JILMA MARÍA ALEMÁN LAPORTE

Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem- estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais

São Paulo

2017

JILMA MARÍA ALEMÁN LAPORTE

Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3501
FMVZ

Laporte, Jilma María Alemán
Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais. / Jilma María Alemán Laporte. -- 2017.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori.

1. Protocolos anestésicos. 2. Analgesia. 3. Opióides. 4. Vocalização ultrassônica.
5. Oxigenação. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS POR VÍA INTRAPERITONEAL EM RATOS DE EXPERIMENTAÇÃO", protocolado sob o CEUA nº 9635260116, sob a responsabilidade de **Claudia Madalena Cabrera Mori e equipe; Jilma María Alemán Laporte; Denise Tabacchi Fantoni** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 06/04/2016.

We certify that the proposal "Influence of different anesthetic associations by intraperitoneal injections in laboratory rats", utilizing 28 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9635260116, under the responsibility of **Claudia Madalena Cabrera Mori and team; Jilma María Alemán Laporte; Denise Tabacchi Fantoni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 04/06/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2016 a 02/2018**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Procedência: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **28**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **180 a 450 g**

Resumo: Os ratos são uns dos animais mais comumente utilizados em investigação, e em muitos desses procedimentos experimentais anestesia é requerida ou recomendada. Portanto, assegurar o bem estar dos animais de laboratório e evitar a dor e sofrimento desnecessários é uma das principais considerações em experimentação animal. Um protocolo anestésico balanceado consiste na associação de várias drogas utilizando doses baixas de cada componente para conseguir assim minimizar as potenciais complicações decorrentes da anestesia e garantir a segurança do sucesso nos procedimentos. A utilização de analgésicos como os opióides nos protocolos de anestesia podem ajudar com o controle da dor assim como reduzem a doses dos anestésicos para obter uma anestesia cirúrgica. Uma dos principais objetivos nos procedimentos experimentais é contar com um protocolo anestésico que tenha tanto um bom controle da inconsciência como da analgesia e o miorelaxamento do animal, garantindo a repetibilidade e fidelidade dos dados gerados. Na América Latina, a maioria dos protocolos anestésicos restringem-se à utilização de cetamina mais xilazina, desta forma existe a necessidade de instaurar novos protocolos anestésicos mais seguros e com melhores resultados para evitar o sofrimento dos animais. O presente projeto tem como objetivo comparar os efeitos clínicos de diferentes protocolos anestésicos e sua influência nos parâmetros cardiovasculares, respiratórios e bioquímicos para determinar o protocolo mais efetivo e seguro que garante o bem estar em ratos de laboratório.

Local do experimento: Departamento de Patologia da FMVZ USP.

São Paulo, 11 de abril de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 15 de março de 2017
CEUA N 9635260116

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Claudia Madalena Cabrera Mori

Área: Patologia Experimental E Comparada

Claudia Madalena Cabrera Mori (orientador)

Título da proposta: "INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS POR VÍA INTRAPERITONEAL EM RATOS DE EXPERIMENTAÇÃO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 01/dezembro/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Na literatura estão descritas as doses dos anestésicos, sedativos e opióides utilizadas separadamente em ratos de experimentação, porém as doses das associações que serão testadas no presente projeto (com exceção da xilazina + ketamina + acepromazina) ainda não foram descritas. Desta forma, foi necessário a realização de mais testes a fim de adequar as doses para obtenção de melhores resultados no experimento principal. Além disso, devido aos procedimentos propostos durante e após a anestesia, como avaliação de dor, coleta de sangue e histopatologia, optou-se por utilizar um grupo de animais para cada protocolo anestésico ao invés de repetir as anestésias nos mesmos indivíduos. Além disso, durante a realização do experimento piloto também foi possível demonstrar que os animais tinham a saturação de oxigênio muito baixa durante o procedimento anestésico, o que podia ser revertido com a administração de oxigênio por via de uma máscara. Por isso foi decidido que o oxigênio seria fornecido durante a anestesia e seria realizada a hemogasometria para avaliar os efeitos da oxigenação nos animais sob anestesia. Nesse sentido, será necessário aumentar o número amostral de 28 para 56 animais."

Comentário da CEUA: "Solicita-se o aumento do n amostral de 28 para 56 ratos, em função de adaptações ao protocolo experimental de anestesia. Este aumento foi devidamente justificado."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 24 de abril de 2017
CEUA N 9635260116

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Claudia Madalena Cabrera Mori

Área: Patologia Experimental E Comparada

Claudia Madalena Cabrera Mori (orientador)

Título da proposta: "Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 11/abril/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicita-se alteração do título do projeto".

Comentário da CEUA: "Alteração de título aprovada".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALEMÁN LAPORTE, Jilma

Título: **Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

***Dedico** este trabalho a meu amor, meu companheiro de vida Gilbert . Te amo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus que me concedeu cada uma das incríveis experiências e oportunidades que consegui viver a longo deste mestrado.

Ao meu amado esposo Gilbert que graças a seu apoio, conselhos e sacrifícios me ajudou a culminar este projeto com sucesso. Te amo e admiro imensamente.

À minha família, em especial a meus pais e avó que me deram todo seu apoio e amor. Apesar que a distância foi grande sempre os senti junto a mim. Amo vocês.

Ao meu anjo e orientadora Claudia Mori que me recebeu como aluna e me guiou e ajudou a crescer como profissional. Obrigada porque sem você nada disto seria possível, você é incrível. E o melhor este é somente o início!

Aos meus amigos do mundo inteiro que fiz em minha estadia no Brasil por fazer de minha vida mais feliz.

À minha equipe de trabalho, Mariana Aranha, Dennis, Luciana, Pedro, que além de colegas de trabalho se converteram em minha família no Brasil. Obrigada por ser minha mão direita no projeto e também na vida com sua amizade. Os quero muito meninos! Não sei como pagar para vocês tanta ajuda.

À Yamê por suas sugestões sobre anestesia e empréstimo de seus aparelhos de monitoramento. Muito obrigada, você ajudou a que meu projeto fosse melhor!

Aos meus companheiros de laboratório, Mariana Aranha, Dennis, Danilo, Marianna Manes, Ana, Elaine e Nicássia por todas as experiências que vivi com vocês. Contem sempre comigo!

Aos companheiros do Biotério de Patologia, Mauro, Luciana e Nelsinho. Vocês me ajudaram de forma incondicional. Obrigada por tudo.

À Silvia, Sandra, Marcio, Renaide, Silvânia, Flávia, Ana e a todos os bioteristas com os quais trabalhei; por me ensinar tantas coisas durante meus estágios em seus biotérios.

Às professoras Aline e Denise, assim como ao Marco pelo apoio e conselhos na parte da anestesia. Também ao seu laboratório por emprestar-me o aparelho de gasometria para realizar minhas análises. Aprendi muito graças a vocês.

Ao laboratório de Farmacologia do VPT, em especial ao Herculano por ajudar-me com a realização de muitas das análises do meu projeto.

À Martha Bernardi e Thiago Kirsten pelos conselhos na parte de vocalização e por compartilhar sua valiosa experiência comigo.

À Ester por ajudar-me com as análises clínicas e por seu apoio.

Ao Biotério Central do ICB pelo fornecimento dos animais para meu projeto.

À Provet e à Dra. Martha pelo empréstimo das seringas de gasometria que foram tão difíceis de conseguir.

À CAPES pela bolsa que me concedeu para poder fazer este sonho realidade.

A todos os colegas, funcionários e docentes do Departamento de Patologia da FMVZ/USP pela excelente experiência de poder trabalhar e aprender junto com vocês.

Aos animais que deram sua vida em favor da ciência e por ajudar a melhorar o bem-estar de outros animais.

Muito obrigada e que Deus os abençoe!

*“Os animais foram criados pela mesma mão caridosa de Deus que nos criou. É nosso dever protegê-los e promover seu bem-estar” **Madre Teresa de Calcuta***

RESUMO

ALEMÁN LAPORTE, JM. **Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Assegurar o bem-estar dos animais de laboratório e evitar a dor e o sofrimento desnecessários são as principais considerações na experimentação. Por isso, a investigação em busca de novos protocolos anestésicos que garantam um mínimo ou nulo desconforto dos animais tem-se convertido num tema prioritário. Neste estudo realizou-se a comparação do efeito da combinação de xilazina (X) e ketamina (K) com acepromazina (A) e opióides [metadona (Me), morfina (Mo) e tramadol (T)] com a finalidade de avaliar sua influência nos parâmetros fisiológicos de ratos de laboratório, para ambos os sexos, bem como seu poder analgésico e o efeito da oxigenação sobre os mesmos. A associação XKA para ratos machos e fêmeas e a associação XKMe para fêmeas foram as mais seguras e eficazes para procedimentos anestésicos. Porém, os resultados do teste de formalina com a medição da vocalização ultrassônica (VUS) sugerem que o protocolo de XKA tem um poder analgésico baixo, não sendo indicado para procedimentos que possam gerar dor moderada ou severa. Todas as associações anestésicas tiveram efeitos importantes como diurese, manutenção dos olhos abertos e hiperglicemia, os quais devem ser considerados quando possam influenciar nos resultados experimentais. Também, se conseguiu demonstrar que a oxigenação melhora a saturação de oxigênio (SO₂) e os valores da pressão parcial de oxigênio (pO₂) confirmando que sua utilização deveria ser sempre parte dos procedimentos experimentais com anestesia injetável para evitar a hipoxemia. Não obstante, observou-se uma acidose respiratória por aumento da pressão parcial do CO₂ (pCO₂) e diminuição do pH, cuja causa se relacionou à hipoventilação por depressão respiratória e acúmulo de CO₂ durante o transcorrer da anestesia. Tal situação demonstra a necessidade de oxigenar os animais desde a indução da anestesia e de administrar medicamentos para reverter a depressão respiratória como a naloxona, bem como utilizar animais que não apresentem nenhum tipo de comprometimento respiratório. Portanto, a inclusão de analgesia e a oxigenação nos protocolos anestésicos injetáveis devem ser utilizadas de forma rotineira garantindo a mínima presença de dor e, com isso, resultados mais confiáveis nos procedimentos experimentais.

Palavras-chave: 1. Protocolos anestésicos 2. Analgesia 3. Opióides 4. Vocalização ultrassônica 5. Oxigenação

ABSTRACT

ALEMÁN LAPORTE, JM. **Refinement of techniques of injectable anesthesia to ensure the wellbeing of laboratory rats in experimental procedures.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Ensuring the wellbeing of laboratory animals and avoiding unnecessary pain and suffering is one of the main considerations in experimentation. Therefore, the investigation of new anesthetic protocols that guarantee a minimum or null discomfort of the animals has become a priority theme. In this study, it was made an evaluation of the effect of the combination of xylazine (X) and ketamine (K) with acepromazina (A) and opioids [methadone (Me), morphine (Mo) e tramadol (T)] with the purpose of comparing their influence on the physiological parameters of laboratory rats, for both sexes, and evaluating their analgesic power and the effect of the oxygenation on them. The XKA protocol for male and females rats and the XKMe protocol for females were the safest and most effective for anesthetic procedures. However, the results of the formalin test with the measurement of the ultrasonic vocalization (VUS) suggest that the XKA protocol had a low analgesic power, and it is not indicated for procedures that can generate moderate or severe pain. All anesthetic protocols had important effects as diuresis, maintenance of open eyes, and hyperglycemia; these effects should be considered when they could influence in the experimental results. It was demonstrated that oxygenation improves oxygen saturation (SO₂) and oxygen partial pressure (pO₂) confirming that its use should be considered in the experimental procedures with injectable anesthesia to avoid hypoxemia. Nevertheless, a respiratory acidosis was observed due to the increase in partial pressure of CO₂ (pCO₂) and the decrease in pH, that could be caused for the hypoventilation due to respiratory depression and CO₂ accumulation during the course of anesthesia. This leads to consider the need to pre-oxygenate animals from induction, to use drugs to reverse respiratory depression such as naloxone, and to work with animals that are not respiratory compromised. Therefore the inclusion of analgesia and oxygenation in anesthesia protocols should begin to be used routinely ensuring minimal presence of pain and thus more reliable results in the experimental procedures.

Keywords: 1. Anesthesia 2. Analgesic 3. Laboratory rats 4. Ultrasonic vocalization 5. Oxygenation

LISTA DE FIGURAS

COMPARAÇÃO DE QUATRO ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS COM XILAZINA E KETAMINA E SEU EFEITO ANALGÉSICO EM RATOS DE LABORATÓRIO

- Figura 1 - Variação da temperatura corporal (°C) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média..... 36
- Figura 2 - Variação da frequência cardíaca (batimento por minuto [bpm]) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média 37
- Figura 3 - Variação da frequência respiratória (respirações por minuto [rpm]) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média 37
- Figura 4 - Número de vocalizações ultrassônicas durante o teste de formalina em ratos machos (A) e fêmeas (B) nos diferentes intervalos de tempo (a: dos 5 aos 8 minutos, b: dos 10 aos 13 minutos, c: dos 15 aos 18 minutos, d: dos 20 aos 23 minutos, e: dos 25 aos 28 minutos), submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média 41
- Figura 5 - Duração das vocalizações ultrassônicas durante o teste de formalina em ratos machos (A) e fêmeas (B) nos diferentes intervalos de tempo (a: dos 5 aos 8 minutos, b: dos 10 aos 13 minutos, c: dos 15 aos 18 minutos, d: dos 20 aos 23 minutos, e: dos 25 aos 28 minutos), submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média 42

ADMINISTRAÇÃO DE OXIGÊNIO COMO TÉCNICA DE REFINAMENTO DA ANESTESIA INJETÁVEL EM RATOS DE LABORATÓRIO

- Figura 1 - Variação da saturação de oxigênio (SO₂) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média..... 61

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1: COMPARAÇÃO DE QUATRO ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS COM XILAZINA E KETAMINA E SEU EFEITO ANALGÉSICO EM RATOS DE LABORATÓRIO

Tabela 1 -	Doses (mg/Kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório de ambos os sexos	30
Tabela 2 -	Modelos que explicam a influência da anestesia sobre os diferentes parâmetros fisiológicos avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado de acordo com o sexo.....	36
Tabela 3 -	Comparação da margem de segurança, sinais clínicos, reflexos e tempo de anestesia de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol)	39
Tabela 4 -	Modelos que explicam a influência da anestesia sobre os tempos anestésicos avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado de acordo com o sexo	40
Tabela 5 -	Comparação do tamanho do efeito de acordo com Cohen's d dos tempos de anestesia que tiveram diferença em ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol).....	40
Tabela 6 -	Modelos que explicam a influência da anestesia sobre o número de vocalizações ultrassônicas avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado de acordo com o sexo.....	41
Tabela 7 -	Comparação das médias $\pm$ desvio padrão com os dados de referência dos hemogramas de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol)	43
Tabela 8 -	Comparação das médias $\pm$ desvio padrão com os dados de referência dos parâmetros bioquímicos de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol).....	44

CAPITULO 2: ADMINISTRAÇÃO DE OXIGÊNIO COMO TÉCNICA DE REFINAMENTO DA ANESTESIA INJETÁVEL EM RATOS DE LABORATÓRIO

Tabela 1 -	Doses (mg/Kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório de ambos os sexos	59
Tabela 2 -	Modelos que explicam a influência da anestesia sobre a saturação de oxigênio (SO ₂) avaliada em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado de acordo com o sexo	61
Tabela 3 -	Médias $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos na análise dos gases sanguíneos arteriais em ratos sem e com oxigenação, submetidos a diferentes protocolos anestésicos (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol), para ambos os sexos.....	63
Tabela 4 -	Tamanho do efeito da presença de oxigênio sobre os gases sanguíneos em ratos machos submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol). Tamanho do efeito (TE), Erro Padrão (EP) e 95% Intervalos de Confiança (IC). A direção da covariável positiva indica que a magnitude da variável é mais alta nos animais oxigenados quando comparados aos animais que não foram oxigenados	64
Tabela 5 -	Tamanho do efeito da presença de oxigênio sobre os gases sanguíneos em ratos fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T:Tramadol). Tamanho do efeito (TE), Erro Padrão (EP) e 95% Intervalos de Confiança (IC). A direção da covariável positiva indica que a magnitude da variável é mais alta nos animais oxigenados quando comparados aos animais que não foram oxigenados	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Acepromazina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIC	Critério de Informação de Akaike
AICc	Critério de Informação de Akaike para amostras pequenas
AICcWT	Peso de Akaike para amostras pequenas
ALT	Alanino amino transferase
AST	Aspartato transaminase
bpm	Batimentos por minuto
cHCO ₃	Concentração do íon bicarbonato
EP	Erro padrão
GH	Hormônio do crescimento
GLMM	Modelo linear generalizado misto
K	Ketamina
k	Número de parâmetros do modelo estatístico
IC	Intervalos de confiança
Me	Metadona
min	Minutos
Mo	Morfina
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
pH	Potencial hidrogeniônico
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
rpm	Respirações por minuto
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
SPF	Specific Pathogen Free
T	Tramadol
TE	Tamanho do efeito
VUS	Vocalizações ultrassônicas
X	Xilazina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1.	ANESTESIA NA EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	21
1.2	REFLEXOS E PARÂMETROS QUE DEVEM SER MENSURADOS DURANTE UMA ANESTESIA	22
1.3	ASSOCIAÇÕES DE ANESTÉSICOS COM OPIOIDES PARA ANALGESIA INTRA E PÓS-OPERATÓRIA.....	22
1.4	VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA	23
1.5	OXIGENAÇÃO DURANTE ANESTESIA.....	24
2	CAPÍTULO 1: COMPARAÇÃO DE QUATRO ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS COM XILAZINA E KETAMINA E SEU EFEITO ANALGÉSICO EM RATOS DE LABORATÓRIO	25
	RESUMO.....	26
	ABSTRACT.....	27
2.1.	INTRODUÇÃO.....	28
2.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.2.1	Animais.	30
2.2.2.	Comissão de ética	30
2.2.3	Procedimento anestésico	30
2.2.4.	Avaliação da analgesia pela vocalização ultrassônica	32
2.2.5	Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	32
2.2.6.	Análise estatística	33
2.3	RESULTADOS	35
2.3.1.	Parâmetros fisiológicos.....	35
2.3.2.	Sinais clínicos, reflexos e tempos de anestesia	37
2.3.3.	Avaliação da analgesia pela vocalização ultrassônica	40
2.3.4.	Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	42
2.4	DISCUSSÃO	45
2.5	CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS.....	50
3	CAPÍTULO 2: ADMINISTRAÇÃO DE OXIGÊNIO PARA EVITAR PROBLEMAS DE HIPÓXIA COMO TÉCNICA DE REFINAMENTO DA ANESTESIA INJETÁVEL EM RATOS DE LABORATÓRIO	54

