do sistema cardiovascular. A depender da espécie, o coração pode ser dividido em quatro câmaras, como nos crocodilianos, ou em três câmaras, presente nas demais espécies. Portanto, em iguanas o coração é tricavitário, dois átrios e um ventrículo. Mesmo tendo um só ventrículo a mistura de sangue, oxigenado e não oxigenado, é mínima em condições normais, isto porque um musculoso septo impede esta mistura durante os batimentos

cardíacos. Entretanto, esta característica anatômica possibilita a formação do *shunt*, por exemplo, quando o animal está em apneia o sangue que normalmente iria para os pulmões é redirecionado, no ventrículo, para a grande circulação (MURRAY, 2005).

Discute-se que os répteis possuem o sistema porta renal isto é, uma válvula na veia ilíaca externa na altura dos rins controlada pelo sistema nervoso autônomo (HOLZ et al., 1997). Quando há uma exacerbação na atividade do sistema nervoso simpático, essa válvula se abre e o sangue proveniente dos membros pélvicos e da cauda é direcionado para a veia cava caudal, atingindo a grande circulação. Por outro lado, quando o sistema parassimpático está exacerbadamente ativo, a válvula se fecha e o sangue proveniente dos membros pélvicos e da cauda é desviado para o parênquima renal. Acredita-se que este sistema permite a correta perfusão renal nas mais variadas condições, até mesmo quando o animal se apresenta em condição de privação de líquido (MITCHELL, 2009) prevenindo isquemia e necrose tubular.

A presença do sistema porta renal ativo sugere que a administração dos fármacos se restrinja apenas nos membros torácicos, pois há relatos (HOLZ et al., 1997; SYKES; GREENACRE, 2006) de que administrações nas extremidades caudais poderia implicar em excreção imediata sem atingir a circulação sistêmica e o sitio de ação, e mesmo em possíveis lesões renais causadas pela excreção dos fármacos antes de serem biotransformados. Kummrow et al. (2008) observaram que a biodisponibilidade da buprenorfina é reduzida, até 70%, quando a administração ocorreu no subcutâneo dos membros pélvicos de tartaruga de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*). Esta variação na biodisponibilidade também foi observada em cobras pítons, na qual a administração do terço caudal representou menor biodisponibilidade do que no terço cranial dos animais (HOLZ et al., 2002).

Apesar das evidências anteriores, o funcionamento do sistema porta renal ainda não está esclarecido para todas as espécies, bem como para as diferentes condições de manejo. Em jacaré do papo amarelo (*Caiman latirostris*) a qualidade da anestesia dissociativa não diferiu quando a administração dos fármacos foi no membro torácico ou no membro pélvico

(CAMPAGNOL et al., 2014). Isto pode sugerir que o estresse da contenção dos animais, logo a exacerbação do sistema nervoso simpático, tenha contribuído para a abertura das válvulas e o direcionamento do sangue para a grande circulação. Apesar de ser descrito em répteis, alguns estudos demonstram que sua presença não está totalmente esclarecida. Em tartaruga de orelha vermelha (HOLZ et al., 1997) e iguana verde (BENSON; FORREST, 2002), o fluxo sanguíneo proveniente dos membros pélvicos é desviado dos rins entrando diretamente na grande circulação, ao passo que o sangue da cauda é direcionado imediatamente para os rins.

Os estudos supracitados mostram que pouco se sabe sobre o sistema porta renal e sua real influência na distribuição e metabolismo dos fármacos, além de existir uma enorme variação fisiológica entre as espécies. Entretanto parece ser conveniente evitar administrações na região caudal, tendo a certeza que a administração torácica é mais segura neste âmbito.

Outra característica da classe é a necessidade de ingerir pouco volume de água. Esta resistência à desidratação é explicada por três alterações fisiológicas: a primeira é a baixa taxa metabólica, que implica em diminuta frequência respiratória e, conseqüentemente, redução na perda de água pela respiração (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008); a segunda é o tipo da excreta renal, o ácido úrico, o qual é pouco solúvel em água e, portanto, necessita de menor proporção de solventes para sua excreção (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008); e, por último, a presença das glândulas de sal, que excretam sódio, potássio, bicarbonato e cloreto em concentrações superiores as eliminadas pelos rins prevenindo a perda de água (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2008).

Iguanas são répteis da família da Iguanidae, que pertencem à ordem Squamata e à subordem Sauria, que é referente aos lagartos. Essa família é composta por mais de 35 espécies divididas em seis gêneros: *Amblyrhynchus* (iguana marinha de Galápagos); *Brachylophus* (iguanas das Ilhas Fiji); *Conolophus* (iguana terrestre de Galápagos); *Cyclura* (iguanas terrestres da América Central); *Iguana* (iguana verde e iguana do caribe); *Sauromalus* (iguana da América do Norte). Em geral, são animais herbívoros que

eventualmente se alimentam de insetos, apresentam hábitos diurnos e estão distribuídos em regiões com clima tropical a temperado. Normalmente são encontrados nas copas de árvores, porém existe uma espécie altamente adaptada à vida em oceanos, como é observado em Galápagos (SWANSON, 1950).

A criação de animais exóticos como *pet* cresce rapidamente em todo o mundo. É estimado que nos Estados Unidos existam 7,3 milhões de répteis criados como animais de estimação, bem como no Reino Unido em que os répteis *pet* ultrapassam o número de *pets* convencionais.

Entre todas as espécies de répteis, os lagartos ganham destaque na criação doméstica, pois não são animais peçonhentos como algumas cobras e apresentam comportamento dócil (KELSEY; EHRLICH; HENDERSON, 1997). Destes, destaca-se a espécie conhecida como iguana-verde ou lagarto do Novo Mundo. Esses animais são nativos do México, América Central e América do Sul (DIVERS, 1996) e compreendem uma das espécies de répteis mais comuns como *pet*. São animais dóceis, de fácil manejo e responsivos ao proprietário; aceitam a manipulação e apresentam extensa longevidade, chegando a viver 25 anos (STAHL, 2003).

Fisiopatologia da dor

A dor na medicina veterinária ainda é um desafio, pois os animais não possuem uma maneira clara de comunicação, o que faz com que o veterinário tenha que reconhecer os sinais da dor em seus pacientes. Somado a impossibilidade de verbalizar a dor, destaca-se que cada animal manifesta a dor com diferentes comportamentos.

Utilizar o termo dor para animais gera divergência, pois acredita-se que os mesmos não tenham envolvimento emocional na dor, e pela dor ser definida como uma experiência emocional a uma injúria tecidual (BATESON, 1991; RUTHERFORD, 2002). Discute-se que os vertebrados não humanos possam apresentar apenas nocicepção; eventos endógenos desencadeados diante de

um estímulo nocivo a fim de proteger a área estimulada (MOSLEY, 2011). Apesar desta discordância, sabe-se que os animais têm grande parte dos componentes envolvidos na nocicepção e na dor, uma vez que a fisiopatologia da dor é semelhante entre os vertebrados e que a dor compreende um mecanismo de proteção (BARROT, 2012; SNEDDON et al., 2014).

A nocicepção, parte fisiológica da dor, consiste em quatro processos, a saber: transdução, transmissão, modulação e percepção do estímulo nociceptivo. Inicialmente, uma estimulação nociceptiva (térmica, química e pressórica) é transformada em potencial pelos nociceptores (SNIDER; McMAHON, 1998). Estes nociceptores são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem, que por sua vez, são responsáveis por transmitirem o impulso nervoso referente a nocicepção até o sistema nervoso central (SNC).

Os neurônios de primeira ordem são divididos em três grupos: as fibras A β , mielinizadas e com grande diâmetro, as quais transmitem as sensações inócuas (vibração, tato e pressão) e têm a função de transmitir rapidamente o impulso, sendo consideradas fibras protetivas (KAJANDER; BENNETT, 1992); as fibras A δ , mielinizadas e que possuem diâmetro intermediário assim como a velocidade da transmissão, enviam informações referentes à dor aguda, rápida e forte, e são estimuladas apenas mediante estímulos intensos (nociceptores de alto limiar) (KAJANDER; BENNETT, 1992); e as fibras C, que são finas, sem mielina e de transmissão lenta. Estas são responsáveis por remeterem a segunda dor, que tem a característica de ser difusa e constante (WOOLF; KING, 1987).

Estes neurônios de primeira ordem, neurônios aferentes, irão transmitir a despolarização até o corno dorsal da medula espinhal para que o impulso seja então modulado (BROWN; KIRK; YANAGISAWA, 1973). Em mamíferos, o corno dorsal é dividido em 10 lâminas, sendo que os principais neurônios responsáveis pela modulação e propagação do estímulo álgico estão localizados nas lâminas superficiais I, II e III (TODD; SPIKE, 1993). Nestas lâminas, ocorre a conexão das fibras aferentes com interneurônios, excitatórios ou inibitórios, com os neurônios propioespinhas, responsáveis pela atividade

reflexa, e com os neurônios de projeção, que transmitem o impulso nervoso até o SNC. Isto permite uma resposta adequada e organizada frente a um estímulo doloroso (MILLAN, 1999)

Ainda na medula espinhal, os interneurônios são responsáveis por liberar neurotransmissores inibitórios e excitatórios responsáveis pela fase de modulação da intensidade da dor (BASBAUM; FIELDS, 1979; CRUZ; BASBAUM, 1985). Os principais neurotransmissores excitatórios são o glutamato e substância P que estes são responsáveis por propagarem o estímulo nociceptivo, pelas fibras de segunda ordem ou neurônios de projeção, até o SNC (AANONSEN; WILCOX, 1990). Por outro lado, opioides endógenos e o ácido gama-aminobutírico (GABA) são neurotransmissores inibitórios, impedindo ou reduzindo a intensidade da propagação do estímulo (HAMMOND, 1997; ZUBIETA et al., 2001; PARSADANIAN et al., 2015).

Uma vez modulado, o estímulo algico é encaminhado até o encéfalo por neurônios de projeção, localizados nas lâminas I, III e VI da medula espinhal (D'MELLO; DICKENSON, 2008). No encéfalo a intensidade, o local e os aspectos cognitivos (percepção) são percebidos pelo tálamo, mesencéfalo, sistema límbico e pela formação reticular (WILLIS; WESTLUND, 1997) fazendo com que o animal perceba e responda ao estímulo doloroso.

Como descrito anteriormente, a modulação da dor compreende uma etapa complexa envolvendo neurotransmissores inibitórios e excitatórios. Dentre os inibitórios destacam-se os opioides endógenos beta-endorfinas, encefalinas e dinorfinas. Estes são responsáveis por uma série de atividades metabólicas para manter a homeostase corporal, como controle do ciclo respiratório, da temperatura, do trato gastrointestinal, das funções cognitivas e da nocicepção. Os opioides endógenos atuam como neuromoduladores em três diferentes receptores, conhecidos com μ , κ e δ (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). Atualmente, a nomenclatura dos receptores opioides podem variar, sendo algumas possibilidades aceitas, como por exemplo, a padronizada pela *International Union of Pharmacologists* (IUPHAR, acessado em 06 de julho de 2015) é MOR para o receptor μ , KOR para o receptor κ e DOR para o receptor δ .

Os receptores opioides são estruturas proteicas localizadas na membrana celular que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (Figura 1). São ativados por opioides, endógenos ou exógenos, que se ligam ao domínio extracelular desencadeando o processo de sinalização da proteína G. Esta irá promover a abertura de canais de potássio e o fechamento de canais de cálcio alterando o potencial de ação de membrana e a concentração intracelular de íons, modificando a neurotransmissão (JORDAN; DEVI, 1999; STRANGE, 1999).

Figura 1 – Esquema ilustrativo de um receptor opioide (μ) acoplado a proteína G.

Fonte: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/65/1/223>.

O receptor μ é o receptor totalmente ativado pelos opioides agonistas puros (morfina) e parcialmente ativado pelo agonista-parciais (buprenorfinas) ou pelo agonista-antagonista (butorfanol) (PASCOE, 2000). Quando ativado por um fármaco opioide sua atividade está relacionada à analgesia e a alguns outros efeitos adversos. Além disto, esse receptor quando ativado por opioides endógenos, participa do controle da nocicepção, do ciclo respiratório e da atividade gastrointestinal (DHAWAN et al., 1996).

O receptor κ é um receptor fortemente ativado pelos opioides agonistas-antagonistas e de maneira mais fraca pelos opioide agonistas totais e parciais (PASCOE, 2000). Quando estimulado pelo opioides endógenos o mesmo é responsável pela termorregulação, controle da diurese, e secreções neuroendócrinas (DHAWAN et al., 1996). Já sua estimulação pelos fármacos opioides é caracterizada por baixa ocorrência de efeitos colaterais bem como por uma analgesia fraca (PASCOE, 2000).

Já o receptor δ é o sítio ativo da principal endorfina, a deltorfina e é o local de ação de alguns antagonistas derivados da naltrexona (KOSTERLITZ et al., 1980). Está distribuído no sistema nervoso central (SNC), bulbo olfatório e neurônios sensitivos periféricos, e sua atividade está ligada à analgesia e funções cognitivas (DHAWAN et al., 1996). Os opioides agonistas totais apresentam uma baixa afinidade por esse receptor (PASCOE, 2000).

Um alinhamento dos receptores opioides, com auxílio do software BLAST, mostra que essas estruturas foram bem conservadas durante a evolução das espécies (Figura 2). Algumas estruturas, como os domínios transmembranas, são preservados entre os vertebrados como homem, bovino, sapo, tubarão, galinha e peixes. Os receptores μ e δ de galinha, sapo e mamíferos apresentam similaridade de 96% e 98%, respectivamente, e o receptor κ de sapo é 91% semelhante ao receptor humano (LI; KEITH; EVANS, 1996).

Figura 2 – BLASTp da sequência de aminoácidos referentes aos μ de diferentes vertebrados. Nesta imagem observa-se a região que abrange os aminoácidos 390 até 400, a qual é altamente conservada entre os vertebrados.

Gallus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSTVRQNTRDHASTANTVDRTNHQLE	405
Columba	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSTVRQNTRDHASTANTVDRTNHQV-	293
Alligator	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSTRIQNTREHASTANTVDRTNHQLE	389
Mus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSARIQNTREHPSTANTVDRTNHQLE	388
Rattus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSTVRQNTREHPSTANTVDRTNHQLE	388
Homo	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSNIEQQNSTRIQNTRDHPSTANTVDRTNHQLE	390
Macaca	SCLNPVLYAFLDEDFKRCFREFCIPTSSNIEQQNSTRIQNTRDHPSTANTVDRTNHQLE	390
Bos	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSTRIQNTRDHPSTANTVDRTNHQLE	391
Sus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTIEQQNSARIQNTRDHPSTANTVDRTNHQLE	391
Ophiophagus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSTSTIEQQNSTRIQNTREHASSAHTMDRTNQV-	316
Taricha	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSSTAEQQNSIRVRHNTRDHSTANTVDRTNHQV-	398
Danio	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCVPSVLDLQNSTRSRNPQRDQSSGHTVDRTNQV-	384
Carassus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCVPSVLDLQNSTRTNPQREGQSSGHTADRTNQV-	383
Catostomus	SCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCVPSVLDLQNSTRNSNPQCEGQSSGHTKVDRTNQV-	383
*****:*****::** *****:*. * : *** * : : *::.. **.*:**		
Gallus	LQEAETTPLP	415
Columba	-----	
Alligator	LLEAETTPQP	399
Mus	NLEAETAPLP	398
Rattus	NLEAETAPLP	398
Homo	NLEAETAPLP	400
Macaca	NLEAETAPLP	400
Bos	NLEAETTPLP	401
Sus	NLEAETAPLP	401
Ophiophagus	-----	
Taricha	-----	
Danio	-----	
Carassus	-----	
Catostomus	-----	

Fonte: própria autoria.

Estudo da dor em répteis

Acreditava-se que pela posição filogenética e pelo desenvolvimento anatomofisiológico da classe, os componentes necessários para nocicepção não estivessem presentes em répteis. Isto explica o porquê de acreditar que essa classe não possuía a capacidade de sentir dor. Porém, são encontradas na literatura evidências da presença de estruturas envolvidas na nocicepção, tais como nociceptores periféricos (LIANG; TERASHIMA, 1993), estruturas centrais envolvidas na modulação da dor (TEN DONKELAAR; DE BOER-VAN HUIZEN, 1987), neurotransmissores e componentes do sistema opioide (XIA et al., 2001).

Outras evidências da presença de dor em répteis são a capacidade de demonstrarem resposta aversiva a estímulos álgicos, como reflexo de retirada de membro frente ao estímulo térmico (SLADKY et al., 2007; SLADKY;

KINNEY; JOHNSON, 2008), e a tolerância ao aumento da temperatura no durante o teste de *termal threshold* (COUTURE et al., 2017) quando os mesmos são tratados com analgésicos. De apresentarem alterações fisiológicas, como o aumento da frequência cardíaca, frente ao estímulo químico (WILLIAMS et al., 2016). Além disto, os répteis apresentam anorexia após intervenção cirúrgica sem o correto tratamento da dor (JAMES et al., 2017). Todas estas evidências mostram que os répteis apresentam dor frente a um estímulo nocivo e que também se beneficiam com tratamentos analgésicos (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011).

Em lagartos (TEN DONKELAAR; DE BOER-VAN HUIZEN, 1981), tartarugas (REINER, 1987) e jacarés (BRAUTH, 1984) são descritas a presença de diencéfalo, mesencéfalo, tálamo, formação reticular e substância negra, os quais participam da modulação e percepção da dor em mamíferos e possivelmente na modulação e percepção da dor em répteis. Destaca-se ainda a identificação de neurotransmissores envolvidos no processo da dor, como catecolaminas, serotonina (WOLTERS et al., 1985), substância P e opioides endógenos (NG; HON; CHENG, 1986; WOLTERS; TEN DONKELAAR; VERHOFSTAD, 1986) além de pró-encefalinas (GOLDSMITH et al., 1992) distribuídos pelo encéfalo e pela medula espinhal de diferentes espécies de répteis.

Outra similaridade entre mamíferos e répteis é a presença de nociceptores periféricos, identificados na pele da face e na mucosa oral de cobras da subfamília *Crotalinae* (LIANG; TERASHIMA, 1993). Além da presença de três lâminas no corno dorsal da medula espinhal de lagartos *Gekko gekko* (TEN DONKELAAR; De BOER-VAN HUIZEN, 1987). Neste estudo, foram detectados neurônios responsáveis pela projeção do impulso nervoso do corno dorsal até o encéfalo, semelhante ao que é observado em mamíferos, em que a projeção do impulso nociceptivo ocorre nas primeiras lâminas do corno dorsal da medula espinhal (D'MELLO; DICKENSON, 2008).

Por último, ressalta-se que assim como os mamíferos, os répteis possuem receptores opioides. Xia et al. (2001) identificaram que tartaruga de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*) apresentam no córtex cerebral e

no hipocampo os receptores δ e μ sem demonstrar, entretanto, correlação com dor e analgesia. O que se sabe até então é que estes receptores estão, fisiologicamente, correlacionados a processos reprodutivos e de termorregulação (LINDBERG; WHITE, 1986).

