

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

RENATO TESSARE PICCOLO

**AVALIAÇÃO DO USO DE CETAMINA E ACEPROMAZINA EM
DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OTIMIZAÇÃO DA ANESTESIA
EM RATOS DE EXPERIMENTAÇÃO**

**São Paulo
2018**

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

**AVALIAÇÃO DO USO DE CETAMINA E ACEPROMAZINA EM DIFERENTES
PROTOCOLOS PARA OTIMIZAÇÃO DA ANESTESIA EM RATOS DE
EXPERIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental sob orientação da Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

RENATO TESSARE PICCOLO

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

**AVALIAÇÃO DO USO DE CETAMINA E ACEPROMAZINA EM DIFERENTES
PROTOCOLOS PARA OTIMIZAÇÃO DA ANESTESIA EM RATOS DE
EXPERIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori

RENATO TESSARE PICCOLO

São Paulo
2018

Piccolo, Renato Tessare.

Avaliação do uso de cetamina e acepromazina em diferentes protocolos para otimização da anestesia em ratos de experimentação / Renato Tessare Piccolo. - 2018.

59 f. : il. color + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Madalena Cabrera Mori.

1. Cetamina
 2. Acepromazina.
 3. Tramadol.
 4. Xilazina.
 5. Metadona.
 6. Bem-estar.
- I. Bernardi, Maria Martha (orientadora).
II. Mori, Claudia Madalena Cabrera (coorientadora). III. Título.

RENATO TESSARE PICCOLO

**AVALIAÇÃO DO USO DE CETAMINA E ACEPROMAZINA EM DIFERENTES
PROTOCOLOS PARA OTIMIZAÇÃO DA ANESTESIA EM RATOS DE
EXPERIMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Data de aprovação: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Esther Lopes Ricci Adari Camargo
Universidade Presbiteriana Mackenzie - MACKENZIE

Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Universidade Paulista – UNIP

Agradeço a todos os professores que me acompanharam durante a pós-graduação, em especial às professoras Maria Martha Bernardi e Claudia Madalena Cabrera Mori, responsáveis pela orientação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e força para superar as dificuldades.

À Instituição, pelo ambiente criativo e amigável que proporciona.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Martha Bernardi, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e por ter acreditado em meu potencial.

À Professora Doutora Claudia Madalena Cabrera Mori, pela oportunidade de estudar uma espécie e um tema tão espetaculares.

Aos animais que deram suas vidas em favor da ciência.

E a todos, da UNIP e da USP, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

A pesquisa científica não deve infringir o bem-estar dos animais em experimento. A busca de protocolos anestésicos mais eficazes e seguros visa dar mais qualidade de vida para ratos de laboratório, gerando pouco ou nenhum sofrimento dos animais durante a execução dos experimentos. Embora ainda não seja possível erradicar todos os tipos de experimento que utilizem animais, deve-se minimizar o sofrimento nas práticas biomédicas. O objetivo deste estudo foi comparar efeitos de três protocolos anestésicos em ratos, por meio do tempo de anestesia cirúrgica, propiciando o bem-estar quando submetidos aos experimentos. Cada grupo de oito ratos machos recebeu um protocolo diferente: (1) protocolo ACXT – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), xilazina (2,5 mg/kg) e tramadol (10 mg/kg); (2) protocolo ACXMe – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), xilazina (2,5 mg/kg) e metadona (0,5 mg/kg); e (3) protocolo ACMiMe – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), midazolam (5 mg/kg) e metadona (5 mg/kg). Foram monitoradas a temperatura corporal, a pressão arterial, a capnografia, as frequências cardíaca, de pulso e respiratória, avaliando perdas e retornos dos reflexos, inclusive o reflexo de dor para garantir o bem-estar dos animais quando submetidos aos experimentos. Ratos anestesiados com o protocolo (1) ACXT permaneceram 46 minutos em plano anestésico cirúrgico, enquanto ratos anestesiados com o protocolo (2) ACXMe permaneceram 1 hora e 3 minutos em plano anestésico cirúrgico. Ratos anestesiados com o protocolo (3) ACMiMe tiveram taxa de mortalidade de 75% (6/8). Nos protocolos (1) ACXT e (2) ACXMe, todos atingiram plano anestésico cirúrgico, analgesia adequada e não ocorreu óbito (0/16). Os protocolos (1) ACXT e (2) ACXMe refinaram os protocolos anestésicos utilizados em ratos de laboratório, humanizando procedimentos e dando ênfase no bem-estar.

Palavras-chave: cetamina; acepromazina; tramadol; xilazina; metadona; bem-estar.

ABSTRACT

Scientific research should not infringe the well-being of animals in experiment. The search for more effective and safe anesthetic protocols aims at giving a better quality of life for laboratory rats, generating little or no suffering of the animals during the execution of the experiments. Although it is not yet possible to eradicate all types of animal experimentation, we must minimize suffering in biomedical practice. The target of this study was to compare the effects of three anesthetic protocols on rats, by using surgical anesthesia, propitiating the well-being when submitted to experiments. Each group of eight male rats has received a different protocol: (1) ACXT protocol – acepromazina (2 mg/kg), ketamine (100 mg/kg), xylazine (2,5 mg/kg) and tramadol (10 mg/kg); (2) ACXMe protocol – acepromazina (2 mg/kg), ketamine (100 mg/kg), xylazine (2,5 mg/kg) and methadone (0,5 mg/kg); and (3) ACMiMe protocol – acepromazina (2 mg/kg), ketamine (100 mg/kg), midazolam (5 mg/kg) and methadone (0,5 mg/kg). Body temperature, blood pressure, capnography, heart, pulse and respiratory rates were evaluated, assessing losses and reflex returns, including pain reflex to guarantee well-being when submitted to the experiments. Rats anesthetized with protocol (1) ACXT remained 46 minutes in surgical anesthetic plane, while anesthetized rats with protocol (2) ACXMe remained 1 hour and 3 minutes in surgical anesthetic plane. Rats anesthetized with protocol (3) ACMiMe had a mortality rate of 75% (6/8). In protocol ACXT and ACXMe, all reached surgical anesthetic plane, adequate analgesia and no death (0/16). Protocols ACXT and ACXMe refined the anesthetic protocols used in laboratory rats, humanizing procedures and emphasizing well-being.

Keywords: ketamine; acepromazine; tramadol; xylazine; methadone; well-being.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Doses (mg/kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório.....	22
Tabela 2 Valores fisiológicos de ratos Wistar, machos, adultos jovens.....	23
Tabela 3 Doses e efeitos de um fármaco isolado ou de associações anestésicas em ratos, por aplicação intraperitoneal (IP) coletadas de publicações.....	24
Tabela 4 Dados estatísticos de frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corporal e concentração de dióxido de carbono durante o período de anestesia cirúrgica em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	36
Tabela 5 Resultados estatísticos da ANOVA de uma via no tempo de indução e perda de reflexos, período de anestesia não cirúrgica, período de analgesia, período de recuperação e período de anestesia cirúrgica em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	39
Tabela 6 Período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda ou retorno dos reflexos em ratos submetidos à aplicação de diferentes associações anestésicas.....	41
Tabela 7 Comparativo entre as doses utilizadas nos protocolos deste estudo (protoc. 1, protoc. 2 e protoc. 3) em relação aos protocolos XKA, XKMe e XKT, utilizados por Laporte (2017).....	42
Tabela 8 Comparativo entre a ordem em que os ratos foram anestesiados em relação a velocidade da perda de todos os reflexos e o retorno de um dos reflexos em cada rato submetidos a diferentes associações anestésicas.....	44
Tabela 9 Comparação dos sinais clínicos, reflexos e taxa de mortalidade em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características esperadas de cada fármaco após sua aplicação via intraperitoneal em ratos.....	19
Figura 2	Animais preparados para o início do experimento.	25
Figura 3	Ratos posicionados individualmente, em decúbito lateral.....	26
Figura 4	Posicionamento dos ratos sobre a bancada com isolamento térmico.....	28
Figura 5	Pinça tipo Kelly reta, 16 cm, com ranhuras transversais das pontas encapadas com borracha tubular de 5 mm, utilizada para avaliar o reflexo podal de retirada e o reflexo de retirada da cauda.	30
Figura 6	Variação da frequência cardíaca durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	31
Figura 7	Variação da frequência respiratória durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	32
Figura 8	Variação da temperatura corporal durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	33
Figura 9	Variação da concentração de dióxido de carbono no final da expiração (ETCO ₂) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	34
Figura 10	Variação da frequência de pulso (FP) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	35
Figura 11	Variação da pressão arterial média não-invasiva (PAM) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.	35
Figura 12	Período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda de todos os reflexos (período de indução e período de anestesia não cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	37
Figura 13	Período de tempo entre a perda de todos os reflexos e o retorno do primeiro reflexo (período de anestesia cirúrgica) para cada protocolo (com	

desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	37
Figura 14 Tempo de analgesia (período de analgesia) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	38
Figura 15 Período de tempo entre o retorno do primeiro reflexo até o retorno da habilidade de caminhar (período de recuperação) de cada protocolo em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	38
Figura 16 Comparativo entre XKA com ACXT (protocolo 1), e XKMe com ACXMe (protocolo 2); os dois melhores protocolos deste estudo (ACXT e ACXMe) e os dois melhores protocolos utilizados por LAPORTE (2017) (XKA e XKMe) em relação ao período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda de todos os reflexos (período de indução e período de anestesia não cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	43
Figura 17 Comparativo entre XKA com ACXT (protocolo 1), e XKMe com ACXMe (protocolo 2); os dois melhores protocolos deste estudo (ACXT e ACXMe) e os dois melhores protocolos utilizados por Laporte (2017) (XKA e XKMe) em relação ao período de tempo entre a perda de todos os reflexos e a recuperação do primeiro reflexo (período de anestesia cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Conceitos	14
1.2 Vantagens e desvantagens dos tipos de anestesia	16
1.3 Fármacos empregados em procedimentos para anestesia em ratos.....	17
1.4 Variabilidade de resultados em machos	19
1.5 Bem-estar animal	20
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Projeto piloto	21
2.2 Animais	22
2.3 Comissão de ética.....	23
2.4 Protocolos anestésicos	23
2.5 Procedimento anestésico.....	24
2.5.1 Preparação	24
2.5.2 Prevenção da hipotermia	26
2.5.3 Registro de dados.....	27
2.5.4 Avaliação	28
2.6 Análise estatística	29
3 RESULTADOS.....	31
3.1 Parâmetros fisiológicos	31
3.2 Sinais clínicos, reflexos e tempos da anestesia.....	36
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÕES	49
APÊNDICE A – Projeto piloto.....	50
APÊNDICE B – Controle de parâmetros	51
APÊNDICE C – Ficha de controle de anestesia.....	52
APÊNDICE D – Protocolo do Projeto CEUA	53
APÊNDICE E – Autorização de uso de dados publicados	54
6 REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceitos

Um dos primeiros estudiosos a respeito dos direitos dos animais, Jeremy Bentham, em sua obra “Uma introdução aos princípios da moral e da legislação”, afirma que o problema não consiste em saber se os animais podem raciocinar, mas se podem sofrer (CAMPOS e LEME, 2018).

No Brasil, a primeira lei estabelecendo as normas para práticas didático-científicas da vivissecção de animais surgiu em 8 de maio de 1979 (Lei nº 6.638/1979), e a Lei nº 11.794/2008, criada posteriormente e regulamentada em 15 de junho de 2009, permanece até os dias de hoje (LAMOUNIER, 2015).

A Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979, e dá outras providências. No artigo 14, o animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). E no parágrafo 4º, o número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento (BRASIL, 2018).

O principal papel do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) é avaliar as decisões que envolvem animais em experimentos. Além do aspecto defensivo, cabe ao comitê zelar pela pesquisa científica, orientando os pesquisadores sobre os diversos tipos de protocolos existentes, de modo que a pesquisa possa atingir seus objetivos sem violar os direitos dos animais (FEIJÓ, 2006).

A analgesia reduz alterações centrais quando opioides são administrados isoladamente ou associados antes da incisão cirúrgica, havendo diminuição da intensidade da dor pós-operatória (OLIVEIRA, SAKATA, *et al.*, 2004).

A anestesia geral promove diminuição da transmissão de impulsos dolorosos periféricos para o sistema nervoso central, porém não é capaz de inibi-los totalmente (KATZ, 2001). Os estímulos nociceptivos provocam sensibilização central, aumentando a intensidade da dor (KATZ e MCCARTNEY, 2002).

A analgesia preemptiva bloqueia ou reduz a sensibilização central e a dor patológica (MCQUAY, 2009).

