

EFEITO DA TILETAMINA-ZOLAZEPAM E MORFINA EM RATOS: PERÍODO DE LATÊNCIA, AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Kelly Priscila Pandolfi*

Márcia Cristina Menão**

Paulo César de Carvalho Ferreira***

Deise Carla Almeida Leite-Dellova****

RESUMO:

Os pesquisadores têm buscado alternativas para minimizar a dor e o estresse dos animais de laboratório. Os procedimentos que causam desconforto e dor devem ser realizados com o uso de anestesia e analgesia. A associação tiletamina-zolazepam (TZ) é utilizada para a anestesia de roedores, tendo como vantagens a fácil administração e rápida indução, e as desvantagens da longa recuperação e analgesia variável. Nesta situação, o uso da morfina poderia proporcionar uma analgesia adicional; porém, os efeitos da TZ e a morfina ainda não foram descritos em ratos. O objetivo deste estudo foi determinar o período de latência de um protocolo envolvendo a TZ (30 mg/Kg) e a morfina (2 mg/Kg) em ratos Wistar machos, além de avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos desta espécie, após a anestesia. A TZ e a morfina foram administradas, conjuntamente, por via intramuscular. O sangue foi obtido por punção cardíaca e para os testes laboratoriais foram utilizadas técnicas já padronizadas. Os resultados indicaram que o protocolo anestésico foi eficaz para a anestesia e analgesia nos ratos, devido ao curto período de latência ($6,26 \pm 1,23$ min, $N = 50$) e a ausência de respostas aos estímulos dolorosos. Exceto pelo maior valor de ureia, a TZ e a morfina, praticamente, não interferiram nos parâmetros bioquímicos; porém foram observadas alterações hematológicas importantes, como: baixos valores para a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina.

Palavras-chave: analgesia; anestesia; animais de laboratório; hemograma; perfil bioquímico.

*Clínica médica de cães e gatos. Médica veterinária autônoma. Fisiologia Renal. E-mail: keke.pandolfi@gmail.com

** Faculdades Metropolitanas Unidas. Epidemiologia, Microbiologia e Patologia Aviária. E-mail: marcrismenao@gmail.com

*** Universidade de Santo Amaro (UNISA). Anestesiologia veterinária. E-mail: pauloccf@ig.com.br

**** Departamento de Medicina Veterinária FZEA/USP. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Fisiologia de órgãos e sistemas. Fisiologia Renal. Clínica médica de cães e gatos. E-mail: leite-dellova@usp.br

EFFECT OF TILETAMINE-ZOLAZEPAM AND MORPHINE IN RATS: LATENCY PERIOD, BIOCHEMISTRY AND HEMATOLOGICAL EVALUATION

ABSTRACT:

Researchers seek alternatives to minimize the pain and stress of laboratory animals. Procedures that promote pain should be performed under anesthesia and analgesia. The combination tiletamine-zolazepam (TZ) is used for rodent anesthesia, with advantages: easy administration and rapid induction and disadvantages: long recovery and variable analgesia. In this situation, morphine could provide an additional analgesia; however, the effects of TZ plus morphine have not been described in rats. The objective of this study was to determine the latency period of TZ plus morphine in rats Wistar male, and evaluate the biochemical and hematological parameters of this species, after anesthesia. TZ plus morphine were administered intramuscularly. Blood was obtained by cardiac puncture and laboratory tests were performed using standardized techniques. The results indicated that the anesthetic protocol was effective to anesthesia and analgesia in rats, due to the short latency period (6.26 ± 1.23 min, $N = 50$) and absence of responses to painful stimuli. Except for the higher urea, TZ plus morphine, practically, did not interfere in the biochemical parameters; but important hematological alterations were observed: low values for red blood cell count and hemoglobin concentration.