Apesar das evidências da presença da dor em répteis, em 2004 os membros da *Association of Reptile and Amphibia Veterinarians* foram questionados sobre a presença da dor em répteis. O resultado mostrou que 98% dos veterinários reconhecem que os répteis sentem dor porém, apenas 39% desses afirmaram administrar algum tipo de analgésico nos animais (READ, 2004). Isso exemplifica a inexperiência dos médicos veterinários em reconhecer e tratar a dor nesses animais. A incapacidade em perceber alterações comportamentais nas diferentes espécies de répteis frente a um estímulo doloroso, a falta de dados sobre a eficácia, a dose a ser utilizada e a presença de efeitos indesejáveis dos fármacos na classe culminam em um tratamento inadequado ou até mesmo a ausência do mesmo (MOSLEY, 2005).

Avaliar a dor em répteis ainda é um desafio, pois as escalas de dor utilizadas em mamíferos (MURRELL et al., 2008; BRANDONI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014) não são aplicáveis para répteis por serem espécie-específicas. Recentemente uma escala para avaliar a dor foi desenvolvida para répteis, especificamente para cobras, lagartos e quelônios (AYERS, 2016) porém, deve-se destacar que a escala é aplicável a dor crônica e pode sofrer influência com a subjetividade dos avaliadores.

Arelado a dificuldade em avaliar a dor em répteis e para reduzir a subjetividade ao avaliar a dor com escalas, normalmente, os estudos de dor nesses animais são realizados com a inferência de algum tipo de estímulo nociceptivo como, por exemplo, o estímulo térmico (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011; COUTURE et al., 2017; LEAL et al., 2017), químico (WILLIAMS et al., 2016, JAMES et al., 2017) ou cirúrgico (JAMES et al., 2017). Aparentemente, o estímulo nociceptivo mais utilizado em estudos científicos com répteis é o estímulo térmico, no qual é avaliada a latência do reflexo de retirada dos membros ou cauda em tartarugas (SLADKY et al., 2007; BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011), cobras e lagartos (SLADKY; KINNEY; JOHNSON,

2008; LEAL et al., 2017), os quais evidenciam que esse estímulo produz respostas consistentes para aqueles animais.

O uso do estímulo térmico apresenta algumas vantagens como a possibilidade de fuga rápida, o cessar imediato do estímulo que previne lesões teciduais e a fácil aplicação uma vez que os animais estão adaptados (MOSLEY, 2011; SLADKY; MANS, 2012). Entretanto, deve-se destacar que é observada uma variação no tempo da latência do reflexo de retirada do membro de acordo com a espécie estudada. Lagartos do deserto, acostumados a altas temperaturas ambientais, parecem tolerar por mais tempo temperaturas mais altas em comparação com tartarugas, oriundas de ambientes mais frios (SLADKY; MANS, 2012). Outro ponto que pode influenciar na resposta ao estímulo é a presença ou não do observador. Fleming e Robertson (2012) relatam aumento na tolerância ao estímulo térmico de iguanas quando o observador estava presente, assim como Bisetto (2016) que relatou aumento no tempo de latência da retirada do membro quando os observadores foram alterados.

O tratamento da dor em répteis ainda é pouco expressivo, porém dentre os fármacos analgésicos, os opioides compõe o grupo farmacológico mais amplamente estudado para o tratamento da dor em diversas espécies. Em mamíferos, a analgesia promovida pelos opioides está relacionada com a interação entre a molécula do fármaco e seu OR específico, μ , δ ou κ , em diferentes pontos do SNC e dos nervos periféricos (MINAMI; SATOH, 1995).

Os opioides são classificados de acordo com a interação que estabelecem com os receptores, podendo ser classificados como agonista puro (morfina, metadona, fentanila e seus derivados), agonista parcial (buprenorfina e nalbufina), agonista-antagonista (butorfanol e nalbufina) e antagonista (naloxona e naltrexona).

A morfina é conhecida como o protótipo dos opioides e, a partir dela, novos fármacos sintéticos foram desenvolvidos. A analgesia da morfina está relacionada com a sua ação agonista em receptor μ , sendo que doses altas

promovem ação em receptor κ . É o opioide mais utilizado em medicina veterinária devido a sua segurança, eficácia e tolerância (PASCOE, 2000).

Em répteis, a morfina apresenta resultados analgésicos contraditórios nas diferentes espécies estudadas, o que mostra a necessidade de estudos em todas as espécies de répteis. O uso de 40 mg/kg de morfina não promoveu atividade antinociceptiva em cobras do milho (*Pantherophis guttatus*) submetidas ao estímulo térmico (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008). Também não foi eficaz em reduzir a frequência cardíaca de cobras píton bola (*Phyton regius*) submetidas ao estímulo químico com capsaicina e tratadas com 10 mg/kg de morfina (WILLIAMS et al., 2016).

Para dragões barbados (*Pogona vitticeps*), o uso de 10 mg/kg de morfina promoveu analgesia moderada, apenas 4 horas após a administração, quando a tolerância ao aumento da temperatura foi avaliada (COUTURE et al., 2017). Porém, a latência do reflexo de retirada do membro aumentou em tartarugas de orelha vermelha e dragões barbados (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON 2008) e em teiús (LEAL et al., 2017) submetidos a termoalgiometria, o mesmo ocorrendo em tartarugas de Bell (*Kinixys speikii*) submetidas à administração de formalina como estímulo nociceptivo (WAMBUGU et al., 2010). Esses estudos apontam a morfina como uma alternativa aparentemente eficiente para o controle da dor de algumas espécies de répteis.

Uma consideração importante a ser feita é a variação nas doses estudadas. Estudos com a morfina em répteis já avaliaram os efeitos de doses variando entre 0,5 (KANUI; HOLE, 1992) e 40 mg/kg (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008). No estudo com teiús conduzido pelo presente grupo de pesquisa (LEAL, 2015), foi demonstrado que 5 mg/kg produziu analgesia de curta duração, 10 mg/kg apresentou analgesia de até 12 horas, entretanto 20 mg/kg morfina culminou com óbito de um animal. Isto sugere que a dose de morfina em répteis pode variar entre as espécies.

O butorfanol é amplamente indicado pela literatura para répteis, com doses variando entre 0,02 mg/kg e 25mg/kg (READ, 2004). Possivelmente a

ampla indicação do uso do butorfanol se deve a facilidade em adquirir o fármaco (SCHNELLBACHER, 2010), ao fato de existir um efeito teto que promove menos depressão respiratória, por não liberar histamina (PASCOE, 2000) e possivelmente por grande parte dos veterinários acreditarem que aves e répteis só possuem receptores KOR, baseados em um resultados de um estudo anterior (MANSOUR, 1988), e portanto não responderiam aos agonistas puros.

Assim como a morfina, o uso do butorfanol em répteis apresenta resultados controversos. Esse opioide não apresentou efeito analgésico frente à estimulação térmica em tartarugas da orelha vermelha e dragões barbados (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008), teiús (LEAL et al., 2017) e iguanas tratadas com 1 mg/kg (FLEMING; ROBERTSON, 2012), assim como não reduziu a frequência cardíaca de píton bola frente ao estímulo químico (WILLIAMS et al., 2016). Em contrapartida, uma dose de 20 mg/kg de butorfanol foi eficaz frente ao estímulo térmico em cobras do milho (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008).

Uma possível explicação para esses resultados divergentes com o uso dos opioides pode estar na diferença de distribuição e na concentração dos receptores opioides no SNC dos animais dessa classe. Apesar do gene dos receptores opioides ter sido altamente conservada durante a evolução dos vertebrados (LI; KEITH; EVANS. 1996), sabe-se que a concentração e a distribuição dos receptores opioides diferem entre as espécies (MANSOUR et al., 1988). Ao comparar a distribuição dos receptores opioides em dois mamíferos, o rato (μ - 41%, δ - 50% e κ - 9%) e o homem (μ - 29%, δ - 34% e κ - 37%), pode-se notar que os μ e δ estão em maior concentração no rato do que no homem; por outro lado, o κ é mais concentrado no homem do que no rato (MANSOUR et al., 1988). Este estudo nos faz pensar que, possivelmente, existe uma diferença na distribuição dos receptores opioides nos répteis, e isto pode ser responsável pelas diferentes respostas frente ao uso dos fármacos opioides.

Além da analgesia, principal efeito esperado dos opioides, sabe-se que dependendo da espécie, da dose e da condição clínica do animal, os opioides

podem causar excitação ou sedação (MAMA; PASCOE; STEFFEY, 1993; MAIANTE et al., 2009). Até o presente momento, o único estudo que avalia comportamentos relacionados a sedação dos opioides em répteis foram produzidos pelo grupo de pesquisa (LEAL, 2015). Para iguanas o que é visto na literatura é a influência dos opioides, principalmente do butorfanol, na redução da concentração de anestésicos inalatórios (HERNANDEZ-DIVERS et al., 2005; MOSLEY, 2005; MOSLEY, 2011) ou na tentativa de utilizá-lo como agente indutor (TRNKOVÁ; KNOTKOVÁ; KNOTEK, 2008) porém, estudos que determinam o grau de sedação dos opioides em iguanas são desconhecidos pelo nosso grupo de pesquisa.

A avaliação da sedação promovida por diferentes fármacos em répteis normalmente é realizada pelo emprego de escalas que pontuam os diferentes comportamentos dos animais. Esses tipos de escalas já foram utilizadas para quelônios (BIENZLE; BOYD, 1992; SLEEMAN; GAYNOR, 2000; EMERY et al., 2004), jacarés (CAMPAGNOL et al., 2014) e lagartos (BISETTO, 2016; LEAL, 2015; SOBREIRA; BRESSAN; CARREGARO, 2016). Destaca-se que os estudos de sedação em lagartos supracitados foram realizados com escalas especialmente desenvolvidas pelos autores. Apesar de amplamente utilizadas e de serem eficazes na avaliação da sedação em répteis, deve-se destacar que esse tipo de avaliação pode sofrer grande influência dos avaliadores, uma vez que essas escalas não são validadas.

Em animais de laboratório a sedação é avaliada por diferentes testes comportamentais. O teste de campo aberto é um dos testes consagrados para avaliar a atividade locomotora de ratos submetidos a tratamentos que possam promover alterações do SNC. Trata-se de uma arena dividida em quadrantes iguais, onde o animal é colocado no centro e sua atividade locomotora é avaliada por um período de tempo. Em répteis, o teste de campo aberto foi utilizado com sucesso em serpentes para avaliar o comportamento frente ao predador (HERZOG; BURGHARDT, 1986) e em teiús, tanto para avaliar a sedação frente ao opioides (LEAL, 2015) como para avaliar a sazonalidade desses animais (BISETTO, 2016). Porém, o teste não foi aplicável para iguanas verdes tratadas com midazolam (SOBREIRA; BRESSAN;

CARREGARO, 2016) e para avaliar a sazonalidade destes animais (BISETTO, 2016). Acredita-se que esta inabilidade do teste pode estar relacionado ao comportamento arborícola dos animais (BISETTO, 2016).

Em contrapartida, esses estudos anteriores (BISETTO, 2016; SOBREIRA; BRESSAN; CARREGARO, 2016) revelaram que uma possibilidade plausível para avaliar a sedação em iguanas é o teste de natação forçada, uma vez que se trata de uma espécie com excelente habilidade de natação (VLECK et al., 1981). Nesta metodologia, empregada em ratos, avalia-se as alterações promovidas por fármacos no SNC, ao comparar o tempo de imobilidade, mantendo apenas a cabeça fora da água, com o tempo de natação forçada (CALIL et al., 2002). Originalmente, este teste é empregado para testar fármacos antidepressivos assim, animais não tratados tendem a permanecer mais tempo imóveis do que os animais tratados (PORSOLT; LePICHON; JALFRE, 1977).

HIPÓTESES

A hipótese do presente estudo é que iguanas verdes possuem os receptores opioides μ , κ e δ distribuídos pelo sistema nervoso central (SNC). Ademais, que a morfina será capaz de promover sedação e analgesia ao passo que o butorfanol não será efetivo para as iguanas.

OBJETIVO DA PESQUISA

Objetivo geral

Caracterizar os receptores opioides no SNC de *Iguana iguana* (iguana-verde) e avaliar o efeito sedativo e analgésico da morfina e do butorfanol nesses animais.

Objetivos específicos

Determinar a sequência dos mRNAs dos receptores opioides de iguanas a partir do transcriptoma do SNC, utilizando a técnica de RNA-Seq.

Caracterizar, quando a porcentagem de distribuição, os receptores opioides presentes no SNC de iguanas utilizando a análise de imunohistoquímica.

Avaliar a sedação promovido por duas doses de morfina (5 e 10 mg/kg) e de butorfanol (5 e 10 mg/kg) administrados pela via intramuscular em iguanas, utilizando o teste de natação forçada para quantificar a atividade física dos animais.

Avaliar e comparar o efeito antinociceptivos desses dois opioides, administrados pela via intramuscular, em iguanas submetidas ao estímulo nociceptivo térmico na face plantar do membro pélvico.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto em questão foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 14.1.477.74.0) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio – Protocolo 44767-2), conforme a instrução normativa nº154, de 01 de março de 2007.

Animais

Para o estudo, foram obtidas iguanas jovens provenientes do jacarezário mantido pelo Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Rio Claro, SP. Na ocasião da aquisição os animais apresentavam 2 anos de idade e eram imaturas sexualmente, podendo assim serem machos ou fêmeas.

No lagartário experimental da FZEA-USP, os animais foram mantidos em duas caixas de fibra com capacidade de 750 litros contendo substrato de maravalha, dois recipientes plásticos com água suficiente para os animais se banharem, e troncos de árvores, permitindo que desenvolvam seu hábito arborícola (Figura 3).

Figura 3 – Caixa de fibra para alojamento dos animais. Destaca-se a presença de animais nos galhos, sob o *basking* e animais nos galhos fora do *basking*. Destaca-se ainda a presença da lâmpada UV e o fornecimento de alimento e água.

Fonte: Própria autoria.

O lagartário (18m²) possuía climatização com ar condicionado, a fim de manter a temperatura ambiente com uma variação entre 25°C e 30°C, conforme recomendações de Fleming e Robertson (2012). Cada caixa possuía uma lâmpada incandescente infravermelha de secagem 250w X 200v¹, para o fornecimento do aquecimento focal (35°C - 45°C - *basking*), e uma lâmpada de espectro solar integral para terrários com necessidade de radiação UV², para o fornecimento de 2% de raios UV-A e 0,5% de raios UV-B, necessários para garantir o correto metabolismo e atividade dos animais. As duas fontes de luz era ativadas por um timer temporizador analógico sempre as 6 horas e desativadas as 18 horas. Diariamente, os animais recebiam uma dieta

¹ Empalux, São Paulo, Brasil.

² Reptil Jungle Pro Terra T8 30w, JBL GmbH & Co. KG, Alemanha.

composta de couve manteiga, rúcula, almeirão, suplementada com cálcio³ e vitaminas⁴ específicas para os répteis, e a cada 15 dias era acrescido à dieta ração comercial para jabutis⁵. As fontes de água foram trocadas diariamente e era permitido livre acesso à água durante todo o dia.

O uso dos animais nas etapas experimentais respeitou o tempo de adaptação e climatização às novas condições de manutenção, o qual foi de três meses. Posterior a isto, foi realizada a desverminação com o uso do febendazole⁶ (25 mg/kg, via oral) e a colocação de um microchip⁷ no subcutâneo dos animais para identificação e fornecimento da temperatura corporal, coletada durante todas as etapas experimentais (Figura 4). Antes do início da experimentação foi realizada uma avaliação clínica e física dos animais para confirmar a higidez de acordo com os parâmetros fisiológicos dentro da normalidade para a espécie (ROSSI, 2005).

Figura 4 – Imagens obtidas durante a colocação do microchip nas iguanas. A – aplicação de anestésico local (0,1 mL de Lidocaína 2%); B – Inserção do aplicador do microchip no subcutâneo da região escapular.

Fonte: Própria autoria.

Etapas 1 - Caracterização dos receptores opioides

Para realização desta primeira etapa, três iguanas jovens, nesta fase já com 3 anos de idade, saudáveis, sem distinção sexual e pesando 100 gramas

³ Repti Calcium, Zoo Med Laboratories, Inc, California, EUA.

⁴ Reptivite, Reptile Vitamins, Zoo Med Laboratories, Inc, California, EUA.

⁵ Ração para Répteis Jabuti, Alcon, Camboriu, SC.

⁶ Top Gard Puppy Suspensão, Vansil, Descalvado, SP.

⁷ Leitora Pocket reader Allflex®. Joinville, SC.

foram submetidas à eutanásia para que fosse possível a colheita do SNC dos animais (encéfalo, tronco encefálico, cerebelo e porção inicial da medula espinhal) (Figura 5). Estes materiais biológicos colhidos foram então utilizados para obter o sequenciamento dos receptores opioides (material de dois animais) e para confecção de lâminas de imuno-histoquímica para a localização destes receptores (material de um animal).

Figura 5 – Desenho esquemático da anatomia macroscópica do sistema nervoso central de lagartos.

Fonte: <http://hunter-hughes.wixsite.com/tpwbiology/single-post/2015/05/21/Nervous-System>, traduzido por BRESSAN TF.

Para isto, os animais foram pré-tratados com midazolam⁸ (2 mg/kg) pela via intramuscular (IV) e, posteriormente, submetidos à indução anestésica com tiopental⁹ (10 mg/kg), administrado na veia da cauda (IV). Após constatado plano adequado/profundo de anestesia (sem resposta ao estímulo doloroso de pinçamento da cauda), foi administrado 20 mL de cloreto de potássio 19,5%¹⁰, por punção intracardíaca. O óbito dos animais foi confirmado

⁸ Dormire® 15mg, Cristália, Itapira-SP, Brasil

⁹ Thiopentax® 1g, Cristália, Itapira-SP, Brasil

¹⁰ Cloreto de potássio 19,1%, Isofarm, Eusébio-CE, Brasil

após a ausência de batimentos cardíacos durante a auscultação com doppler ultrassônico¹¹ por mais de 2 minutos.

Determinação da sequência dos receptores opioides

Colheita de material e extração do RNA

A colheita do SNC das duas iguanas destinadas ao teste de sequenciamento do RNA (RNAseq) foi realizada de maneira asséptica a fim de evitar contaminação com outros RNAs que não os do próprio animal. Para isto, com uma lâmina de bisturi estéril, foi realizado um corte longitudinal no centro do crânio que permitiu a abertura da calota craniana e exposição do SNC. O SNC foi descolado das meninges e inteiramente fragmentado com auxílio de outra lâmina de bisturi e uma pinça anatômica. O *pool* de fragmentos de diferentes partes do SNC foi conservados à 7°C, embebidos em RNAlater RNA Stabilization Solution¹² por 24 horas (Figura 6).

Figura 6 – Imagens obtidas durante a colheita do Sistema Nervoso Central (SNC) de uma iguana. A – administração intracardíaca de cloreto de potássio, após obtenção de plano profundo de anestesia; B – abertura longitudinal do crânio com exposição do SNC; C – fragmentos do SNC após colheita.

Fonte: Própria autoria.

Posteriormente a este período, as amostras foram retiradas do RNAlater e conservadas a -80°C até a extração do RNA. A extração do RNA foi realizada

¹¹ Doppler Vascular, Parks Medical Electronics, Inc., Aloha, Oregon, EUA

¹² AM7020, Ambion, Life Technologies, Califórnia, EUA

utilizando Trizol¹³, conforme técnica descrita por Sambrook e Russel (2001) e a integridade e concentração das amostras foi confirmada usando eletroforese capilar em gel no equipamento Bioanalyzer 2100 com *Labchips RNA 6000 Nano*¹⁴ de acordo com as orientações do fabricante (Figura 7).