Para uma abordagem analgésica preemptiva correta, é fundamental a verificação da eficácia analgésica de um tratamento e a sua duração no período pós-operatório inicial (KISSIN, 2002).

Ratos submetidos a treinos de alta intensidade demonstraram aumento significativo no limiar de hipernocicepção, redução na massa corporal, bem como hipertrofia das glândulas adrenais e coração e aumento dos rins (LANA, PAULINO e GONÇALVES, 2006). Estresse pré e pós-operatório aplicados em ratos submetidos à exodontia demonstraram que há retardo na cronologia do processo de reparo alveolar (ALVES e OKAMOTO, 1989). Exercício físico crônico prévio a um estado de estresse agudo induzidos em ratos alterou a contagem de leucócitos do sangue e a função fagocítica de macrófagos alveolares (NASCIMENTO, CAVALCANTE, *et al.*, 2004), comprovando que a dor pode interferir no resultado final em um experimento.

Inúmeras pesquisas são realizadas em animais de experimentação. O bem-estar destes animais é regido atualmente por rigorosas normas de manipulação. O emprego de técnicas anestésicas é fundamental para que interfira o mínimo possível no experimento a ser realizado, além de conferir contenção química, hipnose e analgesia (FANTONI, 2004). O rato de laboratório é uma das espécies animais mais comumente utilizadas em investigação (ALBRECHT, HENKE, *et al.*, 2014). Os anestésicos atualmente utilizados, como a cetamina e a tiletamina, podem afetar de forma diferente uma série de parâmetros fisiológicos: glicose, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, AST e ALT. Seus efeitos foram amplamente estudados, em particular, a influência de moléculas anestésicas em parâmetros bioquímicos plasmáticos em ratos (BOUGHERARA e BOUAZIZ, 2014). A técnica anestésica utilizada deve ser a combinada, na qual o equilíbrio anestésico minimiza a interferência causada pelos fármacos na fisiologia animal, provendo recuperação suave, rápida e livre de dor (RIVERA, 2002). Além dos requisitos para realizar os estudos de forma mais eficiente possível, os procedimentos devem ser refinados a fim de minimizar dor, sofrimento e número de animais na pesquisa (FLECKNELL,

2016).

1.2 Vantagens e desvantagens dos tipos de anestesia

A anestesia é a perda da sensação local ou em todo organismo. Atinge diversos graus de ação de acordo com cada fármaco utilizado. Assim, é dividida de acordo com o objetivo a ser atingido.

A tranquilização mantém o indivíduo relaxado e consciente do entorno. A sedação leva o indivíduo à sonolência, desconectado do entorno. A hipnose é o sono artificial. A narcose confere sedação profunda, com ou sem hipnose. A catalepsia tem como característica principal a rigidez maleável, não respondendo a estímulos. A analgesia é ausência de estímulo doloroso. A neuroleptoanalgesia é hipnose com analgesia. A anestesia local é analgesia limitada a uma área, e anestesia regional é limitada a uma zona. De um modo geral, para o uso de ratos em experimento, estas modalidades não têm vantagens.

Para que se consiga a imobilidade ideal ao anestesiar ratos para experimentos, deve-se utilizar a anestesia geral, levando à perda total da consciência. A anestesia geral é dividida em anestesia cirúrgica, que é o conjunto de imobilização, perda de consciência, insensibilidade, relaxamento muscular e analgesia; e anestesia dissociativa, cujo conjunto é catalepsia, analgesia e alteração da consciência.

A anestesia geral cirúrgica tem todas as características, que, somadas, fornecem uma anestesia ideal. Na anestesia dissociativa, na qual normalmente utiliza-se apenas a associação xilazina e cetamina, tem-se características que não fornecem uma boa anestesia, já que uma anestesia dissociativa não é uma anestesia cirúrgica.

Apesar de existirem protocolos mais modernos, ainda se utiliza xilazina e cetamina como rotina.

Na atualidade, não se admite que se realizem procedimentos cirúrgicos sem a presença de analgésicos opioides. Apesar da xilazina possuir discreta analgesia visceral e a cetamina analgesia somática, estes fármacos não suportam

cirurgias extensas nem abertura de cavidade, tornando-a antiética, além de predispor à dor crônica. A cetamina, assim como a xilazina, é um fármaco hipertensor, levando a danos principalmente nos rins e na retina. Além disso, ao promoverem vasoconstrição, levam a alterações no miocárdio e respiratória, diminuindo as trocas gasosas (GEHRCKE, TREIN e MASSONE, 2017).

1.3 Fármacos empregados em procedimentos para anestesia em ratos

Com relação aos estudos relacionados aos fármacos para anestesia em ratos, as referências são mais antigas, e as atualizações mais recentes não foram encontradas devido, principalmente, ao fato de não surgirem novas descobertas em relação a este tema.

As associações anestésicas são compostas pela mistura de dois ou três fármacos, pois um único agente não pode produzir todos os efeitos que se procuram numa boa anestesia (ARRAS, AUTENRIED, *et al.*, 2001). Apesar dos pequenos roedores compreenderem aproximadamente 85% de todos os animais utilizados em pesquisa, há poucas informações disponíveis sobre o uso atual de anestesia e analgesia em animais de laboratório após cirurgia ou em outros procedimentos potencialmente dolorosos (RICHARDSON e FLECKNELL, 2005). Ademais, a informação científica sobre protocolos anestésicos utilizados em roedores de laboratório que incluam a combinação desses anestésicos com opioides ainda é muito limitada, apesar de apresentar vantagens pela redução de dose requerida dos anestésicos para atingir uma anestesia cirúrgica e diminuir a necessidade de analgésicos pós-operatórios (HEDENQVIST, ROUGHAN e FLECKNELL, 1999).

A acepromazina (fenotiazínico) confere sedação (que pode prolongar no período pós-anestésico), potencializa a ação dos anestésicos hipnóticos e analgésicos opioides, causa hipotensão moderada, causa depressão na regulação da temperatura e não tem ação analgésica (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980).

O midazolam (benzodiazepínico) confere sedação marcada em roedores, potencializa a ação da maioria dos analgésicos, produz relaxamento muscular e seu efeito hipnótico é mínimo (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980).

A xilazina (agonista alfa-2-adrenérgico) é um sedativo potente, produz analgesia de leve a moderada, potencializa a maioria dos anestésicos, produz depressão cardiovascular e respiratória (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980), produz arritmia cardíaca, hiperglicemia (SAHA, XIA, *et al.*, 2005) e diurese (GREENE e THURMON, 1988).

A metadona e o tramadol (opioides) produzem sedação moderada, analgesia profunda, e podem produzir depressão respiratória (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980).

A cetamina empregada sozinha tem limitações severas na maioria das espécies, mas em combinação é um fármaco valioso (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980). A cetamina (agente dissociativo) produz imobilidade, depressão respiratória moderada, aumenta a pressão arterial e o tônus muscular esquelético, produz recuperação prolongada e um estado de sedação cataléptica com aparente falta de consciência (WHITE, WAY e TREVOR, 1982), deprime o reflexo da piscadela da córnea e mantém os reflexos laríngeos e faríngeos. Seus efeitos em roedores são variáveis e podem ser necessárias altas taxas de dose para a imobilização (GREEN, KNIGHT, *et al.*, 1980).

As associações dos fármacos nos três protocolos foram escolhidas baseadas nas características de cada fármaco, como estão representadas na Figura 1.

Foram formulados três protocolos: (1) ACXT – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), xilazina (2,5 mg/kg) e tramadol (10 mg/kg); (2) ACXMe – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), xilazina (2,5 mg/kg) e metadona (0,5 mg/kg); e (3) ACMiMe – acepromazina (2 mg/kg), cetamina (100 mg/kg), midazolam (5 mg/kg) e metadona (5 mg/kg).

O protocolo 1 (ACXT) tem como característica sedação e anestesia acentuadas. O protocolo 2 (ACXMe) tem como característica sedação, anestesia e analgesia acentuadas. E, finalmente, o protocolo 3 (ACMiMe) tem como característica anestesia, analgesia e relaxamento muscular acentuados.

Figura 1 Características esperadas de cada fármaco após sua aplicação via intraperitoneal em ratos.

	A	X	T	Me	Mi	C
Sedação	↓	↑	↓	↓	↓	
Analgesia		↓	↓	↑		↓
Relaxamento muscular					↑	↓
Anestesia						↑
Hipnose						↓
Potencialização	↑				↑	
Pressão arterial	↓					↑
Temperatura corporal	↓					
Depressão cardiovascular		↑				
Depressão respiratória	↑	↑	↑	↑		↑

A – acepromazina; X – xilazina; T – tramadol; Me – metadona; Mi – Midazolam; C – cetamina; ↑ – acentuada; ↓ – leve; ↑ – aumenta; ↓ – diminui.

1.4 Variabilidade de resultados em machos

A maioria dos estudos realizados com machos e fêmeas demonstrou maior variabilidade de resultados em machos. A distribuição a uma massa corporal magra maior e um metabolismo mais rápido nos machos pode explicar a necessidade de suplementação anestésica em machos, mas não nas fêmeas (ZAMBRICKI e D'ALECY, 2004). Segundo Laporte (2017), alguns ratos machos acordavam antes de terminar o teste, e em todas as associações com opioides os ratos machos acordavam antes de terminar os intervalos de tempo. Para os demais parâmetros, não foram observadas diferenças estatísticas entre os sexos (ALONSO, POMPERMAYER, *et al.*, 2006).

1.5 Bem-estar animal

O bem-estar animal é um pré-requisito para resultados experimentais mais realísticos, portanto devem ser usados procedimentos que reduzam o sofrimento dos animais e melhorem o seu bem-estar (DAMY, CAMARGO, *et al.*, 2010). No âmbito da pesquisa, é vantajoso promover o alívio da dor, pois o animal com dor sofre alterações patofisiológicas que podem influenciar os resultados dos experimentos (BARROS, 2014).

É também importante diminuir a taxa de mortalidade anestésica em experimentos como reportados por diversos pesquisadores: Gomes, Serigolle, *et al.* (2014) mencionaram que “2 ratos em 5 não se recuperaram da anestesia”, Netto, Gaia, *et al.* (2010) mencionaram que “5 ratos em 30 morreram provavelmente devido aos efeitos da anestesia”, Oliveira, Oliveira Junior, *et al.* (2003) mencionaram que “3 dos 35 ratos morreram na indução anestésica”, e Carvalho (2002) disse que “4,17% morreram durante procedimento anestésico”.

Anestésicos injetáveis são amplamente utilizados em animais de laboratório, por uma série de razões, como a facilidade na administração, menos riscos ocupacionais aos pesquisadores (FLECKNELL, 2016) e facilidade na manutenção de vários animais anestesiados ao mesmo tempo (FISH, BROWN, *et al.*, 2008). Há uma relutância em refinar metodologias anestésicas, porque acredita-se que os anestésicos usados na nova técnica poderão afetar o modelo animal escolhido e o período do pós-cirúrgico (NEVES, MANCINI FILHO e MENEZES, 2013).

A anestesia geral produz perda da consciência, mas o animal continua recebendo e processando os estímulos dolorosos. Assim, se o procedimento for invasivo e/ou causar dor, deve-se associá-lo com analgésicos. A anestesia cirúrgica é obtida quando os reflexos e o tônus muscular normal são perdidos (segundo o CONCEA). Portanto, é necessário buscar protocolos com diversos fármacos com o objetivo de atingir as características do plano de anestesia cirúrgica.

Ainda não foram realizados estudos com protocolos associando 4 fármacos na anestesia em ratos. É importante avaliar a dor intraoperatória e durante a recuperação da anestesia (ZUBIETA, SMITH, *et al.*, 2001) (JOURDAN, CHAPUY, *et al.*, 1998) (MICZEK e VIVIAN, 1998).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Projeto piloto

O Projeto piloto é um recurso fundamental para análise do planejamento e dos procedimentos que foram adotados. Trata-se de um instrumento capaz de reproduzir eficazmente e em escala reduzida parte significativa dos meios que foram encontrados no momento definitivo de coleta de dados (SILVA e OLIVEIRA, 2015).

Baseado em um estudo prévio realizado em nosso laboratório (dados não publicados) com oito protocolos anestésicos que consistiram em combinações anestésicas dissociativas com analgésicos e/ou relaxantes musculares, foram comparados quanto à sua eficácia e segurança (plano de anestesia cirúrgica e taxa de mortalidade), monitorando frequência cardíaca, frequência respiratória, frequência de pulso, pressão arterial, temperatura corporal, capnografia, perdas de reflexos de coordenação e ataxia, de endireitamento, palpebral, de retirada de cauda e podal, e retorno dos reflexos palpebral, de retirada de cauda, podal, de movimento de cabeça, de endireitamento e da habilidade para caminhar (APÊNDICE A – Projeto piloto).