RESUMO	55
ABSTRACT	56
3.1 INTRODUÇÃO	57
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
3.2.1. Animais	58
3.2.2. Comissão de ética	59
3.2.3. Delineamento experimental	59
3.2.4. Análise dos gases sanguíneos arteriais	60
3.2.5. Análise estatística	60
3.3 RESULTADOS	61
3.3.1. Saturação de oxigênio (SO₂)	61
3.3.2. Gases sanguíneos arteriais	61
3.4 DISCUSSÃO	66
3.5 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE	73
4 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÃO (Geral)	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A anestesia e analgesia em animais de experimentação são componentes cruciais em procedimentos que impliquem dor ou desconforto dos mesmos. Uma anestesia bem controlada é fundamental para reduzir potenciais complicações cirúrgicas e garante a segurança e o sucesso nos procedimentos (MOLINA et al., 2015). Atualmente uma das obrigações na investigação com animais de experimentação é o cumprimento do princípio dos 3R's (refinamento, redução e substituição) enunciados por Russel e Burch em 1959. Uma anestesia cuidadosamente planejada e um bom manejo da dor podem ajudar a refinar o estudo e a reduzir o numero de animais que serão utilizados (FLECKNELL, 2009).

Apesar do amplo uso de diferentes associações anestésicas, a maioria dos protocolos anestésicos em roedores de laboratório ainda restringem-se à utilização de ketamina mais xilazina. A utilização desta combinação com acepromazina em ratos está descrita na literatura (BOUGHERARA; BOUAZIZ, 2014; WELBERG et al. 2006), porém é pouco utilizada em nosso meio. Ademais, não existe muita informação científica de protocolos anestésicos utilizados em roedores de laboratório que incluam a combinação desses anestésicos com opióides. Por isso, o presente estudo é importante para esclarecer o efeito destas associações, já que tem sido comprovado que a administração pré-operatória de opióides com os protocolos anestésicos pode reduzir a dose requerida dos mesmos para atingir uma anestesia cirúrgica, além de reduzir a necessidade de analgésicos pós-operatórios (HEDENQVIST; ROUGHAN; FLECKNELL, 2000).

A maioria dos estudos realizados com diferentes associações anestésicas utilizaram somente ratos machos, não considerando que podem ter grandes diferenças na resposta anestésica entre os sexos, por isso é importante fazer os testes também em fêmeas para avaliar as variações que podem surgir devido às diferenças metabólicas e hormonais (ZAMBRICKI; D'ALECY, 2004).

Por outro lado, já foi descrito na literatura que qualquer associação anestésica pode causar diferentes efeitos nos órgãos, nos parâmetros do sistema cardiovascular e respiratório, na temperatura corporal, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos ou até mesmo nas habilidades cognitivas dos animais (ALBRECHT et al. 2014; RODRIGUES et al. 2006). Portanto, é muito importante o estudo destas associações anestésicas para garantir a segurança do animal durante qualquer procedimento anestésico.

Um dos efeitos adversos mais comuns na anestesia injetável, por via intraperitoneal, com associações que contem xilazina e ketamina ou opióides é a depressão respiratória. A baixa oferta de oxigênio pode comprometer o metabolismo aeróbico celular com consequente

morte celular (ARRAS et al. 2001). Esta situação pode causar alterações nos resultados dos estudos nos quais estes fármacos são utilizados. Por esta razão, torna-se indispensável adotar métodos que previnam tais efeitos adversos, como por exemplo, a administração de oxigênio para o animal. Não obstante, em vários estudos os autores recomendam a utilização de oxigênio na anestesia injetável por via intraperitoneal (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007; HEDENQVIST; ROUGHAN; FLECKNELL, 2000); no entanto, esta pratica é incomum na maioria dos laboratórios.

Por essa razão, o objetivo deste estudo é comparar os efeitos de quatro diferentes associações anestésica, administradas por via intraperitoneal, e sua influência nos parâmetros fisiológicos e comportamentais de ratos de laboratório, avaliando seu poder analgésico e o efeito da oxigenação sobre os mesmos.

1.1.ANESTESIA NA EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

A anestesia é uma das técnicas mais comuns na experimentação animal. Neste sentido para assegurar a confiabilidade dos resultados experimentais, todo investigador deveria conhecer detalhadamente os possíveis efeitos causados pelos fármacos administrados nos animais e de que forma poderiam influenciar na sua pesquisa (ZUÑIGA, 2001). Como o procedimento anestésico pode influenciar os resultados dos experimentos, a escolha do protocolo mais adequado tem que ser considerado levando em conta os requerimentos experimentais, bem como os aspectos éticos e legais (MOLINA et al., 2015; ALBRECHT et al., 2014). A anestesia em roedores de laboratório é particularmente desafiante, devido aos problemas relacionados com seu tamanho, tais como hipotermia, metabolismo acelerado, e dificuldade para determinar sinais clínicos e as funções cardiorrespiratórias (GARGIULO et al., 2012). Desta forma é importante encontrar um protocolo anestésico balanceado, que pode ser obtido pela combinação de vários fármacos, para proporcionar tanto um bom controle de inconsciência como de analgesia e miorelaxamento para minimizar os riscos anestésicos (BOUGHERARA; BOUAZIZ, 2014).

As duas principais vias de administração de anestésicos em pequenos roedores são a via parenteral e a via inalatória. A duração da anestesia, por qualquer via é variável dependendo do metabolismo individual, idade, sexo e estado corporal do animal. No caso da via parenteral, a administração intraperitoneal é muito utilizada por ser de fácil acesso e permitir a injeção de grandes volumes, além de causar um mínimo de estresse nos ratos (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007).

As associações anestésicas usualmente são compostas pela mistura de dois ou três componentes, pois um único anestésico não pode produzir todos os efeitos que se procuram

numa boa anestesia (ARRAS et al. 2001). A ketamina é um dos fármacos de uso parenteral mais utilizado em ratos de laboratório. Essa substância é classificada como um antagonista do N-Metil D-Aspartato (NMDA) que causa uma anestesia dissociativa, mas que tem uma limitada habilidade de produzir um adequado relaxamento muscular e analgesia, motivo pelo qual é tipicamente associada com diferentes compostos, como xilazina, acepromazina, dentre outros (MOLINA et al. 2015, WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013; WELBERG et al. 2006). A xilazina é um narcótico α -2 agonista adrenérgico, com propriedades de relaxamento muscular, analgesia e sedação que tem a capacidade de potencializar a ação da maioria dos fármacos anestésicos, como a ketamina, para produzir anestesia cirúrgica (GIROUX et al. 2015). A acepromazina pertence à família das fenotiazinas. Este fármaco tem a capacidade de produzir sedação e permite reduzir a doses dos anestésicos gerais, porém provoca hipotensão leve e hipotermia (FLECKNELL, 2009).

1.2. REFLEXOS E PARÂMETROS QUE DEVEM SER MENSURADOS DURANTE UMA ANESTESIA

O uso de agentes anestésicos altera significativamente a fisiologia do animal. O grau das alterações causadas varia, porém a maioria dos agentes anestésicos geram hipotermia e diminuição das atividades cardiovascular e respiratória (MOLINA et al.2015; PICOLLO et al. 2012; HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007). Por isso, o monitoramento dos parâmetros fisiológicos durante a anestesia permite tomar medidas que possibilitem minimizar os riscos anestésicos e complicações na recuperação.

Durante a anestesia também se devem monitorar a perda e o retorno dos reflexos. O reflexo de endireitamento da postura corporal é o primeiro que o animal perde indicando o início da indução anestésica. Na sequência ocorre a perda dos reflexos palpebral, retirada de cauda e podal. Os reflexos palpebrais e de retirada de cauda são perdidos usualmente em resposta a um plano leve ou médio de anestesia, seguido pela perda do reflexo podal, que é o indicador que o animal atingiu um plano de anestesia cirúrgica (ARRAS et al.2001) . O retorno de algum destes reflexos indica que o animal está iniciando sua recuperação da anestesia.

1.3. ASSOCIAÇÕES DE ANESTÉSICOS COM OPIOIDES PARA ANALGESIA INTRA E PÓS-OPERATÓRIA

A potencialização dos efeitos da anestesia com a combinação de diferentes substâncias anestésicas e analgésicas (como os opióides) é de suma importância em roedores de

laboratório. Diferentemente de outras espécies animais de maior porte, nas quais a administração pela via intravenosa geralmente é utilizada facilitando o ajuste da dose, nos pequenos roedores a via intraperitoneal é a mais utilizada para a administração de anestésicos e de outras substâncias (ROUGHAN; OJEDA; FLECKNELL, 1999). Desta forma, uma boa indução irá impactar sobre os efeitos do procedimento anestésico com um todo.

Os opióides selecionados para serem testados neste projeto, em combinação com a ketamina e a xilazina, serão a morfina, a metadona e o tramadol. A morfina é um opióide hidrofílico que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueio do sistema nervoso simpático ou motor (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). A metadona da mesma maneira que a morfina é um opióide agonista dos receptores μ com a diferença que também atua como antagonista não competitivo dos receptores N-metil D-aspartato (NMDA) (ABREU et al. 2012). A metadona é reconhecida por seu uso em pacientes que não respondem a outros tipos de analgésicos. Tramadol é um opióide sintético que tem uma afinidade com baixa especificidade por receptores opióides μ , produzindo um efeito analgésico moderado quando comparado com a morfina. A inibição de receptores de serotonina e norepinefrina é um mecanismo analgésico considerado secundário, mas que participa ativamente no efeito analgésico do tramadol. Este efeito é semelhante ao dos agonistas alfa-2 adrenérgicos, ainda que não ocorram as alterações cardiovasculares características destes últimos (NATALINI, 2007).

1.4. VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA

Os ratos emitem vocalizações ultrassônicas (VUS) como forma de comunicação, que reflete um importante significado biológico em relação ao seu comportamento. As VUS podem acontecer em diversos contextos como na separação maternal dos filhotes, na exposição a um predador, nos estímulos estressantes, quando ratos jovens brincam, durante a cópula, durante brigas e depois ou na expectativa de um estímulo aversivo inevitável. Desta forma, o monitoramento das VUS é um método eficaz para identificar manifestações de dor (OLIVEIRA; BARROS, 2006).

Os ratos adultos emitem dois tipos de VUS em diferentes frequências: as vocalizações de 22kHz que são produzidas em situações aversivas e perigosas, e as de 50 kHz que são produzidas em situações de comportamento não aversivas (PORTFORD, 2007).

O teste de formalina foi originalmente desenvolvido por Dubuisson e Dennis (1977), e desde então tem sido amplamente utilizado para avaliar as respostas relacionadas com dor. O procedimento envolve a injeção subcutânea de formalina diluída no coxim plantar do rato,

para depois avaliar as respostas do animal de acordo com critérios comportamentais objetivos. O teste da formalina é uma técnica estatisticamente válida, que tem duas vantagens em relação a outros testes de dor: é necessária pouca ou nenhuma contenção, permitindo a observação livre de toda a gama de respostas comportamentais; e o estímulo da dor é contínuo e não transitório, tendo assim maior semelhança com a maioria das dores clínicas (DUBBUISSON; DENNIS, 1977). Este teste pode ser utilizado para avaliar a ação de analgésicos como os opióides, sendo importante para ver seu efeito na dor intraoperatória e na recuperação da anestesia.

1.5. OXIGENAÇÃO DURANTE ANESTESIA

A diminuição da frequência respiratória é comum na anestesia (ARRAS et al. 2001). Esta depressão pode causar hipoxemia e hipercapnia levando à morte celular se não for corrigida. Por esta razão, torna-se importante a administração de oxigênio para manter estáveis os parâmetros fisiológicos do animal, bem como evitar alterações nos resultados dos estudos que utilizam anestesia injetável por via intraperitoneal (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007; HEDENQVIST; ROUGHAN; FLECKNELL, 2000).

Para monitorar a oxigenação do animal durante a anestesia podem ser utilizados equipamentos como o oxímetro de pulso ou pela quantificação da concentração dos gases sanguíneos. O oxímetro de pulso é um dispositivo simples que monitora a saturação de oxigênio no sangue arterial. Porém, este tipo de aparelho pode apresentar limitações como má conexão, pigmentação da pele, frequência cardíaca elevada (como muitos aparelhos só registram até 250 batimentos por minuto) e o uso de agentes anestésicos que causam vasoconstrição periférica (WRIGHT; HELLYER, 1996). A análise dos gases sanguíneos é mais complicada de realizar em pequenos roedores, devido à dificuldade de acesso arterial, porém é a técnica mais confiável para mensurar a função respiratória (SEI et al. 2016).

**CAPÍTULO 1: COMPARAÇÃO DE QUATRO
ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS COM XILAZINA E
KETAMINA E SEU EFEITO ANALGÉSICO EM
RATOS DE LABORATÓRIO.**

2 COMPARAÇÃO DE QUATRO ASSOCIAÇÕES ANESTÉSICAS COM XILAZINA E KETAMINA E SEU EFEITO ANALGÉSICO EM RATOS DE LABORATÓRIO.

RESUMO

A busca continua do refinamento de técnicas visando o bem-estar animal durante sua utilização em procedimentos experimentais propicia a investigação do efeito de novas associações anestésicas que sejam eficazes, seguras e que tenham bom poder analgésico. Neste estudo avaliou-se o efeito de quatro associações anestésicas que incluíam a combinação de xilazina (X) e ketamina (K) misturadas com acepromazina (A) ou três tipos de opióides [metadona (Me), morfina (Mo) e tramadol (T)]. O objetivo foi comparar a influência dos diferentes protocolos anestésicos nos parâmetros fisiológicos e o poder analgésico de cada associação em ratos de laboratório, de ambos os sexos, visando estabelecer uma anestesia mais efetiva e segura. A associação XKA para ratos machos e fêmeas e a associação XKMe para fêmeas foram as mais seguras e eficazes para procedimentos anestésicos. Porém, o resultado da medição da vocalização ultrassônica (VUS) produzida durante o teste de formalina sugere que o protocolo XKA tem um poder analgésico baixo; por tanto não sendo indicado para procedimentos que possam gerar dor moderada ou severa. Todas as associações causaram depressão na temperatura corporal e nas frequências respiratória e cardíaca. Ademais estes protocolos tiveram efeitos importantes tais como diurese, manutenção dos olhos abertos, pouco relaxamento muscular (com exceção do protocolo XKA) e hiperglicemia. Estes resultados indicam que se deve incluir um bom monitoramento e cuidados durante a anestesia para prevenir complicações que comprometam a vida do animal e garantir a boa recuperação do mesmo. Além disso, as alterações fisiológicas causadas pela anestesia também devem ser consideradas para evitar interferência nos resultados experimentais. A inclusão de analgesia nos protocolos anestésicos deve ser empregada de forma rotineira garantindo a mínima presença de dor e com isso resultados mais confiáveis e reprodutíveis nos procedimentos experimentais.