Figura 7 – Imagens obtidas durante a extração do RNA utilizando a técnica do Trizol. A – Fragmentos do Sistema Nervoso Central embebidos em Trizol; B – estratificação do RNA, DNA e proteínas após algumas etapas de extração; C – observação das bandas de RNA formadas após a extração.

Fonte: Própria autoria.

Síntese do cDNA e sequenciamento das bibliotecas de RNA

O sequenciamento foi terceirizado pelo laboratório Centro de Genômica da USP¹⁵. Seguiu-se o protocolo do *kit TruSeq™ RNA Sample Prep* de acordo com o guia *TruSeq® RNA sample preparation v2*¹⁶ que, resumidamente, isolou os RNAs com cauda poliA de um pool de RNAs total com *beads* de oligo-dT em duas rodadas de purificação. Esses RNAs isolados foram então fragmentados para a síntese da primeira fita de cDNA, a qual foi realizada utilizando *primers* hexâmeros randômicos e enzima transcriptase reversa. Por sua vez, a segunda fita de cDNA foi produzida a partir da substituição da fita de RNA. As fitas duplas de cDNAs tiveram então suas extremidades reparadas pelas enzimas 3'-5' exonucleases e foram removidos os nucleotídeos sobressalentes de

¹³ T9424, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

¹⁴ Agilent Technologies Ireland, Dublin, Irlanda

¹⁵ ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil

¹⁶ Illumina, USA, 2012, Part # 15026495 Rev. D

ambas as extremidades, a fim de evitar que os fragmentos se ligassem a outros. Adaptadores *reads paired-end* foram adicionados às extremidades poliA para iniciar as leituras e formação das bibliotecas, que foram sequenciadas no equipamento *Illumina HiSeq 2500*, utilizando o *kit TruSeq PE Cluster* e *TruSeq SBS kit* (2x100pb). Utilizou-se uma *lane* para realização da formação das bibliotecas de RNA.

Alinhamento de reads e análise da expressão gênica

A qualidade do sequenciamento foi confirmada pelo software *FastQC*¹⁷ e os adaptadores foram removidos com o uso do software *SeqClean*¹⁸, a fim de manter apenas *reads* maiores ou iguais a 50 pares de bases de comprimento e com qualidade superior a 20. Em seguida, concatenou-se todos os *reads senso* e todos os *reads anti-senso* e a montagem *denovo* dos *reads* e a geração do transcriptoma foi realizada pelo programa Trinity (HAAS et al., 2014), com os parâmetros default, adicionando o parâmetro “trimmomatic” para o controle de qualidade. O arquivo de referência, contendo possíveis genes reconstruídos, foi comparado com a base de proteínas do UniProt utilizando o algoritmo BLASTn do BLAST+ (CAMACHO et al., 2009) para identificar a possível função de cada gene.

Após a identificação de cada gene foi possível buscar a sequência genética compatível com os receptores opioides μ , κ e δ . A confirmação de que tais sequências eram de fato dos receptores procurados foi realizada através de um BLAST, no qual a sequência obtida foi testada com todo o banco de dados do NCBI.

Imuno-histoquímica dos receptores opioides no SNC

¹⁷ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

¹⁸ <https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>

Seleção dos anticorpos anti-receptores opioides

Um dos cuidados necessários ao desenvolver a técnica de imunohistoquímica para localização dos receptores opioides no SNC das iguanas foi a escolha adequada dos anticorpos anti-receptores opioides. Até o momento não existem anticorpos específicos para iguanas e, por isso, foi necessário escolher os anticorpos que se alinhassem em algumas partes da sequência obtida com a técnica anterior.

Os anticorpos selecionados foram o *Anti-OPRK1/Kappa Opioid Antibody IHC-plus* (LS-A228), o *Anti-OPRD1/Delta Opioid Antibody IHC-plus* (LS- A224) e o *Anti-OPRM1/Mu Opioid Antibody* (aa161-187) (LSC163127), todos da empresa LifeSpan BioSciences, Inc.®. Para chegar a essa seleção foi necessário transformar as sequências de nucleotídeos em sequências de aminoácidos, utilizando o software *ExPASy Translate Tool*¹⁹. Com as sequências de aminoácidos, foi realizado um BLAST²⁰ para identificar as regiões homólogas entre as sequências dos receptores opioides do homem (*Homo sapiens*) e das sequências obtidas para iguanas (Figura 8). Após identificar as regiões homólogas, iniciaram-se as buscas por anticorpos já testados e vendidos comercialmente que se ligassem a uma dessas regiões (Figura 9) a fim de evitar erros de marcação por falsas ligações antígeno-anticorpo.

¹⁹ <https://web.expasy.org/translate/>

²⁰ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Figura 8 – Parte do BLAST entre a sequência de aminoácidos do receptor μ humano (Query) e de iguana (Sbjct).

Download ▼ Graphics						
unnamed protein product						
Sequence ID: Query_232679 Length: 493 Number of Matches: 1						
Range 1: 194 to 482 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match						
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
547 bits(1409)	0.0	Compositional matrix adjust.	270/289(93%)	278/289(96%)	0/289(0%)	
Query 1	MKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSVNYLLGTWPFGTTICKIVISIDYYNMFTSIFTL				60	
Sbjct 194	MKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSVNYLLGTWPFGTTICKIVISIDYYNMFTSIFTL				253	
Query 61	CTMSVDRIYAVCHPVKALDFRTPRNAKIVNVCNWI+SSAIG+PVM MATTK GSIDCT				120	
Sbjct 254	CTMSVDRIYAVCHPVKALDFRTPRNAKIIINVCNWI+SSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCT				313	
Query 121	LKFSHPAWYWNLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRI				180	
Sbjct 314	LKFSHPAWYWNLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRI				373	
Query 181	TRMVLVVAVFIVCWTPIHIVVIVKALVHIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAF				240	
Sbjct 374	TRMVLVVAVFIVCWTPIHIVVIVKALVHIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAF				433	
Query 241	LDENFKRCFREFCIPTASTIEQQNSTRIRQNRDHPSTANTVDRTNQV				289	
Sbjct 434	LDENFKRCFREFCIPTSSNIEQQNSTRIRQNRDHPSTANTVDRTNHQL				482	

Fonte: Própria autoria.

Figura 9 – Sequência completa de aminoácidos referentes ao receptor μ humano (em preto) sobreposta pela sequência de aminoácidos referentes ao receptor μ de iguana (em vermelho). Destacado em verde a sequência de aminoácidos ao qual o anticorpo se liga.

```

MCLHRRVPSEETYSLDRFAQNPPFLPPPSLPASESRMAHAPLLQRCGAARTGFCKKQQELWQRRKEAAEA
LGTRKVSVLLATSHSGARPAVSTMDSSAAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNLSHLDGNLSDPCGP
NRTDLGGRDLSLCPPTGSPSMITAITIMALYSIVCVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADA
LATSTLPFQSVNYLLGTWPFGTILCKIVISIDYYNMFTSIFTLCTMSVDRIYAVCHPVKALDFRTPRNAK
IINVCNWI+SSAIGLPVMFMATTKYRQGSIDCTLTFSHPAWYWNLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLM
ILRLKSVRMLSGSKEKDRNLRIITRMVLVVAVFIVCWTPIHIVVIVKALVHIPETTFQTVSWHFCIALG
YTNSCLNPVLYAFDENFKRCFREFCIPTSSNIEQQNSTRIRQNRDHPSTANTVDRTNHQLENLEAETA
PLP

```

Fonte: Própria autoria

Imuno-histoquímica

Para realização desta etapa, uma iguana foi levada até o laboratório onde seria realizado o exame, e neste local foi realizada a eutanásia do animal.

O SNC da iguana foi processado de maneira que permitisse a realização da técnica de imuno-histoquímica. Para isto, imediatamente após a eutanásia do animal conforme descrito anteriormente, o SNC (encéfalo, tronco encefálico, cerebelo e a porção inicial da medula espinhal) foi colhido inteiro e fixado em formol tamponado a 10% por 48 horas para então ser confeccionado o bloco de parafina com o material biológico. Foram realizados cortes de 5 µm no bloco para confecção das lâminas.

A técnica de imuno-histoquímica, também foi terceirizada e desenvolvida pelo laboratório VetPat²¹ e o protocolo utilizado respeitou a seguinte ordem:

1º passo - Imersão em solução de 70 mL de metanol e 30 mL de peróxido de hidrogênio (30 vol%), durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS;

2º passo - Recuperação antigênica em calor úmido $\pm$ 90°C (Steam Cuisine 700 Hi Speed – T-Fal), durante 20 minutos em tampão Citrato (pH 6,0);

3º passo- Esfriamento em temperatura ambiente, por no mínimo 20 minutos, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS;

4º passo - Bloqueio das reações inespecíficas, realizado através da incubação das lâminas em leite em pó (5%) diluído em PBS, durante 25 minutos;

5º passo - Incubação, overnight, com anticorpo primário (OPRD1; OPRM1 e OPRK1 – todos na diluição 1:50) diluídos em PBS, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS;

6º passo - Incubação, durante 30 minutos, com anticorpo secundário Goat anti Mouse Biotinilado (1:100) diluído em PBS, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS;

²¹ VetPat, Campinas-SP, Brasil

7º passo - Amplificação e acentuação da reação Avidina-Biotina peroxidase - ABC (segundo recomendações do Kit – ABC – Horseradish Peroxidase - Dako) por 30 minutos, seguido de duas lavagens de 5 minutos em PBS;

8º passo - Diaminobenzidina - DAB (segundo recomendações do Kit – DAB Reagent Set KPL), de 5 a 8 minutos;

9º passo - Lavagem em água corrente;

10º passo - Coloração de fundo com Hematoxilina de Harris diluída 1:2 em água destilada por 1 minuto;

11º passo - Lavagem em água corrente para retirada do excesso de corante;

12º passo - Desidratação e montagem com lamínula em Entelan.

O tampão utilizado para realização da imuno-histoquímica foi o PBS com pH 7,6 e a fixação em formal tamponado 10% permitiu uma excelente fixação do SNC da iguana.

O controle negativo foi realizado pela substituição do anticorpo primário por água destilada e posteriormente o protocolo foi seguido como o descrito. E a porcentagem de marcação dos receptores opioides foi realizada mediante a contagem da células marcadas frente ao total de células do SNC em 5 campos distintos na objetiva de 40x.

Etapa 2 - Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas

Os efeitos sedativos e antinociceptivos da morfina e do butorfanol foram testados mediante o emprego do teste de natação forçada, do escala de parâmetros comportamentais e do teste de termoalgimetria em 10 iguanas criadas conforme a descrição no tópico animais (páginas 26-27).

Cada animal foi submetido aos testes supracitados sob a influência de cinco diferentes tratamentos, os quais foram sorteados de maneira aleatória

(papéis identificados retirados de uma sacola de pano) sempre antes de cada teste. Os tratamentos testados foram: solução salina (NaCl 0,9%²²) no volume de 0,1 mL/kg (grupo CON), morfina²³ na dose de 5 mg/kg (MOR₅), morfina na dose de 10 mg/kg (MOR₁₀), butorfanol²⁴ na dose de 5 mg/kg (BUT₅) e butorfanol na dose de 10 mg/kg (BUT₁₀). Ademais, para confirmar que os testes utilizados para avaliar a sedação dos opioides era confiável foi incluído, apenas para os testes escala de parâmetros comportamentais e natação forçada, o grupo MID no qual os animais receberam 2 mg/kg de midazolam.

Todos os tratamentos foram administrados pela via intramuscular (IM) no membro torácico, a fim de padronizar a administração e evitar possíveis influências do sistema porta renal. A avaliação dos efeitos sedativo e analgésico dos opioides nas iguanas verdes sempre foi realizada na primavera e no verão, uma vez que no inverno as baixas temperaturas ambientais poderiam reduzir o metabolismo dos animais (DE SOUZA et al., 2004; BISETTO, 2016). Assim, os testes de sedação foram realizados entre Outubro de 2014 e Abril de 2015 e entre Outubro e Novembro de 2015 e o teste de termoalgiometria entre Novembro de 2015 e Abril de 2016 e entre Outubro e Dezembro de 2016. Em todas as ocasiões foram respeitados 15 dias de intervalo entre um tratamento e outro, para garantir que um não influenciasse o outro.

Outra padronização realizada no presente estudo foi a hora do início das avaliações. Todos os momentos basais foram avaliados entre 11 horas e 30 minutos e 12 horas e 30 minutos horas para aproveitar o momento de maior taxa atividade dos animais. Portanto, a avaliação das 12 horas ocorreu sempre entre 23:30 e 24:30 horas, momento em que os *basking* estavam desligados e os animais apresentavam a menor taxa de atividade diária.

²² Cloreto de Sódio, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE.

²³ Dimorf® Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP.

²⁴ Torbugesic, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP.

Avaliação da sedação pelos parâmetros comportamentais

Para a avaliação da sedação foi desenvolvida uma escala na qual eram pontuados alguns parâmetros comportamentais. Esta escala desenvolvida para iguanas teve como base escalas comportamentais de outros répteis, como cágados (EMERY et al., 2014) e jacarés (CAMPAGNOL et al., 2014). Vale destacar que a escala desenvolvida pelo grupo de pesquisa foi previamente testada em outros dois estudos (BISETTO, 2016; SOBREIRA; BRESSAN; CARREGARO, 2016) e foi o teste mais eficiente para atestar sedação, apesar da interferência humana.

A avaliação da escala de parâmetros comportamentais foi realizada sempre antes do teste de natação. Para isto, as iguanas eram posicionadas sobre uma mesa e os parâmetros foram avaliados antes do tratamento (basal) e em 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração do tratamento. Cada parâmetro comportamental foi pontuado de acordo com as características observadas e, ao final da avaliação, os escores foram somados a fim de determinar o grau de sedação dos animais. As pontuação finais variavam entre 0 e 12 pontos, sendo que 0 a 2 pontos era considerada ausência de sedação; 3 a 5 era considerado tranquilização; 6 a 8 pontos - sedação moderada; 9 a 12 pontos - sedação intensa (Tabela 1).

Tabela 1 – Sistema de pontuação baseado em quatro parâmetros comportamentais, utilizado para avaliar o grau de sedação em *Iguana iguana*.

Categoria	Descrição	Pontuação
Manipulação	Animal alerta, nos galhos e oferece resistência ao ser capturado, tentando escapar e se defender com a cauda; apresenta-se muito resistente à contenção física	0
	Animal alerta, nos galhos e tentando escapar ao ser capturado; oferece pouca resistência ao ficar na mão	1
	Animal alerta, porém não se encontra sobre galhos. Tenta escapar de maneira lenta e não oferece resistência ao ficar na mão	2
	Animal deitado sobre a maravalha, sem tentativas de fugas na captura e sem resistência ao ficar na mão	3
Altura da cabeça	Acima ou igual a 4 cm, ou igual ou maior que o basal	0
	Entre 2 e 3 cm ou 1 a 2 cm menor que o basal	1
	Entre 0 e 1cm ou 3 a 4 cm menor que o basal	2
	Sem sustentar a cabeça quando estimulado	3
Relaxamento muscular	Oferece resistência ao tracionar o membro paralelamente a cauda.	0
	Permite tracionar o membro e tem retorno imediato	1
	Permite tracionar o membro e demora entre 3 a 30 segundos para retornar a posição normal	2
	Permite tracionar o membro sem retornar a posição normal	3
Endireitamento postural	Oferece grande resistência ao ser posicionado em decúbito dorsal; normalmente se agarra à mão do avaliador ou utiliza a cauda para impedir o posicionamento	0
	Permite ser posicionado em decúbito dorsal porém, tem retorno imediato a posição quadrupedal	1
	Permite ser posicionado em decúbito dorsal porém, demora entre 3 a 30 segundos para retornar a posição quadrupedal	2
	Permite ser posicionado em decúbito dorsal sem retornar a posição quadrupedal	3
Total		

Fonte: Própria autoria

Teste de natação forçada para avaliação da sedação

No teste de natação forçada foi avaliado o tempo, em segundos, que as iguanas permaneciam em natação ativa quando colocadas dentro de uma piscina. O tempo máximo de natação foi fixado em 120 segundos para evitar que ocorresse fadiga muscular nos animais.

Para o teste de natação foi utilizada uma caixa plástica transparente (piscina - 28,5 cm x 40 cm x 60 cm), preenchida com água na temperatura entre 23°C e 28°C e com profundidade suficiente para que os animais não tivessem acesso ao fundo da piscina, mesmo que com a cauda. Para evitar que os animais saíssem da piscina era colocado uma tampa de vidro sobre a mesma e todo o teste foi filmado²⁵, evitando a interferência humana no comportamento normal dos animais (Figura 10).

Assim, as iguanas eram colocadas, uma a uma, no centro da piscina antes do tratamento (basal) e aos 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração do tratamento. Ao final do teste os animais eram devolvidos as caixas de manutenção.

²⁵ Sony Handycam HDR-XR550, Tokyo, Japão.

Figura 10 – *Iguana iguana* submetida ao teste de natação forçada.

Fonte: Própria autoria.

Avaliação da nocicepção pelo teste de termoalgimetria

No teste de termoalgimetria foi avaliado o tempo de tolerância dos animais frente ao estímulo nocivo térmico aplicado na face plantar do membro pélvico. Para isso, o estímulo nociceptivo térmico foi produzido por um termoalgímetro²⁶, o qual consistia em um aparato que incide uma luz infravermelha na potência de 70mW/cm³ fornecendo assim uma fonte de calor com a temperatura de aproximadamente 47°C. Essa fonte de calor permaneceu ativa por 31 segundos ou até que o animal fizesse o movimento de reflexo de retirada do membro; nesse momento o cronômetro era parado automaticamente.

Previamente ao início do estímulo nociceptivo, os animais foram alocados nos compartimentos de contenção do termoalgímetro, os quais foram completamente vedados com barreiras opacas para evitar contato visual entre os animais e o observador. Foi respeitado um período de cinco minutos para

²⁶ Modelo 37370, Ugo Basile Co, Varese, Itália.

que os animais se adaptassem ao local das avaliações. Após esse período, o sensor infravermelho era posicionado sob a superfície de vidro da plataforma, de modo que o estímulo fosse aplicado sob a superfície plantar do membro pélvico (Figura 11).

Figura 11 – Aplicação de teste álgico, com auxílio do termoalgímetro, em *Iguana iguana*.

Fonte: Própria autoria

A latência do reflexo de retirada do membro (LRRM) frente ao estímulo térmico foi mensurada antes do tratamento (basal) e em 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após o tratamento. Em cada momento foram realizadas duas avaliações com um intervalo de dois minutos entre elas, e caso a diferença da LRRM fosse superior a 3 segundos uma terceira avaliação era realizada. A média dessas avaliações era considerado o valor final da LRRM no momento.

Avaliação da temperatura corporal

Previamente a realização de cada avaliação, sedativa ou nociceptiva, era realizada a aferição da temperatura corporal. Esta avaliação foi realizada pela leitura da temperatura fornecida pelo microchip previamente inserido no subcutâneo dos animais, como descrito anteriormente (página 39). As leituras da temperatura corporal eram realizadas antes dos testes serem iniciados.

Análise Estatística

Na primeira etapa os resultados obtidos foram analisados de maneira descritivas, sendo descrita as sequências de aminoácidos dos receptores opioides e a porcentagem de ocorrência desses receptores no SNC das iguanas.

Para avaliar os efeitos sedativo e analgésico dos opioides nas iguanas primeiramente foi realizado um teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As avaliações dentro dos grupos, em relação ao basal foram realizadas por meio do teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, para os dados com distribuição não-paramétrica e por meio do teste de análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas seguido do pós-teste de Dunnett para os dados com distribuição paramétrica. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste de ANOVA de duas vias para amostras repetidas seguido do pós-teste teste de Tukey.