Keywords: analgesia; anesthesia; laboratory animals; blood count; biochemistry profile.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as preocupações éticas que envolvem os animais de laboratório vão além do conceito da dor, abrangendo o sofrimento e o estresse. O uso de anestésicos e analgésicos em procedimentos dolorosos e/ou cirúrgicos reduz de forma importante o sofrimento dessas espécies (Hedenqvist 2008). Sendo assim, o controle da dor nos animais é de responsabilidade dos profissionais que trabalham na pesquisa e consistente com a opinião pública, cujo apoio diminui à medida que as experiências que envolvem dor aumentam (Vicente; da Costa 2014).

A tiletamina é um anestésico dissociativo, que isoladamente promove apenas imobilização e rigidez muscular, por este motivo sempre é associada a um benzodiazepínico, como o zolazepam, promotor de sedação e relaxamento muscular (Saha et al. 2007). Vários estudos indicam a utilização da associação da tiletamina-zolazepam (TZ) como anestésico em roedores, baseados na fácil administração, indução rápida e ausência de respostas às manipulações cirúrgicas (Machado et al. 2009, Redfors et al. 2014). Contudo, a analgesia alcançada com esta associação é variável, com melhores efeitos sobre o controle da dor somática, do que a visceral (Ferrari et al. 2005, Spinella et al. 2012), levando ao desenvolvimento de protocolos que produzam um efeito antinociceptivo adicional, como por exemplo, a combinação entre TZ e opiáceos (Seddighi et al. 2014). De acordo com Wenger (2012), os opiáceos são efetivos para o controle da dor visceral, aguda ou crônica, em roedores.

Avaliando a resposta de ratos ao teste de retirada da cauda, que consiste na aplicação de um estímulo doloroso na cauda do animal, com a finalidade de provocar o seu movimento de retirada, Wilson et al. (1992) evidenciaram um tempo de resposta três vezes maior (indicativo de tolerância à dor) nos ratos anestesiados com TZ e um opiáceo (o butorfanol), em comparação ao uso da TZ sozinha. Estes resultados demonstraram, pela primeira vez, a baixa efetividade da TZ para a analgesia em ratos, mas que as propriedades analgésicas deste anestésico podem ser intensificadas pela combinação com outros fármacos. Além disso, o aumento da dose da TZ não produz uma maior analgesia, mas prolonga a recuperação do animal (Meyer; Fish 2011).

Os opiáceos, como a morfina, são utilizados em animais de laboratório como analgésicos e também para reduzir a dose dos anestésicos, em um procedimento conhecido como anestesia multimodal (Flecknell 2015). A morfina é um agonista do receptor μ e por esta razão promove analgesia supra espinhal, espinhal e periférica, além de sedação e depressão respiratória (Dugdale 2010). Os receptores μ estão localizados nos neurônios pré e pós-sinápticos da via de sinalização da dor e ao ativar estes receptores, a morfina inibe a transmissão dos sinais dolorosos na medula espinhal (Al-Hasan; Bruchas 2011).

Os objetivos desse estudo foram determinar o período de latência do protocolo TZ e morfina em ratos e avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos desta espécie, após a anestesia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, hípidos e desverminados, da linhagem *Wistar*, com peso médio de $274 \pm 1,93$ g e 11 semanas de idade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (protocolo 13/09).

Os ratos (em jejum de 8 horas) foram anestesiados com TZ (Zoletil® 50/Virbac®, 30 mg/kg) e morfina (Cristália®, 2 mg/kg). O período de latência compreendeu o tempo entre o final da administração intramuscular dos fármacos e a perda dos reflexos. Posteriormente, realizou-se a coleta de 4 mL de sangue por punção cardíaca (sem a abertura do tórax), utilizando agulhas hipodérmicas 25 x 7 mm e seringas de 5 mL (Becton Dickinson®). Em seguida, os ratos foram eutanasiados pela administração de cloreto de potássio 10% (Isofarma®, 50 mg/rato), após a confirmação da inconsciência (Brasil 2013).

