

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHAREALDO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Heloisa Bertolli de Almeida

**HRV como indicador de Bem-Estar e recuperação no lagarto teiú,
Salvator merianae.**

São Carlos
2021

**HRV como indicador de Bem-Estar e recuperação no lagarto teiú,
Salvator merianae.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

HELOISA BERTOLLI DE ALMEIDA

**HRV como indicador de Bem-Estar e recuperação no lagarto teiú,
Salvator merianae.**

Monografia apresentada no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Prof. Dr. Cléo Alcantara Costa Leite
Co-Orientador Renato Filogonio

São Carlos – SP
2021

Agradecimentos

Aos meus pais e meu irmão que me fazem, como sempre fizeram. Às palavras precisas de minha mãe, aos ouvidos gentis de meu pai e à permanente disponibilidade de meu irmão.

Ao, tanta coisa, Davi. Por me lembrar que a vida é como andar de bicicleta, se não olhar para frente você perde o equilíbrio.

Aos grandes incitadores de minha existência política e científica: Fer, Tio Edson e Tia Herta. Aos 13 anos me apresentaram a UFSCar, e aos 18 comemoramos meu ingresso.

Aos não categorizáveis, Paulo, Guilherme e Fabiana. Não saberia por onde começar os agradecimentos, nem quando terminaria.

Às que aumentam o orgulho de meu título de bióloga por, justamente, o compartilhem comigo: Ana, Belle, Monique e Gabi.

Ao encontro que Sara e eu fizemos que fosse. As conversas, as trocas, a ciência.

Aos colegas de laboratório pela partilha de conhecimento, cafés, bares e risadas. Os novos são sempre bem-vindos e tão logo, parte.

I would also like to thank Professor Edwin Taylor, Professor Tobias Wang, and his team. You all shared incredible conversations and good science.

Ao Gustavo pelos infinitos ensinamentos e entusiasmo. Dividir ideias, projetos e imprevistos é um privilégio. Sorte a nossa!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao Renato, pela co-orientação constante em conversas, planos e impasses com a escrita científica.

Ao Cléo, pela fantástica orientação, pelos infindáveis planos revolucionários e pela formação. As horas de discussão e planejamentos foram sempre combustível.

Por fim, agradeço aos que se interessem pela leitura. O lampejo de que parte desse trabalho contribua com aqueles que anseiam aperfeiçoar o bem estar animal, me foi estímulo em mais momentos do que pude calcular.

RESUMO

Por motivos éticos e instrumentais, pesquisas sobre o bem-estar de animais cativos têm alcançado um novo patamar de preocupação. Contudo, a própria definição de bem-estar animal enfrenta controvérsias e colabora para difícil definição e escassez de ferramentas objetivas para atestá-lo. Grande parte das metodologias são focadas e descritas para mamíferos e fundamentadas em condições físicas e/ou comportamentais. No caso dos répteis, apontados como animais de "comportamento simples", é inconsistente atestar ou avaliar um estado de bem-estar através de observações comportamentais e vieses antropocêntricos. Neste cenário, análises de aspectos funcionais e regulatórios característicos da fisiologia de uma espécie, podem se tornar ferramentas de avaliação eficientes e objetivas. Nesse trabalho, propusemos a avaliação da integridade funcional do Sistema Nervoso Autônomo, aferida pela análise de variabilidade cardíaca (*Heart Rate Variability – HRV*), como índice de recuperação pós-procedimentos e bem-estar de lagartos teiús, *Salvator merianae*. A análise foi implementada na avaliação da condição animal durante uma série de procedimentos frequentes em instalações de manutenção de animais. A variabilidade foi mapeada após contenção e manejo, inspeção, injeção, profilática, sedação e plano anestésico. Nosso trabalho corroborou a caracterização de HRV da espécie. Sobre tal padrão, observamos o impacto depressor dos procedimentos sobre a HRV dos indivíduos e conseguimos identificar o retorno desta aos padrões de repouso pré-estabelecidos. O tempo de retorno possui relação com o grau de interferência dos procedimentos utilizados. Indicamos que tal análise pode ser uma ferramenta útil sob as circunstâncias testadas.

Palavras-chave: Squamata. Répteis. Variabilidade da frequência cardíaca. Sistema Nervoso Autônomo.

ABSTRACT

The welfare of captive animals acquired significant degrees of concern due to several ethical and instrumental reasons. However, the absence of agreement on the definition of the physiological mean of welfare contribute to the lack of objective tools to measure/quantify it. Current methodologies used to infer welfare are based on behavioral indexes and they are focused on mammalian species. Reptiles are described as 'behaviorally simple', which makes assessing their welfare based on human observations of behavioral characteristics rather inconsistent. In this regard, analyses of the regulatory physiological function have the potential to provide reliable evaluations. In this project, we propose using the Heart Rate Variability (HRV) analysis as a measurement to attest the integrity of the autonomic nervous system (ANS) and so, as an index of welfare and recovery in tegu lizards, *Salvator merianae*. We followed the HRV during sequential protocols commonly employed in animal facilities. The lizards had their variability traced after handling and inspection, injections, prophylaxis, sedation, and anesthetic plan. Our study confirms the HRV characterization for our design species, tegu lizard *Salvator merianae*. The analysis was efficient in signaling both the depressor effect provoked by each maneuver and the recovered variability values afterwards. Time needed for recovery was shown to be correlate to the disturbance degree created by the maneuvers. We exhibit the HRV value as assess method under the tested terms.

Key words: Squamata. Heart Rate Variability. Reptiles. Welfare.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Registro fotográfico de exemplar de Lagarto tegu, *S. merianae*, (847g) com eletrodos para ECG aderidos a seu dorso. Fase de preparação anterior à aplicação da bandagem para estabilização dos eletrodos.

Figura 2: Trecho de eletrocardiograma de um exemplar de teiú, *S. merianae* (massa corpórea: 1221g), demonstrando a qualidade do registro obtido com os eletrodos superficiais. O sistema, mesmo com conexão de cabos permitiu registro dos animais em repouso e sem estresse. Barra inferior, 1 segundo.

Figura 3: Progressão de alteração da média de densidade espectral (PSD – Power Spectral Density, azul) e f_H (vermelho) e ao longo de 24h em teiús (n=6, massa corpórea: $1619 \pm 536,9g$, média \pm desvio padrão), *S. merianae*, em repouso, a 30 °C. O tempo 0 marca o momento imediatamente posterior ao manuseio para fixação dos eletrodos superficiais e acomodação do animal na câmara experimental. Os círculos são medias dos valores ao longo à cada hora de registro. O erro padrão da média (EPM) é indicado pela área sombreada ao longo de cada traçado. A linha tracejada marca o valor médio mínimo de PSD que caracteriza o repouso (150.000 ms^2).

Figura 4: Análise de HRV no domínio da frequência em *S. merianae*, (massa corpórea: 1700g), a 30 °C. A figura apresenta a plotagem de padrão apresentado durante o período de repouso (preto); o efeito da contenção e manuseio (perturbação I – cinza escuro); e o efeito de uma perturbação maior, sedação com CO₂ seguida de 2h de isoflurano (perturbação VI – cinza claro). Os picos observados entre as frequências 0.06 Hz e 0.13 Hz (linhas pontilhadas) estão relacionados às interações cardiorrespiratórias conforme descrito anteriormente (Duran et al., 2020).