Como cada grupo experimental apresentou um valor basal diferente, optou-se por realizar uma normalização dos valores a fim de obter apenas a diferença das respostas. Para isto, foi realizada subtração do valor de cada momento com o seu basal em cada grupo. Vale destacar que essa normalização dos valores foi realizada individualmente para cada animal sendo gerada uma nova média e novos valores de desvio padrão.

Os dados não-paramétricos estão expressos em mediana (valor mínimo - valor máximo). Os dados paramétricos estão expressos em média $\pm$

desvio padrão nas tabelas e média $\pm$ erro padrão nas figuras. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Etapa 1 - Caracterização dos receptores opioides

Avaliação da qualidade dos RNA extraídos

A qualidade e a concentração do mRNA extraído pela técnica do Trizol foi comprovada por meio do teste Agilent 2100 Bioanalyzer (Figura 12A e B). As amostras obtiveram concentrações de 267 ng/μL e de 55 ng/μL, para primeira iguana (I1) e para a segunda iguana (I2) respectivamente. Já o valor do *RNA integrity number* (RIN), que indica a integridade do RNA extraído foi de 8,4 para a amostra I1 e de 10 para amostra I2.

Figura 12 – Resultados obtidos após a análise de qualidade da extração do RNA pelo teste Agilent 2100 Bioanalyzer. A – resultados obtidos para a amostra I1; B – resultados obtidos para a amostra I2.

Fonte: Própria autoria.

Sequenciamento dos reads e análise de novo dos transcriptos do SNC

No presente estudos foram criadas duas bibliotecas independentes para as amostras extraídas das iguanas (I1 e I2). Cada sequência montada possuía 100 pb independentes de cDNA. Foram sequenciados 34.811.815 *reads* para cada uma das amostras. Após a avaliação da qualidade e filtragem dos adaptadores e bases com baixa qualidade foram obtidos 34.810.352 *reads* para a amostra I1 e 32.649.045 *reads* para amostra I2.

As *reads* das duas amostras foram unidas e, após a análise do *denovo* dos transcriptos, foram gerados 45.943 sequências de aminoácidos. Destaca-se que muitas sequências estavam em duplicata ou triplicata e por tal razão, um novo filtro foi utilizado a fim de manter apenas uma sequência de aminoácidos de cada proteína. Assim, foram obtidas 13.788 sequências de aminoácidos expressos no SNC das iguanas.

O comprimento das sequências de aminoácidos variou entre 7388 e 36 aminoácidos com 364 aminoácidos de média. A distribuição do comprimento das sequências evidenciou que 13,68% (1887 sequências) das sequências tiveram entre 36 e 99 aminoácidos, 81,58% (11249 sequências) das sequências tiveram entre 100 e 999 aminoácidos e 4,72% (651 sequências) das sequências tiveram entre 1000 e 7388 aminoácidos.

Análise de similaridade das sequências de aminoácidos das iguanas

A homologia das sequências de aminoácidos das iguanas foi correspondente com 11,84% de proteínas de aves, 1,82% de proteínas de peixes, 3,51% de proteínas de anfíbios, 81,98% de proteínas de mamíferos, 0,35% de proteínas de plantas, 0,06% de proteínas de invertebrados, 0,41% de proteínas de fungos/bactérias/vírus e apenas 0,3% de répteis. Dentre as espécies com a maior homologia, destaca-se a *Homo sapiens* (6774 transcriptos) seguido do *Mus musculus* (1766 transcriptos), *Bos taurus* (1413 transcriptos) e *Gallus gallus* (1298 transcriptos).

Anotação dos dados funcionais com base no Gene ontology (GO)

Com base no *Gene Ontology* (GO), padronização internacional da função dos genes, 6159 genes (44,66% de todos os genes) tiveram suas funções atribuídas pelo *Genbank*.

A caracterização dos genes é normalmente dividida em três grupos que são o processo biológico, componentes celulares e as funções moleculares. Para as sequências das iguanas foram identificados 25948 processos biológicos, 19835 componentes celulares e 12833 função molecular. As três principais categorias são subdivididas em 60 categorias, de acordo com as funções proteicas, sendo que as cinco funções mais anotadas para o processo biológico foram regulação biológica (4085 genes), processos metabólicos (3990 genes), resposta a estímulo (2909 genes), processo multicelular de organismo (2544 genes) e componente celular de organização (2578 genes); no componente celular as cinco funções mais anotadas foram membrana (2861 genes), núcleo (2763 genes), componente macrocelular (1958 genes), lúmen de membrana (1877 genes) e sistema endomembrana (1515 genes); as cinco funções mais anotadas para função molecular foram proteína obrigatória (4169 genes), ácido nucléico obrigatório (1507 genes), íon obrigatório (1479 genes) e atividade de transferase (964 genes) (Figura 13).

Figura 13- *Gene ontology* dos transcritos de iguanas evidenciado as principais categorias e funções celulares de cada transcripto.

Fonte: Própria autoria.

Caracterização dos receptores opioides

Dentre as muitas proteínas sequenciadas, foram obtidas três compatíveis com os receptores opioides δ , κ e μ (Tabela 2). As sequências de nucleotídeos dessas proteínas (Anexo 1) foram submetidas a um novo BLAST para confirmar que se tratavam dos receptores opioides. Posteriormente, as sequências de nucleotídeos foram transformadas em sequências de aminoácidos (Anexo 2) para que fosse possível realizar a busca dos anticorpos.

Tabela 2 – Dados dos receptores opioides obtidos ao submeter os transcriptos sequenciados pela técnica de RNAseq ao software Trinity.

Trinity_ID	Proteína_ID	Gene_ID	Espécie	%ident	n_aa	Descrição
DN67099_c0g1i1	P41143	OPRD	HUMAN	72,973	370	Delta-type opioid receptor OS=Homo sapiens
DN178285_c0g1i1	P33534	OPRK	MOUSE	73,276	116	Kappa-type opioid receptor OS=Mus musculus
DN75893_c2g3i2	Q95M54	OPRM	MACFA	86,096	374	Mu-type opioid receptor OS=Macaca fascicularis

Trinity_ID: identificação do transcripto no Trinity; Proteína_ID: identificação da proteína; Gene_ID: identificação do gene referente ao transcriptos; Espécie: espécie com a maior homologia entre as proteínas; %indet: porcentagem de identificação entre a proteína obtida e a de maior homologia; n_aa: número de aminoácidos da proteína; Descrição: descrição da função da proteína e da espécie homóloga. Fonte: Própria autoria.

Imuno-histoquímica dos receptores opioides no SNC

Foi possível identificar, principalmente no córtex cerebral, a marcação para o receptor δ em 50% dos neurônios (Figura 14A) e o receptor κ em 80% dos neurônios (Figura 14B). Porém, não foram observadas marcações para o receptor μ no tecido colhido (Figura 14C).

Figura 14 – Fotomicrografia do sistema nervoso central (SNC) de iguana. A - SNC, especificamente o córtex cerebral, marcado para δ na ponta da seta (objetiva de 20x). B – SNC, especificamente o córtex cerebral, marcado para κ na ponta da seta (objetiva de 20x). C - SNC com ausência de marcação para μ nos neurônios (objetiva de 20x). Barras com 200 μ m.

Etapa 2 – Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas

Avaliação sedativa

Escala de parâmetros comportamentais

Ao serem avaliados os escores de sedação com base na escala de parâmetros comportamentais observou-se que o grupo CON apresentou pontuações compatíveis com ausência de sedação, sem ter diferença estatística ao longo dos momentos. Por outro lado, o grupo MID apresentou pontuação compatível com sedação intensa entre 30 minutos e 1 hora e com sedação moderada às 2 horas, sendo que esses três momentos foram diferentes do seu basal. Nos demais grupos, apesar dos escores de sedação serem compatíveis com ausência de sedação, detectou-se diferença estatística entre alguns momentos e os respectivos basais. Em MOR₅ foram detectadas diferenças nas avaliações entre 30 minutos e 2 horas após a administração e com 12 horas da administração. Já nos grupos MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ as diferenças foram detectadas entre 30 minutos e 3 horas da administração e com 12 horas da administração (Figura 15).

Figura 15 – Avaliação da sedação em *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (mediana e intervalo interquartil). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria.

Na comparação entre os grupos foi observado que MID teve uma pontuação de sedação superior aos demais grupos nas avaliações entre 30 minutos e 2 horas. Ainda, pode-se evidenciar que os grupos MOR₅, MOR₁₀ e BUT₁₀ obtiveram pontuações estatisticamente superiores ao CON aos 30 minutos e que, neste momento, BUT₅ foi semelhante ao CON, MOR₅ e MOR₁₀ e inferior a BUT₁₀ (Tabela 3).

Com uma hora, os tratamentos MOR₅ e BUT₅ resultaram em pontuações semelhantes a todos os tratamentos exceto MID. Já MOR₁₀ e BUT₁₀ foram diferentes de CON e MID neste momento. Às duas horas os tratamentos MOR₅, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ resultaram em pontuações semelhantes entre si, porém foram diferentes de MID e CON. Às 3 horas, apenas CON foi diferente de MID, MOR₁₀ e BUT₁₀. Já com 12 horas BUT₁₀ diferiu estatisticamente de MID e CON.

Tabela 3 – Sedação baseada na escala comportamental de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (mediana e intervalo interquartil). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
CON	0,5 (0 - 1)	0 (0 - 2) ^a	0,5 (1 - 2) ^a	1 (0 - 1) ^a	1 (0 - 1) ^a	0 (0 - 1)	0,5 (0 - 1)	0,5 (0 - 2) ^a	0 (0 - 1)
MID	0 (0 - 0)	11 (6 - 12) ^b	9 (5 - 12) ^b	5 (3 - 7) ^b	1 (0 - 3) ^b	1 (0 - 2)	0 (0 - 1)	1 (1 - 2) ^a	0 (0 - 1)
MOR₅	0 (0 - 2)	1,4 (0 - 4) ^{cd}	2 (1 - 2) ^{ac}	2 (0 - 4) ^c	0,5 (0 - 2) ^{ab}	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	1 (1 - 4) ^{ab}	0 (0 - 1)
MOR₁₀	0 (0 - 0)	2 (0 - 6) ^{cd}	2,5 (1 - 4) ^c	2 (0 - 6) ^c	2 (0 - 4) ^b	0 (0 - 4)	0 (0 - 1)	1 (0 - 2) ^{ab}	0 (0 - 1)
BUT₅	0 (0 - 0)	1 (0 - 3) ^{ac}	1 (0 - 4) ^{ac}	2 (1 - 3) ^c	1 (0 - 2) ^{ab}	0 (0 - 1)	0 (0 - 2)	1 (0 - 2) ^{ab}	0 (0 - 1)
BUT₁₀	0 (0 - 2)	2,5 (1 - 7) ^{cd}	2 (0 - 4) ^c	2 (0 - 2) ^c	2 (1 - 3) ^b	0,5 (0 - 2)	0 (0 - 2)	2 (0 - 4) ^{bb}	0 (0 - 0)

Fonte: Própria autoria.

Teste de natação forçada

Para o teste de natação forçada, foi observado que no CON apenas às 12 horas houve redução do tempo de natação. Em contrapartida os demais tratamentos (MID, MOR₅, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀) apresentaram redução no tempo de natação, em comparação aos seus basais, entre 30 minutos e 4 horas e às 12 horas de avaliação. Entretanto, deve-se destacar que os grupos MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ também apresentaram diferenças do basal na avaliação de 6 horas pós-tratamentos (Figura 16).

Figura 16 – Tempo de natação (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média $\pm$ erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria.

A comparação entre os grupos em cada momento revelou que já no basal a média do CON foi igual a MID porém, foi menor aos demais grupos; por outro lado, MID, MOR₅, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ obtiveram médias semelhantes

entre si. Com 30 minutos e 1 hora de avaliação MID apresentou o menor tempo de natação, sendo igual estatisticamente apenas a BUT₅ e BUT₁₀. Já os tratamentos CON, MOR₅, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ foram estatisticamente semelhantes entre si nesses momentos avaliados.

Com 2 horas de tratamento, MID diferiu estatisticamente de MOR₅ e MOR₁₀, porém obteve média igual ao CON, BUT₅ e BUT₁₀. Já os tratamentos CON, MOR₅, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ foram semelhantes estatisticamente entre si. Após 3 horas, MOR₁₀ foi estatisticamente diferente apenas de MID. Ainda com 3 horas, o tempo de natação de MID aumentou e foi estatisticamente semelhante aos demais grupos.

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos às 4 horas porém, às 6 horas de avaliação, MID e MOR₅ apresentaram os maiores tempos de natação, sendo estatisticamente diferentes de MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀; neste momento todos os grupos foram semelhantes estatisticamente ao CON. Com 12 horas de avaliação, apenas MID obteve média superior ao CON. Não foi observada diferença entre os grupos às 24 horas de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4 – Tempo de natação (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
CON	54 ± 22 ^a	52 ± 21 ^a	53 ± 22 ^a	45 ± 24 ^{ab}	49 ± 20 ^{ab}	43 ± 16	56 ± 18 ^{ab}	28 ± 15 ^a	60 ± 18
MID	70 ± 18 ^{ab}	26 ± 10 ^b	28 ± 13 ^b	34 ± 11 ^b	43 ± 9 ^{ab}	53 ± 12	64 ± 11 ^a	45 ± 10 ^b	72 ± 20
MOR₅	72 ± 20 ^b	50 ± 23 ^a	54 ± 29 ^a	54 ± 22 ^a	52 ± 15 ^{ab}	45 ± 18	68 ± 18 ^a	37 ± 19 ^{ab}	69 ± 23
MOR₁₀	80 ± 25 ^b	50 ± 21 ^a	46 ± 20 ^a	51 ± 20 ^a	56 ± 12 ^a	60 ± 11	60 ± 21 ^{ab}	39 ± 21 ^{ab}	75 ± 28
BUT₅	76 ± 25 ^b	40 ± 18 ^{ab}	42 ± 20 ^{ab}	48 ± 19 ^{ab}	53 ± 23 ^{ab}	59 ± 22	59 ± 20 ^{ab}	36 ± 17 ^{ab}	70 ± 21
BUT₁₀	75 ± 22 ^b	42 ± 22 ^{ab}	40 ± 17 ^{ab}	43 ± 19 ^{ab}	36 ± 21 ^b	53 ± 24	45 ± 19 ^b	39 ± 30 ^{ab}	65 ± 25

Fonte: Própria autoria.

Para normalizar a diferença entre os valores basais e detectar apenas o efeito dos fármacos durante as avaliações, foi gerada uma nova estatística na qual foram utilizados apenas a diferença no tempo de natação de cada momento em relação ao basal do seu grupo. Nesta nova avaliação, as diferenças em relação ao basal de cada grupo foram mantidas, como na Figura anterior. MID e MOR₅ com diferenças entre 30 minutos e 4 horas; MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ com diferenças entre 30 minutos e 6 horas; e todos os grupos com diferenças às 12 horas (Figura 17).

Figura 17 – Diferença entre os tempos de natação dos momentos com o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (SAL) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria

Entre grupos, a diferença no momento basal foi normalizada, uma vez que foi calculada a diferença do valor do basal com ele mesmo (Tabela 5). Aos 30 minutos CON foi diferente estatisticamente de MID, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀.

Neste mesmo momento MOR₅ foi diferente de MID e BUT₅. Os demais tratamentos foram semelhantes entre si.

Em 1 hora de avaliação, novamente, CON e MOR₅ apresentaram as menores variações em relação ao basal, sendo semelhantes entre si. Já MID, MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ foram semelhantes entre si e obtiveram as maiores variações em relação ao basal. Às 2 horas CON e MOR₅ foram diferentes estatisticamente de MID e BUT₁₀. Já às 3 horas CON e MOR₅ diferiram apenas de BUT₁₀.

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos às 4 horas de avaliação, porém, às 6 horas BUT₁₀ foi estatisticamente diferente de MID, SAL e MOR₅ e semelhante a MOR₁₀ e BUT₅. Já MOR₁₀ apresentou diferença estatística de MOR₅. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos as 12 e 24 horas.

Tabela 5 – Diferença nos tempos de natação entre os momentos e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
CON	0 ± 0	-2 ± 17 ^a	-1 ± 24 ^a	-8 ± 14 ^a	-4 ± 24 ^a	-10 ± 20	2 ± 19 ^{ab}	-26 ± 25	6 ± 13
MID	0 ± 0	-44 ± 20 ^b	-42 ± 7 ^b	-35 ± 9 ^b	-26 ± 16 ^{ab}	-16 ± 21	-5 ± 21 ^{ab}	-25 ± 12	2 ± 10
MOR₅	0 ± 0	-22 ± 31 ^{ac}	-18 ± 37 ^a	-18 ± 28 ^a	-19 ± 15 ^a	-27 ± 17	-4 ± 19 ^{ab}	-35 ± 17	-3 ± 17
MOR₁₀	0 ± 0	-30 ± 23 ^{bc}	-33 ± 26 ^b	-28 ± 22 ^{ab}	-24 ± 25 ^{ab}	-20 ± 21	-20 ± 22 ^{ac}	-41 ± 25	-5 ± 16
BUT₅	0 ± 0	-36 ± 21 ^b	-34 ± 22 ^b	-28 ± 24 ^{ab}	-23 ± 19 ^{ab}	-17 ± 17	-17 ± 24 ^{abc}	-40 ± 15	-6 ± 11
BUT₁₀	0 ± 0	-32 ± 25 ^{bc}	-34 ± 19 ^b	-31 ± 16 ^b	-38 ± 13 ^b	-21 ± 15	-30 ± 10 ^c	-35 ± 17	-9 ± 9

Fonte: Própria autoria.

Teste de Termoalgimetria

O teste de termoalgimetria revelou que apenas MOR₁₀ apresentou aumento na LRRM entre 2 e 4 horas. Curiosamente, às 12 horas, os tratamentos MOR₅, MOR₁₀ e BUT₅ apresentaram aumento no tempo de LRRM (Figura 18).

Figura 18 – Latência do reflexo de retirada do membro (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgimetria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria.

A avaliação entre os grupos, em cada momento, revelou que no basal não foi detectada diferença estatística entre os grupos, assim como às 24 horas, na qual os valores já haviam se normalizado. Com 30 minutos e 1 hora a diferença estatística foi detectada apenas entre CON e MOR₁₀. Às 2 horas, apenas MOR₁₀ foi diferente estatisticamente de CON e BUT₅. Já em 4 horas

CON foi diferente estatisticamente de MOR₁₀ e BUT₅ porém, esses tratamentos foram semelhantes entre si e com os demais grupos. As 6 horas MOR₁₀ e BUT₁₀ foram estatisticamente diferentes de CON. Já às 12 horas MOR₁₀ e BUT₅ foram diferentes de CON, sendo que MOR₁₀ foi também diferente de MOR₅ e BUT₁₀ (Tabela 6).

Tabela 6 – Latência do reflexo de retirada do membro (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± erro padrão). Letras iguais indicam similaridade estatística entre os grupos.