Palavras-chave: 1. Protocolos anestésicos 2. Analgesia 3. Opióides 4. Vocalização ultrassônica

ABSTRACT

The continuous research for the refinement techniques to ensure animal wellbeing during its use in experimental procedures leads the investigation of the effect of new anesthetic associations that are effective, safe and have good analgesic power. In this study, it was made an evaluation of the effect of four anesthetic associations that included the combination of xylazine (X) and ketamine (K) with acepromazina (A) and opioids [methadone (Me), morphine (Mo) and tramadol (T)]. The objective was to compare the influence of these anesthetic protocols on the physiological parameters and the analgesic power of each association in laboratory rats, of both sexes, to determine which protocol is the safest and most effective one. The XKA protocol for male and females rats and the XKMe protocol for females were the safest and most effective for anesthetic procedures. However, the result of measuring ultrasonic vocalization (VUS) during the formalin teste suggest that the XKA protocol had the lowest analgesic power showing that it is not a good protocol for painful procedures. All protocols produced depression in body temperature, respiratory and heart rate and had important effects as diuresis, maintenance of open eyes, low muscle relaxation (with the exception of the XKA protocol) and hyperglycemia. These results suggest that good monitoring and care during anesthesia should be always included to prevent complications that compromise the life of the animal and ensure a good recovery. The physiological changes caused by these protocols should also be considered to avoid interference in the results of the experimental procedures. The inclusion of analgesia in anesthesia protocols should be used routinely, ensuring minimal presence of pain and thus more reliable results in the experimental procedures.

Keywords: 1. Anesthetic protocol 2. Analgesia 3. Opioids 4. Ultrasonic vocalization

2.1. INTRODUÇÃO

O rato de laboratório é uma das espécies animais mais comumente utilizada em investigação, sendo que em muitos procedimentos experimentais o uso de anestesia é requerida ou recomendada (ALBRECHT et al. 2014). Uma anestesia bem controlada é fundamental para reduzir potenciais complicações cirúrgicas e garante a segurança e o sucesso nos procedimentos (MOLINA et al. 2015). Na seleção de um agente anestésico devem-se considerar os seguintes aspectos: 1) escolha de fármacos disponíveis e fáceis de preparar, 2) baixo estresse na indução e recuperação, 3) mínimo impacto nos parâmetros fisiológicos, assim como nos resultados da pesquisa, 4) possibilidade de ajustar o nível de anestesia para prolongá-la caso for necessário, 5) rápida recuperação da anestesia. A anestesia em roedores de laboratório é particularmente desafiante devido aos problemas relacionados com seu tamanho, como por exemplo, hipotermia, metabolismo acelerado, e dificuldade para determinar sinais clínicos e as funções cardiorrespiratórias (GARGIULO et al. 2012). Desta forma, é importante estabelecer um protocolo anestésico balanceado, que pode ser obtido pela combinação de diferentes fármacos, possibilitando tanto um bom controle de inconsciência como de analgesia e miorelaxamento para minimizar os riscos anestésicos (BOUGHERARA; BOUAZIZ, 2014).

As associações anestésicas são compostas pelas misturas de dois ou três fármacos, pois um único agente não pode produzir todos os efeitos que se procuram numa boa anestesia (ARRAS et al. 2001). A ketamina é um dos fármacos de uso parenteral mais utilizado em ratos de laboratório e é normalmente associada com outras substâncias como a xilazina (MOLINA et al. 2015, WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013; WELBERG et al. 2006). A utilização desta associação com acepromazina está descrita na literatura (BOUGHERARA; BOUAZIZ, 2014; WELBERG et al. 2006), porém é pouco utilizada em nosso meio. Ademais, a informação científica sobre protocolos anestésicos utilizados em roedores de laboratório que incluam a combinação desses anestésicos com opióides, como o tramadol, a morfina e a metadona ainda é muito limitada. A administração pré-operatória de opióides, concomitantemente com os protocolos anestésicos, apresenta vantagens tais como a possibilidade de reduzir a dose requerida dos anestésicos para atingir uma anestesia cirúrgica, além de reduzir a necessidade de analgésicos pós-operatórios (HEDENQVIST; ROUGHAN; FLECKNELL, 2000). Diante disso, o presente estudo é importante para esclarecer o efeito de protocolos anestésicos que utilizam XK combinado com diferentes opióides.

A maioria dos estudos realizados com diferentes associações anestésicas utilizaram somente ratos machos, não considerando que podem ter grandes diferenças na resposta anestésica entre os sexos, por isso é importante fazer os testes também em fêmeas para avaliar as variações que podem surgir devido às diferenças metabólicas e hormonais (ZAMBRICKI; D'ALECY, 2004).

Entre os diversos comportamentos dos ratos, a vocalização serve como indicador de estados emocionais e aversivos que podem ser audíveis ou ultrassônicas (OLIVEIRA; BARROS, 2006). Os ratos adultos emitem dois tipos de vocalização ultrassônica em diferentes frequências: as vocalizações de 22kHz ($>0,3$ s) que são produzidas em situações aversivas e perigosas, e as de 50 kHz ($<0,3$ s) que são produzidas em situações de comportamento não aversivas (PORTFORD, 2007). Para avaliar a dor o teste da formalina, no qual se injeta solução de formalina diluída 10% no coxim plantar do rato, é um dos modelos químicos mais utilizados. Os efeitos analgésicos dos opióides têm sido extensivamente estudados com este teste (DUBBUISSON; DENNIS, 1977; SEVOSTIANOVAA et al., 2003), e foi demonstrado que a morfina tem influência no controle da dor no contexto clínico, porém ainda não foram realizados estudos com estes opióides em um contexto de anestesia em ratos, sendo importante avaliar a dor intraoperatória e na recuperação da anestesia (ZUBIETA et al., 2001, JOURDAN et al., 1998; MICZEK, K. A.; VIVIAN, 1998).

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos dos diferentes protocolos anestésicos em ratos de laboratório e sua influência nos parâmetros cardiovasculares, respiratórios e sanguíneos, visando avaliar o poder analgésico de cada associação anestésica por meio da vocalização ultrassônica, para determinar os protocolos mais efetivos e seguros, garantindo o bem-estar em ratos de laboratório e a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Animais

Foram utilizados 64 ratos Wistar-Han (*Rattus norvegicus*) (28 fêmeas e 36 machos), de 8 a 12 semanas, de padrão sanitário SPF (Specific Pathogen Free). Estes ratos foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Cada grupo de ratos foi separado por sexo e dividido em grupos de no máximo quatro animais, que foram alojados em gaiolas de polipropileno com cama de sabugo de milho que foram trocadas uma vez por semana. Os animais foram mantidos sob condições climáticas controladas, com temperatura entre 22 e 24 °C, com uma umidade relativa variando de 45% a 65% e um ciclo de 12:12h claro: escuro. Os ratos foram alimentados com ração peletizada comercial (Nuvilab CR1®- Quimtia, PR, Brasil) e tiveram acesso a água *ad libitum*. Antes do início dos experimentos os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde permaneceram por pelo menos uma semana para adaptação.

2.2.2. Comissão de ética

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo do Projeto n°. 9635260116). As condições de alojamento e manejo dos animais estão de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do NRC (2010).

2.2.3. Procedimento anestésico

Baseado em um estudo prévio realizado em nosso laboratório (dados não publicados) determinaram-se as doses dos protocolos anestésicos utilizados neste estudo, conforme consta na tabela 1:

Tabela 1 - Doses (mg/Kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório de ambos os sexos.

Sexo	Associações anestésicas (mg/Kg)			
	XKA	XKMe	XKMo	XKT
Machos	7,5 + 60 + 2	5 + 60 + 5	7 + 60 + 1	7,5 + 65 + 5
Fêmeas	5 + 60 + 1	5 + 60 + 5	5 + 60 + 1,5	5 + 60 + 5

X: Xilazina (Anasedan®- Ceva, 20mg/ml, SP, Brasil), K: Ketamina (Dopalen®- Ceva, 100mg/ml, SP, Brasil), A: Acepromazina (Acepran® 0,2%- Vetnil, 2mg/kg, SP, Brasil), Me: Metadona (Mytedom®- Cristália, 10mg/ml, SP, Brasil), Mo: Morfina (Dimorf®- Cristália, 10mg/ml, SP, Brasil), T: Tramadol (Tramadon®- Cristália, 50mg/ml, SP, Brasil).

Cada protocolo foi testado em no mínimo sete animais. No caso dos machos foram utilizados até 10 animais por grupo nas associações anestésicas combinadas com opióides, para possibilitar as medições das VUS no teste de formalina, visto que alguns ratos acordavam antes de terminar o teste. Todos os animais foram previamente pesados para determinar a dose exata de cada droga. Os animais foram identificados por meio de uma marca na cauda com um marcador indelével.

Para evitar algum efeito do ritmo circadiano os experimentos foram realizados entre as 6.00 e as 12.00 horas. A administração intraperitoneal foi feita no quadrante inferior direito do abdômen com o animal mantido numa posição com a cabeça inclinada para abaixo para evitar a penetração visceral. A injeção foi feita com uma agulha de 26 G em um ângulo de 45°. Os anestésicos foram colocados em um tubo de plástico cônico (Eppendorf®, SP, Brasil) onde foram misturados antes de serem administrados com uma injeção única para reduzir o estresse dos animais pela manipulação excessiva.

Logo em seguida da administração da anestesia, os ratos foram colocados sozinhos numa gaiola e quando perdiam o reflexo de endireitamento (reflexo que corrige a orientação do corpo quando é retirado de sua posição normal) foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma manta térmica previamente aquecida para manter sua temperatura corporal. Um lubrificante ocular estéril (Vidisic® Gel- Bauch + Lomb, 2mg/kg, SP, Brasil) foi instilado em ambos os olhos.

Durante a anestesia foram registrados os seguintes períodos: 1) Indução - período compreendido entre a administração do anestésico até o momento em que perdem o reflexo de endireitamento, 2) anestesia não cirúrgica - período compreendido entre a perda do reflexo de endireitamento até a perda do reflexo palpebral, de retirada de cauda e podal, 3) anestesia cirúrgica - tempo entre a perda completa de todos os reflexos e a recuperação deles, 4) recuperação - período compreendido entre a recuperação de todos os reflexos e a habilidade de caminhar. Também foi mensurado o tempo total de duração da anestesia, que foi o período desde a administração da associação anestésica até a recuperação da habilidade de caminhar.

Depois do período de indução um oxímetro de pulso (NT1A-V®- Solaris Medical Technology, Inc, CA, USA) foi colocado no coxim do membro posterior esquerdo e logo depois os parâmetros fisiológicos e reflexos foram mensurados a cada 5 minutos até o retorno do reflexo de endireitamento. A frequência cardíaca foi determinada pelo oxímetro de pulso e a frequência respiratória foi determinada por contagem direta observando os movimentos torácicos ou abdominais. A temperatura corporal foi monitorada utilizando um termômetro digital inserido no reto do animal. Os reflexos foram avaliados da seguinte maneira: o reflexo

podal de retirada por meio de uma compressão nos espaços interdigitais dos membros posteriores com um pinça atraumática, o reflexo palpebral por meio de um leve toque da pinça atraumática na margem da pálpebra, e o reflexo de aperto da cauda por meio de uma compressão na extremidade da cauda com a pinça atraumática (FERRARI et al. 2005). Qualquer resposta negativa ou positiva ao estímulo foi classificada como perda ou retorno do reflexo, respetivamente.

2.2.4. Avaliação da analgesia pela vocalização ultrassônica

Foram injetados 60 µl de uma solução de formalina (formaldeído 37%, p/p, diluído à 5% em 0.9% salina p/p) via subcutânea no coxim do membro posterior direito de cada rato, assim que este recuperou os movimentos das vibrissas. Após 5 minutos da injeção da formalina, a vocalização ultrassônica (VUS) foi mensurada com um monitor específico (Ultravox 2,0, Noldus Information Technology, VA, USA).

Um rato foi testado de cada vez e o detector de VUS foi colocado sobre a cabeça do animal posicionado em decúbito dorsal. O detector foi ajustado para detectar frequências de 22 kHz com uma amplitude de filtro ajustado em quatro para minimizar o ruído de fundo. Para evitar o ruído ambiental o experimento foi feito em uma sala apropriada com isolamento acústico.

O número total e a duração de VUS para cada rato foram gravados durante intervalos de 3 minutos por um período total de 30 minutos ou até o retorno do reflexo de endireitamento. Durante a gravação foi feito um estímulo doloroso por meio da compressão com uma pinça bulldog a cada 20 segundos na área na qual a formalina foi injetada.

2.2.5. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Depois da anestesia cada animal foi colocado novamente em sua gaiola para permitir sua recuperação e a metabolização dos fármacos por 12 a 24 horas. No dia seguinte, a anestesia foi repetida utilizando a mesma associação do dia anterior. Depois que o rato apresentou a perda total de seus reflexos, foi feita uma incisão abdominal para colocar um cateter 24G na artéria aorta abdominal para fazer coletas de sangue. Uma parte do sangue coletado foi colocada em um tubo com EDTA (EDTA Sal Dissódico 2H₂O P.A. - LojaSynth, SP, Brasil) com uma concentração total de 10% (m/v) e foi processado imediatamente em um sistema automatizado (pocH-100iv Diff - Sysmex, SP, Brasil) para obter os resultados do hemograma. Outra parte do sangue coletado foi colocada em um tubo sem EDTA e 2 horas depois da coleta foi centrifugada a 4000 revoluções por minuto por 10 min. para separar o

soro e congelá-lo a -20°C . As análises séricas das enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT), função renal (ureia e creatinina) e glicose foram realizadas com kit comercial da marca Bioclin (MG, Brasil) em um equipamento automático para análise bioquímica (SBA-200-CELM, SP, Brasil). A metodologia empregada para as determinações acima citadas está de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante. Os valores obtidos do hemograma foram comparados com os valores publicados por Giknis; Clifford, 2008. Os valores da bioquímica foram comparados com os valores de referência do laboratório do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, no qual foram processadas as amostras (dados não publicados).

2.2.6. Análise estatística

Foi testado o efeito da anestesia sobre a temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e saturação de oxigênio nos ratos de ambos os sexos utilizando um modelo linear misto (LLMs). Nas variáveis de resposta foi aplicada uma transformação logarítmica para aumentar a normalidade quando foi necessário e as variáveis explicativas foram as associações anestésicas e o tempo. O fator aleatório foi a identidade de cada rato.

O efeito de cada associação anestésica na duração no tempo de indução, na anestesia não cirúrgica, na anestesia cirúrgica, na recuperação e na duração total da anestesia foi avaliado por meio de modelos lineares. Nas variáveis de resposta foi aplicada uma transformação logarítmica para aumentar a normalidade quando foi necessário e as variáveis explicativas foram as associações anestésicas. Quando diferenças foram detectadas foi avaliado o efeito de tamanho utilizando o Cohen's d. Todos os modelos foram avaliados em um quadro teórico-informativo, utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc), para avaliar a força relativa dos modelos candidatos concorrentes (BURNHAM; ANDERSON, 2002). As probabilidades relativas de cada modelo candidato foram calculados utilizando os pesos de AICc, com pesos que variavam de 0 (sem suporte) a 1 (suporte completo) relativo a todo o modelo em conjunto.

Também foi investigado se o número de vocalizações em ratos machos e fêmeas diferiam de acordo a associação anestésica e o tempo, utilizando modelos lineares generalizados mistos (GLMMs) com uma distribuição de Poisson. Os modelos foram testados com sobredispersão.

A análise estatística foi executada em R 3.3.2. Os modelos LMMs e GLMMs foram ajustados utilizando o pacote lme4. O modelo de seleção foi conduzido com o pacote

AICcmodavg. Os efeitos de tamanho de Cohen's d foram obtidos como o pacote effsize e utilizando as regras básicas definidas em Sawilowsky (2009) para interpretar os efeitos de tamanho.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Parâmetros fisiológicos

A temperatura corporal, a frequência cardíaca e a frequência respiratória em ratos machos só diferiram ao longo do tempo de acordo com a seleção do modelo. O mesmo padrão foi observado nas fêmeas (Tabela 2). Considerando todos os protocolos anestésicos, a temperatura corporal média dos machos oscilou de 35,7 °C (aos 10 minutos) utilizando XKA até 37,6°C (aos 60 minutos) utilizando XKMe. No caso das fêmeas, a temperatura corporal média oscilou de 36,3 °C (aos 10 minutos) utilizando XKMe até 37,7°C (aos 50 minutos) utilizando XKMo (Figura 1). Considerando as quatro associações anestésicas, nos machos a diferença entre as médias da frequência cardíaca no minuto inicial e no minuto final foram menores do que à diferença das médias da frequência cardíaca em fêmeas entre os mesmos tempos (Figura 2). No caso das fêmeas que receberam o protocolo de XKMe depois dos 10 minutos a frequência cardíaca média se manteve ao redor dos 250 bpm até o minuto 40 (Figura 2B). Todos os protocolos para ambos os sexos apresentaram médias menores a 70 rpm na frequência respiratória no minuto 10. Porém, as fêmeas depois do minuto 20 tiveram um aumento acentuado na frequência respiratória, com exceção do protocolo em se utilizou morfina (Figura 3). Tanto em machos quanto em fêmeas observou-se uma redução nos valores dos parâmetros fisiológicos avaliados nos primeiros 10 minutos.