O sangue coletado foi transferido para tubos com EDTA ou sem anticoagulante (seco) (Becton Dickinson®) para a realização das análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente. A glicemia foi determinada no sangue total, com o uso de fitas reagentes e glicosímetro (Advantage®/ Roche®). A concentração das proteínas plasmáticas totais foi mensurada por refratometria (refratômetro manual QUIMIS®). As concentrações de hemoglobina no sangue e de alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, colesterol total e triglicerídeos no soro foram determinadas por método colorimétrico e espectrofotometria, utilizando-se *kits* comerciais da Labtest Diagnóstica®.

O hematócrito foi determinado pela técnica do micro-hematócrito. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer, com amostras de sangue diluídas na proporção de 1:200 (em líquido de Marcano) e 1:20 (em líquido de Thoma), respectivamente. O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores do hematócrito, da concentração de hemoglobina e da contagem de hemácias, segundo o método descrito por Stockham e Scott (2011). A contagem diferencial das células da série leucocitária foi realizada em esfregaços de sangue corados pelo método Panótico. As células foram visualizadas em microscópio óptico, usando a objetiva de imersão em óleo (100X).

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva e apresentados como valores médios, com seus respectivos desvios padrão. Estes resultados foram comparados a valores de referência, considerando o sexo e a idade dos ratos.

3. RESULTADOS

O período de latência foi de $6,26 \pm 1,23$ min (N = 50), onde os ratos apresentaram relaxamento muscular e perda dos reflexos de dor superficial e profunda, verificados por meio do pinçamento interdigital.

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos ratos, após anestesia com TZ e morfina, são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Os valores médios da concentração de FA, creatinina e hemoglobina, da contagem de hemácias, CHCM e do valor relativo de linfócitos foram inferiores às referências. Enquanto que os valores médios da concentração de ureia, VCM e dos valores relativos de neutrófilos e monócitos foram superiores. Os baixos valores da concentração de hemoglobina e da contagem de hemácias resultaram no aumento VCM e na redução do CHCM. Os demais parâmetros avaliados estavam dentro da faixa de normalidade para a espécie.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos de ratos anestesiados com TZ e morfina. Comparação entre os resultados obtidos neste estudo e os valores de referência para a espécie.

Parâmetros bioquímicos	Valores médios \pm desvio padrão (N = 50)	*Valores de Referência (faixa de variação)
Glicose (mg/dL)	83,78 \pm 10,31	70 - 208
Proteínas totais (g/dL)	6,45 \pm 0,20	5,2 - 7,1
ALT (UI/L)	20,53 \pm 8,75	18 - 45
FA (UI/L)	54,00 \pm 3,40	62 - 230
Creatinina (mg/dL)	0,16 \pm 0,03	0,2 - 0,5
Ureia (mg/dL)	53,13 \pm 3,09	12,3 - 24,6
Colesterol total (mg/dL)	64,63 \pm 3,82	37 - 85
Triglicerídeos (mg/dL)	68,38 \pm 19,48	20 - 114

*Giknis e Clifford (2008). Valores para ratos *Wistar*, machos de 8 a 16 semanas de idade.

TZ = tiletamina-zolazepan. mg = miligrama. dL = decilitro. g = grama. ALT = alanina amino transferase. UI = unidades internacionais. L = litro. FA = fosfatase alcalina.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de ratos anestesiados com TZ e morfina. Comparação entre os resultados obtidos neste estudo e os valores de referência para a espécie.