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
CON	11,3 ± 4,0	11,7 ± 2,4 ^a	11,4 ± 2,4 ^a	10,4 ± 2,3 ^a	10,7 ± 1,3 ^a	10,8 ± 4,4 ^a	14,8 ± 3,6 ^a	13,3 ± 2,6
MOR₅	12,8 ± 2,9	15,9 ± 3,2 ^{ab}	15,7 ± 5,5 ^{ab}	14,5 ± 5,3 ^{ab}	14,1 ± 4,9 ^{ab}	14,6 ± 3,5 ^{ab}	17,7 ± 3,4 ^{ac}	12,8 ± 3,6
MOR₁₀	13,2 ± 3,0	16,3 ± 6,5 ^b	17,1 ± 7,6 ^b	18,4 ± 6,2 ^b	17,6 ± 5,0 ^b	16,6 ± 8,9 ^b	22,6 ± 4,2 ^b	13,8 ± 2,9
BUT₅	12 ± 3,7	14,2 ± 4,0 ^{ab}	14,1 ± 7,8 ^{ab}	13,7 ± 6,5 ^a	15,6 ± 7,2 ^b	12,9 ± 6,3 ^{ab}	20,6 ± 3,8 ^{bc}	11,6 ± 2,2
BUT₁₀	14,4 ± 2,5	14,7 ± 2,6 ^{ab}	13,5 ± 3,9 ^{ab}	14,7 ± 2,9 ^{ab}	14,2 ± 4,9 ^{ab}	16,3 ± 4,6 ^b	17,3 ± 3,0 ^{ac}	14 ± 3,3

Fonte: Própria autoria.

Como exemplificado anteriormente a normalização dos dados obtidos, a fim de sair de um mesmo ponto basal, revelaram a mesma estatística em relação ao basal detectada com os valores originais (Figura 19).

Figura 19 – Diferença na latência do reflexo de retirada do membro entre os momento e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria.

Entre grupos, ao longo do tempo, observou-se que no momento basal, aos 30 minutos, 6 horas e 24 horas não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Porém, à 1 hora MOR₁₀ foi estatisticamente diferente de BUT₁₀. Às 2 e 4 horas MOR₁₀ diferiu de CON e BUT₁₀, sendo semelhante aos demais tratamentos. Já com 12 horas MOR₁₀ e BUT₅ foram diferentes de CON e também de BUT₁₀. (Tabela 7).

Tabela 7 – Diferença na latência do reflexo de retirada do membro entre os momentos e o basal (segundos) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (SAL) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão). Letras iguais indicam semelhança entre os grupos.

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
COM	0 ± 0	0,3 ± 1,1	0,1 ± 3 ^{ab}	-0,9 ± 2,9 ^a	-0,6 ± 4,2 ^a	-0,5 ± 4,2	3,4 ± 6,2 ^a	1,9 ± 5,8
MOR₅	0 ± 0	3,1 ± 2,3	2,9 ± 4,3 ^{ab}	1,7 ± 4,5 ^{ab}	1,3 ± 6 ^{ab}	1,8 ± 3,7	4,9 ± 2,6 ^{ab}	0 ± 3,3
MOR₁₀	0 ± 0	3,1 ± 7,2	3,9 ± 7,6 ^{ab}	5,2 ± 5,6 ^b	4,4 ± 3,6 ^b	3,3 ± 8,4	9,4 ± 4,3 ^b	0,6 ± 1,4
BUT₅	0 ± 0	2,1 ± 4,2	2 ± 6,1 ^{ab}	1,6 ± 5 ^{ab}	3,5 ± 5,4 ^{ab}	0,8 ± 5	8,5 ± 2,4 ^b	-0,4 ± 2,6
BUT₁₀	0 ± 0	0,3 ± 3,5	-0,9 ± 5,1 ^a	0,3 ± 4,3 ^a	-0,2 ± 4 ^a	1,9 ± 3,6	2,9 ± 2,4 ^a	-0,4 ± 1,7

Fonte: Própria autoria.

Temperatura corporal

A avaliação da temperatura corporal durante a realização dos testes de sedação revelou que, para todos os grupos, apenas na avaliação de 12 horas foi observada diferença estatística do basal (Figura 20).

Figura 20 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas aos testes de sedação (escala comportamental e natação forçada) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria.

Entre grupos, a comparação das temperaturas corporais obtidas durante a realização dos testes de sedação não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 8).

Tabela 8 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas aos testes de sedação (escala comportamental e natação forçada) que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão).

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
COM	31,6 ± 2,3	30,1 ± 0,8	30,2 ± 2,6	30,2 ± 1,9	30,1 ± 0,6	30,7 ± 1,8	31,2 ± 1,0	27,4 ± 1,2	30,7 ± 1,9
MID	30,0 ± 0,7	29,3 ± 0,7	28,7 ± 0,7	28,5 ± 0,6	29,0 ± 0,9	29,2 ± 0,6	30,6 ± 1,2	27,6 ± 1,1	30,3 ± 0,9
MOR₅	30,8 ± 1,8	29,8 ± 1,7	29,4 ± 1,5	29,8 ± 2,3	29,5 ± 1,7	29,9 ± 2,1	31,4 ± 1,7	27,0 ± 0,9	30,4 ± 2,2
MOR₁₀	31,4 ± 2,2	30,1 ± 1,6	29,9 ± 1,2	30,1 ± 1,2	29,8 ± 1,3	30,2 ± 1,6	31,0 ± 1,4	26,4 ± 1,2	30,4 ± 1,9
BUT₅	30,6 ± 2,3	29,3 ± 1,5	29,3 ± 1,3	30,2 ± 0,8	30,2 ± 0,8	30,6 ± 1,1	31,2 ± 2,1	27,1 ± 1,3	31,1 ± 3,1
BUT₁₀	30,7 ± 1,3	29,3 ± 3,5	29,4 ± 2,4	29,4 ± 0,8	29,6 ± 0,8	29,7 ± 0,8	31,1 ± 0,6	26,9 ± 1,1	29,3 ± 1,7

Fonte: Própria autoria.

A avaliação da temperatura corporal durante a realização do teste de termoalgiometria revelou que apenas na avaliação de 12 horas foi observada diferença estatística do basal em todos os grupos estudados (Figura 21).

Figura 21 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média e erro padrão). * indica diferença em relação ao basal.

Fonte: Própria autoria

Entre grupos, a comparação das temperaturas corporais obtidas durante a realização do teste de termoalgiometria não evidenciaram diferenças estatísticas (Tabela 9).

Tabela 9 – Temperatura corporal (°C) de *Iguana iguana* (n = 10) submetidas ao teste de termoalgiometria que receberam 5 mg/kg de morfina (MOR₅), 10 mg/kg de morfina (MOR₁₀), 5 mg/kg de butorfanol (BUT₅), 10 mg/kg de butorfanol (BUT₁₀), 0,5 mL de solução salina 0,9% (CON) ou 2 mg/kg de midazolam (MID) pela via intramuscular (média ± desvio padrão).

	Basal	30 min	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	12 horas	24 horas
CON	33,0 ± 2,6	32,7 ± 2,1	33,1 ± 1,9	33,5 ± 2,6	32,3 ± 1,9	33,3 ± 2,2	29,3 ± 3,7	31,7 ± 1,6
MOR₅	31,8 ± 2,2	32,9 ± 1,5	33,4 ± 1,5	33,0 ± 1,2	33,1 ± 1,9	33,2 ± 1,8	28,2 ± 1,0	31,9 ± 2,1
MOR₁₀	31,1 ± 1,8	31,0 ± 1,3	31,6 ± 1,3	31,8 ± 1,4	31,4 ± 1,2	31,7 ± 0,9	27,9 ± 0,8	30,6 ± 0,9
BUT₅	32,4 ± 1,6	32,0 ± 1,3	33,2 ± 1,5	32,6 ± 1,3	33,8 ± 2,9	33,5 ± 1,8	28,3 ± 1,9	31,4 ± 1,0
BUT₁₀	32,2 ± 2,1	31,7 ± 1,7	32,4 ± 1,7	32,4 ± 1,3	32,2 ± 1,9	32,5 ± 1,8	28,0 ± 1,7	32,2 ± 1,9

Fonte: Própria autoria.

DISCUSSÃO

A escolha da espécie *Iguana iguana* para a realização do estudo se deu por uma série de fatores, dentre eles a popularização desta espécie e a falta de estudos com fármacos analgésicos para a mesma. Destaca-se ainda, que o estudo que avalia analgesia em iguanas descreve não haver efeito analgésico do butorfanol (1 mg/kg) (FLEMING; ROBERTSON, 2012). Como exposto anteriormente, os répteis estão sendo cada vez mais criados por diferentes motivos, como por exemplo, como animais *pet*, como parte de coleções de zoológicos ou mesmo como modelo experimental.

Dentre os répteis, a iguana-verde é a mais criada como animal de estimação em todo o mundo (ROBINSON et al., 2015), muito provavelmente por sua facilidade de criação e docilidade com os tutores. Além disso, as iguanas têm sido utilizadas para monitorar a qualidade do ecossistema onde naturalmente ocorrem, e participam ativamente da dispersão de sementes sendo importante para a manutenção da biodiversidade (MOURA et al., 2015).

Com a popularização das iguanas, acredita-se que a abordagem clínica e cirúrgica será cada vez mais frequente. E diante da necessidade ética e, para reduzir a morbidade e mortalidade frente a procedimentos dolorosos (SLADKY; MANS, 2012) faz-se necessário o uso de uma terapia analgésica nestes animais. Porém, normalmente, a terapia analgésica de iguanas é feita de maneira empírica pois, como citado anteriormente poucos estudos avaliaram este efeito. Outrossim, até o presente momento eram desconhecidos estudos que descrevessem a presença dos receptores opioides ou mesmo distribuição destes receptores nas iguanas, e este é mais um ponto crucial para o correto tratamento da dor.

Destaca-se ainda que, muitas vezes, extrapola-se de outros animais a terapia analgésica para as iguanas. Porém, como observado em estudos anteriores, os efeitos farmacológicos variam de acordo com a espécie estudada (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008; LEAL et al., 2017). Assim, o grupo entendeu ser necessário estudar esses efeitos em iguanas-verdes.

Outro ponto que deve ser destacado foi a padronização do ambiente experimental. As iguanas são animais ectotérmicos, portanto, seu metabolismo está intimamente ligado ao ganho de calor vindo do meio ambiente. O metabolismo dos fármacos também é influenciado por essa variação (CARREGARO et al., 2009). Assim, uma padronização na temperatura ambiental foi imposta para manter os animais saudáveis, com metabolismo constante e para minimizar esse efeito sobre os resultados obtidos.

Etapa 1 – Caracterização dos receptores opioides

O emprego da técnica de RNAseq permitiu identificar sequências de pares de bases e, conseqüentemente, aminoácidos compatíveis com os três receptores opioides buscados (μ , κ e δ). Esse resultado era esperado, uma vez que em tartaruga de ouvido vermelho já haviam sido identificados os mesmos receptores estudados (XIA et al., 2001) e também por serem encontrados em bancos de dados (NCBI) *predicted* de outros répteis como lagarto anoles verde (*Anolis carolinensis*), o lagarto dragão barbado, cobra píton birmanesa *Python bivittatus*, entre outros. Outrossim, como os receptores opioides tiveram uma parte conservada na evolução das espécies esperávamos encontrá-los no material colhido das iguanas (LI; KEITH; EVANS, 1996).

Por outro lado, na técnica de imuno-histoquímica, mesmo com anticorpos previamente selecionados, não foi possível observar a marcação dos receptores μ e os demais receptores opioides marcaram apenas a região do núcleo. Isto pode estar relacionado a uma série de fatores, como correlacionados a expressão gênica. A expressão gênica compreende a etapa de transformação do DNA em uma proteína (ALBERTS et al., 2017), portanto é possível que o mRNA sequenciado na técnica de RNAseq referente a μ não estivesse expressando a proteína no momento da imuno-histoquímica. Em alguns casos a expressão gênica de uma determinada proteína depende de um sinal extracelular (ALBERTS et al., 2017), e por se tratarem de animais saudáveis não houvesse o estímulo para a expressão de μ . Outrossim, deve-se

destacar que a expressão dos receptores μ é aumentada frente a um processo inflamatório (ZÖLLNER et al., 2003).

Outro fato que pode ter interferido nesses resultados são possíveis falhas na ligação dos anticorpos de imuno-histoquímica com os receptores. Apesar dos receptores opioides terem as sequências gênicas bem conservadas durante a evolução das espécies (LI; KEITH; EVANS, 1996), as poucas variações podem interferir na conformação dos receptores. Assim sendo, como os anticorpos utilizados são específicos de mamíferos (coelhos e ratos) pode ser que o local de ligação não estivesse livre para a correta reação de ligação antígeno-anticorpo. Isto pode ter contribuído para a ausência de marcação dos receptores μ ou mesmo pela marcação errada dos demais receptores opioides. Deste modo, a interpretação destes resultados devem ser realizadas cuidadosamente.

Dentre os receptores estudados, δ apresentou o maior número de pares de base (3445pb), seguido do μ (2671pb) e κ (1327pb). Ao compararmos esses números com os receptores opioides do humano (dados do NCBI) observamos que o receptor δ das iguanas possui mais pares de base do que do humano (δ_{humano} 1873). Já os receptores μ e κ são menores, haja visto que no humano estes receptores tem 15279 pb e 4981 pb respectivamente. Isto mostra que apenas uma parte dos receptores é conservada entre as espécies, e que possivelmente nem todo o receptor μ e κ foi sequenciado.

O BLAST obtido pelo banco de dados do NCBI identificou que para os três receptores a espécie com maior homologia foi o anoles verde, possivelmente por se tratar de uma espécie de réptil. Entretanto, o sequenciamento dos receptores do anoles verde são apenas *predicted*, logo uma previsão da sequência destes receptores. O κ apresentou a maior porcentagem de cobertura quando comparado com μ e δ , que foram respectivamente 92%, 72% e 32%. Isto mostra que apesar de ser a espécie com maior homologia, os transcriptos do anoles verde e da iguana verde ainda são diferentes entre si.

Outro ponto que deve ser destacado é a diferença entre as espécies homólogas obtidas pelo *software* Trinity e pelo BLAST do NCBI. Isso possivelmente ocorreu porque o NCBI é uma base de dados mais completa contendo maior número de sequências de nucleotídeos.

Ao serem comparadas as sequências de aminoácidos também pelo BLAST, pode-se notar que o programa primeiramente indica que as três proteínas referentes aos receptores opioides fazem parte da superfamília das proteínas transmembranas acopladas à proteína G. Além disto, é indicado que se trata de uma proteína com sete domínios transmembrana, estando de acordo com o que é descrito para os receptores opioides (LI; KEITH; EVANS, 1996). A sequência de aminoácidos referente ao δ teve a maior homologia com a proteína do dragão barbado, de κ com a galinha e de μ com o anoles verde. Isso novamente nos indica uma conservação dos receptores opioides entre as espécies (LI; KEITH; EVANS, 1996), haja visto que os receptores são proteínas.

Além de identificar os receptores opioides, objetivo do estudo, a técnica do RNAseq permitiu gerar um transcriptoma *de novo* para a *Iguana iguana*, até então desconhecido em sites de busca. Apesar da montagem do transcriptoma da iguana ter sido realizado sem um genoma de referência, uma vez que não existe o sequenciamento genético da espécie, acredita-se que esse sequenciamento *de novo* dê informações confiáveis, pois desde a extração do RNA, na qual se obteve o valor do RIN superior a 8, até o sequenciamento propriamente dito, os dados obtidos estão de acordo com artigos utilizados como base (NAGALASKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010; HUANG et al., 2015; LI et al., 2015).

A qualidade dos resultados também pode ser observada no sequenciamento do RNA, no qual todos os *reads* obtidos e utilizados para a montagem do transcriptoma obtinham 100 ou mais pares de bases. Ademais, a montagem desses *reads* rendeu um alto número de sequências de aminoácidos expressos no SNC das iguanas, em que a maioria dessas proteínas possuíam entre 100 e 999 aminoácidos, o que demonstra a capacidade da técnica em capturar um grande número de transcriptos. Este

amplo número de sequências obtidas também foi observada em estudos anteriores, sendo considerado por esses autores como uma técnica consistente (HUANG et al., 2011; MU et al., 2014).

Diante da ausência de genomas de referência para a espécie estudada, é difícil afirmar que a montagem das sequências foi realizada de maneira 100% efetiva. Porém, como 61% das sequências de aminoácidos foram iguais ou superiores a 200 aminoácidos, acredita-se que a montagem obtida foi confiável, já que a maioria dos estudos considera as sequências de aminoácidos com 200 ou mais aminoácidos como efetiva (SADAMOTO et al., 2012; LI et al., 2015).

Outro ponto ser destacado é a variedade de espécies e classes homólogas com os transcriptos das iguanas. Isto possivelmente se deve pela falta de genoma de referência durante a montagem. No presente estudo, a maior parte de homologias foram atribuídas aos mamíferos. Isto possivelmente ocorreu pela disponibilidade dos genomas completos nos bancos de dados, que em sua maioria são genomas de espécies domésticas. Por sua vez, o baixo número de homologias com répteis pode ter sido decorrente do pouco conhecimento genético da classe Reptilia, em que a maioria é *predicted*, ou mesmo pela grande variação fisiológica e metabólica observada dentro desta classe (DESSAUER, 1970; CREWS, 1980).

Destaca-se que a avaliação da função de cada gene expresso no SNC da iguanas indicou que a maior parte é responsável por processos biológicos como regulação e metabolismo celular, assim como foi observado por Li et al. (2015). Entretanto, deve-se destacar que apenas 44,66% de todos os genes tiveram suas funções atribuídas pelo Genbank. Isto também foi observado por Li et al. (2015), em que apenas 14% dos transcriptos obtidos em tartarugas de orelha vermelha foram correlacionados às funções genéticas. Possivelmente, a maior parte dos transcriptos sequenciados não possui descrição de suas funções proteicas nos bancos de dados ou as diferentes nomenclaturas dadas a um mesmo gene pelos bancos de dados pode ter atrapalhado essa busca.

Etapa 2 – Avaliação sedativa e antinociceptiva dos opioides em iguanas

Nesta etapa o objetivo era avaliar os efeitos sedativo e antinociceptivo da morfina e do butorfanol, em diferentes doses, nas iguanas. Os resultados revelaram que a dose de 5 mg/kg de morfina apresentou uma sedação leve de até 4 horas. Já as doses de 5 mg/kg de butorfanol e de 10 mg/kg de morfina e butorfanol apresentaram sedação mais pronunciada com duração de 12 horas. Por outro lado, o efeito nociceptivo foi observada apenas pela dose de 10 mg/kg de morfina. Essa analgesia começou com duas horas após a administração e terminou com 4 horas de administração.

A escolha dos opioides baseou-se no objetivo de estudar os receptores e fármacos amplamente utilizados na prática da medicina veterinária e que sabidamente estão envolvidos com analgesia em outras espécies. Para isto, foi escolhido um agonista μ puro, a morfina, e um antagonista de receptores μ e agonista de receptores κ , o butorfanol. Como explanado na revisão de literatura, são desconhecidos os efeitos sedativo e analgésico destes fármacos para iguanas verdes, entretanto o que é especulado pelos profissionais que atendem esses animais é que o butorfanol seria o fármaco ideal para o tratamento da dor nessa espécie (HAWKINS, 2006; MOSLEY, 2011). Possivelmente isso deve ser decorrente do desconhecimento de seus efeitos na espécie e pela baixa depressão cardiovascular e respiratória que este fármaco promove em mamíferos (PASCOE, 2000).