Tabela 2 - Modelos que explicam a influência da anestesia sobre os diferentes parâmetros fisiológicos avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado de acordo com o sexo.

Modelo	Ratos Machos				Ratos Fêmeas			
	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c
Temperatura								
Tempo	9	424,54	0,00	1,00	8	298,93	0,00	1,00
Tempo x Protocolo	30	456,16	31,62	0,00	3	316,98	18,05	0,00
Modelo nulo	3	482,55	58,01	0,00	6	318,92	19,99	0,00
Protocolo	6	486,07	61,53	0,00	26	322,92	23,99	0,00
Frequência Cardíaca								
Tempo	9	2013,79	0,00	1,00	8	1481,91	0,00	1,00
Tempo x Protocolo	30	2043,47	29,68	0,00	26	1492,96	11,05	0,00
Modelo nulo	3	2138,74	124,95	0,00	6	1517,84	35,93	0,00
Protocolo	6	2143,54	129,75	0,00	3	1532,16	50,26	0,00
Frequência respiratória								
Tempo	9	2063,60	0,00	1,00	8	1601,22	0,00	0,96
Tempo x Protocolo	30	2075,94	12,34	0,00	26	1607,77	6,55	0,04
Modelo nulo	3	2184,85	121,25	0,00	6	1633,58	32,36	0,00
Protocolo	6	2190,39	126,78	0,00	3	1635,71	34,49	0,00

a Número de parâmetros considerados no modelo

b Diferença entre o valor de AICc do modelo atual versus o modelo de melhor aproximação (AICcmin)

c Akaike weight: Probabilidade de que o modelo atual (i) é o melhor modelo entre os considerados

Figura 1- Variação da temperatura corporal (°C) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

Figura 2- Variação da frequência cardíaca (batimento por minuto [bpm]) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

Figura 3- Variação da frequência respiratória (respirações por minuto [rpm]) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

2.3.2. Sinais clínicos, reflexos e tempos de anestesia

Tanto para machos como para fêmeas mais de 85% dos animais apresentaram micção em todos os protocolos e 100% dos animais permaneceram com os olhos abertos durante todo o período de anestesia. Somente os animais que foram anestesiados com XKA não apresentaram piloereção (Tabela 3).

O protocolo que utilizou acepromazina teve a melhor tolerância cirúrgica em ambos os sexos, e no caso das fêmeas também tiveram boa tolerância com o protocolo XKMe. A associação XKT não conseguiu atingir a tolerância cirúrgica em ambos os sexos, o mesmo

aconteceu com a associação XKMo em machos. A perda do reflexo podal foi o melhor indicador da tolerância cirúrgica dos ratos (Tabela 3).

O modelo selecionado mostrou um forte apoio ao efeito do protocolo sobre a duração da anestesia não cirúrgica e a recuperação nos ratos machos (Tabela 4). Os ratos machos anestesiados com XKA mostraram a menor duração da anestesia não cirúrgica, quando comparados com outros protocolos (Tabela 3), e as diferenças entre os protocolos foram grandes de acordo com os valores de Cohen's d de efeito de tamanho (Tabela 5). Em relação à duração da recuperação anestésica existiram diferenças grandes e medianas entre os protocolos, exceto entre as associações XKT e XKMe nas quais as diferenças foram insignificantes (Tabela 5). O modelo também mostrou algum apoio ao efeito do protocolo na anestesia cirúrgica e na duração total da anestesia (Tabela 4: anestesia cirúrgica: AICc $w = 0,17$, duração total: AICc $w = 0,40$). Existiu uma diferença pequena na duração da anestesia cirúrgica entre os protocolos XKA e XKMe (Table 5: Cohen's $d = -0,50$; 95% CI = $-2,04 - 1,04$). Em relação à duração total, dois grupos principais foram observados (Tabela 3); as associações XKA e XKMo mostraram uma duração maior em comparação com XKMe e XKT e suas diferenças foram grandes de acordo com Cohen's d (Tabela 5).

Em fêmeas a duração da anestesia não cirúrgica diferiu entre os protocolos (AICc $w = 1,0$; Tabela 4). As fêmeas mostraram dois grupos principais; as associações XKA e XKMe mostraram uma duração menor em comparação com as associações XKMo e XKT (Tabela 3) e suas diferenças foram muito grandes ou gigantes de acordo com Cohen's d (Tabela 5). O modelo selecionado também mostrou algum apoio pelo efeito do protocolo na recuperação e duração total (Tabela 4: recuperação: AICc $w = 0,26$, duração total: AICc $w = 0,14$). A recuperação em ratos anestesiados com XKMe foi a menor (Tabela 3), e teve diferenças grandes e muito grandes comparadas com os outros protocolos (Tabela 5). A associação XKT teve a menor duração total de anestesia (Tabela 3) com diferenças médias e muito grandes comparadas com as outras associações (Tabela 5).

Tabela 3- Comparação da margem de segurança, sinais clínicos, reflexos e tempo de anestesia de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol).

Anestésicos	Ratos Machos				Ratos Fêmeas			
	XKA	XKMe	XKMo	XKT	XKA	XKMe	XKMo	XKT
Margem de segurança								
Tolerância cirúrgica	6/7	5/10	0/9	0/10	6/7	6/7	2/7	0/7
Índice de mortalidade	1/7	0/10	0/9	0/10	0/7	0/7	0/7	0/7
Sinais clínicos								
Micção	7/7	9/10	8/9	10/10	6/7	7/7	6/7	6/7
Abertura dos olhos	7/7	10/10	9/9	10/10	7/7	7/7	7/7	7/7
Piloerecção	0/7	8/10	7/9	6/10	0/7	7/7	6/7	3/7
Perda de reflexos								
Podal	6/7	5/10	0/9	0/10	6/7	6/7	2/7	0/7
Retirada da cauda	7/7	10/10	7/9	0/10	6/7	7/7	7/7	7/7
Palpebral	7/7	10/10	7/9	0/10	7/7	7/7	7/7	7/7
Endireitamento	7/7	10/10	7/9	0/10	7/7	7/7	7/7	7/7
Tempos de anestesia								
Indução	3,00 ±0,50	2,90 ±0,30	3,30 ±0,60	3,80 ±0,50	2,30 ±0,30	3,90 ±0,90	3,10 ±0,30	2,90 ±0,30
Não cirúrgica	10,90 ±2,20	26,20 ±6,60	44,90 ±6,70	46,70 ±2,50	9,40 ± 3,20	7,90 ± 0,90	37,70 ± 7,60	29,40 ± 5,50
Cirúrgica	27,70 ±5,70	34,80 ±6,60	-	-	31,30 ± 5,20	42,30 ± 8,70	45,00 ± 1,00	-
Recuperação	31,00 ±6,70	9,30 ±2,90	22,20 ±5,90	10,90 ±4,00	38,10 ± 13,70	7,10 ± 3,60	29,60± 11,30	24,10 ± 4,30
Duração total	90,30 ±15,60	62,90 ±10,40	87,60 ±10,60	62,10 ±5,50	85,90 ± 16,50	87,30 ± 8,52	99,90 ± 16,50	64,00 ± 5,10

Tabela 4 - Modelos que explicam a influência da anestesia sobre os tempos anestésicos avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado acordo ao sexo.

Modelo	Ratos Machos				Ratos Fêmeas			
	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c
Indução								
Modelo nulo	2	41,55	0,00	0,92	2	42,66	0,00	0,94
Protocolo	5	46,42	4,87	0,08	5	48,05	5,39	0,06
Anestesia não cirúrgica								
Protocolo	5	308,12	0,00	1,00	5	58,83	0,00	1,00
Modelo nulo	2	323,46	15,34	0,00	2	76,63	17,79	0,00
Anestesia cirúrgica								
Modelo nulo	2	93,84	0,00	0,83	2	122,41	0,00	0,94
Protocolo	3	96,97	3,13	0,17	4	127,76	5,35	0,06
Recuperação								
Protocolo	5	299,66	0,00	0,90	5	267,25	2,07	0,26
Modelo nulo	2	303,95	4,29	0,10	2	265,19	0,00	0,74
Duração total								
Modelo Nulo	2	48,01	0,00	0,60	2	280,83	0,00	0,86
Protocolo	5	48,83	0,82	0,40	5	284,49	3,67	0,14

a Número de parâmetros considerados no modelo

b Diferença entre o valor de AICc do modelo atual versus o modelo de melhor aproximação (AICcmin)

c Akaike weight: Probabilidade de que o modelo atual (i) é o melhor modelo entre os considerados

Tabela 5 - Comparação do tamanho do efeito de acordo com Cohen's d dos tempos de anestesia que tiveram diferença em ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol).

Comparação	Anestesia não cirúrgica		Recuperação		Duração total	
	Ratos		Ratos		Ratos	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
XKA – XKMe	-0,9 ^e	0,1 ^b	1,8 ^f	1,8 ^f	0,8 ^e	0,0 ^a
XKA – XKMo	-2,2 ^g	-1,8 ^f	0,5 ^d	0,3 ^c	0,1 ^b	-0,3 ^c
XKA – XKT	-5,0 ^g	-1,7 ^f	1,4 ^f	0,5 ^d	1,1 ^e	0,7 ^d
XKMe – XKMo	-0,9 ^e	-2,1 ^g	-0,9 ^e	-1,0 ^e	-0,8 ^e	-0,4 ^c
XKT – XKMe	-1,3 ^f	-2,1 ^g	-0,1 ^b	-1,6 ^f	0,0 ^a	1,2 ^f
XKMo – XKT	0,1 ^b	0,5 ^d	0,7 ^d	0,2 ^c	1,0 ^e	1,3 ^f

a: insignificante, b: muito pequena, c: pequena, d: média, e: grande, f: muito grande, g: gigante

2.3.3. Vocalização ultrassônica

O modelo revelou um forte apoio na interação do efeito do protocolo e do tempo no número de vezes que os ratos machos realizaram uma vocalização. O mesmo padrão foi observado em fêmeas (Tabela 6 w = 1,00). Essas interações indicam que o efeito do protocolo sobre o número de vezes que os ratos realizaram uma vocalização não foi constante ao longo do tempo.

Tabela 6 - Modelos que explicam a influência da anestesia sobre o número de vocalizações ultrassônicas avaliados em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado acordo com o sexo.

Modelo	Ratos Machos				Ratos Fêmeas			
	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c
Nº de eventos								
Tempo x Protocolo	21	779,61	0,00	1,00	21	586,77	0,00	1,00
Tempo	6	961,98	182,37	0,00	6	667,94	81,17	0,00
Protocolo	5	1197,09	417,48	0,00	5	988,29	401,52	0,00
Modelo nulo	2	1205,43	425,83	0,00	2	989,57	402,80	0,00

a Número de parâmetros considerados no modelo

b Diferença entre o valor de AICc do modelo atual versus o modelo de melhor aproximação (AICcmin)

c Akaike weight: Probabilidade de que o modelo atual (i) é o melhor modelo entre os considerados

O estímulo doloroso gerou maior número de vocalizações com uma maior duração no protocolo de XKA para ambos os sexos. Somente nos machos no intervalo do tempo d, observou-se um aumento nas vocalizações na associação XKMo, porém com menor duração que a associação XKA (Figura 4A). Em todas as associações com opióides os ratos machos acordaram antes de terminar os cinco intervalos de tempo, motivo pelo qual foi necessário aumentar o número de animais para atingir o objetivo.

Figura 4 – Número de vocalizações ultrassônicas durante o teste de formalina em ratos machos (A) e fêmeas (B) nos diferentes intervalos de tempo (a: dos 5 aos 8 minutos, b: dos 10 aos 13 minutos, c: dos 15 aos 18 minutos, d: dos 20 aos 23 minutos, e: dos 25 aos 28 minutos), submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

Figura 5 – Duração das vocalizações ultrassônicas durante o teste de formalina em ratos machos (A) e fêmeas (B) nos diferentes intervalos de tempo (a: dos 5 aos 8 minutos , b: dos 10 aos 13 minutos , c: dos 15 aos 18 minutos , d: dos 20 aos 23 minutos, e: dos 25 aos 28 minutos), submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

2.3.4. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Nos resultados do hemograma não existiram alterações em nenhuma das associações anestésicas tanto para machos como para fêmeas em comparação com os dados de referência (Tabela 7). No caso dos resultados da análise bioquímica observou-se um aumento na glicemia nos machos em todos os protocolos anestésicos e nas fêmeas no protocolo de XKMe em comparação com os valores de referência. A creatinina teve um leve aumento nas associações acrescidas com opióides nos ratos machos (Tabela 8).

Tabela 7 - Comparação das médias $\pm$ desvio padrão com os dados de referência dos hemogramas de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol).

	Ratos Machos						Ratos Fêmeas					
	XKA (n=6)	XKMe (n=7)	XKMo (n=7)	XKT (n=7)	Referência	XKA (n=7)	XKMe (n=7)	XKMo (n=7)	XKT (n=7)	Referência		
Hto (%)	40,67 $\pm$ 5,93	43,27 $\pm$ 2,69	42,63 $\pm$ 1,30	42,74 $\pm$ 3,45	45,00 $\pm$ 3,50	37,57 $\pm$ 2,02	39,66 $\pm$ 1,85	39,66 $\pm$ 1,85	41,64 $\pm$ 2,70	43,30 $\pm$ 3,10		
Eritrocitos (x106/ul)	7,45 $\pm$ 1,22	7,85 $\pm$ 0,58	7,89 $\pm$ 0,30	7,75 $\pm$ 0,64	8,39 $\pm$ 0,67	6,75 $\pm$ 0,66	7,16 $\pm$ 0,42	6,98 $\pm$ 0,42	7,53 $\pm$ 0,60	8,02 $\pm$ 0,53		
Hb (g/dl)	14,65 $\pm$ 2,40	15,67 $\pm$ 1,06	15,61 $\pm$ 0,60	15,61 $\pm$ 1,32	15,70 $\pm$ 10	13,73 $\pm$ 0,63	14,50 $\pm$ 0,63	14,28 $\pm$ 0,85	15,10 $\pm$ 1,13	15,20 $\pm$ 0,90		
MVC (fl)	54,83 $\pm$ 2,33	55,21 $\pm$ 1,17	54,09 $\pm$ 1,25	55,14 $\pm$ 0,68	53,50 $\pm$ 2,40	55,70 $\pm$ 1,58	55,61 $\pm$ 1,32	56,25 $\pm$ 0,73	55,40 $\pm$ 0,97	53,80 $\pm$ 2,30		
MCH (pg)	19,7 $\pm$ 0,99	19,96 $\pm$ 0,58	19,81 $\pm$ 0,75	19,14 $\pm$ 0,47	18,70 $\pm$ 0,80	20,37 $\pm$ 0,74	20,29 $\pm$ 0,69	20,43 $\pm$ 0,60	20,07 $\pm$ 0,53	19,00 $\pm$ 0,80		
MCHC (g/dL)	35,93 $\pm$ 0,97	36,21 $\pm$ 0,47	36,64 $\pm$ 0,71	36,50 $\pm$ 0,52	34,90 $\pm$ 1,20	36,54 $\pm$ 0,53	36,47 $\pm$ 0,55	36,35 $\pm$ 0,33	36,24 $\pm$ 0,71	35,30 $\pm$ 1,30		
Plaquetas (x103/ul)	773,14 $\pm$ 250,18	894,28 $\pm$ 72,35	861,71 $\pm$ 147,80	875,57 $\pm$ 127,55	904,00 $\pm$ 137,00	655,43 $\pm$ 252,99	755,57 $\pm$ 134,20	805,67 $\pm$ 124,16	845,57 $\pm$ 71,49	929,00 $\pm$ 133,00		
Leucócitos (x103/ul)	4,11 $\pm$ 1,94	4,43 $\pm$ 2,37	4,44 $\pm$ 1,25	5,03 $\pm$ 1,65	4,52 $\pm$ 1,81	3,46 $\pm$ 1,32	2,63 $\pm$ 0,63	3,78 $\pm$ 2,29	2,01 $\pm$ 1,12	3,12 $\pm$ 1,49		
Neutrófilos (%)	15,71 $\pm$ 7,43	15,14 $\pm$ 6,96	14,71 $\pm$ 3,04	15,43 $\pm$ 5,35	15,50 $\pm$ 5,50	14,00 $\pm$ 14,61	11,00 $\pm$ 7,42	13,50 $\pm$ 17,44	11,00 $\pm$ 3,11	15,40 $\pm$ 6,40		
Linfócitos (%)	83,14 $\pm$ 7,49	83,71 $\pm$ 7,43	83,86 $\pm$ 3,39	83,29 $\pm$ 5,12	80,20 $\pm$ 6,30	84,57 $\pm$ 15,75	88,43 $\pm$ 7,00	86,00 $\pm$ 18,17	87,43 $\pm$ 3,60	80,00 $\pm$ 6,70		
Monócitos (%)	0,71 $\pm$ 0,95	1,00 $\pm$ 1,00	0,41 $\pm$ 0,79	1,14 $\pm$ 0,38	1,90 $\pm$ 0,70	1,43 $\pm$ 1,51	0,43 $\pm$ 0,79	0,50 $\pm$ 0,84	0,86 $\pm$ 0,90	2,00 $\pm$ 0,80		
Eosinófilos (%)	0,43 $\pm$ 0,53	0,14 $\pm$ 0,38	0,29 $\pm$ 0,49	0,14 $\pm$ 0,38	1,30 $\pm$ 0,80	0,14 $\pm$ 0,58	0,14 $\pm$ 0,68	0,20 $\pm$ 0,50	0,57 $\pm$ 1,13	1,70 $\pm$ 1,00		
Basófilos (%)	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,20		

Valores de referência: Fonte - Giknis; Clifford, 2008

Tabela 8 - Comparação das médias $\pm$ desvio padrão com os dados de referência dos parâmetros bioquímicos de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol).