Parâmetros hematológicos	Valores médios \pm desvio padrão (N = 50)	*Valores de Referência (faixa de variação)
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	4,73 \pm 0,17	7,27 - 9,65
Hemoglobina (g/dL)	8,95 \pm 0,16	13,7 - 17,6
Hematócrito (%)	40,50 \pm 1,19	39,6 - 52,5
VCM fL	85,75 \pm 0,96	48,9 - 57,9
HCM (pg)	18,93 \pm 0,37	17,1 - 20,4
CHCM (g/dL)	22,10 \pm 0,31	32,9 - 37,5
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	4,24 \pm 1,12	1,96 - 8,25
Neutrófilos (%)	37,82 \pm 5,84	6,2 - 26,7
Eosinófilos (%)	3,50 \pm 0,29	0,2 - 3,5
Linfócitos (%)	54,18 \pm 5,66	66,6 - 90,3
Monócitos (%)	4,5 \pm 1,27	0,8 - 3,8

*Giknis e Clifford (2008). Valores para ratos *Wistar*, machos de 8 a 16 semanas de idade.

TZ = tiletamina-zolazepan. g = grama. miligrama. dL = decilitro. % = porcentagem. VCM = volume corpuscular médio. fL = femtolitro. HCM = hemoglobina corpuscular média. pg = picograma. CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. μL = microlitro.

4. DISCUSSÃO

A administração de TZ e morfina possibilitou a coleta de sangue por punção cardíaca, em condições de anestesia e analgesia. O período de latência foi curto; portanto, rapidamente os ratos entraram em plano anestésico. De maneira semelhante, Ferrari et al. (2005) observaram a perda dos reflexos, após 5 min da aplicação de 40 mg/Kg de TZ em ratos. A depressão respiratória, um dos principais efeitos colaterais atribuídos a estes fármacos (Saha et al. 2007, Flecknell 2015), não foi observada, uma vez que o procedimento para a coleta de sangue foi rápido e logo em seguida os animais foram eutanasiados.

Os efeitos isolados da TZ e da morfina sobre o sistema cardiorrespiratório de ratos é bem descrito na literatura científica (Redfors et al. 2014, Tung et al. 2015). No entanto, não existem relatos de alterações bioquímicas e hematológicas nessa espécie, após a administração dessa associação.

A publicação de Ebisui et al. (2009) apresenta os seguintes parâmetros de normalidade para análises bioquímicas em ratos: glicemia (85 - 132 mg/dL), proteínas totais (6,3 - 8,6 g/dL), ALT (17 - 50 UI/L), FA (39 - 216 UI/L), ureia (32 - 54 mg/dL) e colesterol total (46 - 92 mg/dL), em conformidade com os

resultados do presente estudo. Porém, estes autores não indicaram valores para creatinina e triglicerídeos e, tão pouco, a metodologia utilizada.

Em comparação à referência (Giknis; Clifford 2008), os baixos valores de FA e creatinina dos ratos (Tabela 1), aparentemente, não indicam uma alteração sistêmica e poderiam estar relacionados à anestesia, uma vez que Lu et al. (2012) descreveram uma redução transitória nas concentrações séricas de FA e creatinina, em porcos miniaturas anestesiados com TZ e um opiáceo (tramadol). Os valores médios das concentrações séricas de FA e creatinina dos ratos avaliados no presente estudo também foram inferiores aos descritos por Lu et al. (2012) em porcos miniaturas. O jejum, o aumento da ingestão de proteínas e/ou a elevação da taxa metabólica podem elevar a concentração sérica de ureia em animais normais. Em ratos hígidos, Dantas et al. (2006) também observaram o valor médio da concentração de ureia superior ao descrito por Giknis e Clifford (2008).

Assim como foi observado nesse estudo (Tabela 2), em ratos anestesiados com tiopental sódico, para a coleta de sangue por punção cardíaca, a contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e o CHCM foram inferiores, enquanto o VCM foi superior aos valores de Giknis e Clifford (2008). Portanto, o anestésico utilizado no animal e o local da coleta de sangue devem ser considerados durante a interpretação dos resultados de uma pesquisa.