A escolha das doses utilizadas no presente estudo foram extrapoladas de estudos anteriores, os quais avaliaram os efeitos desses opioides em outros répteis como dragões barbados, tartarugas de orelha vermelha e cobras do milho (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008). Destaca-se que estes autores utilizaram as doses 10 a 20 mg/kg entretanto, a dose de 20 mg/kg promoveu intensa depressão do SNC no estudo piloto de um experimento paralelo realizado no mesmo laboratório (LEAL, 2015) e por tal motivo, a dose foi substituída para 5 mg/kg.

Apesar de alguns estudos indicarem que o sistema porta renal pode não desviar todo o sangue da região caudal em todas as espécies de répteis (HOLZ et al., 1997; BENSON; FORREST, 2002; CAMPAGNOL et al., 2014) ou mesmo que este sistema só estaria ativo frente a algumas condições, como em caso de desidratação (HOLZ et al., 1997; KUMMROW et al., 2008), padronizou-se a administração sempre nos membros torácicos para evitar possíveis interferências nos efeitos dos fármacos estudados.

O sistema porta renal em répteis ainda é bem divergente. Estudos anteriores (HOLZ et al., 2002; KUMMROW et al., 2008) relataram redução na biodisponibilidade dos fármacos quando os mesmos foram administrados na porção caudal do corpo dos animais. Outro ponto que merece destaque, é o fato de que o sistema porta renal desvia o sangue para a veia cava quando o sistema nervoso simpático está exacerbado (MITCHELL, 2009). Portanto, seria esperado que os efeitos dos fármacos não sofressem interferência durante a administração pois, a contenção e administração são momentos estressantes para esses animais. Diante de todas as evidências e falta delas a padronização parece ser uma maneira de minimizar as interferências nos estudos com répteis.

Outro ajuste necessário realizado no presente estudo foi a hora do início das avaliações. Como descrito anteriormente, os animais foram mantidos em um ambiente controlado porém, a sistema de aquecimento utilizado permitia que, ao longo do dia, os animais ganhassem ou perdessem calor. No experimento piloto foi observado que os animais apresentavam as maiores temperaturas corporais entre o meio-dia e as 16 horas. Esse período de maior temperatura corporal foi acompanhado também pelo período diário de maior atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto (BISETTO, 2016), concordando com os hábitos diurnos da espécie (SWANSON, 1950). Assim, ficou padronizado que o momento basal de todos os tratamentos fosse realizado ao meio-dia, aproveitando o pico de atividade das iguanas, o que permitiria identificar melhor uma possível sedação promovida pelos fármacos.

Inicialmente, a metodologia utilizada para avaliar a sedação seria o teste de campo aberto, no qual a atividade locomotora dos animais era

pontuada de acordo com passagem de um quadrante para o outro (LEAL, 2015; BISETTO, 2016). Porém, após o estudo-piloto, foi observado que os animais não apresentavam padrão de atividade locomotora ao longo do dia, possivelmente por serem animais de hábito arborícola, com pouca atividade em solo (SWANSON, 1950). Essa grande variação na atividade locomotora das iguanas no teste de campo aberto também foi observada em estudos anteriores por Bisetto (2016) e Sobreira, Bressan e Carregaro (2016), os quais desencorajaram o uso deste teste para avaliar a atividade locomotora e a sedação das iguanas. Assim, optou-se por avaliar a sedação pelo teste de natação forçada, haja visto que a espécie tem um excelente comportamento de natação (SWANSON, 1950).

O teste de natação forçada foi considerado eficiente para avaliar a sedação na iguanas, porém, revelou que a variação individual pode interferir nos valores, uma vez que já no basal pode ser detectado uma pequena variação (SOBREIRA; BRESSAN; CARREGARO, 2016). Para tornar os resultados da sedação mais fidedignos, foi realizada a avaliação dos parâmetros comportamentais com base em uma escala desenvolvida e testada por Sobreira; Bressan; Carregaro (2016) no mesmo laboratório do presente estudo.

Para certificar-se que os métodos utilizados para avaliar a sedação eram eficientes foi incluído nessa etapa experimental o grupo midazolam (MID), no qual os animais receberam 2 mg/kg do fármaco pela via intramuscular. Este benzodiazepínico é um potente sedativo para iguanas, promovendo pico de sedação com 15 minutos após a administração e duração média de 5 horas (BRESSAN; SOBREIRA; CARREGARO, 2017).

Na escala utilizada pelo presente grupo seria necessário obter uma pontuação mínima de 5 pontos para ter uma sedação moderada, porém a maior pontuação obtida com o uso dos opioides foi 2,5 pontos, compatível com tranquilização.

No presente estudo foi observado que a morfina nas duas doses empregadas, promoveu discreto aumento na pontuação de sedação, saindo de

0 no basal para 2 pontos durante o pico de sedação. Estes resultados mostram que para iguanas, diferente do que foi observado em teiús (LEAL, 2014), a morfina promove apenas uma tranquilização.

A avaliação sedativa da morfina em répteis foi testada em teiús, no qual os autores relataram início da sedação com 2 horas para 5 mg/kg e 3 horas para 10 mg/kg e duração de 4 horas para 5 mg/kg e 6 horas para 10 mg/kg (LEAL, 2015). Em iguanas, o início da sedação ocorreu já com trinta minutos para as duas doses revelando menor período de latência. Já a duração não passou de 4 horas na dose de 10 mg/kg, sendo menor do que a duração observada para teiús com a mesma dose. Essas diferenças podem estar relacionadas com as diferença metabólica e fisiológica na qual cada espécie de réptil apresenta uma característica com o uso dos mesmos fármacos (MOSLEY, 2011; SALDKY; MANS, 2012).

O butorfanol também produziu baixos escores de sedação, sendo que no pico de sedação com 5 mg/kg a pontuação foi 2 e com 10 mg/kg a pontuação foi 2,5. Esse resultado difere do que foi observado para teiús, no qual 5 e 10 mg/kg de butorfanol não foram suficientes para promover sedação nos animais (resultado ainda não divulgado). Para este fármaco o período de latência da sedação ocorre com 30 minutos e a duração vai até 4 horas, independente da dose. Outrossim, a dose de 2 mg/kg parece não ter promovido sedação durante a administração da medicação pré-anestésica em iguanas verdes (HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004) e não contribui para redução da concentração anestésica mínima do isofluorano em iguanas tratadas com 1 mg/kg (MOSLEY; DYSON; SMITH, 2003)

Destaca-se ainda que nos quatro tratamentos com opioides foi observado um aumento na pontuação com 12 horas de avaliação. Esse aumento também foi relatado por Leal (2015), que observou redução na atividade locomotora dos teiús às 12 horas de avaliação. Este fato pode estar relacionado a redução do metabolismo dos animais, uma vez que esta avaliação ocorria sempre à meia-noite e neste momento as temperaturas corporais eram as mais baixas. Bisetto (2016) também observou redução na atividade locomotora de iguanas durante a avaliação à meia-noite, sem efeito

de medicação alguma, e correlacionou este fato à redução da temperatura corporal e do metabolismo dos animais. Porém, não pode ser descartada a possibilidade de uma re-sedação dos animais tratados com os opioides, uma vez que o aumento significativo da pontuação só foi observado nos grupos tratados com opioides e a redução na temperatura corporal foi igual em todos os grupos.

Ainda, no que diz respeito à sedação, o teste da natação forçada teve o objetivo de quantificar a atividade motora dos animais. Neste teste, assim como relatado por outro estudo (SOBREIRA; BRESSAN; CARREGARO, 2016), os grupos experimentais tiveram diferentes tempos de natação nas avaliações do momento basal. No presente estudo, o grupo CON obteve um tempo de natação aproximadamente 33% menor que os demais grupos. O que está de acordo com o observado no estudo anterior que correlaciona essa diferença com variações individuais dos animais.

Com relação ao efeito sedativo dos opioides na atividade locomotora das iguanas, foi observada redução nos tempos de natação em todos os grupos. Os tratamentos com morfina foram responsáveis por reduções entre 30 minutos e 4 horas com 5 mg/kg e entre 30 minutos e 12 horas para 10 mg/kg. Esta redução na atividade locomotora também foi observada em teiús submetidos ao teste de campo aberto (LEAL, 2015). Esses resultados revelam que, apesar de terem sido utilizados diferentes testes para avaliar a atividade motora, o campo aberto para teiú e natação forçada para iguana, foi possível detectar o mesmo comportamento da morfina na atividade motora destas duas espécies de lacertídeos.

O butorfanol também foi eficiente em reduzir a atividade motora das iguanas, sendo o pico e a duração desta alteração igual as observados quando o escore comportamental foi avaliado. Não foram encontrados artigos que avaliam os efeitos do butorfanol sobre a atividade locomotora de outros répteis, porém este fármaco é amplamente indicado em revisões de literatura (HEARD, 2004; HAWKINS, 2006; SHNELLBACHER, 2010). Porém, acreditamos que o efeito sedativo do butorfanol em iguanas é leve, mais parecido com um tranquilização.

Para eliminar os efeitos das variações individuais descritas no teste de natação forçada, as quais levaram a obtenção de diferentes valores no momento basal, a comparação entre os tratamentos foi realizada após a normalização dos resultados como descrito anteriormente, assim como descrito por Sladky, Kinney e Johnson (2008). Após a normalização, foi observado que apenas os tratamentos MOR₁₀, BUT₅ e BUT₁₀ apresentaram reduções no tempo de natação entre 30 minutos e 3 horas. Portanto, devemos considerar que a duração da ação da morfina (10 mg/kg) e das duas doses de butorfanol pode variar entre 12 horas a depender da comparação utilizada.

Avaliar a dor em répteis ainda é um desafio para os veterinários, pois pouco se entende do comportamento destes animais, poucos são os parâmetros para avaliar a dor e muitas variações fisiológicas e comportamentais são descritas nas diferentes espécies de répteis (CREWS, 1980; MOSLEY, 2011; AYERS, 2016). Dentre as maneiras de se avaliar a dor em répteis, o estímulo nociceptivo térmico tem sido o mais utilizado nos estudos com répteis (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008), sendo o principal pesquisador com este estímulo o prof. Dr. Kurt K Sladky. Destaca-se ainda que o grupo de estudo teve colaboração do pesquisador anteriormente citado para aprimorar e padronizar este estímulo para teiús e iguanas (BISETTO, 2016; LEAL et al., 2017).

Apesar de já ser utilizado para avaliar os efeitos nociceptivos dos opioides em répteis, a eficácia deste estímulo ainda é questionada, pois acreditam que por se tratar de animais ectotérmicos tal estímulo não teria validade (MOSLEY, 2011), e também por frequentemente serem observados animais com queimaduras pelas fontes de calor dos terrários (MUSIC; STRUNK, 2016). Porém, mesmo com todos esses questionamentos, o que tem sido observado nos estudos é uma resposta consistente para a latência do reflexo de retirada do membro (SLADKY et al., 2007; SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008; BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011).

O tempo de resposta está ao redor de 16 segundos para tartaruga de orelha vermelha (SLADKY et al., 2007), 9 segundos para dragões barbados, 7 segundos para cobra do milho (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008) e 13

segundos em teiús (LEAL et al., 2017). Isto mostra que a LRRM não variou muito entre as espécies estudadas, e que diferente do que se pensava os animais oriundos de áreas mais quentes (cobra do milho e dragão barbado) tem a LRRM menor que os animais de áreas mais frias (tartaruga de orelha vermelha). Assim, e estando de acordo com Sladky e Mans (2012), este estímulo foi eficiente e consistente para as iguanas no presente estudo, em que a média para a LRRM no momento basal dos grupos testados foi de 12 segundos, estando esse valor dentro dos limites da classe e próximo aos obtidos com teiús.

Apesar da consistência da resposta com o estímulo térmico, deve-se destacar que, em decorrência das variações individuais os basais tendem a apresentar uma variação. No presente estudo, os basais variaram entre 11,3 e 14,4 segundos. Essa variação nos valores obtidos no momento basal dentro de um mesmo grupo experimental também foram relatadas em estudos anteriores (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008; LEAL et al., 2017) e assim como realizado no presente estudo, os valores foram normalizados para comparação entre os grupos.

Para minimizar estes efeitos, o presente estudo foi randomizado, feito na mesma época do ano, iniciando sempre no mesmo horário, com mínimas variações de temperatura corporal entre os grupos e sempre realizado pelo mesmo avaliador, acredita-se que essa diferença possa realmente estar relacionada à variações individuais das próprias iguanas. Vale ressaltar que variações no tempo da LRRM em estudos anteriores foram atribuídas à mudança de avaliador e/ou ao contato visual dos animais com o avaliador (FLEMING; ROBERTESON, 2012; BISETTO, 2016). Porém, no presente estudo as avaliações sempre foram realizadas pelo mesmo pesquisador e foram colocadas barreiras opacas no termoalquímetro para evitar o contato visual dos animais com o meio externo.

Para as iguanas, a intensidade do estímulo foi fixada em 70 mW/cm³ pois, em um estudo com teiús (LEAL, 2015) foi observado que 80 mW/cm³ promoveu queimadura nos animais. Além disto, o cut-off do estímulo foi de 30 segundos e o tempo de avaliação de 3 horas foi removido desta análise. Todas

essas precauções foram utilizadas para evitar queimaduras no local da análise o que, além de ser uma preocupação ética do grupo, poderia promover uma resposta inflamatória que interferiria na LRRM. Ao final de toda a experimentação não foram detectadas marcas de queimaduras nos membros dos animais.

O único grupo que apresentou aumento na LRRM foi a maior dose de morfina (10 mg/kg) e isto ocorreu apenas entre 2 e 4 horas de avaliação. Resposta semelhante a esta também foi observada com a dose de 10 mg/kg de morfina em teiús (LEAL et al., 2017), em dragões barbados (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008) e em tartarugas de orelha vermelha (SLADKY et al., 2007). Entretanto, na primeira espécie de lacertídeo, a dose de 5 mg/kg também apresentou um curto efeito analgésico. Em contrapartida, em cobra do milho a morfina não promoveu aumento no tempo de LRRM, mesmo em altas doses, o que mostra que há uma variação na resposta farmacológica da morfina nos répteis.

Em teiús, com a dose de 10 mg/kg foi observado que o início da ação da morfina ocorreu em torno de 1 hora após a administração e teve 12 horas de duração (LEAL et al., 2017). Já nos dragões barbados, a latência da morfina também ocorreu com duas horas da administração porém, a duração foi até 8 horas após a administração (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008). Já nas iguanas o tempo de duração do aumento no tempo da LRRM foi de apenas 4 horas, sendo que na avaliação das 6 horas o tempo da LRRM já havia retornado a valores basais. Esses resultados fazem acreditar que a morfina apresenta ação antinociceptiva em lacertídeos, como teiús, dragões barbados e iguanas, apenas em altas doses, e mesmo assim a latência e a duração dos efeitos variam muito de espécie para espécie.

O butorfanol, apesar de toda sua indicação literária para répteis, demonstra resultados não muito favoráveis quando se trata de analgesia. Doses baixas do fármaco (1 mg/kg) foram utilizadas em iguanas verdes e não demonstraram ação antinociceptiva suficiente para reduzir a concentração anestésica mínima do isofluorano e do sevofluorano em iguanas (MOSLEY; DYSON; SMITH, 2003; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004). Ainda em iguanas

a dose de 2 mg/kg de butorfanol não promoveu efeito antinociceptivo ao aumento da temperatura (FLEMING; ROBERTSON, 2012).

Apesar destes estudos anteriores, o grupo de pesquisa acreditava que o aumento da dose do butorfanol em iguanas fosse promover uma ação antinociceptiva. Porém, como foi observado para outros répteis, mesmo doses altas não apresentaram efeito analgésico nas iguanas. As doses de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 28 mg/kg não foram eficientes em promover analgesia frente ao estímulo térmico em dragões barbados (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008), tartarugas de orelha vermelha (SLADKY et al., 2017) e teiús (LEAL et al., 2017).

Poderia ser especulado que o estímulo térmico não foi adequado para determinar a analgesia do butorfanol em répteis, porém a analgesia com butorfanol não foi suficiente para promover redução dos marcadores de estresse em píton bola (*Python regius*) submetidas a cirurgia (OLESEN et al., 2008). E o estímulo térmico parece ser eficiente sim em detectar a antinocicepção do butorfanol, uma vez que em cobra do milho esse fármaco apresentou ação de aumento na LRRM, o que mostra mais uma vez que deve-se ter cuidado ao generalizar os efeitos dos opioides para répteis (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008).

Assim como na avaliação da sedação, com 12 horas da administração dos fármacos foi observado um aumento na LRRM nos grupos MOR₅, MOR₁₀ e BUT₅. Este fato está correlacionado com o momento em que o *basking* estava desligado e, conseqüentemente, as temperaturas corporais estavam mais baixas. Sabe-se que baixas temperaturas em répteis são compatíveis com redução no metabolismo (BRATTSTROM, 1965), inclusive dos fármacos (CARREGARO et al., 2009). Está redução no metabolismo pode ter culminado com um novo pico de ação dos fármacos que somado ao fato dos animais estarem “sonolentos” culminou com o aumento no LRRM. Está variação também foi observado por Leal et al. (2017) que utilizaram metodologia muito similar em teiús. Estes autores também correlacionam este fato com a redução do metabolismo.

Apesar de terem sido tomadas todas as medidas necessárias para que o experimento fosse conduzido sem erros, algumas falhas metodológicas podem ser apontadas ao final da fase experimental. Na primeira etapa, caracterização dos receptores opioides, o número de animais utilizados parece ter sido baixo, porém, como existe a necessidade de reduzir e refinar o número experimental optamos por realizar eutanásia no menor número de animais possíveis. Entretanto, se fosse incluído ao menos mais dois animais para realização da imuno-histoquímica as dúvidas quanto as marcações poderiam ter sido sanadas.

Outra limitação da primeira etapa foi quanto ao uso dos anticorpos para imuno-histoquímica. Os mesmos são testados e aprovados para o uso em ratos, coelhos e humanos, e nunca foram testados para répteis. Este fato pode ter contribuído para falsas marcações ou mesmo pela não marcação dos receptores opioides no presente estudo. Uma possibilidade para solucionar este problema, seria a confecção de anticorpos específicos para os répteis, porém como este procedimento demandaria tempo para realizar e validar os anticorpos não seria possível realizar durante o desenvolvimento desta tese.

Na segunda etapa, avaliação sedativa e analgésica, podemos apontar algumas falhas como o uso de apenas um avaliador que estava ciente dos tratamentos. Inicialmente, seriam utilizados apenas testes que mensuravam os tempos de natação ou de retirada do membro, portanto estes resultados não seriam influenciados por uma avaliação cega. Como a inclusão da avaliação comportamental ocorreu após o início da fase experimental, para complementar os resultados da avaliação sedativa, não foi realizada alteração da metodologia inicial. Sabemos que a avaliação da escala comportamental pode sofrer influência do avaliador, entretanto, como os resultados não apontaram sedação leve ou moderada com o uso dos opioides acreditamos que a ciência dos observados não tenha interferido nos resultados.

Nesta etapa ainda, destacamos a grande variação comportamental entre os animais, o que acreditamos, que tenha contribuído para a variação entre os valores basais tanto na avaliação do teste de natação forçada como no teste de termoalgiometria. Para tentar sanar essa variação individual,

optamos por apontar os resultados de duas maneiras, os resultados reais e a diferença dos basais de cada momento.