Os resultados observados nos oito protocolos do projeto piloto determinaram as doses dos protocolos anestésicos utilizados neste estudo, conforme consta no Tabela 1.

Tabela 1 Doses (mg/kg) dos fármacos utilizados nas diferentes associações anestésicas em ratos de laboratório.

	Associações anestésicas		
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
		ACXT	ACXMe
Acepromazina	2 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Cetamina	100 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg
Metadona		0,5 mg/kg	5 mg/kg
Midazolam			5 mg/kg
Tramadol	10 mg/kg		
Xilazina	2,5 mg/kg	2,5 mg/kg	

Acepromazina (Acepran® 0,2% - Vettinil, 2mg/ml, SP, Brasil), cetamina (Dopalen® - Ceva, 100mg/ml, SP, Brasil), metadona (Mytedom® - Cristália, 10mg/ml, SP, Brasil), midazolam (Dormium® - União Química, 5 mg/ml, MG, Brasil), tramadol (Tramadon® - Cristália, 50mg/ml, SP, Brasil), xilazina (Anasedan® - Ceva, 20mg/ml, SP, Brasil).

2.2 Animais

Foram utilizados 32 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, de 8 a 12 semanas, de padrão sanitário S.P.F. (*Specific Pathogen Free*). Estes ratos foram obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Cada grupo de ratos foi dividido em grupos de quatro animais, que foram alojados em gaiolas de polipropileno com cama de sabugo de milho, trocadas duas vezes 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.

2.3 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 (APÊNDICE D – Protocolo do Projeto CEUA). As condições de alojamento e manejo dos animais estão de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do NRC (2011).

2.4 Protocolos anestésicos

Os parâmetros fisiológicos foram baseados em valores já estabelecidos (SEABRA, POMPEU e VALENTI, 2017), utilizados nos meios científicos (SANTOS, SOUZA, *et al.*, 2010) como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 Valores fisiológicos de ratos Wistar, machos, adultos jovens.

Peso (g)	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)	PAD (mmHg)	T (°C)	FR (rpm)	FC (bpm)
300 a 500	138 a 146	106 a 108	87 a 91	38,0	70 a 115	250 a 350

PAS – pressão arterial sistólica; PAM – pressão arterial média; PAD – pressão arterial diastólica; T – temperatura; FR – frequência respiratória; FC – frequência cardíaca.

Os protocolos foram formulados com base em associações já estabelecidas (FLECKNELL, 2016) e utilizadas nos meios científicos (GAERTNER, HALLMAN, *et al.*, 2008), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 Doses e efeitos de um fármaco isolado ou de associações anestésicas em ratos por aplicação intraperitoneal (IP) coletadas de publicações.

Fármaco ou associação	Dose (mg/kg)	Efeito esperado
Acepromazina	0,5 a 2,5	SL
Cetamina	22	SL
Cetamina	25 a 100	SA, Imob, AM
Cetamina + acepromazina	75 + 2,5	ANC
Cetamina + midazolam	75 + 5	ANC
Cetamina + xilazina	75 a 95 + 5	AC
Cetamina + xilazina + acepromazina	100 + 2,5 + 2,5	AC
Cetamina + xilazina + midazolam	75 + 3 + 3	ANC, Imob
Metadona	0,5 a 3	AA
Midazolam	1 a 5	SL
Tramadol	5	AM
Xilazina	1 a 5	SA, AM

SL – sedação leve; SA – sedação acentuada; AM – analgesia moderada; AA – analgesia acentuada; ANC – anestesia não cirúrgica; AC – anestesia cirúrgica; Imob – immobilização.

2.5 Procedimento anestésico

2.5.1 Preparação

Os três melhores resultados observados no projeto piloto foram selecionados: o protocolo 1 (ACXT), o protocolo 2 (ACXMe) e o protocolo 3 (ACMiMe) foram testados em oito animais, com as mesmas doses utilizadas no projeto piloto. Todos os animais foram previamente pesados para determinar a dose exata de cada fármaco. 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 14:00 e as 18:00 horas (

Figura 2).

Figura 2 Animais preparados para o início do experimento.



Foto: arquivo pessoal.

Os anestésicos foram colocados em um tubo de plástico cônic (Eppendorf®, SP, Brasil), onde foram misturados antes de serem administrados com uma injeção via intraperitoneal (IP) para reduzir o estresse dos animais pela manipulação excessiva. Devido à alta taxa metabólica do rato, certos medicamentos, como a cetamina, precisam de doses elevadas para atingir o estado de inconsciência, e este grande volume, se for aplicado via intramuscular, pode causar lesões. Por outro lado, o pequeno tamanho do animal dificulta o acesso venoso, justificando o emprego da via intraperitoneal (BEDENDO, DOBLER, *et al.*, 2017). A injeção foi feita com uma agulha 26 G em um ângulo de 45°. A administração intraperitoneal foi feita no quadrante abdominal inferior esquerdo (do aplicador) e o posicionamento do animal em decúbito dorsal (FLECNELL, RICHARDSON e POPOVIC, 2007).

2.5.2 Prevenção da hipotermia

Logo após a administração da anestesia, os ratos foram colocados isolados em uma gaiola. Quando perdião o reflexo de endireitamento (reflexo que corrige a orientação do corpo quando é retirado de sua posição normal), eram posicionados em decúbito lateral.

Foram observadas em experimentos anteriores necrose de ponta de orelha e queimadura em áreas de contato com o uso de colchão térmico. Assim, para evitar estas lesões, o colchão térmico não foi utilizado.

Para evitar a perda de temperatura corporal dos ratos, o colchão foi substituído pela maravalha, em caixa de polipropileno, e isolado da bancada de inox com uma prancha plástica. A temperatura ambiente foi mantida entre 22 e 24 °C (Figura 3).

Figura 3 Ratos posicionados individualmente, em decúbito lateral.

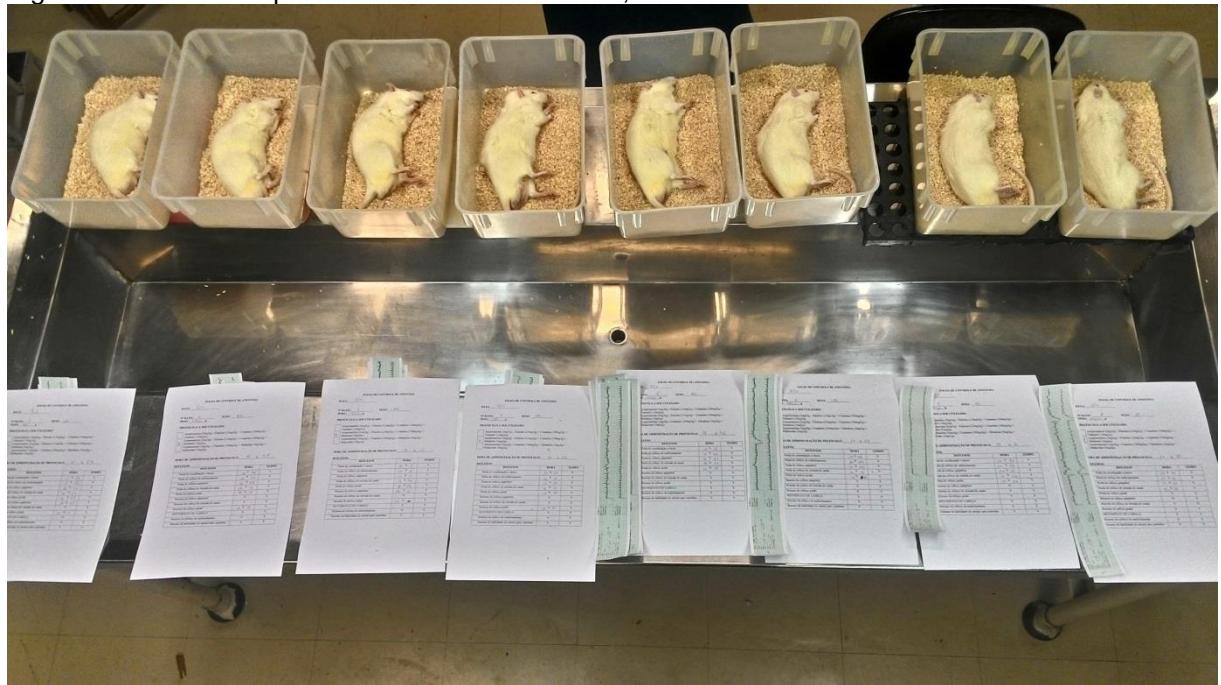


Foto: arquivo pessoal.

2.5.3 Registro de dados

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 de pelo menos um deles, (4) recuperação – período compreendido entre a recuperação do primeiro reflexo e a habilidade de caminhar. Também foi mensurado o tempo total de duração da anestesia – período compreendido entre a administração da associação anestésica até a recuperação da habilidade de caminhar (LAPORTE, 2017).

Depois do período de indução, cada rato foi colocado individualmente em monitor multiparamétrico (SDAMONITOR 12 – SDAMed, SP, Brasil e CODA – Kent Scientific, SP, Brasil) e os parâmetros fisiológicos e reflexos foram mensurados a cada 10 minutos até o momento em que fizeram o primeiro movimento voluntário de cabeça.

Eletrocardiografia, temperatura, respiração e concentração de dióxido de carbono no final da expiração foram impressos em tempo real, enquanto que os dados de pressão arterial e frequência de pulso foram salvos no software do CODA. A análise da frequência cardíaca foi determinada pela impressão do traçado do eletrocardiograma de cinco vias, com precisão de medição de -0,8 mV a 0,8 mV, e calculada através da divisão de 1500 pelo número de milímetros entre 2 complexos QRS (intervalo R-R). A frequência respiratória e a concentração de dióxido de carbono no final da expiração foram determinadas pelo capnógrafo do monitor com precisão de medição de 2 mmHg e por contagem direta, observando os movimentos torácicos ou abdominais. A temperatura corporal foi monitorada utilizando um termômetro retal do monitor com precisão de $\pm 0,1$ °C (Figura 4).

Figura 4 Posicionamento dos ratos sobre a bancada com isolamento térmico.

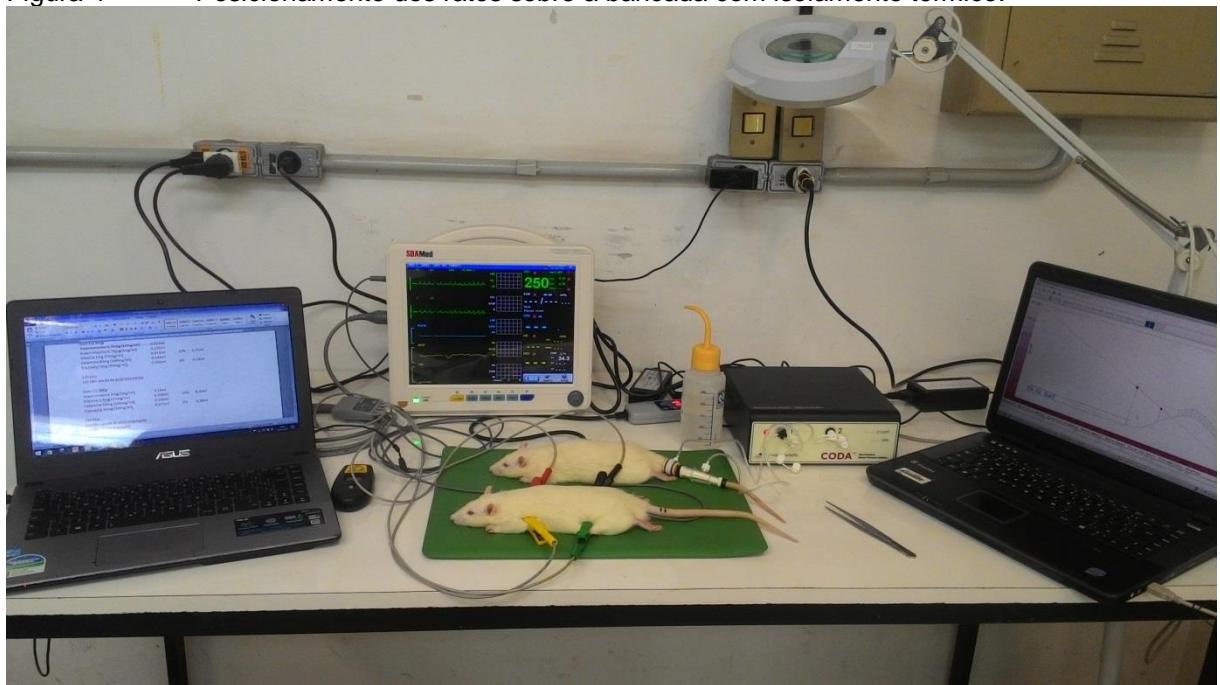


Foto: arquivo pessoal.