Figura 5: Progressão de alteração de valores de f_H média e PSD médio (Power Spectral Density) após a aplicação dos protocolos com perturbações em teiús, *S. merianae* (n=6, massa corpórea: $1619 \pm 536,9g$, média \pm desvio padrão), a 30°C. As perturbações foram: I - Contenção e inspeção, II – Inspeção e injeção intraperitoneal de salina, III – Inspeção e injeção intraperitoneal de antibiótico e anti-inflamatório, IV – Sedação com CO₂, V – Sedação com CO₂ seguida de anestesia inalatória (isoflurano) por 30 minutos, VI – Sedação com CO₂ seguido por 2 horas de anestesia (isoflurano). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. Interior dos símbolos de cor diferente sinalizam diferença estatística entre os valores de repouso (representados pelo tempo -1).

Figura 6: Tempo médio de recuperação necessário para retorno do PSD médio aos níveis de repouso após as perturbações I - VI em teiús, *S. merianae* (n=6, massa corpórea: 1619 ± 536,9g, média ± desvio padrão), a 30 °C.

Figura 7: Progressão de alteração dos valores de f_H (laranja) e PSD (azul escuro) (Power Spectral Density) de indivíduo *S. merianae* injuriado (massa: 2200g) durante o protocolo. Os valores médios de f_H (vermelho) e PSD (azul claro) dos indivíduos *S. merianae* recuperados normalmente (n=6, massa corpórea: 1619 ± 536,9g, média ± desvio padrão) estão indicados para comparação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de HRV em teiú, *S. merianae* (n=6, massa corpórea: $1619 \pm 536,9\text{g}$, média \pm desvio padrão), em repouso, a 30 °C, e modificações decorrentes do protocolo experimental.

Sumário

1	Introdução	11
2	Revisão bibliográfica do tema	13
2.1	Bem-estar animal	13
2.2	Bem-estar animal em répteis	15
3	Metodologia	17
3.1	Animais	17
3.2	Fixação de eletrodos superficiais	17
3.3	Procedimentos	18
3.3.1	Registro do padrão de repouso	19
3.3.2	Protocolo experimental	19
3.4	Análise de dados	21
4	Resultados	22
4.1	Padrão de repouso	22
4.2	Protocolo com perturbações	25
5	Discussão	28
5.1	Padrão de repouso	28
5.2	Protocolo com perturbações pontuais controladas	30
6	Considerações finais	33
7	Referências Bibliográficas	34

1 Introdução

Ainda que as contrações do coração de um vertebrado sejam iniciadas por marcapasso miogênico, a frequência cardíaca (f_H) dominante é determinada pelo Sistema Nervoso Central (SNC) através do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (TAYLOR et al., 2014). O SNA inerva o coração desse grupo e modula o trabalho cardíaco. De forma geral, pode-se dizer que o SNA exerce influências parassimpáticas inibitórias e simpáticas excitatórias. Tal inervação, influencia tanto a força de contração quanto a frequência cardíaca e velocidade de condução do estímulo entre as câmaras (ALTIMIRAS, 1999). A modulação dos ramos do SNA é exercida de forma tônica e concomitante. Ininterruptamente, ela ajusta o trabalho cardíaco a uma larga gama de processos fisiológicos (TAYLOR et al., 1999).

O termo variabilidade da frequência cardíaca (*Heart Rate Variability – HRV*) se refere ao efeito de múltiplas oscilações cíclicas concomitantes, efetivadas batimento-a-batimento em um trecho de intervalos cardíacos sequenciais (TASK FORCE et al., 1996). As diversas oscilações incluem ajustes à pressão arterial, à eventos de ventilação, aos ciclos de temperatura, ciclos de atividade e repouso, variações circadianas, dentre outros. Eles resultam em alterações complexas da f_H batimento-a-batimento. Em um sentido amplo, qualquer mudança modulada na frequência cardíaca instantânea qualifica variabilidade na frequência cardíaca (ALTIMIRAS, 1999).

Assim, HRV estará presente em um sistema integro, capaz de utilizar apropriadamente seu potencial modulatório para atingir a homeostase (THAYER et al., 2012; UMETANI et al., 1998; PLEWS et al., 2013). Por conseguinte, a análise de HRV pode gerar informações relevantes sobre a modulação derivada da combinação dos fluxos autonômicos cardíacos simpático e parassimpático (ALTIMIRAS, 1999). Uma vez que o padrão de valores saudáveis de HRV tenha sido obtido através do registro, análise e descrição de animais em repouso e recuperados de quaisquer procedimentos, pode-se utilizá-lo como ferramenta indexadora para identificação de padrões dentro e fora do esperado para tal estado. Um desvio dos valores esperados pode sinalizar potenciais problemas e encorajar uma investigação. Logo, a análise de HRV tem o potencial para ser empregada como ferramenta de avaliação do estado animal.

A aplicação da análise em humanos, iniciada na década de 60, relata importantes contribuições para tal uso na clínica médica. O estudo da alteração do intervalo entre as

contrações diagnosticou doenças fetais (HON & LEE, 1965 apud TASK FORCE et al., 1996), neuropatias (EWING et al., 1985), risco de mortalidade pós infarto (WOLF et al., 1978) e nível de mortalidade de pacientes cardíacos (ROUTLEDGE; CHROWDHARY & TOWNEND, 2002).

A caracterização da HRV em humanos somada aos padrões cardiorrespiratórios similares entre os mamíferos, resultou em um volume muito maior de estudos na classe *Mammalia*, quando comparada às outras. Esta análise tem emergido como um indicador especialmente promissor de estresse e bem-estar de animais de pecuária e seu uso neste meio tem crescido de forma exponencial (VON BORELL et al., 2007). Nos últimos quinze anos, empenhos numerosos foram colocados na avaliação de estresse causado por enfermidades, ordenha e procedimentos dolorosos na criação de bezerros (KOVÁCS et al., 2014). A HRV também foi utilizada como ferramenta de caracterização de gado leiteiro de diferentes temperamentos e reatividade à humanos (KOVÁCS et al., 2015), na avaliação da diferença entre linhagens de galinhas durante a contenção (KORTE; RUESINK & BLOKHUIJUS, 1998) e no estresse causado em porcos pelo aumento de temperatura (BYRD et al., 2020). Contudo, parece ter havido muito pouco progresso efetivo neste momento inicial. Apesar do potencial de aplicação e do interesse geral, diversas tentativas de uso desta ferramenta parecem subestimar a complexidade de modulação autonômica representada pela HRV total, de forma que alguns destes estudos possuem desenho experimental ou conclusões inconsistentes.

O uso na clínica veterinária e pesquisas aplicadas só tiveram mais expressão na última década, investigando mudanças no balanço do Sistema Nervoso (SN) relacionadas às condições patológicas, estresses, disfunções comportamentais, regimes de treinamento, manejo e estado emocional (VON BORELL et al., 2007). A análise foi também utilizada para comprovar os efeitos positivos da interação humano-animal (BERGAMASCO, 2010).

A HRV foi amplamente estudada em mamíferos, mas também observada em aves, peixes e alguns répteis (TAYLOR et al., 2014). Em estudo pioneiro, Monteiro e colaboradores (2018) demonstraram que um dos principais componentes da HRV, a interação cardiorrespiratória, até então identificada como característica dos mamíferos, também está presente no primitivo peixe piramboia, *Lepidosiren paradoxa*. Tal fato indica que os principais componentes da HRV provavelmente evoluíram muito cedo nos tetrapoda e o mecanismo ficou conservado nos mamíferos. Assim, o estudo da HRV nos

vertebrados não-mamíferos, além do potencial de aplicabilidade, fomenta discussões fisiológicas e evolutivas. Trabalhos de biologia comparativa podem elucidar nosso entendimento de sistemas mamíferos e, portanto, dos próprios sistemas humanos (TAYLOR, 1999). Entre os répteis, os empenhos científicos foram as recentes caracterizações da HRV para Squamata com a serpente cascavel *Crotalus durissus* (SANCHES et al, 2019) e o lagarto teiú *Salvator merianae* (DURAN et al., 2020).