Por fim, destaco o uso de apenas um estímulo nocivo, estímulo térmico, que limita os resultados de nocicepção apenas ao estímulo térmico. Assim sendo, mesmo com a baixa resposta antinociceptiva observada no presente estudo, o grupo de pesquisa não desaconselha o tratamento da dor com opioides em iguanas que sabidamente passaram por situações dolorosas e nocivas.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os mRNAs responsáveis pela expressão dos receptores opioides, μ , κ e δ , estão presentes no sistema nervoso central das iguanas verdes (*Iguana iguana*) jovens e saudáveis. Porém, os resultados da imunohistoquímica não permitiram identificar os locais e proporção de distribuição dos mesmos.

As doses de 5 mg/kg de butorfanol, 10 mg/kg de butorfanol e 10 mg/kg de morfina são capazes de reduzir a atividade locomotora e produzir comportamentos compatíveis com tranquilização por até 12 horas após a administração em iguanas verdes jovens e saudáveis.

Por fim, conclui-se que em iguanas jovens, saudáveis e submetidas ao estímulo nocivo térmico apenas o uso da morfina na dose de 10 mg/kg produz efeito analgésico. Este efeito tem início após duas horas de administração e dura até 4 horas após a administração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANOSNEN, L. M.; WILCOX, G. L. Excitatory amino acid receptores and nociceptores neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**. v.41, n.3 p. 309-321, 1990.

ALBERTS, B. et al. Controle da expressão gênica. In: ALBERTS B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2017.

AYERS, H. Pain recognition in reptiles and investigation of associated behavioural sings .**The Veterinary Nurse**. v.7, n.5, p. 292-300, 2016.

BAKER, B. B.; SLADKY, K. K.; JOHNSON, S. M. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.238, n.2, p. 220-227, 2011.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v. 211, p. 39-50, 2012.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: Further studies on the anatomy of pain modulation. **Journal of Comparative Neurology**, v. 187, n. 3, p. 513-531, 1979.

BATESON, P. Assessment of pain in animals. **Animal Behaviour**. v. 42, n.5, p.827-839, 1991.

BENSON, K. G.; FORREST L. Characterization of the renal portal system of the commom green iguana (*Iguana iguana*) by digital subtraction imaging. **Journal of Wildlife Medicine**; v.30, n. 2, p. 235-41, 1999.

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

BISETTO, S. P. Avaliação das atividade locomotora e nociceptiva diárias e sazonais de lagartos mantidos em condições ambientais controladas. 2016, 72p. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

BRATTSTROM, B. H. Body temperatures of reptiles. **The Americam Midland Naturalista**. v. 73, n. 2, p. 376-422, 1965.

BRAUTH, S. E. Enkephalin-like immunoreactivity within the telencephalon of the reptile caiman crocodilus. **Neuroscience**. v. 11, n. 2, p. 345-358, 1984.

BRONDANI, J. T. et al. Refinement and initial validation of a multidimensional composite scale for use in assessing acute postoperative pain in cats. **American Journal of Veterinary Research** v. 72, n. 2, p. 174-183, 2011.

BROWN, D. D.; KIRK, E. J.; YANAGISAWA, N. The tract of Lissauer in relation to sensory transmission in the dorsal horn of spinal cord in the macaque monkey. **Journal of Comparative Neurology**. v. 151, n.2, p. 175-199, 1973.

CALIL, C. M. et al. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 4, p.481-485, 2002.

CAMPAGNOL, D. et al. Comparação da contenção farmacológica com cetamina e xilazina, administradas pela via intramuscular no membro torácico ou pélvico, em jacarés-do-papo-amarelo juvenis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 7, p. 675-681, 2014.

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

CORTÉZ-GOMÉZ, M.; AGUDELO, R.; AGUILAR, V. Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review. **University Science**. v. 20, n. 2, p. 229-245, 2015.

COUTURE, É. L. et al., Validation of thermal threshold nociceptive model in bearded dragons (*Pogona vitticeps*). **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. v.1, p.1-8, 2017.

CREWS D. Interrelationships among ecological, behavioral, and neuroendocrine processes in the reproductive cycle of *Anolis carolinensis* and other reptiles. **Advances in Study of Behavior**. v.11, p.1-74, 1980.

CRUZ, L.; BASBAUM, A. I. Multiple opioid peptides and the modulation of pain: Immunohistochemical analysis of dynorphin and enkephalin in the trigeminal nucleus caudalis and spinal cord of the cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 240, n.4, p. 331-348, 1985.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**. v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DESSAUER, H. C. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. **Biology of the Reptilia**. v.1, p. 1-10, 1970.

DE SOUZA, S. C. R. et al. Seasonal metabolic depression, substrate utilization and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **Journal Experimental Biology**. v.207, p.307-318, 2004.

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

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

EMERY, L. et al. Sedative effects of intranasal midazolam and dexmedetomidine in 2 species of tortoises (*CHELONOIDIS CARBONARIA AND GEOCHELONE PLATYNOTA*). **Journal of Exotic Pet Medicine**. v.23, p. 380-383, 2014.

FLEMING G. J.; ROBERTSON S. A. Assessments of thermal antinociceptive effects of butorphanol and human observer effect on quantitative evaluation of

analgesia in green iguanas (*Iguana iguana*). **American Journal of Veterinary Research**. v. 73, n. 10, p-1507-1511, 2012.

GOLDSMITH, A. M. et al. Detection of Prodynorphin End Products in Lizard, Turtle, and Alligator Brain Extracts, **Peptides**. v. 13, p. 435-440, 1992.

HAMMOND, D. L. Inhibitory Neurotransmitter and Nociception: Role of GABA and Glycine. **The Pharmacology of Pain**. v.130, p.361-383, 1997.

HAWKINS, M. G. The Use of Analgesics in Birds, Reptiles, and Small Exotic Mammals. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v.15, n.3, p.177-192, 2006.

HERNANDEZ-DIVERS, S. M. et al. Comparison of isoflurane and sevoflurane anesthesia after premedication with butorphanol in the green iguana. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 36, n.2, p.169-175, 2005.

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

HOLDEN, J. E.; JEONG, Y.; FORREST, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **American Association of Critical-Care Nurses**. v. 16, n. 3, p. 291-301, 2005.

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

HOLZ, P. H. et al. Effect of injection site on carbenicillin pharmacokinetics in the carpet python, *Morelia spilota*. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**. v. 12, n. 4, p. 12-16, 2002.

HUANG, L. et al. *De Novo* Assembly of the Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Spleen. **Plos One**. v. 10, n. 2, p. 1-19, 2015.

- HUANG, Y. et al. Transcriptome analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) spleen in response to Singapore grouper iridovirus. **BMC Genomics**. v.12, p. 556-, 2011.
- JAMES, L. E. et al. Evaluation of Feeding Behavior as An Indicator of Pain in Snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 48, p.196-199, 2017.
- JORDAN, B. A.; DAVI, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. **Nature**. v. 399, p. 797-700, 1999.
- KAJANDER, K. C.; BENNETT, G. J. Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons. **Journal of Neurophysiology**. v.68, n. 3, p.734-744, 1992.
- KANUI, T. I.; HOLE, K. Morphine and petidine antinociception in the crocodile. **Journaul of Veterinary Pharmacology Therapy**. v. 15, p. 101-103, 1992.
- KELSEY, J.; EHRLICH, M.; HENDERSON, S. O. Exotic Reptile Bites. **American Journal of Emergency Medicine**. v.15, p. 536-537, 1997.
- KOSTERLITZ, H.W. et al. Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu- and delta-receptors. *British Journal of Pharmacology*. v.68, n,2, p, 333-342, 1980.
- KUMMROW, M. S. et al. Pharmacokinetics of Buprenorphine after Single-dose Subcutaneous Administration in Red-Eared Slidesrs (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Zoo an Wildlife Medicine**. v. 39, n.4, p.50-599, 2008.
- LEAL., W. P. Avaliações sedativa e analgésica da morfina em teiús (*Salvator merianae*). 2015 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.
- LEAL., W. P. et al. Antinociceptive efficacy of intramuscular administration of morphine sulfate and butorphanol tartrate in tegus (*Salvator merianae*). **Americam Journal of Veterinary Research**. v. 78, n. 9, p. 1119-1124, 2017.

LI, G. et al. De novo assembly and characterization of the spleen transcriptoma of common carp (*Cyprinus carpio*) using Illumina paired-end sequencing. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 44, p. 420-429, 2015.

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

LIANG, Y. F.; TERASHIMA, S. Physiological properties and morphological characteristics of cutaneous and mucosal mechanical nociceptive neurons with A-delta peripheral axons in the trigeminal ganglia of crotaline snakes. *Journal of Comparative Neurology*. v.328, n.1, p. 88-102, 1993.

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

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

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

MANSOUR, A. et al. Anatomy of CNS opioide receptors. **TINS**. v. 11, n.7, 1988.

MARTIN-JIMENZ, D.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Emergency Care of Reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. v. 10, p-557-585, 2007.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MINAMI, M.; SATOH, M. Molecular biology of the opioide receptors: structures, functions and distributions. **Neuroscience Research**. v.23. p. 121-145, 1995.

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

MOSLEY, C. A.; DYSON, D.; SMITH, D. A. Minimum alveolar concentration of isoflurane in green iguana and the effect of butorphanol on Minimum alveolar concentration. **Journal of American Veterinary Medical Association**. 222, 1559-1564, 2003

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

MOSLEY, C. Pain and nociception in reptiles. **Veterinary Clinics Exotic Animal**. v.14, p.45-60, 2011.

MOURA, A. C. A. et al. Can green iguanas compensate for vanishing seed dispersers in the Atlantic forest fragments of north-east Brazil? **Journal of Zoology**, v. 295, p.189-196, 2015.

MU, Y. et al. De novo characterization of the spleen transcriptome of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and analysis of the immune relevant genes and pathways involved in the antiviral response. **PLoS One**. v. 9, 2014.

MURRAY M J. Cardiopulmonary Anatomy and Physiology. In: MADER, D R. **Reptile medicine and surgery**. 2^a ed. EUA: Saunders Elsevier, p. 25-43, 2005.

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

MUSIC, M. K.; STRUNK, A. reptile critical care and common emergencies. **Veterinary clinics of north america: exotics animal practice**. v. 19, n. 2, p. 599-612, 2016.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**. v. 1, p.1-13, 2010.

NG, T. B.; HON, W. K.; CHENG, C. H. Evidence for the presence of adrenocorticotrophic and opiate-like hormones in the brains of two sea snakes,

Hydrophis cyanocinctus and Lapemis hardwickii. General and Comparative Endocrinology. v.63, n.1, p.31-37, 1986.

OLIVEIRA, F. A. et al. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. **BMC Veterinary Research**. v. 10, n. 200, p. 2-14, 2014.

OLESEN, M. G. et al. Effects os preoperative administration od buthorphanol or meloxicam on physiologic responses to surgery in ball pythons. **Jornal of Americam Veterinary Medical Association**. v. 233, n. 12, p. 1883-1888, 2008.

PARSADANIANTZ, S. M. et al. Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? **Nature Reviews Neuroscience**. v. 16, p.69-78, 2015.

PASCOE, P. J. Opioid Analgesics. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**. v. 30, p. 757-771, 2000.

PINCHEIRA-DANOSO D. et al. Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. **Plos one**. v. 8, n. 3, e59741, 2013.

PORSOLT, R. D.; LePICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. v. 266, n. 5064, p.730-732, 1977.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Rins de vertebrados não-mamíferos. In: _____. **Fisiologia Animal., Mecanismos e Adaptação**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.565-580, 2008.

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

REINER, A. The distribution of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of turtles. *Journal of Comparative Neurology*. v.259, n.1, p.65-91, 1987.

- ROBINSON, J. E. et al. Dynamics of the global trade in live reptiles: Shifting trends in production and consequences for sustainability. **Biological Conservation**. v. 184, p.42-50, 2015.
- ROCHA, C. F. D. et al. Comportamento de Termorregulação em Lagartos Brasileiros. **Oecologia Brasiliensis**. v.13, n.1, p.115-131, 2009.
- ROSSI, J. V. General husbandry and management. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2ª ed. EUA: Saunders Elsevier, p. 25-43, 2005.
- RUTHERFORD, K. M. D. Assessing pain in animals. **Animal Welfare**. v.11, n.1, p, 31-53, 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Protocol 9 – Rapid Amplification of 5´cDNA Ends. In: _____. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 3ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 2, p.8.56-8.60, 2001.
- SANTOS, G. G. L. et al. Antinociceptive properties of Micrurus lemniscatus venom. **Toxicon**. v.6, p.1005-1012, 2012.
- SCHNEIDER, L. et al. Mercury contamination in reptiles: an emerging problem with consequences for wildlife and human health. In: KIM, K. W.; BROWN, R. J. C. Mercury: source, application and health impacts. New York: Nova Scienci Publishers. 2013.
- SCHNELLBACHER, R. Butorphanol. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 19, n.2, p. 192-195, 2010.
- SLADKY, K. K. et al., Analgesic efficacy and respiratory effects of butorphanol and morphine in turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 230, n. 9, p. 1356-1362, 2007.
- SLADKY, K. K.; KINNEY, M. E.; JOHNSON, S. M. Analgesic efficacy of butorphanol and morphine in bearded dragons and corn snakes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n. 2, p. 267-273, 2008.

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

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

SNEDDON, L. U. et al. Defining and assessing animal pain. **Animal Behaviour**. v. 97, p.201-212, 2014.

SNIDER, W. D.; McMAHON, S. B. Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors. **Neuron**. v.20, p.629-632, 1998.

SOBREIRA, T; BRESSAN, T. F.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade de testes comportamentais para análise de sedação em iguanas-verdes (*Iguana iguana*). **Anais do XII Congresso Brasileiro de Anestesiologia Veterinária**, p. 61, Curitiba- 2016.

STHAL., S. J. Pet Lizard Conditions and Syndromes. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. v. 12, n. 3, p. 162-182, 2003.

STRANGE, P. G. G-protein coupled receptors: conformations and states. **Biochemical Pharmacology**. v.58, p.1081-1088, 1999.

SWANSON, P. L. The iguna *Iguana iguana iguana*. **Herpetologica**. v.6, p. 187-193, 1950.

SYKES, J. M.; GREENACRE, C. B. Techniques for drug delivery in reptiles and amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 15, n. 3, p. 210-217, 2006.

TATTERSALL, G. J. et al. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. **Science Advanced**. v. 2, p. 1-18, 2016.

TEN DONKELAAR, H. J.; DE HUIZEN, R. B. A possible pain control system in a non-mammalian vertebrate (a lizard, *Gekko gekko*). **Neuroscience Letters**. v. 83, p. 65-70, 1987.

- TEN DONKELAAR, H. J.; DE HUIZEN, R. B. Basal ganglia projections to the brain stem in the lizard *Varanus examthematicus* as demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. **Neuroscience**. v. 6, n.8, p. 1567-1590, 1981.
- TRNKOVÁ, S.; KNOTKOVÁ, Z.; KNOTEK, Z. Effect of butorphanol on anaesthesia induction by isoflurane in the green iguana. **Acta Vet BRNO**. v. 77, p.245-49, 2008.
- TODD, A. J.; SPIKE, R. C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I–III of the mammalian spinal dorsal horn. **Progress in Neurobiology**. v. 41, n.5, p. 609-645, 1993.
- TRESCOT, A. M. et al., Opioid Pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, p. S133-S153, 2008.
- VALENZUELA-CEBALLOS, S. et al. Variation In the thermal ecology of an endemic iguana from Mexico reduce sites vulnerability to global warming. **Journal of Thermal Biology**. v.48, p. 56-64, 2015.
- VLECK, D. et al. Oxygen consumption during swimming in galapagos marine iguanas and its ecological correlates. **Journal Of Comparative Physiology**. v. 141, p.531-536, 1981.
- WAMBUGU, S. N. et al. Effects of opioids in the formalina test in the Speke's hinged tortoise (*Kinixy's spekiil*). **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v.33, p.347-351, 2010.
- WILLIAMS, C. J. A. et al. Tachycardia in response to remote capsaicin injection as a model for nociception in the ball python (*Python regius*). **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. v.43, p.429-434, 2016.
- WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the Pain System and of the Pathways That Modulate Pain. **Journal of Clinical Neurophysiology**. v.14, n.1, p.2-31, 1997.

WOLTERS, J. G. et al. Distribution of serotonin in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus exanematicus*: an immunohistochemical study.

Neuroscience. v.14, n.1, p. 169-193, 1985.

WOLTERS, J. G.; TEN DONKELAAR, H. J.; VERHOFSTAD, A. A. J.

Distribution of some peptides (substance P, [leu]encephalin, [met]encephalin) in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus exanematicus*.

Neuroscience. v.18, n.4, p. 917-946, 1986.

WOOLF, C. J.; KING, A. E. Physiology and morphology of multireceptive neurons with C-afferent fiber inputs in the deep dorsal horn of the rat lumbar spinal cord.

Journal of Neurophysiology. v.58, n. 3, p.460-479, 1987.

XIA, Y.; HADDAD, G. G. Major Difference in the Expression of d- and m-Opioid Receptors Between Turtle and Rat Brain. **The Journal Of Comparative**

Neurology. v. 436, p.202-210, 2001.

ZÖLLNER C. et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and g-protein coupling in primary afferent neurons. **Molecular**

pharmacology. v.64, n.2, p.202-210, 2003.

ZUBIETA, J. K. et al. Regional Mu opioide receptor regulation of Sensory and affective Dimensions of Pain. **Science**. v.293, p.311-315, 2001.

ANEXO A

Sequência de nucleotídeos dos receptores opioides obtida pela técnica de RNA-seq. A – sequência do δ ; B – sequência do κ ; C – sequência do μ .