	AST (U/L)	ALT (U/L)	GLICEMIA (mg/dl)	UREIA (mg/dl)	CREATININA (mg/dl)
Ratos Machos					
XKA (n=6)	150,73 $\pm$ 41,49	57,04 $\pm$ 9,42	458,29 $\pm$ 83,97*	64,83 $\pm$ 5,24	1,28 $\pm$ 0,27
XKMe (n=7)	160,14 $\pm$ 36,40	61,28 $\pm$ 7,93	493,29 $\pm$ 104,98*	71,42 $\pm$ 8,89	1,29 $\pm$ 0,15*
XKMo (n=7)	160,00 $\pm$ 42,36	66,71 $\pm$ 23,19	525,14 $\pm$ 38,02*	72,29 $\pm$ 12,35	1,39 $\pm$ 0,23*
XKT (n=7)	142,29 $\pm$ 19,55	54,29 $\pm$ 10,36	533,71 $\pm$ 43,73*	65,86 $\pm$ 4,63	1,37 $\pm$ 0,16*
Referência	145,37 $\pm$ 38,58	68,10 $\pm$ 16,31	292,20 $\pm$ 39,75	67,33 $\pm$ 8,60	1,03 $\pm$ 0,08
Ratos Fêmeas					
XKA (n=7)	145,14 $\pm$ 31,99	48,71 $\pm$ 13,80	348,71 $\pm$ 54,86	67,43 $\pm$ 9,22	0,75 $\pm$ 0,09
XKMe (n=7)	141,57 $\pm$ 22,34	74,57 $\pm$ 13,82	389,43 $\pm$ 26,67 *	59,57 $\pm$ 8,40	0,76 $\pm$ 0,08
XKMo (n=7)	145,00 $\pm$ 25,05	52,57 $\pm$ 11,30	374,14 $\pm$ 62,44	62,14 $\pm$ 6,07	0,74 $\pm$ 0,11
XKT (n=7)	153,86 $\pm$ 39,32	58,57 $\pm$ 14,30	363,00 $\pm$ 93,61	66,71 $\pm$ 4,89	0,80 $\pm$ 0,06
Referência	148,50 $\pm$ 16,46	51,40 $\pm$ 10,21	276,40 $\pm$ 55,49	74,77 $\pm$ 9,86	0,74 $\pm$ 0,09

*Parâmetros com uma elevação em comparação aos parâmetros de referência.

Valores de referência: Fonte – dados não publicados do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

2.4 DISCUSSÃO

A busca continua pelo refinamento de técnicas, visando o bem-estar animal durante sua utilização em procedimentos experimentais, requer à investigação de novas associações anestésicas que sejam eficazes, seguras e que tenham bom poder analgésico. O protocolo de XKMe em fêmeas foi o que melhor cumpriu essa premissa. O protocolo XKA tanto em machos como em fêmeas teve propriedades como a perda de consciência e reflexos e bom relaxamento muscular, mas seu poder analgésico não foi suficiente, principalmente para procedimentos invasivos nos quais se possa gerar dor moderada a severa. Associações anestésicas que contenham XK podem produzir alterações na córnea (como ceratite ulcerativa, distrofia, neovascularização e mineralização), diurese e hiperglicemia, o que deve ser considerado caso esses efeitos adversos possam influenciar nos resultados de um procedimento experimental (SAHA et al. 2005).

As diferenças observadas em estudos anteriores entre ratos de ambos os sexos (ZAMBRICKY, D'ALECY, 2004) e o estudo prévio feito em nosso laboratório (dados não publicados), nos levou a utilizar as doses que demonstraram uma maior eficácia e eficiência no uso da anestesia injetável em procedimentos experimentais. Apesar das doses não serem idênticas para ambos os sexos, o comportamento similar nas dinâmicas de cada protocolo nos parâmetros fisiológicos permite concluir que as doses utilizadas nesse estudo foram adequadas. Por esta mesma razão, o objetivo não foi comparar o efeito entre sexos.

A redução em todos os parâmetros fisiológicos, nos primeiros minutos, observada em todas as associações anestésicas tem sido descrita anteriormente com a associação XK (WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013; RODRIGUES et al. 2006; WIXSON et al. 1987). A redução da temperatura corporal observada nos ratos pode estar relacionada ao efeito depressor da ketamina sobre os mecanismos termorreguladores em adição ao fato que os pequenos roedores perdem facilmente calor quando anestesiados, dada a alta proporção da superfície corporal em relação a seu peso (WIXSON et al. 1987).

A depressão da frequência cardíaca, observada em todos os protocolos nos ratos machos e no protocolo XKMe em fêmeas, pode ser produzida principalmente pela ação da xilazina. A ketamina usualmente causa uma estimulação da função cardiovascular, aumentando a frequência cardíaca e a pressão sanguínea. A redução do batimento cardíaco então pode ser um efeito secundário aos $\alpha 2$ -agonistas como resultado do aumento da atividade do reflexo vagal e a uma diminuição da liberação da norepinefrina no sistema nervoso simpático (THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 1996). Em fêmeas, o protocolo XKMe foi o que

causou maior depressão cardíaca porque a metadona pode causar um bloqueio nos canais de cálcio produzindo bradicardia (SEYLER; BOROWITZ; MAICKEL, 1983).

Além da depressão cardíaca, foi observada uma depressão respiratória em todos os protocolos. Os opióides podem produzir este efeito, em altas doses ou em combinação com outros depressores do SNC (FLECKNELL, 2009). Os receptores de opióides são abundantes no centro de controle respiratório. Os opióides agonistas dos receptores μ , como a morfina e a metadona, se unem a estes receptores ativando-os e causando a depressão do ritmo respiratório (WAMSLEY, 1983). A xilazina também pode causar a depressão do SNC pela estimulação dos $\alpha 2$ -adrenoreceptores (SINCLAIR, 2003).

Todos os protocolos neste estudo seguem o mesmo padrão de diminuição dos parâmetros fisiológicos aos 10 minutos. O suporte do animal é crítico principalmente neste período de tempo. Uma melhor recuperação e uma diminuição da mortalidade podem ser favorecidas mediante o monitoramento, aquecimento e oxigenação dos animais.

Uma diurese acentuada foi observada na maioria dos ratos neste experimento, esta também foi registrada em ratos tratados com xilazina (HSU et al., 1986; THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 1996; WIXSON et al., 1987). Esta droga produz a inibição da liberação do hormônio antidiurético, motivo pelo qual a utilização de associações com xilazina não são recomendadas para serem utilizadas em animais com obstrução do trato urinário, desidratados ou hipovolêmicos (TALUKDER; HIKASA, 2009). Somente os ratos que foram anestesiados com XKA não apresentaram piloereção, que pode ser explicado pela ação relaxante da acepromazina. A ketamina é uma droga que produz rigidez muscular, mas quando é combinada com a acepromazina que possuir propriedades relaxantes permite contrapor esse efeito (WELBERG et al., 2006).

Todos os animais anestesiados neste estudo mantiveram os olhos abertos durante a anestesia; além da perda do reflexo palpebral que impede ao animal piscar, a combinação de XK induz uma leve proptose do globo ocular e a retração da pálpebra (ZHANG; LÖFGREN; SÖDERBERG, 2007). Segundo Turner e Albassam (2005) seria possível que o reflexo palpebral se deprima em maior grau em ratos anestesiados com a combinação de XK do que com outras associações anestésicas injetáveis ou inalatórias. As lesões de córnea predispostas pelo uso desta combinação anestésica podem ocorrer devido à perda de água transcorneal pela alteração do humor aquoso quando acontece à exposição contínua da córnea (CALDERONE; GRIMES; SHALEV, 1986), ou à hipoxemia sistêmica que junto com a vasoconstrição dos vasos ciliares e irianos causada pela xilazina, podem culminar em morte celular (TURNER; ALBASSAM, 2005). Por isso, a utilização de protocolos com associações de XK não são

recomendados para estudos oculares, nos quais a avaliação da córnea seja importante. Porém, se não existe outra opção de utilizar uma combinação anestésica diferente, recomenda-se a aplicação de colírios, a suplementação com oxigênio à 100%, e a administração de uma dose adequada de ioimbina para reverter a ação da xilazina.

O protocolo que teve uma melhor ação anestésica em machos foi XKA, com uma duração de anestesia cirúrgica que permite fazer procedimentos que demorem aproximadamente 25 minutos com uma boa margem de segurança. A associação XKMe teve uma duração maior de anestesia cirúrgica com uma recuperação quase três vezes mais rápida que o protocolo de XKA, porém um menor número de animais conseguiram atingir esse nível de anestesia. Nenhum dos animais conseguiu atingir a anestesia cirúrgica com as associações XKMo e XKT; portanto, não se recomenda o uso dessas doses para procedimentos cirúrgicos.

No caso das fêmeas, os protocolos anestésicos mais eficazes foram XKMe e XKA. No primeiro protocolo houve uma maior duração anestésica cirúrgica e a recuperação foi muito mais rápida do que no segundo. Sendo a metadona um opióide que tem um grande poder analgésico, a associação XKMe pode ser uma boa opção para procedimentos que sejam invasivos e dolorosos. A associação XKMo teve uma baixa eficácia, já que somente dois de sete animais conseguiram atingir a anestesia cirúrgica. Além disso, o período de recuperação foi muito prolongado, tornando este protocolo não indicado para procedimentos cirúrgicos. Da mesma maneira que nos machos com o protocolo XKT, nenhuma fêmea atingiu a anestesia o que indica que tampouco é um bom protocolo para utilizar em uma cirurgia.

Tanto em machos como em fêmeas o protocolo XKA foi o que apresentou a maior quantidade de vocalizações ultrassônicas com maior duração, porém as vocalizações não superaram os 0,3 segundos. Segundo a literatura os ratos adultos produzem dois tipos de frequências de VUS: vocalizações longas de 22 kHz relacionadas a estímulos afetivos negativos e vocalizações curtas relacionadas a estímulos afetivos positivos (OLIVEIRA; BARROS, 2006), não obstante em nosso estudo o comportamento da vocalização parece ter sido diferente, pois os animais emitiram vocalizações curtas que não são esperadas em situações aversivas. No entanto, o estudo da dor é muito complexo porque para o mesmo devem-se analisar muitos aspectos (sensoriais, afetivos, autonômicos e comportamentais) e muitos fatores (como estresse ou percepção do ambiente) que podem influenciar sua resposta (SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011). Além do que este estudo foi o primeiro a utilizar as VUS para avaliar a dor em ratos anestesiados em uma fase de recuperação. Portanto, existe a necessidade de pesquisas adicionais para verificar possíveis influências da anestesia no padrão de VUS de ratos. Somado a isso, o fato dos animais que receberam associações com opióides

terem apresentado um número reduzido de VUS pode ser atribuído à natureza analgésica desses fármacos. Por outro lado, a acepromazina é uma fenotiazida que pode produzir sedação moderada, mas não tem poder analgésico por si só (FLECKNELL, 2009). A combinação XKA é considerada uma anestesia balanceada porque proporciona imobilidade suficiente, perda de consciência e analgesia leve, devido à ação da xilazina (LAWSON et al., 2001; WELBERG et al., 2006), porém neste estudo observou-se uma grande diferença com respeito à analgesia quando comparada aos protocolos com opióides. Igualmente é necessário uma investigação mais aprofundada para poder confirmar esse dado.

Não existe evidência clara que possa ser associada às alterações nos níveis de creatina sérica observados nos ratos machos submetidos aos protocolos anestésicos com opióides. O aumento da creatinina pode ocorrer devido à alteração renal que não permite sua liberação pela urina e por consequência se acumula no sangue (COCA; PARIKH, 2008). Porém, as alterações nos rins podem-se apresentar por causas variadas. No que se refere aos procedimentos anestésicos que utilizam a associação XK, não foram encontrados relatos na literatura causando alterações na função renal; no entanto, esses achados requerem estudos mais detalhados.

A hiperglicemia observada nos machos e nas fêmeas da associação XKMe pode ser produto da associação da XK. Saha et al. (2005) demonstraram que ratos alimentados antes de serem anestesiados com uma associação de XK sofreram hiperglicemia. Este fenômeno aconteceu com os animais de ambos os sexos o que reflete as mudanças dos α_2 -adrenoreceptores dependentes de hormônios glicorreguladores como a insulina, a corticosterona, o hormônio do crescimento (GH) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Por tanto, este fator deve ser considerado na escolha da anestesia em ratos, pois pode influenciar nos resultados de estudos em modelos animais nos quais os níveis de glicose devem ser avaliados.

2.5 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES

Em conclusão, a associação anestésica XKA foi o melhor protocolo para ratos machos e também foi adequado para as fêmeas. No entanto, essa associação possui pouco poder analgésico, sendo recomendado a utilização de um analgésico intra-operatório. O protocolo XKMe também apresentou bons resultados para as fêmeas e por seu alto poder analgésico pode ser utilizado para procedimentos cirúrgicos mais invasivos. Todas as associações podem causar depressão na temperatura corporal e nas frequências respiratória e cardíaca, fazendo-se indispensável adotar os cuidados intra e pós-operatórios necessários (monitoramento, aquecimento e oxigenação) para prevenir qualquer complicação anestésica e conseguir uma boa e rápida recuperação. Estes protocolos não podem ser utilizados para procedimentos nos quais o animal esteja hipovolêmico ou desidratado pelo efeito diurético da xilazina. A hiperglicemia e as alterações corneais podem ser causadas por estes protocolos anestésicos caso não se adote as medidas preventivas como, por exemplo, deixar os animais em jejum por 3 a 4 horas antes da anestesia e fornecer oxigenação e instilar colírio lubrificante durante a anestesia, respectivamente.

Devido à elevada variabilidade das respostas individuais frente a cada substância ou associação anestésica, fica claro que não é possível estabelecer um protocolo anestésico padrão para ratos de laboratório; portanto, cada pesquisador deve adaptar seu protocolo à necessidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.; AGUADO, D.; BENITO, J.; GÓMEZ -SEGURA I. A. Reduction of the sevoflurane minimum alveolar concentration induced by methadone, tramadol, butorphanol and morphine in rats. **Laboratory Animals** . v. 46, p. 200–206, 2012.
- ALBRECHT, M.; HENKE, J.; TACKE, S.; MARKERT, M; GUTH, B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. **BMC Veterinary Research**. v. 10, p. 198-212, 2014.
- ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. Optimization of Intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects and anesthesia depth. **American Association for Laboratory Animal Science**. v. 51, n. 5, p. 443-456, 2001.
- BOUGHERARA, H.; BOUAZIZ, O. Effects of anaesthetic/tranquillizer treatments (ketamine, ketamine+acepromazine, Zoletil) on selected plasma biochemical parameters in laboratory rats. **Central European Journal of Experimental Biology**. v. 3, n. 2, p. 1-5, 2014.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach**. 2 ed. New York: Springer-Verlag. 2002 .488 p.
- CALDERONE, L.; GRIMES, P.; SHALEV, M. Acute reversible cataract induced by xylazine and by ketamine-xylazine anaesthesia in rats and mice. **Experimental Eye Research**. v. 42, p.331–337, 1986:
- COCA, S. G.; PARIKH, C. R. Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**. v. 3, p. 481–490, 2008.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v. 4 p. 161–174, 1977.
- FERRARI, L.; TURRINI, G.; ROSTELLO, C.; GUIDI, A.; CASARTELLI, A.; PIAIA, A.; SARTORI, M. Evaluation of two combinations of Domitor, Zoletil 100 and Euthatal to obtain long-term nonrecovery anesthesia in Sprague-Dawley rats. **Comparative Medicine**. v. 55, p. 256–264, 2005.
- FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3.ed. Newcastle: Elsevier Inc. 2009. 300p.