Nosso desenho experimental foi projetado para testar a hipótese de que a HRV poderia ser utilizada para avaliar o estado do animal e assim estaria correlacionada com perturbações causadas por procedimentos clínicos. Desta forma, analisamos a alteração da HRV e sua recuperação ao longo do tempo, após uma sequência de manobras comuns em um laboratório de biologia como manuseio do espécimen, tratamento profilático, sedação e anestesia. Avaliamos também se o aumento de invasividade do procedimento estaria correlacionado com tais modificações. O estudo foi realizado no em lagartos Teiú *Salvator merianae*, espécie que teve o padrão de HRV recentemente descrito.

2 Revisão bibliográfica do tema

2.1 Bem-estar animal

O desafio inicial para o avanço de metodologias na área é a falta de concordância sobre a própria definição do conceito de bem-estar (KAGAN; CARTER & ALLARD, 2015). De forma convencional, o bem-estar é avaliado com base em cinco “liberdades” propostas pelo Comitê Brambell (1965). Tal iniciativa tenta abarcar aspectos fundamentais para o que seria considerado bem-estar e engloba a liberdade de sede e fome, liberdade de medo e distresse, liberdade de desconforto, liberdade de dor e sofrimento e, por fim, liberdade para expressar “comportamentos normais”. Na prática, assegurar condições para suprir as necessidades de qualquer definição de bem-estar dos animais requer postura e disposição em nível institucional, além de expertise e comprometimento para propiciar robustos programas de medição, implementação e avaliação das práticas de cuidado animal (KAGAN; CARTER & ALLARD, 2015). Como consequência, estudos mais recentes têm proposto a implementação de abordagens científicas que criem uma imagem melhor do que seria esperado para o corpo e a mente dos animais e como deveriam ser estabelecidas respostas às situações aversivas e agradáveis (SIEGFORD, 2013). Apesar do avanço ainda há muito para ser compreendido.

Algumas definições e objetivos facilitam o entendimento, mas ainda são de muito difícil aplicação. Por exemplo, há conceituações que indicam que deve ser proporcionando vidas que “valem a pena” serem vividas (MELLOR, 2016). Tal conceito passa por premissas e interpretações de alto teor antropocêntrico e assim, apesar do conceito ajudar, de certa forma, a compreender o que se quer proporcionar, torna muito difícil qualquer ação objetiva envolvendo outras espécies.

Apesar das incertezas acerca do termo bem-estar, uma extensa gama de atividades que envolvem os animais, direta ou indiretamente (KAGAN; CARTER; ALLARD, 2015), demandam uma avaliação categórica do estado dos indivíduos. Um espécime saudável é premissa em esforços para reprodução assistida (PENNINGTON, 2019), em levantamentos da interação humano-animal em zoológicos (LEARMONTH, 2020), na discussão sobre o efeito de situações de entretenimento para turistas (ESSEN; LINDSJÖ; BERG, 2020), na produção de animais para consumo humano (VON BORELL et al., 2007), na investigação de anestesia de animais não-mamíferos (GREUNZ et al., 2018), e em todos os procedimentos de biologia experimental realizados *in vivo*. Em um sentido amplo, como humanos dotados do controle completo sobre o cuidado e o ambiente dos animais cativos, temos a obrigação ética de garantir e de fato promover o bem-estar de animais sob nossos cuidados (BENN; MCLELLAND; WHITTAKER, 2019).

Os indicadores de bem-estar animal estão usualmente divididos em categorias que o avaliam indiretamente, observando aspectos presentes: no ambiente físico, comportamento, em indicadores de saúde física e nutrição e, na própria interação com os cuidadores encarregados (SHERWEN, 2018). Avaliar e aumentar o bem-estar animal deve incluir esforços científicos multidisciplinares, capazes de criar uma figura completa de como uma espécie responde às situações (SIEGFORD, 2013) e o que seria esperado de animais “normais” e saudáveis. Ainda assim, são raras as iniciativas que compilam mais de um indicador.

Considerando a diversidade dos grupos de animais, é de forma desproporcional que grande parte do esforço em novas metodologias é dedicado exclusivamente aos mamíferos. Como resultado, não são todos os métodos disponíveis que foram validados para todos os grupos (SIEGFORD, 2013). Um exemplo é a resposta à novidade, abordagem comum para avaliar ansiedade, e, portanto, bem estar de animais não-humanos. Tal índice avalia o comportamento do indivíduo exposto à um ambiente

familiar, em comparação ao comportamento apresentado em um ambiente novo. A avaliação baseia-se na identificação de comportamentos característicos de estresse ou ansiedade. Os autores puderam identificar comportamental geral compatível com ansiedade nos jabutis *Chelonoidis caarbonaria*, enquanto dragões barbados *Pogona vitticeps*, apesar de aparentemente distinguirem os dois ambientes, não apresentaram tal resposta.

Apesar do interesse contínuo no desenvolvimento de indicadores eficientes, as opções são majoritariamente baseadas em condições físicas ou comportamentais observadas por pessoas treinadas. Para compor o arcabouço de comportamentos ordinários e considerados saudáveis, são usadas observações da espécie em seus habitats naturais. Além da aplicação espécie-específica, as perspectivas pessoais dos observadores (por exemplo, seu treinamento, sua cultura e sua visão ética) podem enviesar a consideração de diferentes elementos do bem-estar como mais ou menos importantes. Isso pode resultar em ênfases diferentes do que constitui um problema ou onde os esforços devem ser focados para melhorar a situação. O bem-estar precisa representar uma boa qualidade de vida no entendimento animal, abstraindo-se das perspectivas dos cientistas humanos ou cuidadores (SCOTT et al., 2003). Desta forma, frente aos desafios inerentes à progressão do desenvolvimento nesta área, é salutar e desejável que novas ferramentas de monitoramento e avaliação sejam projetadas e testadas.

2.2 Bem-estar animal em répteis

Os padrões comportamentais perceptíveis de répteis são compostos de grande número de comportamentos estereotipados. Tal padrão é visto e descrito, de forma geral, como “simples”. O termo parece se referir um padrão geral que seria constituído de grande arcabouço de comportamentos estereotipados e, portanto, descritos como “simples”. Para alguns autores esse padrão seria resultado de sua fisiologia ectotérmica e baixo metabolismo, que prioriza o uso da energia em comportamentos essenciais como caça ou regulação térmica (PARÉ & LENTINI, 2010). Em todo o caso, este é um aspecto complicador para análises e interpretações. Apesar destes animais manifestarem uma matriz de comportamentos que indicam estresse (WARWICK et al., 2013), o reflexo da percepção antropocêntrica torna a avaliação de bem-estar através do comportamento ineficiente. Outra limitação expressiva para esse indicador é a escassez de etogramas para

espécies de répteis em condição natural (BENN; MCLELLAND; WHITTAKER, 2019), que implica, além de comportamentos naturais, alcance e contexto apropriados (WARWICK et al., 2013).

Apesar da disponibilidade insuficiente de métodos para o grupo, as iniciativas que têm como premissa o estado animal saudável ou a melhoria da avaliação de bem-estar propriamente dita são numerosas. Guadarrama e colaboradores (2020) investigaram o efeito da hipóxia causada pela mudança de altitude no bem-estar do ameaçado lagarto-de-contas (*Heloderma Horridum*), devido à transferência de indivíduos para instituições de conservação. Mingo e colaboradores (2019) propuseram o uso de esfregaço bucal para detecção da exposição de lagartos *Podarcis muralis* à pesticidas, a fim de diminuir o grau de invasidade desse tipo levantamento. Lagartos teiús, por exemplo, compuseram estudos de biologia experimental envolvendo procedimentos cirúrgicos que mencionam períodos de recuperação prévios à aquisição de dados (ZENA et al., 2020; DE VERA; GONZÁLEZ, 1997, 1999, 2012). Apesar da menção, os autores não descrevem qual foi o método utilizado para determinar o tempo que os animais ficaram em repouso ou para validar sua recuperação, ponto fundamental em desenho experimental desta natureza.