Foram utilizadas duas fichas de controle. Na ficha “Controle de parâmetros físicos anestésicos” (APÊNDICE B – Controle de parâmetros) foram anotadas a temperatura, as frequências cardíaca, de pulso e respiratória, a concentração de dióxido de carbono no final da expiração e a pressão arterial de cada rato, em cada protocolo, a cada 10 minutos. A ficha “Controle de anestesia” (APÊNDICE C – Ficha de controle de anestesia) foi utilizada para anotar as perdas e retornos de cada reflexo durante o procedimento anestésico, além dos dados de identificação, peso, data e protocolo utilizado.

2.5.4 Avaliação

Como em ratos, a monitorização para analisar os estágios da anestesia é difícil, já que a transição de um estágio para outro é sutil e breve, e são usadas para esta espécie as reações do sistema neuromuscular. O pinçamento do dedo e a análise da frequência respiratória são apropriados para avaliar o grau de anestesia.

O movimento das vibrissas e das orelhas em resposta ao sopro indicará sedação mínima; a não retração de uma pata ou da cauda em resposta ao pinçamento indicará anestesia cirúrgica e a frequência respiratória abaixo de 60 respirações por minuto indicará uma depressão significativa do sistema nervoso central (SIROIS, 2007).

Os reflexos foram avaliados conforme a seguir: o reflexo podal de retirada por meio de uma compressão no dedo do membro posterior com uma pinça tipo Kelly reta, 16 cm, com as ranhuras transversais das pontas encapadas com borracha tubular de 5 mm (Figura 5), feito por uma única pessoa, pressionando até a primeira catraca da cremalheira; o reflexo palpebral por meio de um leve toque da pinça atraumática na margem da pálpebra; e o reflexo de retirada da cauda por meio de uma compressão na extremidade da cauda (FERRARI, TURRINI, *et al.*, 2005) com uma pinça tipo Kelly reta, 16 cm, com as ranhuras transversais das pontas encapadas com borracha tubular de 5 mm, feito por uma única pessoa, pressionando até a primeira catraca da cremalheira. Qualquer resposta negativa ou positiva ao estímulo foi classificada como perda ou retorno do reflexo, respectivamente.

2.6 Análise estatística

Na fase inicial do estudo, foi feito o planejamento da pesquisa, sendo definida a técnica da pesquisa dos dados primários, a necessidade do projeto piloto, a amostragem e os métodos de coleta de dados. A análise descritiva foi o método estatístico utilizado para organizar, descrever e comparar os aspectos importantes através de tabelas e gráficos. O planejamento amostral otimizou o tempo, minimizou o uso de animais e maximizou o bem-estar durante os experimentos.

Figura 5 Pinça tipo Kelly reta, 16 cm, com ranhuras transversais das pontas encapadas com borracha tubular de 5 mm, utilizada para avaliar o reflexo podal de retirada e o reflexo de retirada da cauda.

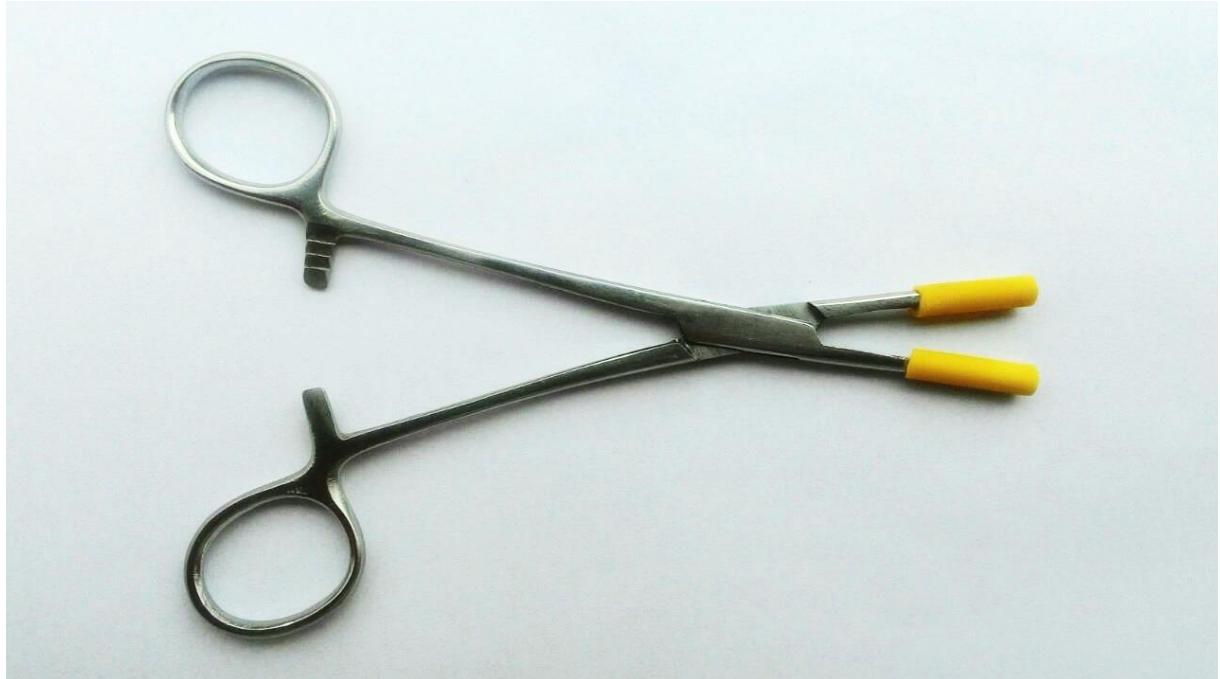


Foto: arquivo pessoal.

Foi utilizado o software *GraphPad Prism* para análise e construção dos gráficos, versão 5.03 *Prism 5 for Windows*, de 10 de dezembro de 2009.

Foi adotado o teste *One-way ANOVA* (análise de variância simples) para verificar diferenças entre as médias da resposta variável (períodos da anestesia) em relação a um tratamento com dois ou mais níveis categóricos (protocolos), e do pós-teste de comparação múltipla de Tukey.

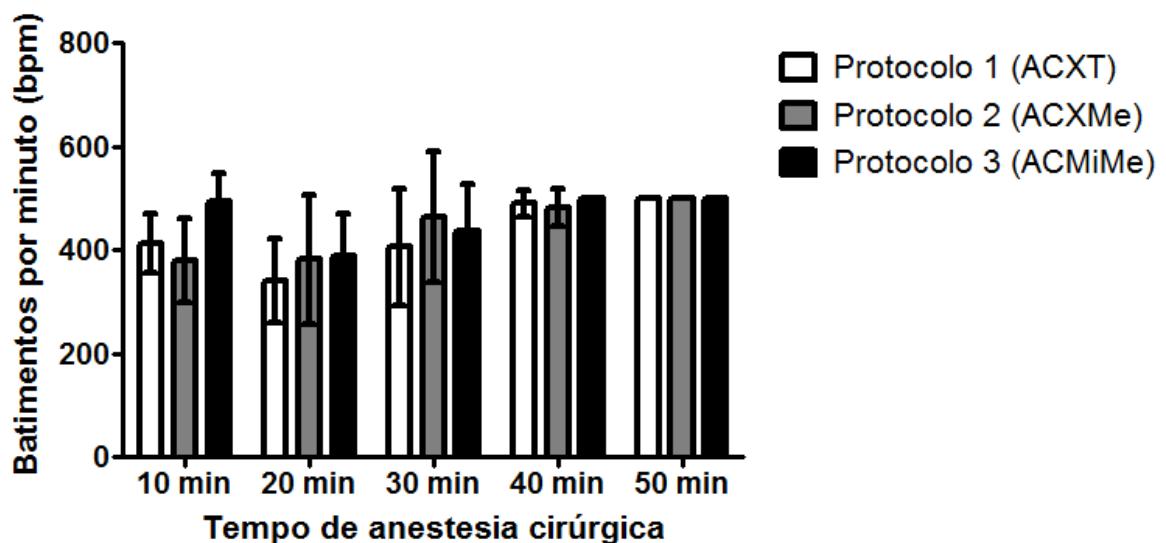
O teste *Two-way ANOVA* (análise de variância de dupla classificação), foi adotado para analisar a variável quantitativa pendente (parâmetro fisiológico) de outras variáveis qualitativas independentes (protocolos). Utilizaram-se três variáveis independentes de primeira ordem (protocolos 1 e 2, 1 e 3, e 2 e 3) e uma de segunda ordem (protocolos 1, 2 e 3) com medidas não repetidas.

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros fisiológicos

Considerando as três associações anestésicas, a frequência cardíaca média variou de 340 batimentos por minuto (bpm), utilizando o protocolo 1 (ACXT) aos 20 minutos, até 500 bpm no protocolo 3 (ACMiMe) a partir dos 40 minutos e nos protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe) aos 50 minutos. Não houve significância estatística no teste de comparação da frequência cardíaca entre os protocolos ($P = 0,6516$), porém o tempo afeta o resultado. O tempo foi responsável por 16,23% da variância total. O efeito é considerado muito significativo ($P = 0,0060$) como observado na Figura 6. Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 4.

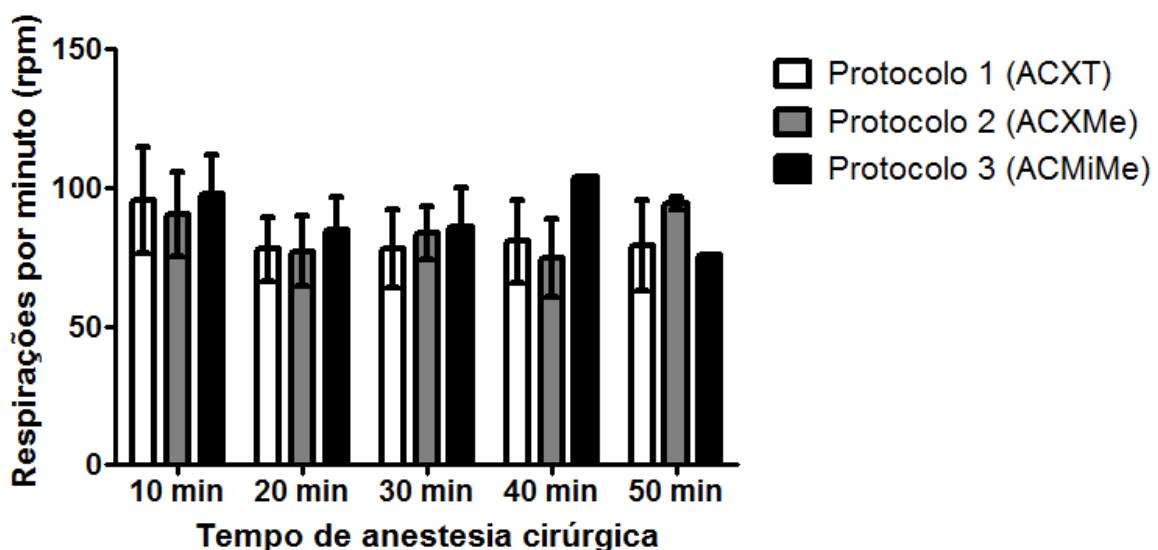
Figura 6 Variação da frequência cardíaca durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. Valor de referência: 250 a 350 bpm.

Entre os três protocolos, a frequência respiratória média foi de 75 respirações por minuto (rpm) no protocolo 2 (ACXMe) aos 40 minutos até 104 rpm aos 40 minutos no protocolo 3 (ACMiMe). Não houve significância estatística no teste de comparação da frequência respiratória entre os protocolos ($P = 0,4218$). Mas o fator tempo afetou o resultado. O tempo foi responsável por 14,58% da variância total. O efeito é considerado muito significativo ($P = 0,0155$), como observado na Figura 7. A análise dentro de cada protocolo mostrou no protocolo 1 (ACXT) aumento da frequência cardíaca aos 40 (P < 0,01) e 50 (P < 0,05) minutos em relação aos 20 minutos. Nos demais protocolos não foram observadas diferenças significativas entre os vários momentos de observação. Na análise do perfil total dos protocolos, notou-se diferenças entre os protocolos 2 (ACXMe) e 3 (ACMiMe) devido ao aumento da frequência cardíaca nos primeiros 10 minutos de observação no protocolo 3 (ACMiMe). Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 4.