GARGIULO, S.; GRECO, A.; GRAMANZINI, M.; ESPOSITO, S.; AFFUSO, A.; BRUNETTI, A.; VESCE, G. Mice anesthesia, analgesia, and care, part I: anesthetic considerations in preclinical research. **Ilar Journal**.v. 53, n. 1, p. 55-69, 2012.

GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD, C. B. Clinical laboratory parameters for Crl:WI (Han). **Charles Rivers**. p.14, 2008.

HEDENQVIST, P.; ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P.A. Effects of repeated anesthesia with ketamine/medetomidine and preanesthetic administration of buprenorphine in rats. **Laboratory Animals**.v. 34, p. 207-211, 2000.

HSU, W. H; BELLIN, S. I; DELLMANN, H. D; HANSON, C. E. Xylazine-ketamine induced anesthesia in rats and its antagonism by yohimbine. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**.v. 189, p. 1040-1043, 1986.

JOURDAN, D.; ARDID, D.; CHAPUY, E.; LE BARS, D.; ESCHALIER, A. Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat. **Life Science**. v. 63, p. 1761-8. 1998

LAWSON, D. M.; DUKE, J. L.; ZAMMIT, T. G.; COLLINS, H. L.; DICARLO, S. E. Recovery from carotid artery catheterization performed under various anesthetics in male, Sprague-Dawley rats. **Contemporary Topics Laboratory Animal Science**. v. 40, n. 4, p. 18-22, 2001.

MICZEK, K. A.; VIVIAN, J. A. Effects of and opioid agonists and antagonists on affective vocal and reflexive pain responses during social stress in rats. **Psychopharmacology**. v. 139 p. 364-75, 1998.

MOLINA, A. M.; MOYANO, M. R.; SERRANO-RODRÍGUEZ, J. M.; AYALA, N.; LORA, A. J.; SERRANO-CABALLERO, J. M: Analyses of anaesthesia with ketamine combined with different sedatives in rats. **Veterinarni Medicina**, v. 6, p. 368-375, 2015.

NATALINI, C. **Teorias e técnicas em anestesiologia veterinária**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 296p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8 ed. Washington D.C: National Academies Press, 2010. 220p.

OLIVEIRA, A.; BARROS, H. Ultrasonic Rat Vocalizations During the Formalin Test: A Measure of the Affective Dimension of Pain?. **Pain Medicine**. v. 102, p.832–839, 2006.

PORTFORD, C. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 46, n. 1, p. 28 – 34, 2007.

RODRIGUES, S. F.; APARECIDA, M.; MARTINS, J. O.; SANNOMIYA, P; TOSTES, R.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Differential effects of chloral hydrate and ketamine/xylazine induce by the s.c. route. **Life Sciences**. v. 79, p. 1630-1637, 2006.

SAHA, J. K.; XIA, J.; GRONDIN, J. M.; ENGLE, S. K.; JAKUBOWSKI, J. A. Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. **Experimental Biology and Medicine** v. 230, p.777–784, 2005.

SAWILOWSKY, S.S. New Effect Size Rules of Thumb. **Journal of Modern Applied Statistical Methods**. v. 8, n. 2, p. 597-599, 2009

SEVOSTIANOVAA, N.; ZVARTAUB, E.; BESPALOV, A.; DANYSZ, W. 2003. Effects of morphine on formalin-induced nociception in rats. **European Journal Pharmacology**. v. 462, p. 109 – 113, 2003.

SEYLER, D. E.; BOROWITZ, J. L.; MAICKEL, R. P. Calcium channel blockade by certain opioids. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 3, p. 536-542, 1983.

SILVA, N. S. F; SAKATA, R. K.; ISSY, M. A. Efeitos observados com diferentes doses de morfina subaracnóide em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 54, n. 1, p. 60-67, 2004.

SILVA, J. A; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. **Revista Dor**. v. 12, n. 2, p.138-51, 2011.

SINCLAIR, M. D. A review of the physiological effects of α_2 -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. **Canadian Veterinary Journal**. v. 44, n. 11, p. 885–897, 2003.

TALUKDER, H.; HIKASA, Y. Diuretic effects of medetomidine compared with xylazine in healthy dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 73, n. 3, p. 224-236, 2009.

THURMON, J. C; TRANQUILLI, W. J; BENSON, G. J. **Lumb and Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 3. Ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p. 210-240; 686-735.

TURNER, P. V.; ALBASSAM, M. A. Susceptibility of Rats to Corneal Lesions After Injectable Anesthesia. **Comparative Medicine**. v. 55, n. 2, p. 175-182, 2005.

WAMSLEY, J. K. Opioid receptors: autoradiography. **Pharmacology Reviews**. v. 35, p.69-83, 1983.

WELBERG, L. A. M; KINKEAD, B.; THRIVIKRAMAN, K. V.; HUERKAMP, M. J.; NEMEROFF, C .B.; PLOTSKY, P.M. Ketamine-xylazine-acepromazine anesthesia and postoperative recovery in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 45, p. 13–20, 2006.

WELLINGTON, D.; MIKAELIAN, I.; SINGER, L. Comparision of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 52, n. 4, p. 481-487, 2013.

WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; HUGHES, H. C.; LANG, C. M.; MARSHALL, W. K..The effects of pentobarbital, fentanyl–droperidol, ketamine–xylazine and ketamine–diazepam on core and surface body temperature regulation in adult male rats. **Laboratory Animal Science**. v. 37, n. 6, p. 743–749, 1987.

ZAMBRICKI, E. A.; D'ALECY, L. G. Rat sex differences in anesthesia. **Comparative Medicine**. v. 54, n. 1, p. 49-53, 2004.

ZHANG, F.; LÖFGREN, S.; SÖDERBERG, P. G. Interaction of anaesthetic drugs and UV-B irradiation in the anterior segment of the rat eye. **Acta ophthalmologica**. v. 85, n. 7, p. 745–752, 2007.

ZUBIETA, J. K.; SMITH, Y. R.; BUELLER, J. A.; XU, Y.; KILBOURN, M. R.; JEWETT, M.; MEYER, C. R.; KOEPPE, R. A.; STOHLER, C. S. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. **Science**. v. 293, n. 5528, p.311-315, 2001.

CAPÍTULO 2: ADMINISTRAÇÃO DE OXIGÊNIO COMO TÉCNICA DE REFINAMENTO DA ANESTESIA INJETÁVEL EM RATOS DE LABORATÓRIO

3 Administração de oxigênio como técnica de refinamento da anestesia injetável em ratos de laboratório

RESUMO

Em busca de novas técnicas de refinamento dos procedimentos anestésicos em ratos de laboratório, o fornecimento de oxigênio durante a anestesia injetável é uma metodologia recomendada visando minimizar potenciais complicações intra-operatórias e garantir o sucesso das intervenções cirúrgicas. Apesar destas recomendações, não existem estudos que verifiquem a eficácia da oxigenação e sua influência nos gases sanguíneos arteriais e na saturação de oxigênio durante a anestesia. Por essa razão, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da administração de oxigênio na concentração de 100% para ratos anestesiados com diferentes associações anestésicas usando a combinação de ketamina (K) e xilazina (X) com acepromazina ou diferentes opioides [metadona (Me), morfina (Mo) e tramadol (T)]. Os resultados demonstraram que a oxigenação teve um efeito benéfico sobre a saturação de oxigênio (SO₂) e a pressão parcial de oxigênio (pO₂) causando o retorno dos valores para níveis adequados, evitando a hipoxemia. A acidose respiratória foi observada em todos os ratos anestesiados devido à diminuição do pH e aumento da pressão parcial de CO₂ (pCO₂) que não foi revertida após a administração do oxigênio. Devido ao fato que, na maioria das vezes, a acidose já estava instaurada antes do animal receber a oxigenação, a mesma possivelmente está relacionada à hipoventilação causada pela depressão respiratória induzida pelas associações anestésicas da XK com os opióides, bem como pelo acúmulo de CO₂ durante o transcorrer da anestesia. A partir dos resultados deste estudo conclui-se que, apesar da acidose respiratória, o efeito da oxigenação previniu uma hipoxemia que poderia piorar essa condição. Para evitar a acidose se recomenda pre-oxigenar os animais na indução da anestesia, utilizar fármacos para reverter a depressão respiratória e avaliar a condição sanitária dos animais para que não apresentem comprometido o sistema respiratório.

Palavras-chave: 1- Oxigenação, 2- gases sanguíneos, 3- opióides, 4- hipóxia, 5- acidose respiratória

ABSTRACT

In search of new techniques for the refinement of anesthetic procedures in laboratory rats, the supplementation of oxygen during injective anesthesia is a recommended methodology to minimize potential intraoperative complications and ensure the success of surgical interventions. Despite these recommendations, there are no studies that verify the efficiency of oxygenation and its influence on arterial blood gases and oxygen saturation during anesthesia. For this reason, the objective of this study was to determine the effect of 100% oxygen to anesthetized rats with different anesthetic associations using the combination of ketamine (K) and xylazine (X) with acepromazine or different opioids [methadone (Me), morphine (Mo) and tramadol (T)]. The results showed that oxygenation had a beneficial effect on oxygen saturation (SO₂) and partial pressure of oxygen (pO₂) causing the returned of the values to adequate levels, avoiding hypoxemia. A respiratory acidosis was observed in all anesthetized rats due to pH decreased and partial pressure of CO₂ (pCO₂) increased that was not reversed after oxygen administration. Due to the fact that, most of the time, acidosis was already present before the animal received oxygen, it is possibly related to hypoventilation caused by respiratory depression associated to the anesthetic combinations of XK with opioids, as well as CO₂ accumulation during the course of anesthesia. In conclusion, despite respiratory acidosis, the effect of oxygenation prevented a hypoxemia that could complicate this situation. To prevent respiratory acidosis, it is recommended to pre-oxygenate the animals during induction period, to use drugs to reverse respiratory depression and to evaluate the sanitary condition of the animals avoiding those who have the respiratory system compromised.

Key words: 1- Oxygenation 2- blood gases, 3- opioids, 4- hypoxemia, 5- respiratory acidosis

3.1 INTRODUÇÃO

Muitos dos procedimentos experimentais nos quais os ratos de laboratório são utilizados requerem o uso de anestesia. Apesar da anestesia inalatória ser geralmente mais segura do que a injetável, sua utilização em roedores de laboratório é limitada pela falta de equipamento, instalações ou perícia do investigador (FLECKNELL, 2009; THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 1996), tornando a anestesia injetável (usualmente administrada pela via intraperitoneal) a técnica mais utilizada nesses animais.

O uso de agentes anestésicos altera significativamente a fisiologia do animal. O grau das alterações causadas varia, porém a maioria dos agentes anestésicos geram hipotermia e alteração das atividades cardiovascular e respiratória (MOLINA et al.2015; PICOLLO et al. 2012; HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007). Um dos mais importantes efeitos adversos desse tipo de anestesia é a depressão respiratória (ARRAS et al., 2001), assim como também a acentuada redução da saturação de oxigênio no sangue e alterações nos gases sanguíneos arteriais que levam a hipóxia e hipercapnia. A hipóxia acontece quando existe um inadequado fornecimento ou baixa concentração de oxigênio nos tecidos corporais que podem comprometer o metabolismo aeróbico celular e causar uma disfunção orgânica. A hiperapnia é a condição na qual acontece uma elevação anormal dos níveis de CO₂ no sangue e é geralmente causada por uma doença pulmonar, hipoventilação, ou exposição a fontes externas com altas concentrações de CO₂ (GANESH et al., 2016).

Os anestésicos injetáveis usualmente utilizados como a ketamina e a xilazina em combinação com outros fármacos como os opióides tem a capacidade de diminuir o fornecimento de oxigênio para os tecidos. A xilazina pode produzir alterações cardiovasculares, causar um bloqueio atrioventricular e diminuir a demanda de O₂ pelo miocárdio (SUMANO; OCAMPO, 2006). Além disso, a xilazina também pode causar a depressão do SNC pela estimulação dos α 2-adrenoreceptores (SINCLAIR, 2003). A ketamina induz estimulação cardiovascular e aumenta o consumo de oxigênio, mas em alguns casos pode causar leve depressão respiratória (TREVOR; WHITE, 2009). Os opióides podem causar depressão respiratória geralmente em altas doses e em combinação com outros depressores do sistema nervoso central (FLECKNELL, 2009) quando se unem aos receptores opióides que se encontram no centro da respiração, ativando-os e causando a depressão do ritmo respiratório (WAMSLEY, 1983).

Uma anestesia bem controlada é a base para minimizar potenciais complicações intraoperatórias e garante sucesso reprodutível de intervenções cirúrgicas (MOLINA et al.

2015). Por essa razão, é importante o monitoramento da função respiratória utilizando equipamentos que podem alertar ao investigador sobre possíveis problemas. Dispositivos simples de monitoramento da saturação de oxigênio no sangue arterial podem fornecer informações sobre o estado respiratório do animal. O oxímetro de pulso tem dois diodos emissores de luz e um fotorreceptor que detecta e transforma o espectro de luz em sinais elétricos que são processados por um microcontrolador e indicam a porcentagem de oxigênio transportada pelas células sanguíneas (SUCKOW; WEISBROTH; FRANKLIN, 2006). Esse equipamento é uma ferramenta útil para manter um bom monitoramento do animal durante a anestesia, porém, possui limitações na precisão e por isso pode complementar-se com a análise dos gases sanguíneos para obter um índice mais confiável da condição respiratória (EATWELL et al., 2013; BICKLER; FEINER; SEVERINGHAUS, 2005).

Em alguns estudos, concluiu-se que é importante a administração de oxigênio em roedores sob anestesia injetável (HAJIGHAHRAMANI; VESAL, 2007; HEDENQVIST; ROUGHAN; FLECKNELL, 2000) devido à alta taxa de mortalidade que pode estar associada aos severos efeitos da hipoventilação causada pela anestesia em alguns indivíduos (ARRAS et al., 2001). Apesar dessas recomendações, não existem estudos que verifiquem a eficácia da oxigenação e sua influência nos gases sanguíneos arteriais e na saturação de oxigênio durante o procedimento anestésico em ratos de laboratório. Por essa razão o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da administração de oxigênio na concentração de 100% em ratos anestesiados com diferentes associações anestésicas usando a combinação de ketamina (K) e xilazina (X) com acepromazina (A) ou diferentes opioides [metadona (Me), morfina (Mo) e tramadol (T)].

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais

48 ratos Wistar-Han (*Rattus norvegicus*), de padrão sanitário SPF, 24 fêmeas e 24 machos, de 8 a 12 semanas de idade, foram utilizados nos experimentos. Os ratos foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Cada grupo de ratos foi separado por sexo e dividido em grupos de no máximo 4 animais, que foram alojados em gaiolas de polipropileno com cama de sabugo de milho que era trocada uma vez por semana. Os animais foram mantidos sob condições climáticas controladas, com temperatura entre 22 e 24 °C, com uma umidade relativa de 45% a 65% e um ciclo de 12:12h claro:escuro. Os ratos foram alimentados com ração peletizada comercial (Nuvilab CR1®- Quimtia, PR, Brasil) e tiveram acesso a água *ad libitum*. Antes do início dos

experimentos os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde permaneceram por pelo menos uma semana para adaptação.

3.2.2. Comissão de ética

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo do Projeto n°. 9635260116). As condições de alojamento e manejo dos animais estão de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do NRC (2010).

3.2.3. Delineamento experimental

Em concordância com o princípio dos 3Rs (Refinamento, Substituição -Replacement em inglês- e Redução), este estudo faz parte do anterior (Capítulo 1) e foi desenvolvido ao mesmo tempo e com os mesmos animais nos quais foi avaliada a influência dos protocolos anestésicos que foram utilizados nesta investigação. Por esta razão, o procedimento anestésico foi o mesmo ao descrito anteriormente (Alemán-Laporte 2017, comunicação pessoal).

As associações anestésicas utilizadas neste estudo estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Doses (mg/Kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório de ambos os sexos.

	Associações anestésicas (mg/Kg)			
	XKA	XKMe	XKMo	XKT
Machos	7,5 + 60 + 2	5 + 60 + 5	7 + 60 + 1	7,5 + 65 + 5
Fêmeas	5 + 60 + 1	5 + 60 + 5	5 + 60 + 1,5	5 + 60 + 5

X: Xilazina (Anasedan®- Ceva, 20mg/ml, SP, Brasil), K: Ketamina (Dopalen®- Ceva, 100mg/ml, SP, Brasil), A: Acepromazina (Acepran® 0,2%- Vetnil, 2mg/kg, SP, Brasil), Me: Metadona (Mytedom®- Cristália, 10mg/ml, SP, Brasil), Mo: Morfina (Dimorf®- Cristália, 10mg/ml, SP, Brasil), T: Tramadol (Tramadon®- Cristália, 50mg/ml, SP, Brasil).