A tendência de aquisição de espécimes desta classe como pets cria uma demanda extra para obtenção de informações fidedignas. Trabalhos sobre o tamanho dos recintos para serpentes e suas decorrentes implicações à saúde e bem-estar dos indivíduos (WARWICK; ARENA & STEEDMAN, 2019), encontram levantamentos sobre a comercialização de recintos inadequados e informações precárias oferecidas aos novos “tutores” (D’CRUZE, 2020). Ainda no tópico, um trabalho recente apontou que os répteis adotados como pets no Reino Unido morrem no primeiro ano de vida no novo lar (WARWICK et al., 2017). Essa taxa de mortalidade sugere que o conhecimento geral de comportamentos e cuidados de saúde é insuficiente, em adição à inerente baixa adaptabilidade das espécies à ambientes artificiais (WARWICK et al., 2013). Prevalece a escassez de evidências científicas independentes e objetivas sobre as necessidades das diversas espécies comercializadas (WARWICK et al., 2017).

A heterogeneidade entre os répteis aumenta o desafio do estabelecimento de indicadores de bem-estar confiáveis, com diferenças substanciais de anatomia, dieta, estratégia de alimentação, nicho ecológico, estrutura social e estratégia reprodutiva (BENN; MCLELLAND; WHITTAKER, 2019).

Com o objetivo de desenvolver métodos mais integrativos, os cientistas estão sucessivamente incorporando abordagens de diferentes campos em seus estudos (SIEGFORD, 2013). Nesse contexto, abordagens fisiológicas teriam a vantagem de estar dissociadas de interpretação pessoal dos profissionais e assim, podem se tornar robustas ferramentas de avaliação. Assim, uma possível implementação de parâmetros fisiológicos como a análise HRV, por ser um eficiente indicador da modulação autonômica, pode ser útil para complementar avaliações de recuperação animal e possivelmente, avaliação de bem-estar.

3 Metodologia

3.1 Animais

Seis lagartos teiús (*Salvator merianae* Duméril & Bibron 1839) de ambos os sexos (massa corporal: 1619 ± 536 g, média \pm erro padrão) foram doados pelo Jacarezário, UNESP - Rio Claro, SP - Brasil. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Biologia Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e mantidos em um recinto em grupo. O recinto possui ciclos naturais de luz e temperatura ($\sim 12:12$ h, $18-30$ °C) com fonte de calor complementar artificial (lampa de aquecimento) para comportamento de termorregulação (10:14h – ligada:desligada). Os lagartos tinham acesso livre à água e eram alimentados duas vezes por semana. A alimentação foi interrompida 1 semana antes do experimento. Baseado em critérios comportamentais e avaliação de aspectos físicos, todos os animais utilizados foram julgados saudáveis. A manutenção dos animais e todos os procedimentos descritos foram anteriormente aprovados pelas CEUA-UFSCar.

3.2 Fixação de eletrodos superficiais

Para obtenção do registro de ECG, os animais tiveram 3 eletrodos adesivos acoplados e conectados à um sistema de amplificação e aquisição de dados (Animal BioAmp and Powerlab, ADInstruments). A ligação eletrodo-cabo foi estabilizada e preservada com bandagens elásticas (La Vet - Zhejiang Anji Huabu Industrial Co., roll 10cmx4.5m) circundando a conexão e tronco do animal. Observação da ventilação em

testes piloto indicaram que as bandagens não alteravam padrão e frequência respiratória. O posicionamento dos eletrodos foi encontrado através de testes prévios, visando reduzir interferências e manter a estabilidade do sinal durante movimentação do animal. Sendo assim, dois eletrodos foram aderidos no dorso do animal, em posição rostral e caudal ao coração. Um terceiro eletrodo foi aderido no dorso, na base da cauda (Figura 1). Os lagartos foram minimamente manipulados para a colocação dos eletrodos. Os eletrodos não foram removidos durante todo período de experimentação.

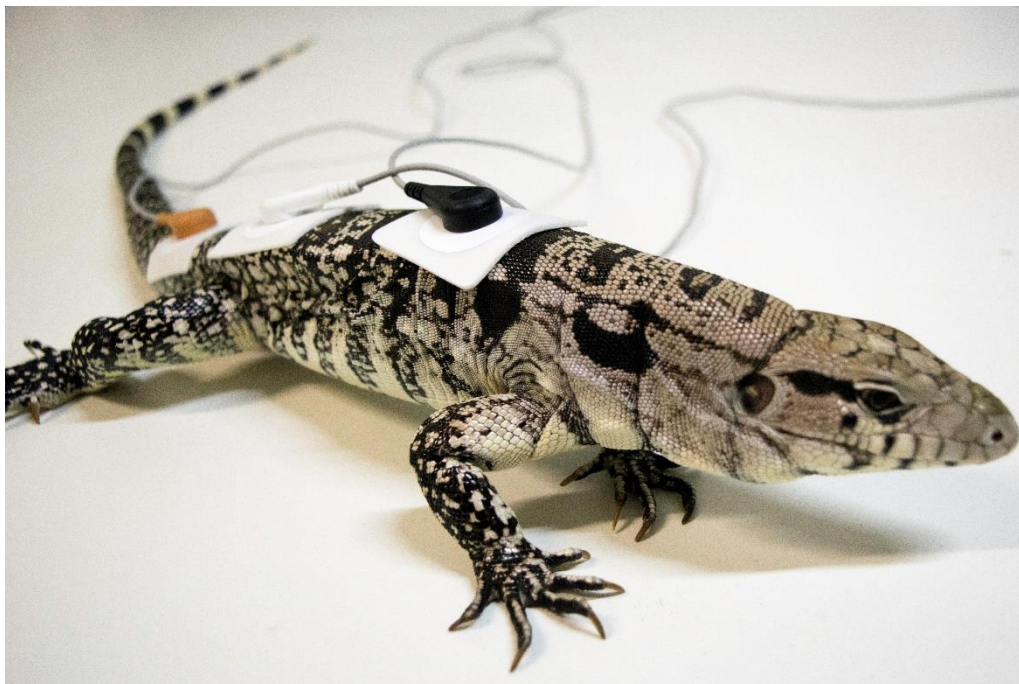


Figura 1: Registro fotográfico de exemplar de Lagarto tegu, *S. merianae*, (847g) com eletrodos para ECG aderidos a seu dorso. Fase de preparação anterior à aplicação da bandagem para estabilização dos eletrodos.

3.3 Procedimentos

Durante o experimento, os animais equipados com eletrodos foram acomodados individualmente em câmaras experimentais (caixas plásticas transparentes - 35x25x11cm). As caixas foram mantidas dentro de uma câmara climática (EL 202/2, Electro Lab) para controle de temperatura (30 °C), ciclo claro-escuro, e isolamento acústico.

3.3.1 Registro do padrão de repouso

O estado de repouso foi definido em nosso experimento como a condição em que o animal estava sem movimentação, livre de estressores ou perturbações aparentes. Os animais foram posicionados nas câmaras experimentais, 24h antes dos registros, para garantir estabilidade térmica e habituação à condição experimental. O sinal de ECG foi registrado continuamente, por 24h, desde o posicionamento dos eletrodos e reposicionamento do animal na câmara experimental. Testes iniciais haviam indicado que algumas horas seria suficiente para a HRV alcançar estabilidade nessas condições experimentais. O sinal de ECG foi utilizado para a análise de HRV (de acordo com os padrões descritos posteriormente) para avaliação da estabilidade da condição de manutenção e reconhecimento do padrão durante o repouso.