Figura 7 Variação da frequência respiratória durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



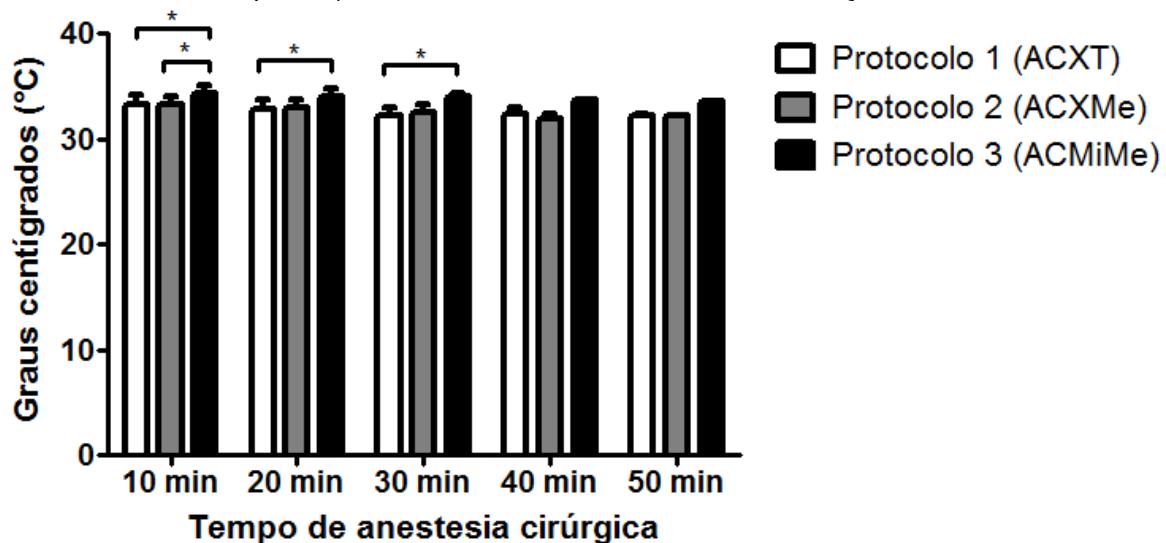
ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. Valor de referência: 70 a 115 rpm.

A temperatura corporal (T°C), a frequência cardíaca (FC), a frequência

respiratória (FR) e a concentração de dióxido de carbono no final da expiração (ETCO₂) foram mensuradas a cada 10 minutos.

Considerando todos os protocolos anestésicos, a temperatura corporal média oscilou de 32,0°C aos 40 minutos utilizando o protocolo 2 (ACXMe) até 34,3°C aos 10 minutos utilizando o protocolo 3 (ACMiMe). O fator protocolo afetou o resultado. O protocolo é responsável por 18,29% da variância total. No teste de comparação da temperatura corporal entre os protocolos, houve grande significância ($P = 0,0003$) quando comparados o protocolo 1 (ACXT) com protocolo 3 (ACMiMe) e o protocolo 2 (ACXMe) com protocolo 3 (ACMiMe). O efeito é considerado significativo ($P < 0,0001$). O fator tempo também afetou o resultado. O tempo foi responsável por 9,89% da variância total. O efeito é considerado significativo ($P = 0,0170$), como observado na Figura 8. Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 4.

Figura 8 Variação da temperatura corporal durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.

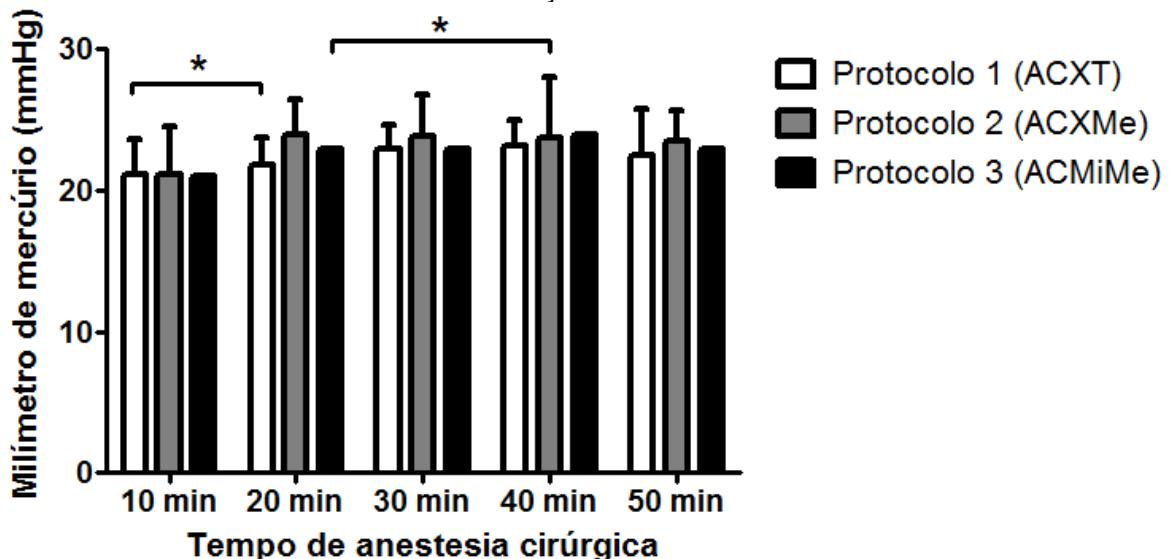


ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. Valor de referência: 38°C.

Nos três protocolos anestésicos, a concentração de dióxido de carbono no final da expiração oscilou de 21 mmHg em todos os protocolos, aos 10 minutos, até

24 mmHg no protocolo 2 (ACXMe) a partir dos 20 minutos, no protocolo 3 (ACMiMe) aos 40 minutos e no protocolo 1 (ACXT) aos 50 minutos. Não houve significância estatística no teste de comparação da frequência respiratória entre os protocolos ($P = 0,4153$). Entretanto, o fator tempo afetou o resultado. O tempo foi responsável por 17,95% da variância total. O efeito foi considerado muito significativo ($P = 0,0008$), como observado na Figura 9. Os dados da análise estatística estão apresentados na Tabela 4.

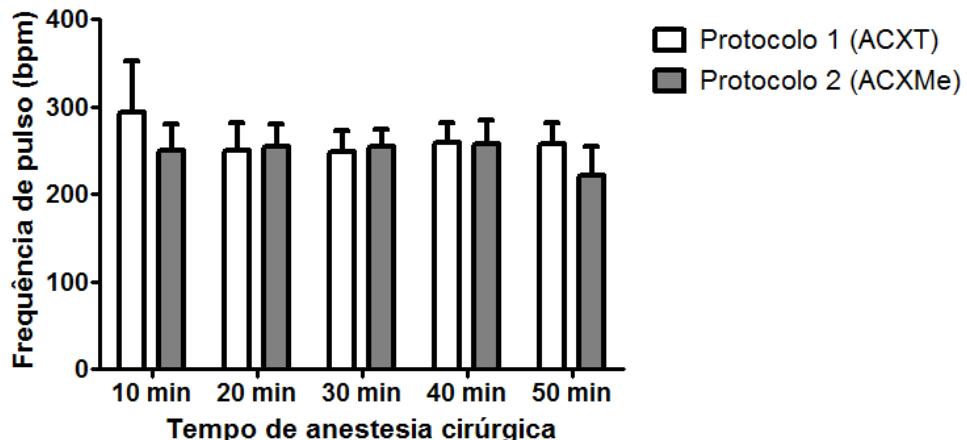
Figura 9 Variação da concentração de dióxido de carbono no final da expiração (ETCO₂) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. Valor de referência: 35 a 45 mmHg.

Nos protocolos anestésicos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe), a frequência de pulso oscilou de 169 bpm no protocolo 2 (ACXMe) aos 50 minutos até 432 bpm no protocolo 1 (ACXT) aos 10 minutos. Este parâmetro não foi mensurado no protocolo 3 (ACMiMe). Não houve significância estatística no teste de comparação da frequência de pulso entre os protocolos (Figura 10).

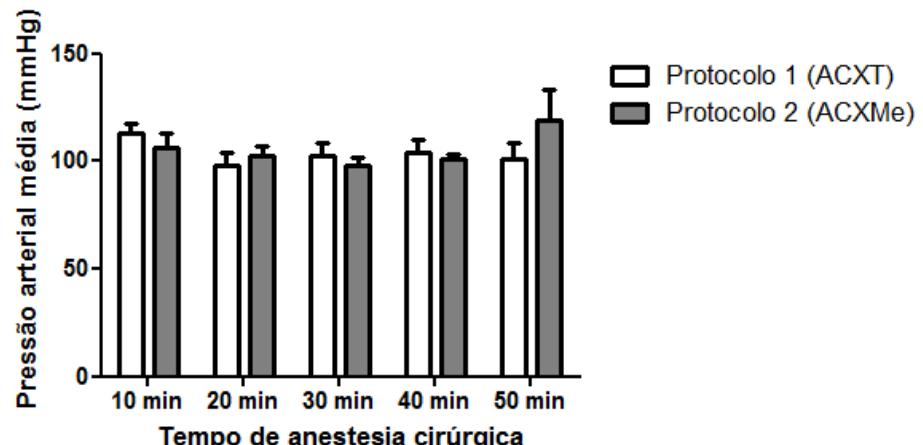
Figura 10 Variação da frequência de pulso (FP) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona. Valor de referência: 250 a 350 bpm.

Nos protocolos anestésicos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe), a pressão arterial média não-invasiva (PAM) oscilou de 74 mmHg no protocolo 1 (ACXT) aos 30 minutos até 151 mmHg no protocolo 2 (ACXMe) aos 50 minutos. Este parâmetro não foi mensurado no protocolo 3 (ACMiMe). Não houve significância estatística no teste de comparação da frequência de pulso entre os protocolos (Figura 11).

Figura 11 Variação da pressão arterial média não-invasiva (PAM) durante o período de anestesia cirúrgica (média e desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de duas vias e ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação ao tempo de observação. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona. Valor de referência 106 a 108 mmHg.

Tabela 4 Dados estatísticos de frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corporal e concentração de dióxido de carbono durante o período de anestesia cirúrgica em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.

Parâmetros		DF	F	P
FC	Interação	8,65	0,15	0,65
	Tempo	4,65	3,97	0,006
FR	Protocolo	2,65	0,58	0,56
	Interação	8,65	0,74	0,66
T	Tempo	4,65	3,32	0,02
	Protocolo	2,65	1,0	0,37
ETCO ₂	Interação	8,65	0,29	0,96
	Tempo	4,65	3,25	< 0,0001
	Protocolo	2,65	12,04	0,17
	Interação	8,65	0,35	0,94
	Tempo	4,65	5,21	0,0008
	Protocolo	2,65	1,33	0,27

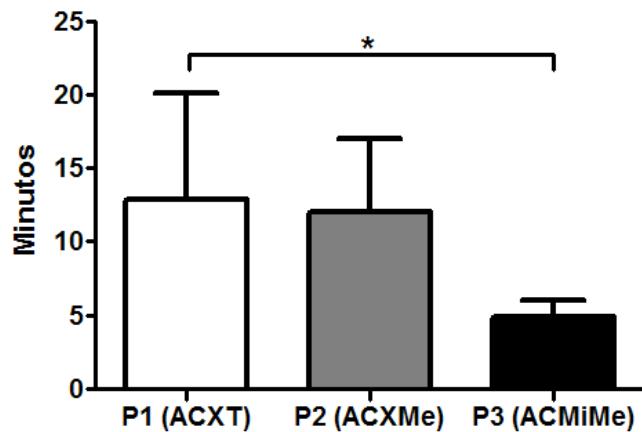
Resultados estatísticos da ANOVA de duas vias. FC – frequência cardíaca; FR – frequência respiratória; T – temperatura; ETCO₂ – concentração de dióxido de carbono no final da expiração; F – fator; P – probabilidade; DF – graus de liberdade.

3.2 Sinais clínicos, reflexos e tempos da anestesia

O tempo para os ratos entrarem em plano de anestesia cirúrgica variou de 5 minutos no protocolo 3 (ACMiMe) até 13 minutos no protocolo 1 (ACXT). O tempo de plano de anestesia cirúrgica variou entre 33 minutos no protocolo 3 (ACMiMe) e 1 hora e 3 minutos no protocolo 2 (ACXMe), tempo suficiente para a realização da maioria das cirurgias de rotina, como castrações. O tempo de analgesia baseada na perda de reflexo de retirada de cauda foi de 1 hora e 3 minutos no protocolo 3 (ACMiMe) a 5 horas e 56 minutos no protocolo 1 (ACXT), extrapolando o tempo de retorno da habilidade de caminhar.

O período de indução e o período de anestesia não cirúrgica mostraram significância ($P = 0,0255$) quando comparados o protocolo 1 (ACXT) com o protocolo 3 (ACMiMe), como mostra a Figura 12.