Outros autores relataram valores abaixo do normal para o número de hemácias e a concentração de hemoglobina em ovelhas (Ceylan et al. 2007) e mini porcos (Jiang et al. 2014) anestesiados com TZ; provavelmente, pelo sequestro de células sanguíneas para o baço e outros reservatórios ou pelo movimento da água do interstício para o compartimento intravascular, visando a manutenção do débito cardíaco. Além disso, o valor do hematócrito dos ratos anestesiados com TZ e morfina ficou próximo ao limite inferior da referência (Giknis; Clifford 2008). Alterações hematológicas semelhantes também foram descritas em cães, após a indução anestésica com outros fármacos, como propofol e tramadol (Costa et al. 2013) e em ratos anestesiados com um barbitúrico (Carvalho et al. 2009).

Considerando os valores relativos, os ratos apresentaram neutrofilia, linfopenia e monocitose, após a anestesia. O estresse agudo e não intencional, ocasionado pela manipulação dos animais, pode justificar estas alterações leucocitárias

(Silva et al. 2008, Pertsov et al. 2015). Além disso, a linfopenia foi descrita como um dos efeitos agudos da morfina (Homburger; Meiler 2006), em concordância com os resultados apresentados. A redução do número de linfócitos pode ser o resultado de uma redistribuição ou remoção da circulação, em resposta à estimulação simpática e/ou ao aumento da concentração circulante das catecolaminas adrenais, induzidos pela morfina (Vallejo et al. 2004).

Um diferencial deste estudo, é que nenhum outro trabalho avaliou o efeito da anestesia com TZ e morfina sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos Wistar. Além disso, procedimentos que causam dor de intensidade moderada, como a punção cardíaca, devem ser realizados em animais anestesiados (Brasil 2016). Estes aspectos impossibilitaram a comparação dos resultados obtidos com outros dados da literatura e também com um controle, composto por ratos não anestesiados.

5. CONCLUSÕES

A associação TZ e morfina mostrou-se efetiva para a indução anestésica e analgesia nos ratos submetidos à punção cardíaca. Exceto pelo maior valor de ureia, o protocolo anestésico praticamente não interferiu nos parâmetros bioquímicos, uma vez que os demais resultados estiveram dentro ou muito próximos da faixa de normalidade; mas pode ter ocasionado alterações em parâmetros hematológicos importantes, como a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina dos ratos. Portanto, deve-se considerar a possibilidade do protocolo anestésico (incluindo TZ e morfina) alterar os resultados dos exames de sangue de um animal normal, interferindo assim com toda a pesquisa.

REFERÊNCIAS

Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiol.* 2011;115(6):1363-1381.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Resolução normativa nº 13, de 20 de

setembro de 2013. Diretrizes da prática da eutanásia. Diário Oficial da União. 2013 set 26; Seção 1. p.5.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Resolução normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica. Diário Oficial da União. 2016 fev 3; Seção 1. p.3.

Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio LC, Machado JP, et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. Rev. CERES. 2009;56(1):51-57.

Ceylan C, Aydilek N, Ipek H. Effects of tiletamine-zolazepam anaesthesia on plasma antioxidative status and some haematological parameters in sheep. Acta Vet Hung. 2007;55(2):191-197.

Costa PF, Nunes N, Belmonte EA, Moro JV, Lopes PCF. Hematologic changes in propofol-anesthetized dogs with or without tramadol administration. Arq Bras Med Vet Zootc. 2013;65(5):1306-1312.

Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Sci Health Sci. 2006;28:165-170.

Dugdale A. Pain. In: _____. Veterinary Anaesthesia: Principles to Practice. Oxford:John Wiley and Sons; 2010. p.8-29.

Ebisui L, Fontes RS, Lapchik VBV. Rato. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko, GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. São Paulo:Atheneu Editora; 2009. p.229-250.

Ferrari L, Turrini G, Rostello C, Guidi A, Casartelli A, Piaia A, et al. Evaluation of two combinations of Domitor, Zoletil 100, and Euthatal to obtain long-term nonrecovery anesthesia in Sprague-Dawley rats. Comp Med. 2005;55(3):256-264.