Assim, a análise de HRV foi realizada a cada hora de registro configurando uma serie temporal ao longo destas 24h. Os parâmetros de HRV foram avaliados com referência aos resultados anteriormente obtidos em registros remotos (telemetria), na mesma espécie e temperatura (Duran et al., 2020). No domínio do tempo, a variabilidade total pode ser avaliada como a dispersão de uma serie de intervalos RR_i , sendo representada pelo desvio padrão de RR_i (SDNN). No domínio da frequência, a análise de HRV usa a densidade espectral (PSD – Power Spectrum Density), como referência da variabilidade total.

3.3.2 Protocolo experimental

Após o estabelecimento dos parâmetros de repouso, obtivemos series temporais de análises construídas com registros antes do procedimento indicado como uma perturbação, imediatamente após tal procedimento, e a cada hora após este momento. Assim, a análise da HRV ao longo do tempo nos permite verificar o efeito de uma perturbação na HRV e sua progressão até retorno à condição estável de repouso, com referencia ao padrão identificado como estabilidade e/ou repouso de cada individuo.

O protocolo experimental utilizado foi constituído por uma série de procedimentos sequenciais, constituídos por perturbações progressivamente mais invasivas. Todos os procedimentos utilizados nesse estudo são comuns em laboratórios de biologia experimental. Depois de cada procedimento (perturbação), os lagartos foram

imediatamente acomodados na câmara experimental até reestabelecimento dos parâmetros de repouso. O ECG foi continuamente registrado ao longo do tempo. Todas as manobras (eventos rápidos) foram realizadas em sala controlada a 28°C, com exceção do plano anestésico, (descrito abaixo nas perturbações V e VI) conduzido a 30 °C.

Os eventos de perturbação foram executados na seguinte sequência, para cada um dos animais:

Perturbação I - Contenção e inspeção. O procedimento foi executado da forma padronizada, com contenção manual e inspeção para análise física com avaliação visual da condição das escamas, cauda, membros, coloração da boca, olhos. O procedimento foi realizado uma vez em cada animal. O procedimento durou cerca de dois minutos.

Perturbação II – Inspeção e injeção intraperitoneal de salina. Este procedimento envolveu manuseio do animal com contenção, seguida de aplicação intraperitoneal de salina estéril (2ml/Kg de NaCl 0,9%). A administração de salina foi utilizada para acessar a perturbação ocasionada pelo possível desconforto físico ocasionado pelo procedimento de injeção.

Perturbação III – Inspeção e injeção intraperitoneal de antibiótico e anti-inflamatório. Este procedimento foi idêntico ao anterior (p-II). Contudo, injetamos dose padrão das drogas utilizadas para profilaxia após procedimentos invasivos (Chemitril 10%, 11mg.kg⁻¹ e Flunixin 5% 1.1mg.kg⁻¹) (FUNK, 2000; BENNET, 1998; SANCHES et al., 2019; DURAN et al., 2020). Os medicamentos foram diluídos em salina até o volume final de 1mL.

Perturbação IV – Sedação com CO₂. Neste procedimento, cada animal foi retirado da câmara de experimentação e inserido em câmara para sedação. Nesta foi promovido o aumento da PCO₂ do ar inspirado. O procedimento completo teve duração aproximada de 20 minutos. CO₂ é comumente utilizado como sedativo de curta duração para garantir o manejo e intubação endotraqueal com segurança (DURAN et al., 2020; SANCHES et al., 2019; CONCEA, 2015).

Perturbação V – Sedação com CO₂ seguida de anestesia inalatória por 30 minutos. Os animais foram sedados como descrito no procedimento anterior (p-IV). Em seguida, o lagarto foi entubado e colocado sob ventilação mecânica com o anestésico

inalatório isoflurano (BOYER, 1998; READ, 2004; DURAN et al., 2020). Para a indução anestésica, utilizamos 3-5% de isoflurano por 5 minutos. Após isso, 1-2% para manutenção. O animal foi mantido em ventilação artificial adequada à massa corpórea (3-5 inspirações.minuto⁻¹, 15-20 mL volume/inspiração) durante todo o procedimento. Os animais foram mantidos sobre manta térmica, a 30°C.

O procedimento para obtenção do plano anestésico foi escolhido devido a sua ampla utilização em procedimentos cirúrgicos neste grupo. Da mesma forma, a escolha da administração de isoflurano é justificada devido à grande segurança quanto a dose e velocidade de recuperação (SLADKY & MANS, 2012; MOSLEY, 2005; BENNETT, 1991; LILLYWHITE, 2017; SANCHES, et al., 2019; DURAN, et al., 2020).

Perturbação VI – Sedação com CO₂ seguido de anestesia por 2 horas. Os animais passaram pelo mesmo procedimento descrito anteriormente (p-V). Contudo, a anestesia teve duração maior. Ao mimetizar um tempo maior de procedimento, analisamos a interferência do tempo de administração na posterior recuperação do animal.

3.4 Análise de dados

Os registros contínuos de ECG possibilitaram seleção de trechos a cada hora, para avaliação do efeito de cada procedimento nos parâmetros de HRV. Em tais análises, utilizamos series temporais com 256 intervalos RR consecutivos (RR_i) nos domínios do tempo e frequência conforme experimento anterior com a mesma espécie (Duran et al., 2020). Utilizamos os programas LabChart (ADInstruments) para tratamento de sinal, análise inicial e extração das séries temporais. O registro bruto foi processado com o filtro digital do LabChart (1-50Hz band-pass) e 2k/s. O programa CardioSeries (v2.4 <http://www.danielpenteado.com>) foi utilizado para a análise de HRV. Para evitar a perda de sinal, utilizamos janelamento Hanning (CAMPBELL et al., 2006; DURAN et al., 2020) e interpolação de 1Hz. Nossa análise seguiu os parâmetros utilizados por Duran e colaboradores (2020) para descrever o padrão de HRV em repouso (30°C) para a espécie. Tais parâmetros foram desenhados para contemplar as recomendações feitas pela *Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology* (1996).

As oscilações de PSD ao longo do tempo foram analisadas a cada hora com os testes de Kruskal Wallis e Dunn, no software R Studio (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). Consideramos $P < 0,05$ para determinação de diferença em todos os casos.

4 Resultados

4.1 Padrão de repouso

O método aplicado para obtenção de sinal de ECG permitiu registros limpos e confiáveis para análise (Figura 2). A contenção do animal para fixação inicial de eletrodos ocasionou medidas de variabilidade total (PSD – Power Spectral Density) ($97.082,9 \text{ ms}^2$) e f_H média ($24,78 \text{ bpm}$) relativamente alteradas em relação aos valores médios estáveis após acomodação na câmara de experimento. Após acomodação, os animais não apresentaram indícios de perturbação no contêiner experimental, ou com o equipamento e fios. Essa interpretação foi corroborada em $1 \text{ hora} \pm 0,44$ (Média \pm Erro padrão da média) após acomodação, quando os teiús alcançaram o padrão de HRV de referência para a espécie (Figura 3 e 4). Tal padrão é identificado, e representado ao longo do repouso, com valores individuais de PSD variando acima do limite estabelecido de 150.000 ms^2 (Figura 3). A f_H média, por sua vez, atinge a faixa de variação caracterizada neste desenho experimental como repouso ($17,58 - 19,94 \text{ bpm}$) a partir da hora 2 ($18,04 \text{ bpm}$). Tais valores foram similares aos obtidos na mesma temperatura em animais com implantes de telemetria (DURAN et al., 2020). Esse resultado indica que a espécie (na condição e idade dos animais utilizados aqui) permite obtenção de dados com equipamento superficial de modo não invasivo.