Durante a anestesia os ratos foram monitorados mensurando os parâmetros fisiológicos e os reflexos a cada 5 minutos desde o tempo de indução até o tempo de recuperação. Para mensurar a saturação de oxigênio foi utilizado um oxímetro de pulso (NT1A-V® Solaris Medical Technology, Inc, CA, USA) que foi colocado no coxim do membro posterior esquerdo.

Os ratos inicialmente respiraram ar ambiental e após 7 minutos da perda do reflexo podal foi administrado oxigênio 100% por meio de uma máscara até a recuperação da anestesia. Depois esses animais foram colocados em uma gaiola individual para sua recuperação e metabolização da anestesia.

3.2.4. Análise dos gases sanguíneos arteriais

No dia seguinte, a anestesia foi repetida utilizando a mesma associação do dia anterior. Depois que o rato apresentou perda total de seus reflexos, foi feita uma incisão no abdômen do mesmo com a finalidade de introduzir um cateter 24G na artéria aorta abdominal para fazer coletas de sangue. A primeira amostra foi coletada com o animal respirando ar ambiental. Depois da primeira coleta, foi colocado um tampão no cateter, o lúmen da artéria foi ocluído com uma pinça para obstruir a saída de sangue, foi administrado oxigênio 100% com uma máscara por um minuto e logo após foi coletada uma segunda amostra de sangue. Ambas as amostras foram coletadas com seringas heparinizadas de 1ml (BD A-LineTM, PL, UK) e foram acondicionadas à 4°C e imediatamente analisadas por um sistema automatizado de gases sanguíneos arteriais (Cobas b 121 System, Roche Diagnostics Limited, MA, DE). Foram mensuradas a pressão parcial de oxigênio (pO₂), a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂), o potencial hidrogeniônico (pH), e a concentração do íon bicarbonato (cHCO₃).

3.2.5. Análise estatística

Para investigar o efeito da utilização de oxigênio nos parâmetros dos gases sanguíneos arteriais utilizou-se um modelo de efeito linear misto (LMMs). A presença de oxigênio foi determinada como fator fixo e a identidade do rato como fator aleatório. Para cada parâmetro em cada associação anestésica foi construído um modelo definido com dois modelos candidatos, o primeiro levantando a hipótese de um efeito da presença de oxigênio e outro com a hipótese que o oxigênio não tem nenhum efeito (modelo nulo, somente interceptação). Depois foi conduzido um multimodelo de inferência sobre os diferentes grupos baseados no AICc (Critério de Informação de Akaike) para determinar o tamanho do efeito e a direção da presença de oxigênio entre os parâmetros. Os tamanhos dos efeitos foram classificados como evidência de um efeito se os intervalos de confiança de 95% não se estendiam a zero (MAZEROLLE, 2006). Essa é uma alternativa informática-teórica para comparações entre grupos e é útil quando o foco é um efeito do fator dado (BURNHAM; ANDERSON; HUYVAERT, 2011; GRUEBER et al. 2011; MAZEROLLE, 2006). A análise estatística foi realizada em R 3.3.2 (R Development Core Team 2008). LMMs foram montados utilizando o pacote lme4 (Bates et al. 2015). Foi calculado o efeito de tamanho da média do modelo utilizando o pacote AICcmodavg (MAZEROLLE, 2006).

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Saturação de oxigênio (SO₂)

A SO₂ nos ratos machos só diferiu ao longo do tempo de acordo com a seleção do modelo. O mesmo padrão foi observado nas fêmeas (Tabela 2). Antes da administração de oxigênio os níveis de saturação do mesmo se encontravam dentro dos intervalos normais (>90%). Depois da administração de oxigênio aos 7 minutos, a recuperação da saturação foi imediata e supera em sua maioria os 95% (Figura 1). O protocolo XKMo teve uma SO₂ menor depois dos 40 minutos mas dentro de uma porcentagem adequada.

Tabela 2 - Modelos que explicam a influência da anestesia sobre a saturação de oxigênio (SO₂) avaliada em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas. A priorização dos modelos foi baseado no Critério de Informação de Akaike (AIC) ajustado para amostras pequenas (AICc) e separado acordo ao sexo.

Modelo	Machos				Fêmeas			
	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c	k ^a	AICc	Delta AICc ^b	AICcWt ^c
SO ₂								
Tempo	9	1165,81	0,00	1,00	8	914,28	0,00	1,00
Tempo x Protocolo	30	1189,49	23,68	0,00	26	949,23	34,96	0,00
Modelo nulo	3	1296,49	130,68	0,00	3	1011,79	97,51	0,00
Protocolo	6	1299,08	133,27	0,00	6	1015,41	101,13	0,00

a Número de parâmetros considerados no modelo

b Diferença entre o valor de AICc do modelo atual versus o modelo de melhor aproximação (AICcmin)

c Akaike weight: Probabilidade de que o modelo atual (i) é o melhor entre os considerados

Figura 1 – Variação da saturação de oxigênio (SO₂) em ratos machos (A) e fêmeas (B) submetidos a anestesia com diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). As barras representam o erro padrão da média.

3.3.2. Gases sanguíneos arteriais

A administração de oxigênio nos animais submetidos às quatro associações anestésicas, tanto em machos como em fêmeas, causou a diminuição do pH (Tabela 3). Entretanto, o modelo de análise não mostrou efeito relacionado ao protocolo de XKMe em machos e XKT em fêmeas devido à pequena diferença entre os valores comparados (Tabela 4 e 5). Todos os animais se encontravam com um pH baixo ($< 7,35$) antes da oxigenação com exceção dos machos com o protocolo de XKA e XKT (Tabela 3).

No caso das variáveis SO_2 , pO_2 , e pCO_2 a tendência foi o aumento dos valores com a aplicação de oxigênio em todos os casos, com a geração de um efeito positivo na maioria desses parâmetros (Tabelas 4 e 5). A SO_2 em todos os animais antes de receber o oxigênio, encontrava-se por abaixo dos níveis adequados ($< 90\%$) sendo os piores valores ($< 80\%$) aqueles obtidos nas associações XKMe em machos e fêmeas, XKMo em fêmeas e XKT em fêmeas (Tabela 3). Os machos com o protocolo XKMe e as fêmeas com o protocolo XKMo sem oxigenação foram os que alcançaram os valores mais baixos da pO_2 (< 60 mmHg) (Tabela 3). Valores elevados da pCO_2 (< 40 mmHg) foram observados em todos os animais sem oxigenar tendo um aumento quando esses foram oxigenados (Tabela 3).

Na variável $CHCO_3$ não foi observado um efeito no momento da administração do oxigênio (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3 - Médias ± desvio padrão dos valores obtidos na análise dos gases sanguíneos arteriais em ratos sem e com oxigenação, submetidos a diferentes protocolos anestésicos (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol), para ambos os sexos.

		Ph		SO2 (%)		pO2 (mmHg)		pCO2 (l)		cHCO3 (l)	
		Sem O2	Com O2	Sem O2	Com O2	Sem O2	Com O2	Sem O2	Com O2	Sem O2	Com O2
XKA	Machos (n=6)	7,38±0,03	7,31±0,05	85,97±6,01	98,53±1,06	75,40±6,94	325,28±84,04	46,42±3,31	55,22±5,98	26,90±1,26	27,05±1,86
	Fêmeas (n=6)	7,34±0,04	7,25±0,04	83,90±5,61	97,28±1,63	77,30±17,98	346,17±72,14	49,07±4,01	60,38±6,24	26,03±3,51	26,13±2,78
XKMe	Machos (n=6)	7,32±0,04	7,27±0,07	75,77±13,81	97,48±3,57	59,03±12,58	278,30±106,90	56,86±7,51	62,95±16,02	28,66±2,15	27,45±3,62
	Fêmeas (n=6)	7,30±0,01	7,19±0,02	65,79±8,52	95,05±4,37	54,77±8,54	280,77±95,58	60,64±2,86	80,67±4,48	29,43±1,02	29,90±0,97
XKMo	Machos (n=6)	7,34±0,03	7,28±0,02	89,03±6,11	99,45±1,52	65,86±7,98	339,16±78,56	54,49±4,58	62,22±5,68	28,78±1,53	28,40±1,75
	Fêmeas (n=6)	7,30±0,01	7,26±0,04	66,12±15,12	97,38±1,06	55,82±8,41	282,83±62,65	58,58±2,15	76,08±58,16	28,43±0,87	28,48±1,33
XKT	Machos (n=6)	7,35±0,04	7,26±0,06	88,16±7,12	99,53±0,90	65,41±10,59	354,57±50,24	50,89±5,35	63,95±7,08	27,10±2,33	27,65±2,30
	Fêmeas (n=6)	7,29±0,06	7,21±0,06	70,23±35,25	97,73±1,24	75,6±31,11	350,93±72,78	58,18±6,49	68,77±12,37	27,25±1,50	27,15±2,10

Tabela 4 - Tamanho do efeito da presença de oxigênio sobre os gases sanguíneos arteriais em ratos machos submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). Tamanho do efeito (TE), Erro Padrão (EP) e 95% Intervalos de Confiança (IC). A direção da covariável positiva indica que a magnitude da variável é mais alta nos animais oxigenados quando comparados aos animais que não foram oxigenados.

Protocolo	Parâmetros	TE	EP	95% IC	Direção da covariável
XKA	pH	-0,07	0,02	(-0,11; -0,03)	-
	SO ₂	12,51	2,42	(7,77; 17,26)	+
	pO ₂	249,84	31,6	(187,91; 311,78)	+
	pCO ₂	8,71	2,7	(3,41; 14,00)	+
	cHCO ₃	0,01	0,82	(-1,59; 1,62)	Sem efeito
XKMe	pH	-0,02	0,04	(-0,1; 0,05)	Sem efeito
	SO ₂	21,65	6,27	(9,36; 33,94)	+
	pO ₂	219,35	38,24	(144,39; 294,3)	+
	pCO ₂	1,07	6,01	(-10,71; 12,86)	Sem efeito
	cHCO ₃	-0,49	1,52	(-3,47; 2,5)	Sem efeito
XKMo	pH	-0,06	0,01	(-0,09; -0,04)	-
	SO ₂	10,28	2,63	(5,13; 15,43)	+
	pO ₂	273,3	26,12	(222,11; 324,49)	+
	pCO ₂	7,14	2,98	(1,3; 12,97)	+
	cHCO ₃	-0,22	0,76	(-1,71; 1,27)	Sem efeito
XKT	pH	-0,09	0,02	(-0,12; -0,05)	-
	SO ₂	11,31	3,33	(4,78; 17,83)	+
	pO ₂	289,16	17,96	(253,95; 342,37)	+
	pCO ₂	12,02	3,4	(5,37; 18,68)	+
	cHCO ₃	0,02	1,13	(2,25; -2,2)	Sem efeito

Tabela 5 - Tamanho do efeito da presença de oxigênio sobre os gases sanguíneos arteriais em ratos fêmeas submetidos a diferentes associações anestésicas (X: Xilazina, K: Ketamina, A: Acepromazina, Me: Metadona, Mo: Morfina, T: Tramadol). Tamanho do efeito (TE), Erro Padrão (EP) e 95% Intervalos de Confiança (IC). A direção da covariável positiva indica que a magnitude da variável é mais alta nos animais oxigenados quando comparados aos animais que não foram oxigenados.

Protocolo	Parâmetros	TE	EP	95% IC	Direção da covariável
XKA	Ph	-0,08	0,02	(-0,13; -0,04)	-
	SO ₂	13,36	2,24	(8,97; 17,76)	+
	pO ₂	268,86	27,73	(214,51; 323,22)	+
	pCO ₂	10,92	3,47	(4,11; 17,72)	+
	cHCO ₃	0,01	1,64	(-3,21; 3,23)	Sem efeito
XKMe	pH	-0,12	0,01	(-0,13; -0,1)	-
	SO ₂	28,43	3,54	(21,49; 35,37)	+
	pO ₂	225,77	33,42	(160,27; 291,27)	+
	pCO ₂	19,94	1,84	(16,34; 23,54)	+
	cHCO ₃	0,06	0,5	(-0,93; 1,04)	Sem efeito
XKMo	pH	-0,11	0,01	(-0,14; -0,08)	-
	SO ₂	31,11	6,08	(19,2; 43,03)	+
	pO ₂	227,01	23,58	(180,79; 273,23)	+
	pCO ₂	17,44	3,32	(10,94; 23,94)	+
	cHCO ₃	0,00	0,57	(-1,11; 1,12)	Sem efeito
XKT	pH	-0,07	0,04	(-0,16; 0,01)	Sem efeito
	SO ₂	10,48	17,81	(-24,42; 45,39)	Sem efeito
	pO ₂	275,33	29,51	(217,5; 333,17)	+
	pCO ₂	4,9	7,09	(-9,01; 18,8)	Sem efeito
	cHCO ₃	-0,01	0,81	(-1,6; 1,58)	Sem efeito

3.4 DISCUSSÃO

Em busca de novas técnicas de refinamento dos procedimentos anestésicos, uma metodologia muito sugerida é a utilização de oxigênio na anestesia injetável para minimizar potenciais complicações intraoperatórias e garantir o sucesso nas intervenções cirúrgicas. A melhoria imediata observada na saturação de oxigênio, em todos os protocolos anestésicos utilizados neste estudo, reforça a importância da oxigenação dos ratos durante os procedimentos anestésicos injetáveis. Porém, todos os animais independentemente do protocolo anestésico utilizado, desenvolveram acidose respiratória apesar da oxigenação, que pode estar relacionada à depressão respiratória que impede o animal de ter uma boa ventilação, com consequente acúmulo de CO₂. Na maioria dos casos, a acidose já tinha se instalado antes da oxigenação e piorou com o tempo que o animal permaneceu anestesiado, motivo pelo qual se concluiu que o efeito foi acumulativo pelo tempo da anestesia.

Em uma investigação realizada previamente a esta (Alemán-Laporte 2017, comunicação pessoal), utilizando as mesmas associações anestésicas, demonstrou-se que todos os protocolos em ratos de ambos os sexos produziam depressão respiratória principalmente nos primeiros 10 minutos da anestesia. Na primeira parte deste experimento a diminuição da saturação de oxigênio (SO₂) coincide exatamente com essa depressão respiratória, caindo rapidamente a níveis inferiores a 90%. Valores menores que 90% de SO₂ são um motivo de preocupação porque se correlaciona a uma pressão parcial de oxigênio (pO₂) de 60 mmHg, a partir da qual uma diminuição adicional da saturação pode resultar em uma grande queda da pO₂ o que pode levar a hipoxemia (VOGLER, 2006). Em vários modelos animais se demonstrou que a hipoxemia causa efeitos prejudiciais em quase todos os órgãos a nível celular levando a alterações como insuficiência cardíaca aguda, hipertensão pulmonar, insuficiência renal aguda e danos no tecido neuronal com diminuição da função cognitiva (BREZIS; ROSEN, 1995; CROSS et al., 1963; GOZAL; DANIEL; DOHANICH, 2001; ZIELINSKI, 2005).

Logo após a administração do oxigênio a melhora imediata da saturação indica que a concentração sanguínea de oxigênio no aumentou e com isso, pode-se afirmar que esta prática é necessária durante procedimentos com que utilizem anestesia injetável, em especial aqueles que adotem as mesmas associações deste estudo. Em concordância, Fornari et al. 2012 administraram oxigênio durante um procedimento cirúrgico em ratos, realizado com a associação anestésica injetável de ketamina e dexmedetomidina, demonstrando que os animais oxigenados apresentaram um aumento na taxa de sobrevivência e uma perda de peso

pós-cirúrgica significativamente menor do que aqueles que não receberam oxigênio, confirmando o efeito benéfico desta prática.

Na segunda parte dessa investigação, na análise de gases arteriais observou-se que a SO_2 e a pO_2 encontrava-se abaixo dos níveis adequados, sendo principalmente os protocolos combinados com opióides os que tiveram os piores valores. Os agentes α -2 agonista adrenérgicos como a xilazina tem uma capacidade de causar uma depressão respiratória moderada, mas quando são combinados com outros fármacos potentes como os opióides, essa depressão pode ser severa levando a diminuição da capacidade de oxigenação do animal (SUCKOW; WEISBROTH; FRANKLIN, 2006). No entanto, essa situação foi eliminada com a suplementação do oxigênio que refletiu na melhora da condição clínica dos animais em todos os casos.

Os valores da SO_2 , medida nos gases arteriais, corroboraram com os dados obtidos pelo oxímetro de pulso, os quais demonstraram um mesmo comportamento dos valores de saturação dos animais com e sem oxigenação. Os oxímetros de pulso são aparelhos relativamente precisos para mensurar os níveis de oxigenação normais, mas se tornam mais imprecisos a medida que a saturação cai abaixo de 80%. Não obstante, para a avaliação clínica é uma das ferramentas mais úteis, pois uma queda da saturação de oxigênio durante a anestesia pode ser detectada e corrigida imediatamente (FLECKNELL, 2009).