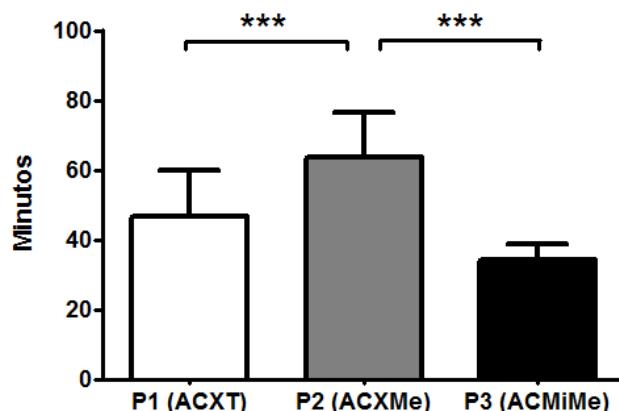
Figura 12 Período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda de todos os reflexos (período de indução e período de anestesia não cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. * $P < 0,05$.

O período de anestesia cirúrgica mostrou significância ($P = 0,0024$) comparando protocolo 1 (ACXT) com protocolo 2 (ACXMe), e comparando protocolo 2 (ACXMe) com protocolo 3 (ACMiMe), como mostra a Figura 13. Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 5.

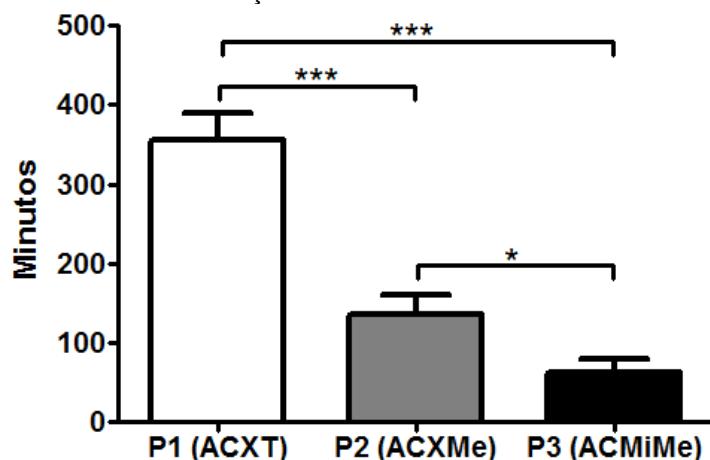
Figura 13 Período de tempo entre a perda de todos os reflexos e o retorno do primeiro reflexo (período de anestesia cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. *** $P < 0,001$.

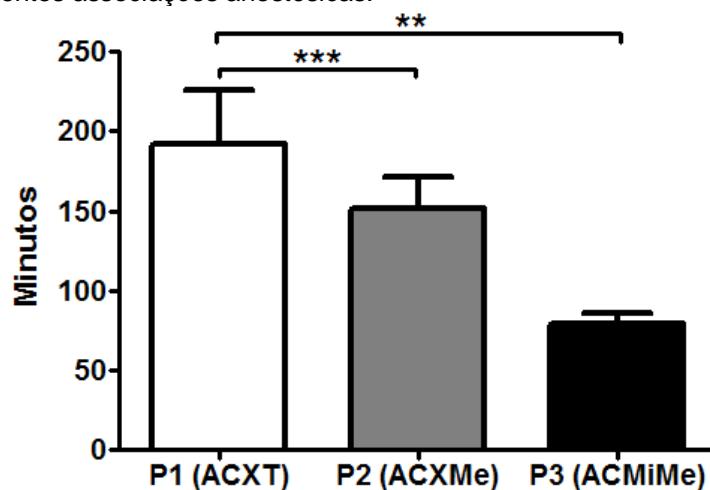
O período de analgesia mostrou grande significância ($P < 0,0001$), principalmente quando comparado protocolo 1 (ACXT) com protocolo 2 (ACXMe) e protocolo 1 (ACXT) com protocolo 3 (ACMiMe), como mostra a Figura 14. Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 5.

Figura 14 Tempo de analgesia (período de analgesia) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. * $p < 0,05$; *** $P < 0,001$.

Figura 15 Período de tempo entre o retorno do primeiro reflexo até o retorno da habilidade de caminhar (período de recuperação) de cada protocolo em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

O período de recuperação mostrou grande significância ($P = 0,0002$), principalmente quando comparado o protocolo 1 (ACXT) com o protocolo 2 (ACXMe), como mostra a Figura 15. Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Resultados estatísticos da ANOVA de uma via no tempo de indução e perda de reflexos, período de anestesia não cirúrgica, período de analgesia, período de recuperação e período de anestesia cirúrgica em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.

Parâmetro	DF	F	P
Tempo de indução e perda de reflexos	2,18	4,49	0,026
Período de anestesia não cirúrgica	2,19	206,40	0,0001
Período de analgesia	2,17	156,80	< 0,0001
Período de recuperação	2,17	15,77	0,0002
Período de anestesia cirúrgica	2,18	50,11	< 0,0001

F – fator; P – probabilidade; DF – graus de liberdade.

4 DISCUSSÃO

Segundo a *International Association for the Study of Pain*, “a dor é uma sensação desagradável e uma experiência emocional associada com um dano tecidual potencial ou real”. Os processos dolorosos acarretam uma série de alterações fisiológicas que interferem nos eixos neuroendócrinos, aumentando os níveis de aldosterona, cortisol (levando a hiperglicemia), catecolaminas (alterações cardíacas) e provocando alterações respiratórias. Por isso, experimentos que utilizem estes parâmetros podem ter os resultados alterados pela dor. Como os mecanismos da percepção da dor são semelhantes entre homem e animal (LAPCHIK, MATTARAIA e KO, 2010), excetuando-se experimentos nos quais a dor é um parâmetro avaliado, um pesquisador deve evitá-la a qualquer custo.

Os ratos anestesiados com o protocolo 1 (ACXT) entraram em anestesia aos 12 minutos e permaneceram por 46 minutos em plano de anestesia cirúrgica, e levaram 3 horas e 12 minutos para se recuperarem. Os ratos anestesiados com o protocolo 2 (ACXMe) entraram em anestesia aos 12 minutos e permaneceram por 1 hora e 3 minutos em plano de anestesia cirúrgica, e se recuperaram do procedimento anestésico em 3 horas e 12 minutos. Os ratos anestesiados com o protocolo 3 (ACMiMe) entraram em anestesia aos 4 minutos e permaneceram por 33 minutos em plano de anestesia cirúrgica, e se recuperaram do procedimento anestésico em 1 horas e 19 minutos (Tabela 6).

Laporte (2017) utilizou protocolos com três fármacos associados, nas mesmas condições replicadas neste experimento. Os quatro protocolos de Laporte (2017) foram: (1) XKA (xilazina 7,5 mg/kg, cetamina 60 mg/kg, acepromazina 2 mg/kg), (2) XKMe (xilazina 5 mg/kg, cetamina 60 mg/kg, metadona 5 mg/kg), (3) XKT (xilazina 7,5 mg/kg, cetamina 65 mg/kg, tramadol 5 mg/kg) e (4) XKMo (xilazina 7 mg/kg, cetamina 60 mg/kg, morfina 1 mg/kg). Os melhores protocolos foram XKA e XKMe. Os protocolos deste estudo foram comparados na tabela abaixo com os protocolos XKA, XKMe e XKT (Tabela 7).

Tabela 6 Período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda ou retorno dos reflexos em ratos submetidos à aplicação de diferentes associações anestésicas.

	Perdas e retornos dos reflexos após a aplicação		
	Protocolo 1 ACXT	Protocolo 2 ACXMe	Protocolo 3 ACMiMe
Perda de coordenação e ataxia	1 min	1 min	1 min
Perda de reflexo de endireitamento	2 min	2 min	2 min
Perda de reflexo palpebral	6 min	4 min	3 min
Perda de reflexo de retirada de cauda	8 min	6 min	3 min
Perda de reflexo podal	12 min	12 min	4 min
Retorno de reflexo palpebral	59 min	75 min	27 min
Retorno do reflexo podal	61 min	51 min	25 min
Movimento de cabeça	99 min	94 min	51 min
Retorno do reflexo de endireitamento	149 min	123 min	76 min
Retorno de reflexo de retirada de cauda	356 min	135 min	63 min
Retorno da habilidade para caminhar	192 min	151 min	79 min

Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam.

O protocolo XKA teve tempo médio de indução de 3 minutos e tempo médio de anestesia não cirúrgica de 11 minutos, enquanto que o protocolo XKMe teve tempo médio de indução de 3 minutos e tempo médio de anestesia não cirúrgica de 26 minutos (LAPORTE, 2017). O período de indução e o período de anestesia não cirúrgica mostrou grande significância ($P < 0,0001$). Quando comparado o par de colunas XKA com o protocolo 1 (ACXT), não apresentou diferença significante, mas quando comparado o par de colunas XKMe com o protocolo 2 (ACXMe), apresentou grande diferença significante. Na Figura 16, comparou-se estes dados com a média dos protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe). Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 7 Comparativo entre as doses utilizadas nos protocolos deste estudo (protoc. 1, protoc. 2 e protoc. 3) em relação aos protocolos XKA, XKMe e XKT, utilizados por Laporte (2017).

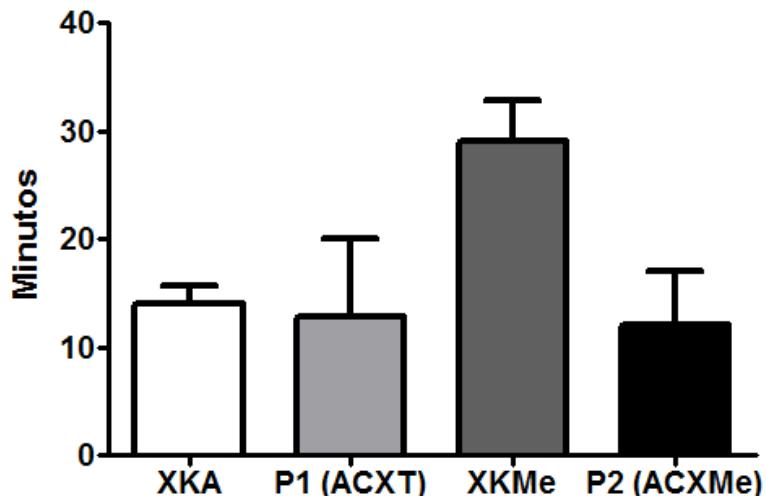
	Associações anestésicas (mg/kg)					
	Protoc. 1 ACXT	Protoc. 2 ACXMe	Protoc. 3 ACMiMe	XKA	XKMe	XKT
Acepromazina	2	2	2	2		
Cetamina	100	100	100	60	60	65
Metadona		5	5		5	
Midazolam			5			
Tramadol	10					5
Xilazina	2,5	2,5		7,5	5	7,5

Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam; XKA – xilazina, cetamina e acepromazina; XKMe – xilazina, cetamina e metadona; XKT – xilazina, cetamina e tramadol.

O protocolo XKA teve tempo médio de anestesia cirúrgica de 28 minutos, enquanto que o protocolo XKMe teve tempo médio de anestesia cirúrgica de 34 minutos (LAPORTE, 2017). O período de anestesia cirúrgica mostrou grande diferença significante ($P < 0,0001$) quando comparado XKA com ACXT (protocolo 1) e XKMe com ACXMe (protocolo 2). Na Figura 17, comparou-se com a média dos protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe). Os dados da estatística estão apresentados na Tabela 5.

Figura 16

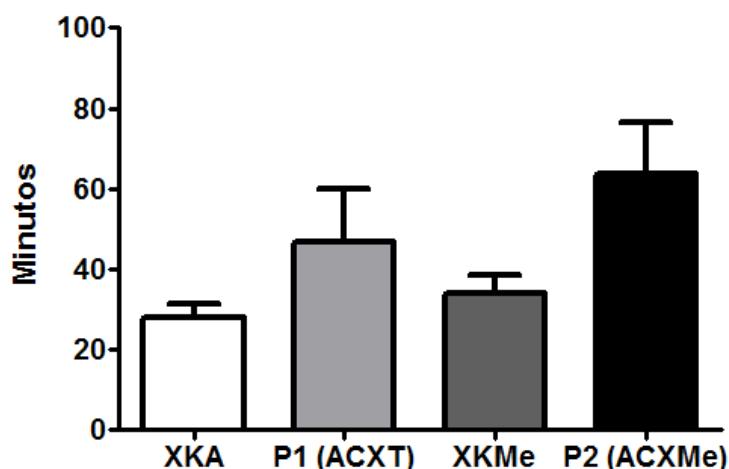
Comparativo entre XKA com ACXT (protocolo 1), e XKMe com ACXMe (protocolo 2); os dois melhores protocolos deste estudo (ACXT e ACXMe) e os dois melhores protocolos utilizados por LAPORTE (2017) (XKA e XKMe) em relação ao período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda de todos os reflexos (período de indução e período de anestesia não cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. XKA – xilazina, cetamina e acepromazina; ACXT (protocolo 1) – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; XKMe – xilazina, cetamina e metadona; ACXMe (protocolo 2) – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona.