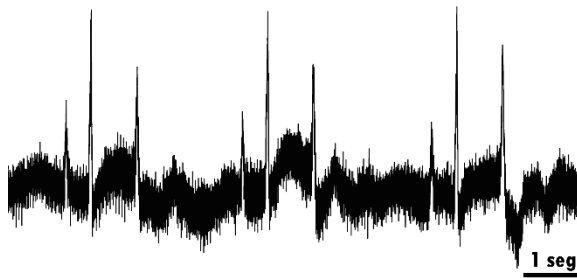


Figura 2: Trecho bruto de eletrocardiograma de um exemplar de teiú, *S. merianae* (1221g), demonstrando a qualidade do registro obtido com os eletrodos superficiais. O sistema, mesmo com conexão de cabos permitiu registro dos animais em repouso e sem estresse. Barra inferior, 1 segundo.

As análises de HRV no domínio do tempo e da frequência apresentaram resultados equivalentes à descrição anteriormente publicada, realizada para *S. merianae*, em repouso, a 30 °C, com o uso de telemetria. Os parâmetros do domínio do tempo: RRi, SDNN, RMSSD; e os parâmetros no domínio da frequência: PSD, LF e HF, e posição de picos cardiorrespiratórios estavam presentes e em similaridade às condições estipuladas para repouso (Tabela 1, Figura 3).

Padrão de repouso

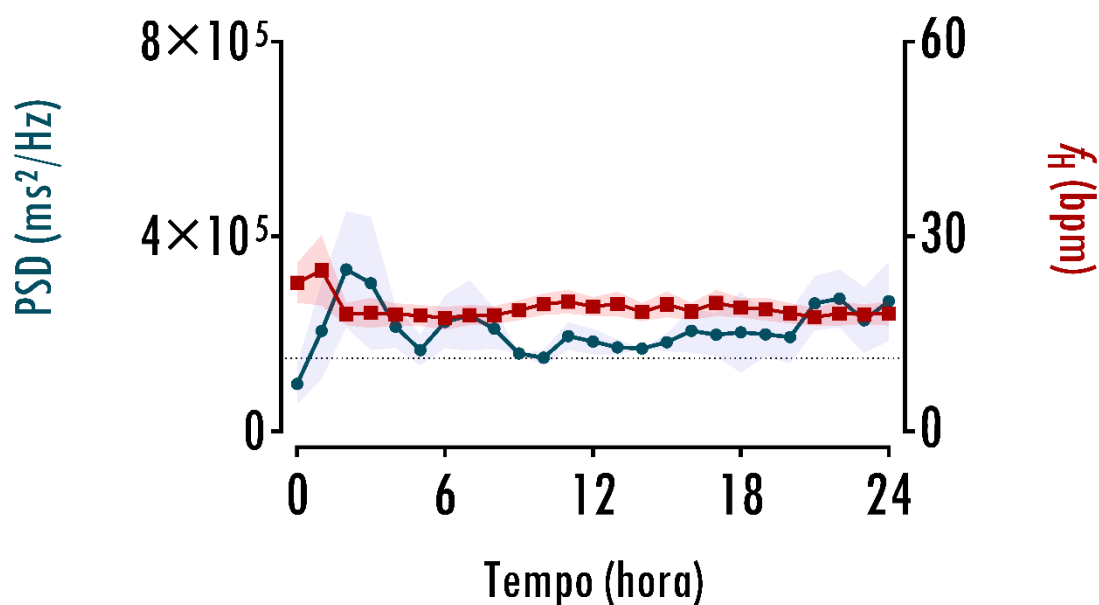


Figura 3: Progressão de alteração da média de densidade espectral (PSD – Power Spectral Density, azul) e f_H (vermelho) e ao longo de 24h em teiús (n=6, massa: 1619 ± 536,9g), *Salvator merianae*, em repouso, a 30°C. O tempo 0 marca o momento imediatamente posterior ao manuseio para fixação dos eletrodos superficiais e acomodação do animal na câmara experimental. Os círculos são médias dos valores ao longo à cada hora de registro. O erro padrão da média (EPM) é indicado pela área sombreada ao longo de cada traçado. A linha tracejada marca o valor médio mínimo de PSD que caracteriza o repouso (150.000 ms²).

A análise espectral também revelou a presença de um pico em área de muito baixa frequência, além de dois picos proeminentes em faixa similar (0,06 – 0,13Hz) às de ocorrência seus principais componentes de frequência respiratória (Figura 4). Isto permitiu a segmentação espectral em LF e HF que indicam valores similares aos caracterizados durante o repouso em 30°C (Tabela 1).

A análise de HRV no domínio da frequência indica que o efeito de perturbações pode claramente ser observada como alteração do padrão normal e na variabilidade total (Figura 4).

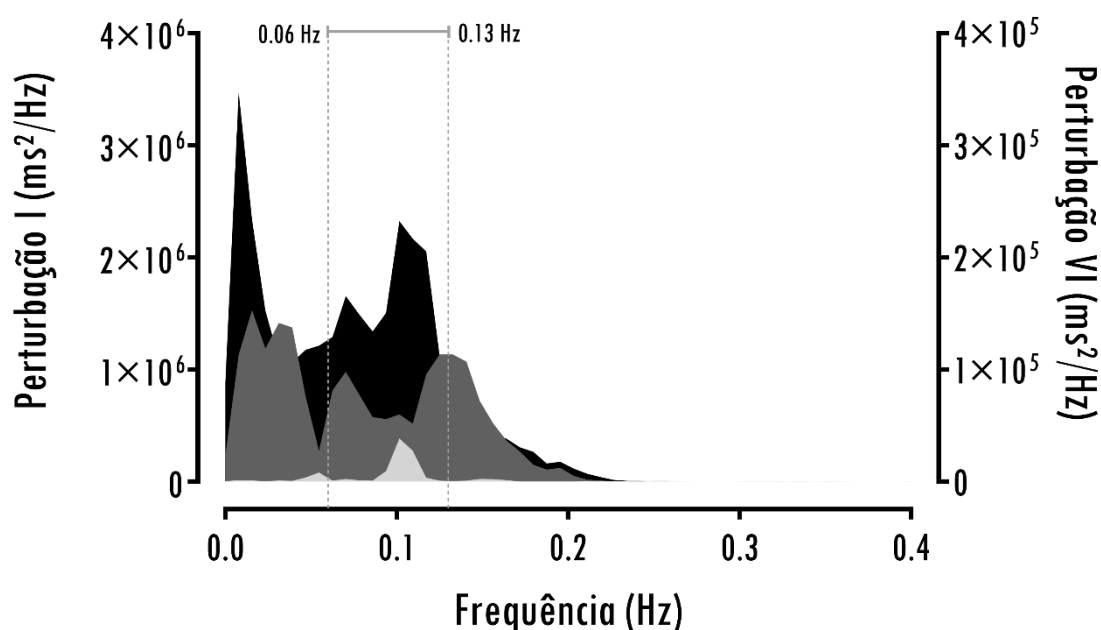


Figura 4: Análise de HRV no domínio da frequência em *S. merianae*, a 30°C. A figura apresenta a plotagem de padrão apresentado durante o período de repouso (preto); o efeito da contenção e manuseio (perturbação I – cinza escuro); e o efeito de uma perturbação maior, sedação com CO₂ seguida de 2h de isoflurano (perturbação VI – cinza claro). Os picos observados entre as frequências 0,06 Hz e 0,13 Hz (linhas pontilhadas) estão relacionados às interações cardiorespiratórias conforme descrito anteriormente (Duran et al., 2020).

Tabela 1

Parâmetros de HRV em teiú, *S. merianae* (n=6, massa corpórea: 1619 ± 536,9g, média ± desvio padrão), em repouso, a 30 °C, e modificações decorrentes do protocolo experimental.