A - DOR

TCCTACATTAGCAGAGCTTGCAGAAATCATAGTTCTCTGCTCAGATATTGAACAGCAGCAGACGAAGGAGGGAGGTAGTGCAGTTTATGATCTGTAGCAGATGGTATGCAGGA
GGTTTGAAGATAGATGCCGGTCAGCACCCGCTGGTATTGAGAGCTCTTACCTTCTTTTATCCTGGCCGCCGTTTCCCTTTCTCTCCTTCAAGTTCTGGGGTTTTTGGAGAGCCGCTT
GCAAGGGAGCGGGTGAGGAGCGCGCGTTCCCGGGCAGCTTTCGGAAGGAAGGACTCTGAGCGGTGAATCGCGGGATCTTTCCAGTCGGACGTCAGGCTGGGCTCGGGGAG
CTCCCTGCCGTGATGGAGCTGTCCACCTTCCCTGGTGCCGAAATGTACCCCAATTTCTTTCACAACACCACCGCGCAAGATTTAGCTCCAGTTGGCTCACAACGTCACACGCC
ACGAGCCCATCTCCAGTGAAGAATGCGACCTCCATCGTCATAGCCATCGCAATCACTGCCCTGTATTCTGTGGTCTGCGTGGTGGGGCTGCTGGGCAACATTTCTGTAATGTATG
GCATTGTGATACACCAAGATGAAACAGCCACCAATATCTATCTTCAACCTGGCTCTGGCAGATGCCCTGGCCACAGCACACTGCCTTTCCAGAGCGCTAAGTATCTGAT
GGAGACTTGGCCTTTTGGGAACTCCTCTGCAAGATTGTCTCTCCATTGACTACTACAACATGTTTCAAGTATCTTACCCTCACCATGATGAGCGTTGACCGGTACATAGCTG
TCTGCCATCCAGTCAAAGCTCTGGATTTCGGGACTCCAGCGAAAGCAAAATTAATCAACGTTTGTATTGGGTCTCTCTCTGTTATTGGGGTCTCTATCATGATCATGGCTGTTA
CCAAGTCTGACGGTAACGTTGTGTCTCTCCAGTTTCCAAACCTCAGATTACTGGGACACAGTCACCAAGATATGCGTTTTCATTTCGCTTCTTGGTTCCCATCTTG
GTTATCACCATCTGCTATGACTTATGATCTTCTGCTGAAGAGTGTCCGTCTCTCTCGGGCTCCAAAGGAAAAAGACCGCAACCTGCGTGCATCAGATGATGTTCTAGTAGT
GGTGGCTGCATTATCATCTGTTGGACACCCATCCAGATCTTGTCAATTGTTGGACACTGGTGGGCATCAAAAAAGAACCCCTACGTGATGGCAGCCTGCATTTCTGTATTG
CTTTGGGATACACCAACAGCAGCTCAACCCGATTCTCTATGCTTCTTGGATGAAATTTCAAGCGGTGTTCCGAGAGTCTGCTCCTCCCTTCCAGTCACGGATGGAACAGAG
CAGCTTCAGCCGGGCCGGAACACACCCGTCGAGCGTGTCTACCTGCACTCCTTCTGAAGTCTCAATAAGTCAGCATGACTAGACATAGACAGCCCAAAAGGGGCTCCC
AGGGACGCAAAACAGATGAGCTGCACTCTGAAGCAACCCAGTCACCAACACAGAAATCTAGCAGGAAAGGAGAGGCCCTTGAAGTGGCCATATCCCAATTTCTGTACTTTT
AGAACTGCAATACCGTGGAGGAGGGTGAATTTCTCATGAGATTCTGTACAAAAGTAAACAAACAAAGCCAGCAGCTGAAACTGATATACGAGTGTGGATTCTTAAAA
ATAAGAGCAITTCAGTTTGTGAATTTCAAAATCAGCTCGACTGGTTGCTTTCTTTTAAAAACATGTTTGGAAATGCACATAGTTAGCTTTCAAAATGTAAAAAGATTACA
GCAGAAATTTTGTAAATTTGAATATAGTTGGACTGTTGCTTATATACATCACCATTCTTCTGTACTTTCTCCATTCAATATTTCTGGTATTTTATATAACAGTATCAGATGGTT
TTAACAGAGGGTCAGGTCAATGGAAAGCCTCCAAATTACAAAATTTGAATACCTTTCCAAAAAATCAATGGCTACAAAACCTCAITTCAGATATTAATTTGAAGGAATAAATACAG
GAGTTAAATTTGGCTGTGGCAGGAAAGGCCAGTTCATTTCAITTCATTTCAAAACAAGCCACAGTGGTATAACAGACTGCAGATTTTCACTTAAATAAGAACAGCAGACT
GCAGAGATTTGAATCTTGTGGCTTTCTATTCTGCTCACTTTTGTACTACTTACTCTCTTAAAGCGGAAAGAAAAAGGTAATTTCTTTTCAATAAGAGTGTGCTTTT
CAGCTCAGGAGGAGTGAGGACACACTTTCAATTAACCTGGATGTAGAGATGGAACTGGGAATATAAACCTCTGTGTACATCTTGCCTTTAGTTCTTTCCCTTGATCAAAA
CCAAGTATTACAGACTGCAGAGATGTTATCATCTTCAITGCTCCACTGTACCAAGGAACACATTTGAGCCACAGGTTCAATCCATATTATCCAGTGTATGACACAAAGACCTT
GCTTGTAAATATGAAGGCTTCCATCTTTTGAATTTTCCAGGCATTCTGACCTTGCACTCTCTGGGATCCAGAAATCAATTTGACATATCTGTTTCAGGACCCAGCAAGAAACA
AGACATATCTGCCCTCATTGTACATATGAACCTTTAAAAAGGCTCCAGCAATCTCAGGTGGCAATTACAGGCTTGGAGCACAGGTGACTGGGGCTGTGTGAGGCTGCAAT
GGGAGGCTAGGAGGCTACCATTCATCCATCTCTGTTTATGTTTCCAAGGATAGGTGTGCTGTTGGCCATCATGGGAAGACAATGTGGGCTAAACAAGCCTCTGGTTGATC
CACTAGGGCTCTCCTAATATCTTCTACTGCTGCAGTGTACATTTTGAGTAAGCTTTCTGTATTGTTTTTCACTCCATGCTTTATGCTCTGTGTTCAAAATGCATTATCTATCCAT
TGATGGCAGATCGCTAGAAATGAGTGGCAAAACACAGGCAAAAGTAAGGAATGTTGTATTGTTGACAGACCTGGGTCAATAAAGGGAATTAATGAAGTGAAGTTAGTTG
TTATTGTACGGAAGTCTTATCAAGTTGCCCTGCAGTCTGCCCCACTTGGGCTCCTATCACTCACTTAGCCCTTTTACTTTAGGATTCTCTGGTAGTCAGAGCTCAAGATGAT
CTCTATCCCGGACAAAGTGGCTGTGTTGATCAGTGGGCTTGAATGGTATCATGTGGCAATTTTCTCATCAATACTAGATGAAGATAATCAGACAGTGGCCTTCCCTATCTGTA
CAITCTGTATCCAGGATCAACCTTCCATGGCTTGAATGTTTAAAAATACAAAATACAATAAGCAAACTTTGATTGTCATTTTATATAAGGA

B - KOR

AAGTACTGAGTACTTAATGAACCTCTTGGCCCTTTGGGGATGTGCTGTGTGTAATTTGTCATCTCCATTGACTACTACAAC
ATGTTTACCAGCATATTCACCCTGACCATGATGAGCGTTGATCGATACATTGCTGTGTGCCACCCTGTGAAGGCACTGG
ACTTCCGTACTCCTCTGAAGGCAAGATAATCAATATATGTATCTGGCTCTTGTCTTCTATCTGTTGGCATATCAGCCATA
GTCCTGGGAGGCACCAAGGTCAGGGATGATATGGACACAGCCATTACCGAGTGTCTCTGCAATTCCCTGATGATGAC
TATGACTGGTGGGACACTTTTATGAAAAATTTGTGTCTTTGTCTTTGCAATTTATATCCAGTGCTAATTATAGTTGTCTGC
TATAGCCTGATGATTCTGCGCTTGAAGAGTGTGAGACTTCTGTCTGGGTCACGGGAAAAAGACCGGAACCTCCGTCG
CATCACCAAGATTTGGTTCTTGTGTGGTTGCAGTTTTTCATATATCTGCTGGACCCCAATTCATATTTTGTGTGTTAGTTGAAG
CCCTTGGGGATGTGTACACAGTACTGCAGCAATTTCTAGCTATTATTTCTGCATTGCATTAGGCTACACTAATAGCAG
CCTAAATCCGATCCTGTATGCTTTCTGGATGAAAATTTCAAACGGTGTTCAAAGATTTCTGTTTTCTTTCAAGACA
AAGACAGACAGACAGAGCTAGCAGAGTTCGAAGTGCCATTACAGACCCCGTCTATACCAGGGATGCTGATGGTAC
AAACAAGCCAGTATGACTAGTCGTGGAAATGTCACTTTTCTCTGGCCGAGAGGAATCCAATGATCTTGGACT
AACTCAAATAACCAAGTGTGAAATGGCCGTTATGACCTGTAAAGAACTCTGATAGTCTGAAATGCATGTGGG
CATTTGTTGATAATGAGGCTGTCTTCAATGTTTCTGCTCAATGGTTATCAGTTTGGCTCTATTAACAAGTGGCTTTGTGA
CATTGCAGAAATCAATTTTGGCAGAAAGGAAAACTCTTCAAAAACTGCTGTTTTTAATAGTAAAGAGATTAGCTAT
TTTATTCTTCTAGAACTTTCTGCTTGTATTATCTTCCATATGGAAGATAAAATGATTGTTTAGTGATTGCTGAAAAT
AATTAAGGAGTAAAGGAATATTTTATTTTATACCTTACAATGATGACTATTAGTCTATAGTATCTGCCAAAACCTCAG
AATCAGTATTTTGTAGTGAACGCATACTTTTAAAAATGAATATGTTTAAAGATCATGTGAT

C - MOR

TREQLEREERTGLFSLSLSVPASSSSPSSPSPSRSLSPRLRPWSPCS MCRLTKDAVEATTTRRRRLSPRLGRGRTAPLPRP
 ARLQGSRLPPPAITGKGERPGWDCWAAPPPASSSSSLSSASLRAGKGAAAAAAPTAPAPPQPPGSLCLSRPLSGTAS
 ETGDRRESMDGGSWNLSEPNGTQLFCGGPNGLGTRGGSCLASGSPSMVTAIVIMALYSVVCVVGLFGNFLVMYVIIRY
 TKMKATATNIYIFNLALADALATSTLPFQSVNYLLGTWPFGTICKIVISIDYNNMFTSIFTLCTMSVDRIYAVCHPVKALDFR
 TPRNAKIVNVCNWIVSSAIGIPVMVMTTKESNGSIDCTLTFSHPAWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSV
 RMLSGSKEKDRNLRRITRMVLVVAVFIICWTPIHIYVIKALVHIPETTFQTVSWHVCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKR
 CFREFCIPTASTIEQQNSTRVRQNRDHAHASTANTVDRTNQLELLEADTTQPQPPLPLPCSNQSQCHSVIVLFAEKCRV
 VPHLLLSPSKCLKNLQNGLPQRQVSIHIGNNELKSDQMNLSSSLIYSPQECTHCKQNGSGIGVIFLKLVLNNKIGLIIL
 CPSRTKKPEDMGEDYMKEISPCILCIGIQGVKFFLSMCILVYRTFFNHTNINCIFFYGGDVLQASHNNKTEQSYLGHFFDV
 LDETEVLHFIKNKISSKEESPSTFCLDLNISKIHTSIKVFELQDYEMFLGSRWMECVNNVKKCCCLVPEFLHLKQRNTGPF
 RIAVLKRCRATSDGGLHCGVDWGGFFVVLHLDPLSDQNWWRGV

ANEXO B

Tabelas com valores individuais de cada animal referente a pontuação obtida na escala comportamental.

Midazolam 2 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 h	6	11	11	9	11	10	12	11	9	9
1h	5	8	9	8	9	10	9	9	12	12
2 h	5	3	6	3	4	3	5	5	7	7
3 h	0	0	3	1	1	1	2	1	2	2
4h	0	0	2	1	0	1	2	0	2	2
6h	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
12 h	0	1	1	1	2	1	1	1	0	0
24 h	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Salina 0,1 mL/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
0,5 h	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0
1h	1	0	1	2	0	0	0	1	2	0
2 h	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
3 h	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4h	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
6h	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
12 h	1	2	1	0	2	0	0	0	2	0
24 h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Morfina 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
0,5 h	0	1	4	3	1	2	0	3	1	2
1h	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1
2 h	1	1	2	4	2	1	2	0	3	2
3 h	0	2	0	0	0	1	0	2	2	2
4h	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
6h	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12 h	1	1	2	1	1	1	3	2	1	4
24 h	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0

Morfina 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 h	1	0	6	2	2	1	6	1	2	3
1h	4	1	3	2	2	2	3	1	4	3
2 h	2	0	5	3	0	2	2	0	6	2
3 h	2	0	4	3	0	2	0	0	2	2
4h	1	0	4	0	0	0	0	0	2	2
6h	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
12 h	1	1	1	2	0	1	1	2	1	2
24 h	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1

Butorfanol 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 h	1	1	2	0	1	0	2	3	1	3
1h	2	1	0	0	4	1	2	1	1	3
2 h	2	2	1	1	3	1	2	1	2	2
3 h	1	2	1	0	2	0	1	2	0	2
4h	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
6h	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0
12 h	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
24 h	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Butorfanol 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1
0,5 h	2	4	7	3	1	3	1	1	3	2
1h	2	2	2	3	3	3	1	0	4	2
2 h	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2
3 h	1	1	2	1	2	1	3	2	2	2
4h	0	0	1	0	0	1	2	1	0	1
6h	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1
12 h	2	1	2	2	1	0	4	3	1	3
24 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelas com valores individuais de cada animal referente ao tempo de natação (segundos).

Midazolam

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	109	90	60	69	62	65	49	54	72	70
0,5 h	19	23	32	47	31	25	10	26	21	26
1h	55	44	16	26	32	20	17	19	23	28
2 h	34	37	33	39	35	25	21	26	32	31
3 h	60	33	38	45	52	33	46	33	52	43
4h	58	44	40	51	67	42	73	42	65	53
6h	50	78	57	63	76	58	74	47	75	64
12 h	56	60	36	38	49	39	40	31	56	45
24 h	117	68	59	75	76	73	43	58	81	72

Salina

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	17	69	57	46	55	31	49	44	80	93
0,5 h	52	56	31	42	60	44	35	30	72	100
1h	75	54	27	39	59	45	26	40	67	98
2 h	32	42	26	44	49	25	23	36	75	100
3 h	56	42	42	30	56	64	20	42	50	93
4h	50	45	43	35	52	35	18	23	75	56
6h	53	54	39	54	54	63	28	47	75	96
12 h	29	28	15	23	38	29	14	25	28	12
24 h	49	68	41	48	62	55	49	48	82	100

Morfina 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	84	92	76	92	56	40	60	46	90	87
0,5 h	62	16	42	90	45	84	41	23	40	57
1h	45	62	75	58	40	120	14	27	40	62
2 h	52	58	60	44	57	91	16	24	72	69
3 h	40	73	62	45	46	44	41	33	69	74
4h	30	49	40	57	48	44	31	12	68	72
6h	63	93	50	96	63	80	57	39	61	78
12 h	28	53	72	65	21	28	26	14	37	29
24 h	94	68	68	112	59	60	32	44	65	89

Morfina 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	120	75	77	60	109	32	97	81	65	91
0,5 h	96	37	33	43	50	50	78	21	42	49
1h	34	43	48	36	68	44	74	22	22	78
2 h	86	54	34	48	75	51	58	13	38	62
3 h	55	53	54	51	69	68	67	51	29	69
4h	60	61	64	58	67	59	59	58	46	48
6h	77	51	50	45	73	61	97	33	33	79
12 h	35	22	26	32	75	30	73	63	21	20
24 h	120	54	62	62	99	46	82	68	44	119

Butorfanol 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	92	89	109	57	67	71	40	112	87	45
0,5 h	32	80	43	46	37	32	15	60	29	30
1h	63	66	42	37	36	16	19	75	23	49
2 h	62	60	19	38	58	41	32	67	79	27
3 h	89	65	68	29	61	50	14	46	78	35
4h	81	58	60	39	85	57	16	82	75	38
6h	103	83	59	53	56	50	28	45	64	57
12 h	60	51	55	30	38	23	14	37	52	9
24 h	101	92	95	52	63	57	38	82	80	49

Butorfanol 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	78	60	73	94	115	66	93	67	31	74
0,5 h	13	35	24	41	61	61	90	40	39	23
1h	36	42	16	53	59	56	66	31	27	16
2 h	18	39	44	50	77	54	71	25	26	33
3 h	10	30	31	47	73	22	67	33	11	39
4h	63	43	41	106	64	38	69	43	16	53
6h	52	38	25	51	82	38	63	32	17	53
12 h	20	25	20	88	86	20	77	20	15	25
24 h	68	53	65	90	86	66	90	44	27	66

Tabelas com valores individuais de cada animal referente a latência do reflexo de retirada do membros (segundos).

Salina

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	9,8	17,5	9,8	9,9	18,2	9,2	8,5	5,3	12,6	12,7
0,5 h	8,9	16	10,3	11,2	18,7	8,6	9,6	7,5	12,8	13,7
1h	8	14,6	10,8	12,1	12,5	8	10,7	10	13	14,8
2 h	9,4	12,3	12,4	11,7	13,8	7,4	9,7	7,6	7,9	12,2
4h	12,6	9,15	9,3	10,5	11,7	8,8	10,9	11,1	10,5	12,7
6h	3,6	13,3	13,6	10,7	16,9	9,4	9,8	8,8	16,9	5,1
12 h	11,1	8,7	16,3	13,9	13,6	11,9	16,1	17,8	20,8	18,1
24 h	10,2	10,8	10,6	17,9	12,1	14,1	13,4	17,5	13,5	13,1

Morfina 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	12,9	11,6	15,9	15,2	10,9	7,9	12,7	11,4	11,2	18,3
0,5 h	15	11	18,1	16,5	14,3	12,7	21	14,5	15,2	21
1h	11,9	16,2	22,2	22,3	12,4	10,4	22,8	6,8	14,6	17,8
2 h	15,3	11,5	17,5	21,7	21,8	9,9	15,2	10,3	5,2	17,2
4h	16,6	16,7	16	17,8	18,3	16,7	17,8	8,6	4,7	8,5
6h	14,2	16	20,1	17	15	10,6	18,5	8,1	14,8	12,4
12 h	15	19	16,9	16,9	18,6	12,9	16,9	17	17,8	26,3
24 h	14,4	6,9	10,5	19,8	11,2	9,8	15,8	12	12,6	15,5

Morfina 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	14,6	14,6	7,6	12,3	17,5	9,4	13,2	17,1	12,7	13,3
0,5 h	9,2	11,3	8,5	15,4	12,6	24,6	16,3	23,6	27,1	15,2
1h	8,7	8	12,8	14,1	24,8	26	17,1	29,3	20,8	10
2 h	12	16,2	13,1	12,8	23,1	18,9	18,4	26,5	13,3	30,1
4h	14,8	16,9	9,8	15,4	21,5	19,2	17,6	29,3	15,9	16,1
6h	13,8	16,4	12,2	12,8	26,9	27,5	16,6	30	4	5,8
12 h	15,5	25,5	18,1	20,1	23	22,5	22,7	27,3	30,1	22
24 h	13,2	14,9	8,9	12	17,3	12,7	13,8	19,7	12,9	12,9

Butorfanol 5 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	12,1	16,6	15,6	9,9	10,5	8,4	10,9	9,9	19,1	7,9
0,5 h	11,6	12,9	16,9	11,3	9,4	12,6	10,6	19,4	21,4	16,5
1h	12,8	19,6	10,6	2,8	15,9	10	7,8	21,3	30,1	10,3
2 h	12	18,3	9,2	15,8	19,8	8,8	7,7	7,8	27,6	10,3
4h	8,9	13,2	27,8	11,8	19	8	19,8	10,5	26,7	10,3
6h	11,6	8,5	11,6	11,8	15,1	9,8	12,6	8,6	30,1	10
12 h	19,9	22,1	21,2	20,1	24,1	15,5	21,1	19	28,5	15,3
24 h	12,1	13,6	16,7	11,2	9,5	10,7	11	9	12,7	10

Butorfanol 10 mg/kg

	862	868	874	889	907	937	952	978	999	954
basal	14,4	14,5	17	12,8	14,4	11,9	13,9	9,9	18,5	17
0,5 h	14,7	14,9	14,1	13,8	14,7	19,8	11,2	12,3	13,4	18,8
1h	13,5	12,1	19,3	11	13,5	13,1	8,1	20,4	9,3	14,8
2 h	14,7	14,4	15,5	12,3	14,7	11	12,9	21,4	13	17,8
4h	14,2	11,5	12,1	11,4	14,2	10,2	12,5	11,5	17,3	27,1
6h	16,3	17,3	25	10,9	16,3	12	18,9	11,3	13,7	21,9
12 h	17,3	20,8	17,3	16,3	17,3	18,5	15,8	10,3	18	21,7
24 h	14	14,5	16,2	10,6	14	10,8	11,7	10,5	17	21