Figura 17

Comparativo entre XKA com ACXT (protocolo 1), e XKMe com ACXMe (protocolo 2); os dois melhores protocolos deste estudo (ACXT e ACXMe) e os dois melhores protocolos utilizados por Laporte (2017) (XKA e XKMe) em relação ao período de tempo entre a perda de todos os reflexos e a recuperação do primeiro reflexo (período de anestesia cirúrgica) para cada protocolo (com desvio padrão) em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.



ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com relação aos protocolos. XKA – xilazina, cetamina e acepromazina; ACXT (protocolo 1) – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; XKMe – xilazina, cetamina e metadona; ACXMe (protocolo 2) – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona.

Os ratos receberam os protocolos anestésicos na mesma ordem, do rato 1 ao rato 8, com intervalo de 7 dias, respeitando a meia-vida dos fármacos utilizados. Baseado nos itens de perda e retorno de reflexos, foi selecionado em cada protocolo o animal que teve sua perda e seu retorno de reflexos mais lento e mais rápido, demonstrando que (1) os primeiros e os últimos ratos anestesiados não apresentaram diferença de tempo de resposta, e (2) o mesmo indivíduo responde em tempos diferentes para cada protocolo (Tabela 8).

Tabela 8 Comparativo entre a ordem em que os ratos foram anestesiados, em relação à velocidade da perda de todos os reflexos e o retorno de um dos reflexos em cada rato submetidos a diferentes associações anestésicas.

		Reflexos	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
			ACXT	ACXMe	ACMiMe
Rato 1	Perda	11 min	6 min	7 min	
	Retorno	157 min	163 min	75 min	
Rato 2	Perda	7 min	5 min	5 min	
	Retorno	228 min	185 min	-----	
Rato 3	Perda	7 min	17 min	5 min	
	Retorno	172 min	155 min	-----	
Rato 4	Perda	19 min	16 min	-----	
	Retorno	244 min	167 min	84 min	
Rato 5	Perda	28 min	16 min	-----	
	Retorno	219 min	132 min	-----	
Rato 6	Perda	11 min	12 min	4 min	
	Retorno	186 min	142 min	-----	
Rato 7	Perda	11 min	16 min	4 min	
	Retorno	170 min	140 min	-----	
Rato 8	Perda	9 min	8 min	4 min	
	Retorno	162 min	131 min	-----	

Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam.

Durante todo o período da anestesia, 100% (24/24) dos animais nos três protocolos apresentaram micção, olhos abertos durante todo o período de anestesia, perda de coordenação, perda de reflexo de endireitamento, perda de reflexo de endireitamento, perda de reflexo palpebral e ataxia e perda de reflexo de retirada de cauda. Nenhum dos ratos apresentou piloereção (0/24), um dos parâmetros de dor da *Federation of European Laboratory Animal Science* (LAPCHIK, MATTARAIA e KO, 2010) (FLECNELL, RICHARDSON e POPOVIC, 2007) (MAYER, 2007). Somente 25% (2/8) dos animais que receberam o protocolo 3 (ACMiMe) atingiram o plano anestésico cirúrgico, ou seja, segundo plano do terceiro estágio do Plano de Guedel (Tabela 9).

Tabela 9 Comparação dos sinais clínicos, reflexos e taxa de mortalidade em ratos submetidos a diferentes associações anestésicas.

	Margem de segurança, sinais clínicos e reflexos		
	Protocolo 1 ACXT	Protocolo 2 ACXMe	Protocolo 3 ACMiMe
Anestesia não cirúrgica	0% (0/8)	0% (0/8)	75% (6/8)
Anestesia cirúrgica	100% (8/8)	100% (8/8)	25% (2/8)
Micção	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Olhos abertos	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Piloereção	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
Perda de coordenação e ataxia	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Perda de reflexo de endireitamento	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Perda de reflexo palpebral	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Perda de reflexo de retirada de cauda	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Perda de reflexo podal	100% (8/8)	100% (8/8)	75% (6/8)
Retorno de reflexo palpebral	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (8/8)
Retorno de reflexo de retirada de cauda até retorno da habilidade para caminhar	0% (0/8)	100% (8/8)	50% (4/8)
Óbito	0% (0/8)	0% (0/8)	75% (6/8)

Protocolo 1 – acepromazina, xilazina, cetamina e tramadol; protocolo 2 – acepromazina, xilazina, cetamina e metadona; protocolo 3 – acepromazina, cetamina, metadona e midazolam.

O protocolo 1 (ACXT) foi a melhor associação anestésica observada, com alto poder analgésico e tempo de ação. O protocolo 2 (ACXMe) também apresentou bons resultados e bom poder analgésico. Todos os protocolos tiveram variação de temperatura em 3%, mantendo dentro dos padrões aceitáveis para mensuração de pressão arterial, sem a necessidade de aquecimento. A frequência cardíaca teve uma variação crescente de 47%, mantendo dentro dos padrões aceitáveis. A frequência respiratória variou em 36% e ficou dentro dos padrões aceitáveis. A concentração de dióxido de carbono no final da expiração variou em 14% e foi o único parâmetro abaixo dos padrões aceitáveis.

O protocolo 1 (ACXT) teve 47 minutos de plano de anestesia cirúrgica. O protocolo 2 (ACXMe) teve 59 minutos de anestesia cirúrgica. O protocolo 3 (ACMiMe) teve baixo nível de perda de reflexos e alta taxa de mortalidade, tornando o protocolo inviável.

A redução da temperatura corporal observada nos ratos pode estar relacionada ao efeito depressor da cetamina 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, WHITE, *et al.*, 1987).

A diminuição da frequência respiratória pode ser causada pela metadona ao se ligar aos receptores μ ativando-os e causando a depressão do ritmo respiratório (WAMSLEY, 1983) ou pela xilazina pela estimulação dos receptores alfa-2-adrenérgicos (SINCLAIR, 2003).

O índice baixo de ETCO₂ sugere que os fármacos causem depressão cardíaca. No sistema respiratório, a falta de ventilação adequada acumula dióxido de carbono e dificulta a captação de oxigênio. Com aumento progressivo nos níveis de dióxido de carbono, haverá vasodilatação reflexa e consequente aumento da frequência cardíaca. Há depressão também do sistema muscular e, com isso, o relaxamento da língua, a menor contração dos músculos intercostais e o diafragma não desempenhando suas funções plenas contribuem para a deficiência de oxigênio. Portanto, faz-se necessário o controle das vias aéreas em procedimentos anestésicos (DAVIDSON, 1995). Para aumentar o ETCO₂ para 41 mmHg, segundo Caruso (2006), os ratos devem ser intubados e mantidos em respiração espontânea.

Nenhum dos ratos apresentou piloereção, o que pode ser explicado pela ação relaxante da acepromazina (WELBERG, KINKEAD, *et al.*, 2006) ou pela

ausência de dor, já que a piloereção parcial ou marcante é um parâmetro de dor branda, moderada ou substancial (FELASA).

Todos os animais anestesiados neste estudo mantiveram os olhos abertos durante a anestesia devido aos efeitos dissociativos típicos (MADDISON, PAGE e CHURCH, 2010) e o estado de catalepsia promovido pela cetamina (MASSONE, 1994).

Os protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe) mostram melhor ação anestésica com duração de anestesia cirúrgica que permite fazer procedimentos de até 32 minutos (tempo mínimo de anestesia cirúrgica entre todos os ratos anestesiados – rato 5 no protocolo 1 [ACXT]). Ao usar o protocolo 1 (ACXT), verificou-se que todos os ratos atingiram o plano de anestesia cirúrgica (plano 2 do estágio 3 do Plano de Guedel), mantiveram analgesia adequada ultrapassando a recuperação total da anestesia e apresentaram taxa de 0% (0/8) de mortalidade.

O protocolo 3 (ACMiMe) tornou-se inviável, já que somente 25% (2/8) dos ratos sobreviveram, 12,5% (1/8) dos ratos entraram em plano de anestesia cirúrgica e 75% (6/8) dos animais morrerem em até 49 minutos após a aplicação.

Após selecionar os dois melhores protocolos, 1 (ACXT) e 2 (ACXMe), dezenas de ratos, nas mesmas condições dos ratos anteriores, foram divididos em dois grupos de oito ratos. O primeiro grupo recebeu o protocolo 1 (ACXT) e o segundo grupo, o protocolo 2 (ACXMe) e foram mensuradas a pressão arterial sistólica, diastólica e média, e frequência de pulso.

O refinamento da técnica anestésica consistiu em: (1) ter como pré-requisito o bem-estar animal, (2) utilizar a cetamina, (3) reduzir doses dos fármacos, (4) atingir o plano de anestesia cirúrgica, (5) minimizar a interferência causada pelos fármacos e (6) reduzir do número de animais na pesquisa.

Como um único fármaco não produz todos os efeitos de uma boa anestesia, foram utilizados vários fármacos injetáveis numa mesma seringa por via intraperitoneal, facilitando a sua administração e a manutenção de vários animais anestesiados simultaneamente por pesquisadores.

O protocolo 3 (ACMiMe) foi testado com doses elevadas, mas foi o único protocolo com benzodiazepíncio com o intuito de relaxamento muscular.

Os protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe), com ineditismo através de seus quatro fármacos, atingiram média de 47 minutos de anestesia cirúrgica de qualidade.

Apesar do tempo mínimo de 32 minutos (rato 5 no protocolo 1 [ACXT]), o

protocolo 1 (ACXT) pode ser sugerido para anestesias de até 47 minutos, enquanto que o protocolo 2 (ACXMe) pode ser sugerido para anestesias de até 59 minutos.

Ambos, protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe), podem ser usados em detrimento da anestesia inalatória, pois não há necessidade de individualização, já que a aplicação única via IP é rápida e fácil, e pode ser feita em vários ratos em sequência. Sua segurança e estabilidade garantem tranquilidade para o bioterista.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou uma análise de como um protocolo anestésico pode melhorar o tempo de anestesia, a analgesia e o bem-estar animal no uso de ratos de laboratório durante experimentos científicos. Além disso, também permitiu pesquisa de diversas associações anestésicas obtendo dados mais consistentes sobre as etapas do processo anestésico, analgesia, tempo de plano de anestesia cirúrgica, recuperação anestésica e taxa de mortalidade.

Fica claro que não é possível estabelecer um protocolo anestésico padrão para ratos de laboratório, pois a individualização deve sempre ser a principal premissa.

Neste sentido, a utilização dos protocolos 1 (ACXT) e 2 (ACXMe) refina as associações anestésicas já utilizadas em ratos de laboratório, humanizando os procedimentos, com ênfase em bem-estar e analgesia.

APÊNDICE A – Projeto piloto

Resultados do estudo prévio (projeto piloto) utilizando oito protocolos anestésicos com tempo de anestesia cirúrgica e tempo de retorno de reflexo de retirada de cauda.

	Protocolos (fármaco e dose)	TAC	TRC
1	Acepromazina 0,75 mg/kg Xilazina 1 mg/kg	Cetamina 40 mg/kg Tramadol 5 mg/kg	- -
2	Acepromazina 0,75 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 55 mg/kg Tramadol 10 mg/kg	- -
3	Acepromazina 1 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 70 mg/kg Tramadol 10 mg/kg	- -
4	Acepromazina 1 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 100 mg/kg Tramadol 10 mg/kg	11m 0h46m
5	Acepromazina 1 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 70 mg/kg Metadona 0,5 mg/kg	- -
6	Acepromazina 2 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 100 mg/kg Metadona 0,5 mg/kg	12m 1h04m
7	Acepromazina 2 mg/kg Xilazina 2,5 mg/kg	Cetamina 100 mg/kg	- -
8	Acepromazina 2 mg/kg Midazolam 5 mg/kg	Cetamina 100 mg/kg Metadona 5 mg/kg	4m 1h27m

TAC – tempo de anestesia cirúrgica; TRC – tempo de retorno de reflexo de retirada de cauda.