	RRi (s)	PSD (ms ² /Hz)	LF (ms ²)	HF (ms ²)	LF/HF	RMSSD (ms)	Variance (ms ²)	SDNN (s)
Repouso	3,103	249935,50	81186,89	168748,6	0,72	752,57	444799,28	666,96
Perturbação I	2,249	19460,17	12920,85	12920,85	0,46	205,06	45977,79	214,42
Perturbação II	2,052	16929,42	4658,42	122271	0,5	181,47	29220,56	170,94
Perturbação III	1,514*	2638,58*	1120,51*	2245,76*	0,61	80,15*	25281,84*	159,00*
Perturbação IV	1,327*	1227,79*	441,86*	785,93*	0,71	37,35*	2184,37*	46,74*
Perturbação V	1,511*	2965,5*	2352,18*	613,33*	0,95	35,50*	7959,95*	89,22*
Perturbação VI	1,689*	1550,79*	104,3*	1446,49*	0,08	63,77*	1966,4*	44,34*

RRi – inter-beat interval; fH – mean heart rate; PSD – Power Spectral density; LF – Low Frequency Component; HF – High Frequency Component; LF/HF; RMSSD – Square Root of the Mean of the Sum of the Squares of Differences

between adjacent NN intervals; SDNN – Standard Deviation of all NN intervals. Os valores são medianas e os asteriscos apontam diferença estatística em relação ao estado de repouso (Kruskal Wallis – Dunn, $p < 0.05$).

4.2 Protocolo com perturbações

Todas as perturbações reduziram a variabilidade total aferida no momento de execução da manobra, como demonstra a imediata redução do PSD médio e aumento da f_H média (Figura 5). Este efeito é transitório. Nossa análise indica que há relação entre o grau da perturbação e a magnitude de seu impacto na PSD e f_H . Assim, perturbações com maior impacto, demandaram tempos maiores para recuperação do padrão de repouso (Figura 6).

Durante o protocolo experimental da perturbação VI, um de nossos animais sofreu uma lesão acidental na traqueia ao ser entubado para ventilação mecânica. Após procedimentos de atendimento e cuidado, registramos seus parâmetros e apresentamos em comparação com a média do grupo (Figura 7). Este indivíduo não apresentou progressão de retorno aos valores de repouso de PSD e f_H ao longo das 12h de observação.

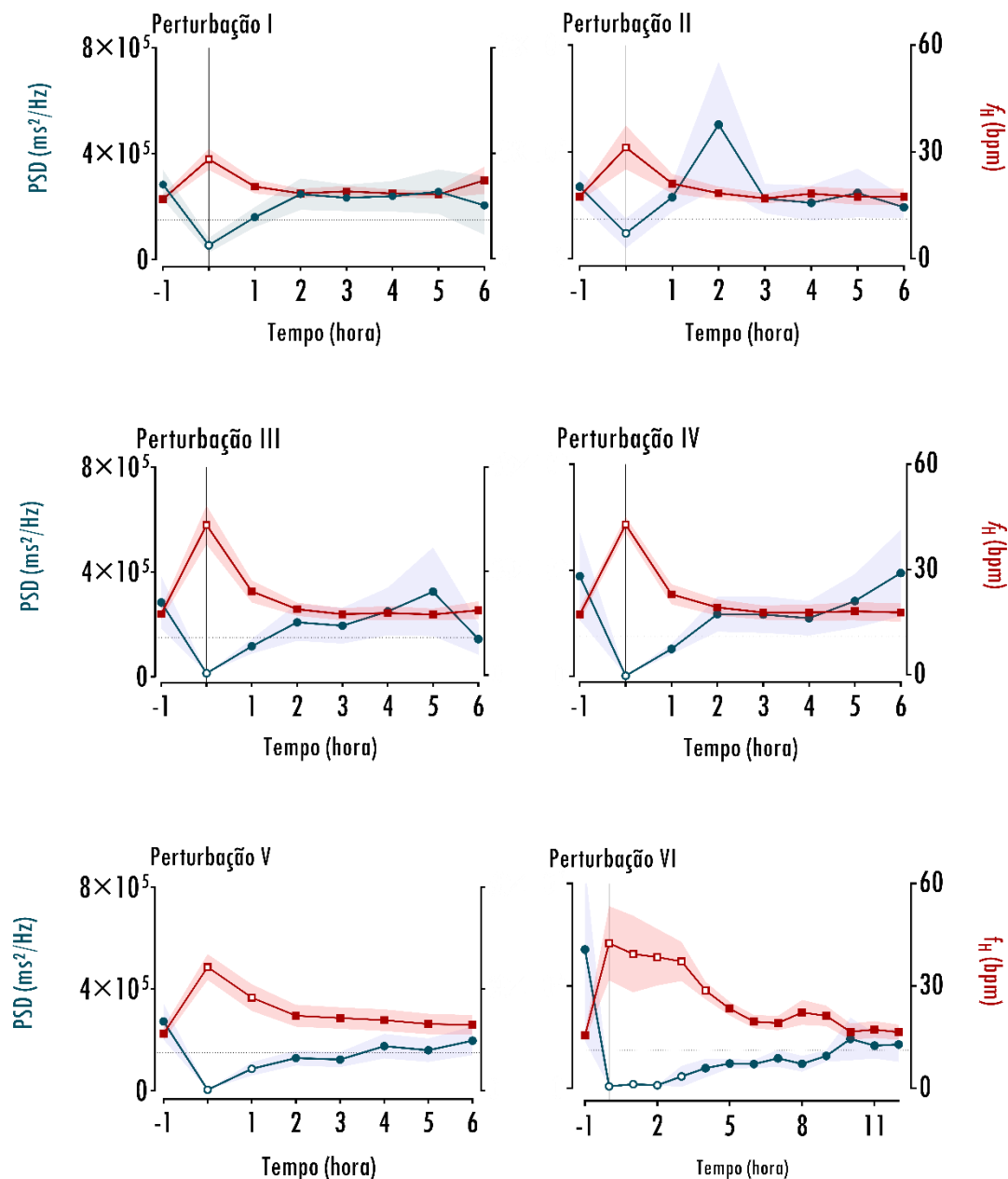


Figura 5: Progressão de alteração de valores de f_H média (vermelho linha contínua) e PSD (Power Spectral Density) médio (azul linha contínua) após a aplicação dos protocolos com perturbações em teiús, *S. merianae* (massa: $1619 \pm 537\text{g}$, média \pm SD), a 30°C . As perturbações foram: I - Contenção e inspeção, II - Inspeção e injeção intraperitoneal de salina, III - Inspeção e injeção intraperitoneal de antibiótico e anti-inflamatório, IV - Sedação com CO_2 , V - Sedação com CO_2 seguida de anestesia inalatória (isoflurano) por 30 minutos, VI - Sedação com CO_2 seguido por 2 horas de anestesia (isoflurano). Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão. Interior dos símbolos de cor diferente sinalizam diferença estatística entre os valores de repouso (representados pelo tempo -1).