A acidose respiratória foi uma complicação observada em todos os casos. Essa condição ocorre pela diminuição do pH a um valor menor que 7,35 e um aumento do CO_2 a valores acima de 60mmHg (FLECKNEL, 2009), situação que aconteceu tanto nos animais antes da oxigenação (com exceção dos machos com as associações XKA e XKT) como depois de receberem oxigênio. A acidose respiratória pode ter diversas causas como a hipoventilação que pode ser ocasionada por problemas que provoquem falhas nas trocas de gases nos alvéolos, tais como obstruções no trato respiratório, pneumonia, pneumotórax, enfisema, transtornos neuromusculares, doenças respiratórias, fármacos que deprimam o SNC (centro respiratório) ou inalação de CO_2 em excesso (ETGES, 2005). Como na maioria dos casos, a hipercapnia e a diminuição do pH aconteceram antes da oxigenação, isso indica que foram causadas pelo efeito depressor dos opióides e a da xilazina no sistema respiratório que impediu os animais de eliminarem de forma adequada o CO_2 acumulando-se no organismo do animal e que, apesar da oxigenação, piorou com o passar do tempo. Como somente foi analisada uma única amostra de sangue depois da oxigenação e, posteriormente, os animais eram submetidos à eutanásia, não se conseguiu demonstrar se com mais tempo de oxigenação

o animal conseguiria reverter esse problema, motivo pelo qual seria importante realizar estudos mais detalhados.

Como recomendações diante os resultados obtidos, deve-se considerar pré-oxigenar o animal a partir da indução anestésica para evitar a hipoxemia desde o início e prevenir também a hipercapnia. Administrar fármacos como a naloxona que tem a capacidade de reverter a depressão respiratória em caso da utilização de opióides ou o doxapram que é um estimulante da respiração. Além disso, os animais devem ser avaliados em relação ao seu estado sanitário, utilizando-se sempre aqueles que não apresentem qualquer tipo de comprometido do seu sistema respiratório (preferencialmente animais SPF para patógenos que afetem as vias aéreas) e, conseqüentemente, apresentem boa capacidade de ventilação.

3.5. CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a suplementação de oxigênio é necessária durante procedimentos nos quais a anestesia injetável é utilizada, devido ao fato que essas associações produzem uma depressão respiratória que afeta a oxigenação e que podem levar ao animal a sofrer de uma hipoxemia. A administração de oxigênio tem um efeito imediato que causa melhora dessa saturação, ajudando a manter o animal estável durante o procedimento anestésico e, conseqüentemente, melhorando sua capacidade de recuperação.

A pesar de ter uma boa oxigenação, a acidose respiratória pode acontecer por alterações na ventilação. Por isso é importante tomar uma série de medidas preventivas como pré-oxigenar os animais desde o momento da indução anestésica, assegurar que os animais utilizados na pesquisa não apresentem alterações pulmonares que impeçam uma boa oxigenação, além de administrar medicamentos que possam reverter a depressão respiratória severa como o naloxona no caso dos opióides.

É importante considerar que o monitoramento da ventilação deve ser realizado sempre em todo procedimento anestésico. Podem-se utilizar ferramentas de fácil manipulação como o oxímetro de pulso ou metodologias um pouco mais complexas e precisas, como a mensuração dos gases sanguíneos que permitem direcionar o investigador para melhorar a qualidade de seus resultados e evitar possíveis complicações que prejudiquem o bem-estar do animal.

A pesar de que muitos autores na literatura enfatizam a importância do uso de oxigênio mesmo na anestesia injetável, o presente estudo é o primeiro artigo que compara a concentração dos gases sanguíneos em ratos anestesiados por via intraperitoneal, com diferentes associações, antes e após a administração de oxigênio. Porém, ainda restam outros múltiplos fatores que podem influenciar na anestesia de ratos de laboratório e igualmente merecem ser pesquisados, por isso é necessário realizar mais investigação sobre essa temática.

REFERÊNCIAS

- ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. Optimization of Intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects and anesthesia depth. **American Association for Laboratory Animal Science**. v. 51, n. 5, p. 443-456, 2001.
- BICKLER, P. E.; FEINER, J. R.; SEVERINGHAUS, J. W. Effect of skin pigmentation on pulse oximeter accuracy at low saturation. **Anesthesiology**. v. 102, p. 715-719, 2005.
- BREZIS, M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. **The New England Journal of Medicine**.v. 332, p.647–55, 1995.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R.; HUYVAERT, K. P. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 65, p. 23–35, 2011.
- CROSS, C. E.; RIEBEN, P. A.; BARRON, C. I.; SALISBURY, P. F. Effects of arterial hypoxia on the heart and circulation: an integrative study.**American Journal of Physiology**. v. 205, p. 963–970, 1963.
- EATWELL, K.; MANCINELLI, E.; HEDLEY, J.; BENATO, L.; SHAW, D. J.; SELF, I.; MEREDITH, A. Use of arterial blood gas analysis as a superior method for evaluating respiratory function in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Record**. v. 173, n. 7, p.166. 2013
- ETGES, R. N. **Terapêutica das alterações do equilíbrio ácido-básico**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2005. Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/terapia_acidobase.pdf. Acesso em: 21 abr. 2017.
- FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3.ed. Newcastle. Elsevier Inc. 2009. 300p.
- FORNARI, R.V., WICHMANN, R., ATSAK, P., ATUCHA, E., BARSEGYAN, A., BELDJOD, H., MESSANVI, F., THURING, C.M., ROOZENDAAL, B. Rodent Stereotaxic Surgery and Animal Welfare Outcome Improvements for Behavioral Neuroscience. **Journal Visualized Experiment**. v. 59, DOI : 10.3791/3528, 2012.
- GANESH, T.; ESTRADA, M.; DUFFIN, J.; CHENG, H. M. T2 and T1 Assessment of Abdominal Tissue Response to Graded Hypoxia and Hypercapnia Using a Controlled Gas Mixing Circuit for Small Animals. **Journal Magnetic Resonance Imaging**. v. 44, p.305–316, 2016.

GOZAL, D.; DANIEL, J. M.,; DOHANICH, G. P. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. **Journal of Neuroscience** . v. 21, p..2442–2450, 2001.

GRUEBER, C. E.; NAKAGAWA, S; LAWS, R. J; JAMIESON, I. G. Multimodel inference in ecology and evolution: challenges and solutions. **Journal of Evolutionary Biology**. v. 24, p. 699–711, 2011.

HAJIGHAHRAMANI, S.; VESAL, N. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v 8, n. 2, p. 106-115, 2007.

HEDENQVIST, P.; ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P.A. Effects of repeated anesthesia with ketamine/medetomidine and preanesthetic administration of buprenorphine in rats. **Laboratory Animals**.v. 34, p. 207-211, 2000.

MAZEROLLE, M. Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. **Amphibia-Reptilia Journal**. v. 27, p. 169-180, 2006.

MOLINA, A. M.; MOYANO, M. R.; SERRANO-RODRÍGUEZ, J. M.; AYALA, N.; LORA, A. J.; SERRANO-CABALLERO, J. M: Analyses of anaesthesia with ketamine combined with different sedatives in rats. **Veterinarni Medicina**, v. 6, p. 368-375, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8 ed. Washington D.C: National Academies Press, 2010.

PICOLLO, C.; SERRA, A. J; LEVY, R. F.; ANTONIO, E. L.; DOS SANTOS, L.; TUCCI P. J. F. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 4, p. 860-864, 2012.

SINCLAIR, M. D. A review of the physiological effects of $\alpha 2$ -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. **Canadian Veterinary Journal**. v. 44, n. 11, p. 885–897, 2003.

SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. **The laboratory rat**.2 ed. USA: Elsevier, Inc. 2006. 626-664p.

SUMANO, L. H. S.; OCAMPO, C. L. **Farmacología Veterinaria**. 3 ed. México, D. F:McGraw-Hill Interamericana. 2006. 1082 p.

TREVOR, A.; WHITE, P. F. **Anestésicos gerais** . 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 1228 p.

THURMON, J. C; TRANQUILLI, W. J; BENSON, G. J. **Lumb and Jones' veterinary anesthesia and analgesia**. 3. Ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p. 210-240; 686-735.

WAMSLEY, J. K. Opioid receptors: autoradiography. **Pharmacology Reviews**. v. 35, p.69-83, 1983.

ZIELINSKI, J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal models versus studies in humans. **European Respiratory Journal**. v. 25, p.173–80, 2005.

APÊNDICE A

FOLHA DE CONTROLE DE ANESTESIA

DATA: _____

PESQUISADORES: _____

GAIOLA: _____ N° RATO: _____ SEXO: _____

PESO: _____ gramas

DATA NASC: ____ / ____ / ____

PROTOCOLO A SER UTILIZADO:

	Xilazina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Ketamina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Acepromazina (_____ mg/kg) _____ mg/ml
	Xilazina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Ketamina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Metadona (_____ mg/kg) _____ mg/ml
	Xilazina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Ketamina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Tramadol (_____ mg/kg) _____ mg/ml
	Xilazina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Ketamina (_____ mg/kg) _____ mg/ml + Morfina (_____ mg/kg) _____ mg/ml

HORA DE ADMINISTRAÇÃO DE PROTOCOLO: _____

REFLEXOS:

REFLEXOS	HORA
Perda de coordenação e ataxia	
Perda do reflexo de endireitamento	
Perda movimento das vibrissas	
Perda do reflexo palpebral	
Perda do reflexo de retirada de cauda	
Perda do reflexo podal	
Retorno do reflexo podal	
Retorno movimento vibrissas	
Retorno do reflexo palpebral	
Retorno do reflexo de retirada de cauda	
Retorno do reflexo de endireitamento	
Retorno da habilidade do animal para caminhar	

HORA DE FINALIZAÇÃO DA ANESTESIA: _____

CONTROLE DE PARÂMETROS FÍSICOS ANESTÉSICOS

Parâmetro	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Temp. Retal															
Frequência Cardíaca															
Frequência Respiratória															
Saturação de Oxigênio															
Observações:															

Parâmetro	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145
Temp. Retal															
Frequência Cardíaca															
Frequência Respiratória															
Saturação de Oxigênio															
Observações:															

MICÇÃO:

1 NÃO TEM	2 POUCO	3 MODERADO	4 MUITO

PILOEREÇÃO:

1 NÃO TEM	2 TEM

ABERTURA OLHOS:

1 NÃO TEM	2 POUCO	3 MODERADO	4 MUITO

4 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÃO

A associação anestésica XKA foi a melhor associação para machos e também é uma boa associação para fêmeas. A única restrição com ela é que possui pouco poder analgésico, por isso é recomendada a utilização de um analgésico intraoperatório. O protocolo XKMe também foi bom para as fêmeas e por seu alto poder analgésico pode ser utilizado para procedimentos cirúrgicos mais invasivos. Essas associações podem causar depressão na temperatura corporal e nas frequências respiratória e cardíaca, por isso é indispensável que o animal receba os cuidados necessários, tais como monitoramento, aquecimento e oxigenação, para prevenir qualquer complicação anestésica e conseguir uma boa e rápida recuperação. Esses protocolos não podem ser utilizados para procedimentos nos quais o animal esteja hipovolêmico ou desidratado pelo efeito diurético da xilazina. A hiperglicemia e as alterações corneais podem ser causadas por estes protocolos anestésicos caso não se adote as medidas preventivas como, por exemplo, deixar os animais em jejum por 3 a 4 horas antes da anestesia e fornecer oxigenação e instilar colírio lubrificante durante a anestesia, respectivamente.

Também é importante tomar em consideração que situações como a acidose respiratória podem ocorrer durante a anestesia, por isso, é recomendado trabalhar com animais que não apresentem qualquer tipo de comprometimento respiratório, utilizar fármacos para reverter a depressão respiratória e pré-oxigenar os animais desde a indução da anestesia.

Devido à elevada variabilidade das respostas individuais, frente a cada substância ou associação anestésica, fica claro que não é possível estabelecer um protocolo anestésico padrão para ratos de laboratório; portanto, cada pesquisador deve adaptar seu protocolo à necessidade da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.; AGUADO, D.; BENITO, J.; GÓMEZ -SEGURA I. A. Reduction of the sevoflurane minimum alveolar concentration induced by methadone, tramadol, butorphanol and morphine in rats. **Laboratory Animals** . v. 46, p. 200–206, 2012.
- ALBRECHT, M.; HENKE, J.; TACKE, S.; MARKERT, M; GUTH, B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. **BMC Veterinary Research**. v. 10, p. 198-212, 2014.
- ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. Optimization of Intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects and anesthesia depth. **American Association for Laboratory Animal Science**. v. 51, n. 5, p. 443-456, 2001.
- BOUGHERARA, H.; BOUAZIZ, O. Effects of anaesthetic/tranquillizer treatments (ketamine, ketamine+acepromazine, Zoletil) on selected plasma biochemical parameters in laboratory rats. **Central European Journal of Experimental Biology**. v. 3, n. 2, p. 1-5, 2014.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stemstimulation in rats and cats. **Pain**. v. 4 p. 161–174, 1977.
- FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3.ed. Newcastle. Elsevier Inc. 2009. 300p.
- GARGIULO, S.; GRECO, A.; GRAMANZINI, M.; ESPOSITO, S.; AFFUSO, A.; BRUNETTI, A.; VESCE, G. Mice anesthesia, analgesia, and care, part I: anesthetic considerations in preclinical research. **Ilar Journal**.v. 53, n. 1, p. 55-69, 2012.
- GIROUX, M. C.; HÉLIE, P.; BURNS, P.; VACH, P. Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. **Experimental Animals**. v. 64, n. 3, p. 253-260, 2015.
- HAJIGHAHRAMANI, S.; VESAL, N. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v 8, n. 2, p. 106-115, 2007.
- HEDENQVIST, P.; ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P.A. Effects of repeated anesthesia with ketamine/medetomidine and preanesthetic administration of buprenorphine in rats. **Laboratory Animals**.v. 34, p. 207-211, 2000.

MOLINA, A. M.; MOYANO, M. R.; SERRANO-RODRÍGUEZ, J. M.; AYALA, N.; LORA, A. J.; SERRANO-CABALLERO, J. M: Analyses of anaesthesia with ketamine combined with different sedatives in rats. **Veterinarni Medicina**, v. 6, p. 368-375, 2015.

NATALINI, C. **Teorias e técnicas em anestesiologia veterinária**. 1 ed. Porto Alegre, Artmed. 2007. 296p

SILVA, N. S. F; SAKATA, R. K.; ISSY, M. A. Efeitos observados com diferentes doses de morfina subaracnóide em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 54, n. 1, p. 60-67, 2004

OLIVEIRA, A.; BARROS, H. Ultrasonic Rat Vocalizations During the Formalin Test: A Measure of the Affective Dimension of Pain?. **Pain Medicine**. v. 102, p.832–839, 2006.

PICOLLO, C.; SERRA, A. J; LEVY, R. F.; ANTONIO, E. L.; DOS SANTOS, L.; TUCCI P. J. F. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 4, p. 860-864, 2012.

PORTFORD, C. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 46, n. 1, p. 28 – 34, 2007.

RODRIGUES, S. F.; APARECIDA, M.; MARTINS, J. O.; SANNOMIYA, P; TOSTES, R.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Differential effects of chloral hydrate and ketamine/xylazine induce by the s.c. route. **Life Sciences**. v. 79, p. 1630-1637, 2006.

ROUGHAN, J. V.; OJEDA, O. B.; FLECKNELL, P. A. The influence of pre-anesthetic administration of buprenorphine on the anaesthetic effects of ketamine/medetomidine and pentobarbitone in rats and the consequences of repeated anaesthesia. **Laboratory Animals** v. 33, p. 234-242, 1999.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. 1 Ed: London. Methuen. 1959. 238p.

SEI, K; FUJITA, M; OKAWA, S; HIRASAWA, T; KUSHIBIKI, T; SASA, I; FURUYA, K; ISHIHARA, M. Appropriate timing of blood sampling for blood gas analysis in the ventilated rabbit. **Journal of Surgical Research** .v. 206, p. 325-336, 2016.

WELBERG, L. A. M.; KINKEAD, B.; THRIVIKRAMAN, K. V.; HUERKAMP, M. J.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P.M. Ketamine-xylazine-acepromazine anesthesia and postoperative recovery in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 45, p. 13–20, 2006.

WELLINGTON, D.; MIKAELIAN, I.; SINGER, L. Comparision of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 52, n. 4, p. 481-487, 2013.

WRIGHT, B.; HELLYER, P. W. Respiratory monitoring during anaesthesia: pulse oximetry and capnography. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 18, p.1083–1097, 1996.

ZAMBRICKI, E. A.; D’ALECY, L. G. Rat sex differences in anesthesia. **Comparative Medicine**. v. 54, n. 1, p. 49-53, 2004.

ZUÑIGA, J. **Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal**. 1ed: España. McGraw-Hill/Interamericana. 2001. 385-418p.