APÊNDICE B – Controle de parâmetros

CONTROLE DE PARÂMETROS FÍSICOS ANESTÉSICOS

APÊNDICE C – Ficha de controle de anestesia

FICHA DE CONTROLE DE ANESTESIA		
DATA: _____		
Nº RATO: _____		SEXO: _____
PESO: _____ g		
PROTOCOLO A SER UTILIZADO:		
<input type="checkbox"/>	Acepromazina (2mg/kg) + Xilazina (2,5mg/kg) + Cetamina (100mg/kg) + Tramadol (10mg/kg)	
<input type="checkbox"/>	Acepromazina (2mg/kg) + Xilazina (2,5mg/kg) + Cetamina (100mg/kg) + Metadona (0,5mg/kg)	
<input type="checkbox"/>	Acepromazina (2mg/kg) + Cetamina (100mg/kg) + Metadona (5mg/kg) + Midazolam (5mg/kg)	
HORA DE ADMINISTRAÇÃO DE PROTOCOLO: _____ h		
REFLEXOS:		
REFLEXOS	HORA	TEMPO
Perda de coordenação e ataxia	h	h
Perda do reflexo de endireitamento	h	h
Perda do reflexo palpebral	h	h
Perda do reflexo de retirada de cauda	h	h
Perda do reflexo podal	h	h
Retorno do reflexo palpebral	h	h
Retorno do reflexo de retirada de cauda	h	h
Retorno do reflexo podal	h	h
MOVIMENTO DE CABEÇA	h	h
Retorno do reflexo de endireitamento	h	h
Retorno da habilidade do animal para caminhar	h	h

APÊNDICE D – Protocolo do Projeto CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MANUTENÇÃO DA ANESTESIA INJETÁVEL TOTAL EM RATOS DE LABORATÓRIO BASEADO EM ANALGESIA E TEMPO DE ANESTESIA CIRÚRGICA", protocolada sob o CEUA nº 2255180917, sob a responsabilidade de **Cláudia Madalena Cabrera Mori** e equipe; Renato Tessari Piccolo; Ana Tada Fonseca Brasil Antírio; Denise Isoldi Seabra; Jilma Maria Alemán Laporte; Maria Martha Bernardi - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 22/11/2017.

We certify that the proposal "MAINTENANCE OF TOTAL INJECTABLE ANESTHESIA IN LABORATORY RATS BASED ON ANALGESIA AND SURGICAL ANESTHESIA DURATION", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 2255180917, under the responsibility of **Cláudia Madalena Cabrera Mori** and team; Renato Tessari Piccolo; Ana Tada Fonseca Brasil Antírio; Denise Isoldi Seabra; Jilma Maria Alemán Laporte; Maria Martha Bernardi - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/22/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2017 a 11/2019 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	08 a 12 semanas	N:	24
Linhagem:	Wistar				Peso:	250 a 350 g	

Resumo: O objetivo deste projeto é comparar diferentes protocolos anestésicos associados aos analgésicos e encontrar a dose e o tempo de bolus intermitente para manter a segurança e os parâmetros vitais dos ratos de laboratório sob anestesia geral.

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

São Paulo, 23 de novembro de 2017

Profa. Dra. Annelise Souza Traldi 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 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

APÊNDICE E – Autorização de uso de dados publicados

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS PUBLICADOS

Autorizo o uso dos dados contidos na dissertação de mestrado “Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais” de minha autoria, com o propósito de comparação entre os resultados obtidos pelos experimentos de Renato Tessare Piccolo.

Permito publicação na dissertação de mestrado do referido autor, onde se faça comparação entre:

- Protocolos criados;
- Doses utilizadas;
- Período de tempo entre a aplicação dos fármacos e a perda de todos os reflexos (período de indução e período de anestesia não cirúrgica);
- Período de tempo entre a perda de todos os reflexos e a recuperação do primeiro reflexo (período de anestesia cirúrgica).

Costa Rica, 12 de maio de 2018.



Jilma María Alemán Laporte

6 REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, M. et al. **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, p. 198-212, 2014.
- ALONSO, D. C. et al. **Tiletamina-zolazepam e levomepromazina na anestesia de ratos.** Ceres, Viçosa, v. 53, n. 308, p. 457-462, Julho-Agosto 2006.
- ALVES, M. C. R.; OKAMOTO, T. **Influência do "stress" no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos.** Rev. Odonto. UNESP, São Paulo, v. 18, p. 119-130, 1989.
- ARRAS, M. et al. **Optimization of Intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects and anesthesia.** American Association for Laboratory Animal Science, Zurique, v. 51, n. 5, p. 443-456, Outubro 2001.
- BARROS, C. A. **Guia de vias de administração, medicamentos e eutanásia para animais em experimentação.** Centro Universitário Filadélfia. Londrina, p. 1-22. 2014.
- BEDENDO, G. H. M. et al. **Considerações anestésicas em animais de laboratório.** XVIII Jornada de extensão, 2017.
- BOUGHERARA, H.; BOUAZIZ, O. **Effects of the anaesthetic / tranquillizer treatments (Ketamine, Ketamine+Acepromazine, Zoletil) on selected plasma biochemical parameters in laboratory rats.** Central European Journal of Experimental, v. 3, p. 1-2, 2014.
- BRASIL. Lei 11794 de 08 de outubro de 2008. **Procedimentos para o uso científico de animais, 2018.** Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/topicos/10691674/paragrafo-4-artigo-14-da-lei-n-11794-de-08-de-outubro-de-2008>>. Acesso em: 20 Janeiro 2018.
- CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. O. P. **O papel do comitê de ética em experimentação animal.** Revista CFMV, Brasília, v. 76, p. 60-62, Jan/Mar 2018.
- CARUSO, J. **Efeitos da intubação orotraqueal em parâmetros gasométricos de ratos anestesiados.** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo. 2006.

CARVALHO, P. T. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** Bioengenharia USP. Ribeirão Preto. 2002.

DAMY, S. B. et al. **Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental.** Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DAVIDSON, J. R. **Intubação: o que é antigo, e o que é novo.** Clin Anestesiol Am Norte, v. 2, p. 357-369, 1995.

DUBUSSON, D.; DENNIS, S. G. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic affects of morphine, meperidine and brain stemstimilation in rats and cats,** v. 4, p. 161-174, 1977.

FANTONI, D. T. **Anestesia em animais de pesquisa.** In: MANINA, J. Anestesiologia: princípios e técnicas. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FEIJÓ, A. G. S. **A função dos comitês de ética institucionais ao uso de animais na investigação científica e docência.** Revista Bioética, v. 12, p. 11-22, 2006.

FELASA. **Federation of European Laboratory Animal Science.** Disponível em: <www.felasa.eu>. Acesso em: 9 novembro 2013.

FERRARI, L. et al. **Evaluation of two combinations of Domitor, Zoletil 100 and Euthatal to obtain long-term nonrecovery anesthesia in Sprague-Dawley rats.** Comparative Medicine, v. 55, n. 3, p. 256-264, Junho 2005.

FISH, E. R. et al. **Anaesthesia and Analgesia for Laboratory Animals.** Elsevier, Oxford, n. 2, 2008.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia.** 4. ed. Newcastle: Elsevier, 2016.

FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A.; POPOVIC, A. **Laboratory Animals.** In: TRANQUILI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia. n. 4. Cap. 39. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 765-784, 2007.

FORNARI, R. V. et al. **Rodent Stereotaxic Surgery and Animal Welfare Outcome Improvements for Behavioral Neuroscience.** Journal Visualized Experiment, v. 59, 2012.

GAERTNER, D. J. et al. **Anesthesia and analgesia for laboratory rodents.** In: FISH, R. E.,

et al. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. 2. ed. San Diego: Elsevier Inc., Cap. 10, p. 239-243, 2008.

GEHRCKE, M. I.; TREIN, T. A.; MASSONE, F. **Associação Cetamina e Xilazina: o grande desconhecimento farmacológico**. Boletim Apamvet, v. 8, p. 18-20, Abril 2017.

GOMES, H. M. et al. **Modelo experimental inviável de isquemia e reperfusão hepática normotérmica em ratos utilizando a manobra de Pringle**. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, n. 27, p. 196-200, 2014.

GREEN, C. J. et al. **Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience**. Laboratory Animals, v. 15, n. 2, p. 163-170, Dezembro 1980.

GREENE, S. A.; THURMON, J. C. **Xylazine: a review of its pharmacology and use in veterinary medicine**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, n. 11, p. 295-313, 1988.

HEDENQVIST, P.; ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. **Effects of repeated anaesthesia with ketamine/meDETomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats**. Laboratory Animals, Newcastle, v. 34, p. 207-211, Outubro 1999.

JOURDAN, D. et al. **Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat**. Life Science, v. 63, p. 1761-1768, 1998.

KATZ, J. **Pre-emptive analgesia: importance of timing**. Can J Anaesth, v. 48, p. 105-114, 2001.

KATZ, J.; MCCARTNEY, C. J. L. **Current status of pre-emptive analgesia**. Curr Opin Anaesthesiol, v. 15, p. 435-441, 2002.

KISSIN, I. **Study design to demonstrate clinical value of preemptive analgesia: is the commonly used approach valid?** Reg Anesth Pain Med, v. 27, p. 242-244, 2002.

LAMOUNIER, C. G. B. **O processo de construção da lei 11.794/2008 (lei Arouca)**, 2015.

LANA, A. C.; PAULINO, C. A.; GONÇALVES, I. D. **Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernociceção e outros parâmetros em ratos**. Rev Bras Med Esporte, v. 12, p. 248-255, Set/Out 2006.

LAPCHIK, V. B.; MATTARAIA, V. G.; KO, G. M. **Cuidados e Manejos de Animais de**

Laboratório. São Paulo: Atheneu, 2010.

LAPORTE, J. M. Refinamento das técnicas de anestesia injetável visando garantir o bem-estar de ratos de laboratório em procedimentos experimentais. Master's Dissertation, São Paulo, Dezembro 2017.

MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B. Farmacologia clínica de pequenos animais. 2. ed. Saunders: Elsevier, 2010.

MASSONE, F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

MAYER, J. Use of behavior analysis to recognize pain in small mammals. Lab Animal, v. 36, Junho 2007.

MCQUAY, H. J. Preemptive analgesia. Anesthesiology, p. 1138-1143, 2009.

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. 364-375, 1998.

NASCIMENTO, E. et al. O exercício físico crónico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. Revista Portuguesa de Ciências do Desporto, v. 4, p. 26-33, 2004.

NETTO, C. C. et al. Efeitos do tempo de descompressão após trauma medular na recuperação neurológica em ratos Wistar. Acta Ortopédica Brasileira, n. 18, p. 315-320, 2010.

NEVES, S.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, p. 234. 2013.

OLIVEIRA, C. M. B. D. et al. Cetamina e analgesia preemptiva. Revista Brasileira de Anestesiologia, Campinas, v. 54, n. 5, p. 739-752, Outubro 2004.

OLIVEIRA, F. M. et al. Modelo experimental de esplenectomia laparoscópica em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, p. 553-556, Maio 2003.

RICHARDSON, C. A.; FLECKNELL, P. A. Anaesthesia and Post-operative Analgesia Following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are We Making Progress?

Atla, Newcastle, v. 1, p. 119-127, 2005.

RIVERA, E. A. **Anestesia em animais de experimentação**. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. Cap. 28, p. 255-261, 2002.

SAHA, J. K. et al. **Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models**. **Experimental Biology and Medicine**, n. 230, p. 777-784, 2005.

SANTOS, M. R. V. et al. **Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe**. Scientia Plena, v. 6, n. 10, 2010.

SEABRA, D. I.; POMPEU, E.; VALENTI, M. L. G. **Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais**. USP. São Paulo, p. 1-8. 2017.

SEVOSTIANOVAA, N. et al. **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 certains opioids**. Fundamental and Applied Toxicology, Virginia, v. 3, n. 6, p. 536-542, novembro-dezembro 1983.

SILVA, L. H.; OLIVEIRA, A. S. **Contribuições do projeto piloto à coleta de dados em pesquisas na área de educação**. Revista Ibero-americana de estudos em educação, Araraquara, v. 10, n. 1, Janeiro/março 2015.

SINCLAIR, M. D. **A review of the physiological effects of a2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice**. Canadian Veterinary Journal, v. 44, n. 11, p. 885-897, 2003.

SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório: Princípios e procedimentos**. São Paulo: Roca, 2007.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. **Veterinary anesthesia and analgesia**. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. Lumb & Jones. Iowa: Baltimore, v. 3, p. 210-735, 1996.

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

WELBERG, L. A. M. et al. **Ketamine-xylazine-acepromazine anestesia and postoperative recovery in rats.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 45, p. 13-20, 2006.

WHITE, P. F.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. **Ketamine – its pharmacology and therapeutic uses.** Anesthesiology, n. 56, p. 119-136, 1982.

WIXSON, S. K. et al. **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.** Medicina comparativa, Michigan, v. 54, p. 49-53, Fevereiro 2004.

ZUBIETA, J. K. et al. **Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain.** Science, v. 293, n. 5528, p. 311-315, 2001.