Flecknell P. Laboratory Animal Anesthesia. 4th ed. Oxford:Elsevier; 2015. p.48-192.

Giknis MLA, Clifford CB. Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han). Charles River Laboratories. [acesso em 2016 set 22]; p.1-14. Disponível em: http://www.criver.com/files/pdfs/rms/wistarhan/rm_rm_r_wistar_han_clin_lab_parameters_08.aspx

Hedenqvist P. Anesthesia and analgesia for surgery in rabbits and rats: A comparison of the effects of different compounds [thesis]. Stockholm: Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet; 2008.

Homburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. *Curr Opin Anesthesiol.* 2006;19(4):423-428.

Jiang S, Fan HG, Lu DZ, Hou JL, Song XD, Wang Y, et al. Effects of the tiletamine/zolazepam-xylazine-tramadol combination on plasma oxidative status and haematological indicators in miniature pigs. *Acta Vet Brno.* 2014;83(2):145-149.

Lu DZ, Fan HG, Jiang S, Zhang LS, Kun MA, Yu SM, et al. Cardiopulmonary, Biochemical and Haematological Effects of the Tiletamine/Zolazepam-Xylazine-Tramadol Combination to Provide Anaesthesia in Miniature Pigs. *J Integr Agr.* 2012;11(8):1340-1346.

Machado EFA, Normand ACR, Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(11):1035-1038.

Meyer RE, Fish RE. In: Fish RE, Brown M, Danneman PJ, Karas AZ. 2nd ed. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals.* Academic Press:Elsevier, 2011. p.47-66.

Pertsov SS, Koplik EV, Kalinichenko LS. Effect of Interleukin-4 on Peripheral Blood Leukocytes in Rats with Various Behavioral Characteristics During Acute Stress. *Bull Exp Biol Med.* 2015;158(5):595-599.

Redfors B, Shao Y, Omerovic E. Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Lab Anim.* 2014;48(1):6-14.

Saha DC, Saha AC, Malik G, Astiz ME, Rackow EC. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2007;46: 74-80.

Seddighi R, Elliot SB, Whitlock BK, Egger CM, Doherty TJ. Antinociceptive and selected physiological effects of morphine and xylazine on tiletamine-zolazepam anesthesia in llamas. *Vet Anaesth Analg*. 2014;41(4):365-371.

Silva R, Almeida Júnior GS, Cury JRM, Amaral RA, Perenha RA, Locatelli L, et al. Leucograma de estresse. *Rev Cient Eletrônica Med Vet*. 2008 [acesso em 2016 set 15]; 4 p. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/Y3IPpWmQwuhdZTp_2013-6-13-15-55-59.pdf.

Spinella G, Vilar JM, Anastasi C, Santana A, Prati U, Roveda L, et al. Three combinations of clonidine in association with tiletamine-zolazepam for anaesthesia induction in rats: evaluation of reflexes and pain sensibility. *Vet Med*. 2012;57(10):536-542.

Stockham SL, Scott MA. Eritrócitos. In: _____. *Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 90-185.

Tung KH, Angus JA, Wright CE. Contrasting cardiovascular properties of the μ -opioid agonists morphine and methadone in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2015;762:372-381.

Vallejo R, de Leon-Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther*. 2004;11(5):354-365.

Vicente AM, da Costa MC. Experimentação animal e seus limites: core set e participação pública. *Physis*. 2014;24(3):831-849.

Wenger S. Anesthesia and analgesia in rabbits and rodents. *J Exot Pet Med*. 2012;21(1):7-16.

Wilson RP, Zagon IS, Larach DR, Lang CM. Antinociceptive properties of tiletamine-zolazepam improved by addition of xylazine or butorphanol. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992;43(4):1129-1133.

RECEBIDO EM: 01/09/2016
ACEITO EM: 26/09/2017