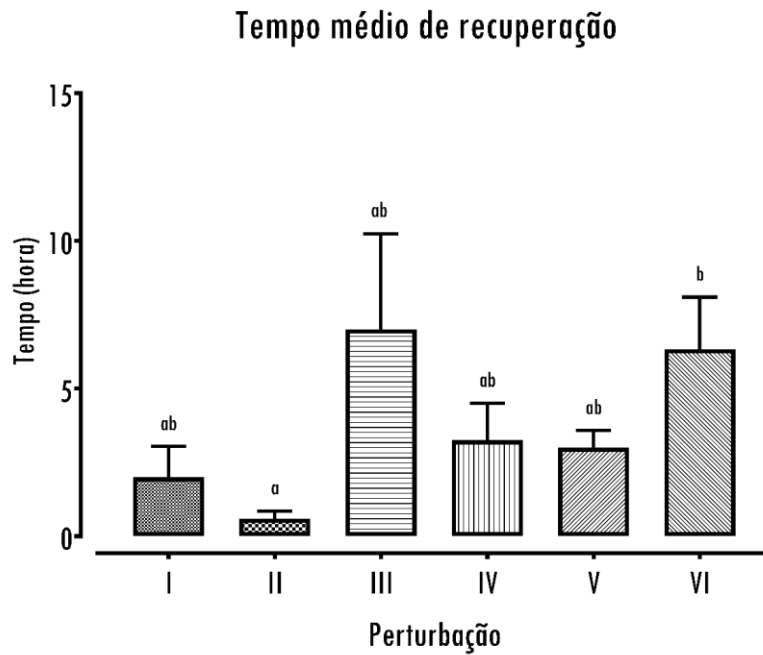


Figura 6: Tempo médio de recuperação necessário para retorno do PSD médio aos níveis de repouso após as perturbações I - VI em teiús, *S. merianae* (massa: 1619 ± 537 g, média \pm SD), a 30 °C. Perturbações: I - Contenção e inspeção, II - Inspeção e injeção intraperitoneal de salina, III - Inspeção e injeção intraperitoneal de antibiótico e anti-inflamatório, IV - Sedação com CO₂, V - Sedação com CO₂ seguida de anestesia inalatória (isoflurano) por 30 minutos, VI - Sedação com CO₂ seguido por 2 horas de anestesia (isoflurano). Letras diferentes denotam diferença estatística entre os valores.

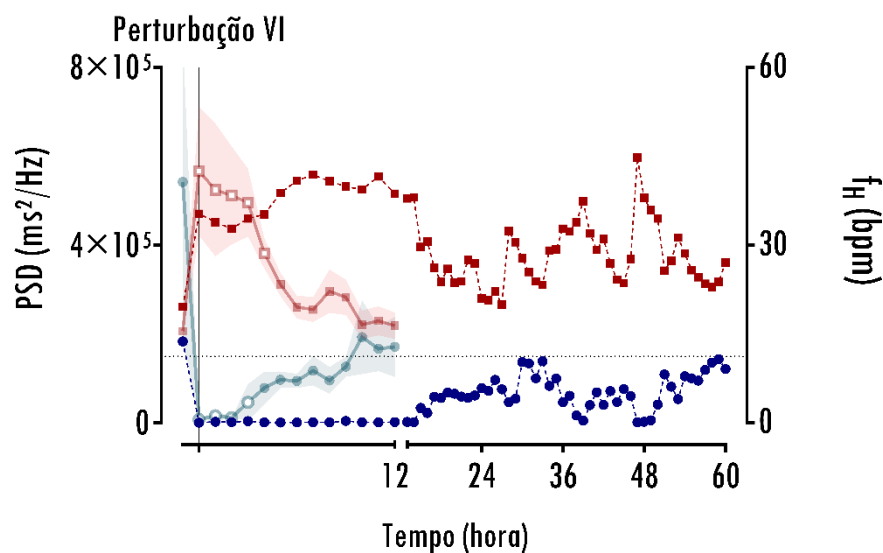


Figura 7: Progressão de alteração dos valores de f_H (vermelho linha tracejada) e PSD (azul linha tracejada) (Power Spectral Density) de indivíduo *S. merianae* lesionado (2200g) durante a execução de pIV. Os valores médios de f_H (vermelho linha contínua) e PSD (azul linha contínua) dos indivíduos *S. merianae* recuperados normalmente (massa: 1619 ± 537 g, média \pm SD) estão indicados para comparação.

5 Discussão

Atestar a condição de bem-estar de um réptil é um desafio singular entre os vertebrados. A situação é fruto da insuficiência de informações, mesmo que triviais, como os padrões de comportamento saudáveis na normalidade. Mesmo estes ainda são controversos ou até mesmo inexistentes para algumas espécies. Estes padrões são premissas para todos os métodos de monitoramento. Nesse cenário, o aumento de esforços multidisciplinares significa a atenuação dessa carência que se faz danosa à manutenção do grupo em qualquer habitat não-natural. A análise de HRV, como método proposto e testado neste projeto, revelou-se viável como ferramenta de monitoramento e eficiente como bioindicador na avaliação de perturbações no estado de repouso do animal e a progressão da recuperação do mesmo. A modulação que orchestra a HRV tem relação direta com a magnitude da perturbação provocada, conforme exposto em nossos resultados. Devido a série de invasividade explorada com nossa análise, pudemos observar o de potencial aplicabilidade para análises de comparação entre procedimentos ou para atestar a recuperação do estado estável de repouso em protocolos experimentais. Tais potencialidades nunca foram proporcionadas no grupo em répteis.

5.1 Padrão de repouso

A análise conseguinte à manipulação dos animais para adesão dos eletrodos apresentou, quando comparada ao valor de referência da espécie $220.203 \pm 37.270 \text{ ms}^2$ (média \pm erro padrão) (Duran et al., 2020), baixa variabilidade observada do parâmetro PSD (Power Spectral Density) na análise de variabilidade no domínio da frequência ($97.082,9 \pm 41.475,403 \text{ ms}^2$, média \pm erro padrão). O procedimento para instrumentação dos animais envolveu manuseio, pesagem, imobilização manual, colagem dos eletrodos e bandagem fixadora. Tal instrumentação foi sucedida de repouso estável, que assistiu o aumento e paridade da variabilidade total ($205.717,180 \pm 99.084,499$, média \pm erro padrão) com o valor de recuperação alcançado em $1 \pm 0,44\text{h}$. Além da progressão de PSD que se alinha com o valor de referência, a f_H média corrobora o mesmo padrão. Imediatamente após a instrumentação, a f_H média alcançou $22,9 \pm 3,1 \text{ bpm}$ (média \pm erro padrão), similar à $21,3 \pm 2,0$ (média \pm erro padrão) bpm, valor da primeira noite pós procedimento de Duran e colaboradores (2020). Já na hora 2 de nosso experimento, os indivíduos apresentam valor de $18,0 \pm 1,7$ (média \pm erro padrão) bpm, dessa vez similar

à recuperação completa dos animais ($16,4 \pm 1,1$ bpm, média \pm erro padrão) que caracterizaram o padrão da espécie (Duran et al., 2020). Tais resultados indicam que executamos o protocolo de procedimentos (p1-p6) em animais no melhor estado possível de repouso estável para tais condições laboratoriais e temperatura. Da mesma forma, podemos indicar que o procedimento de aplicação dos eletrodos superficiais, quando possível, configuram uma alternativa viável e de muito pouco impacto nos animais.

Os parâmetros de HRV no domínio do tempo (SDNN e RMSSD) foram similares aos relatados para animais em repouso, a 30°C, com registro remoto (DURAN et al., 2020), respectivamente, $601,5 \pm 91,0$ s e $800,3 \pm 163,9$ ms (Tabela 1). No domínio da frequência, a análise de HRV também corrobora o estado de repouso estável de nossos animais. Nesta análise (Figura 4), foi possível identificar os mesmos picos de frequência observados por Duran e colaboradores (2020). Os picos são compatíveis com a interação cardiorrespiratória arritmia sinusal respiratória (ASR). Essa interação é inteiramente dependente da modulação parassimpática e assim, sua expressão clara é incompatível com rompantes de atividade e/ou estado de alerta. As condições experimentais aqui propostas, restringiram a possibilidade de atividade normal durante a permanência na câmara experimental (deslocamento livre, exploração do ambiente, interações intra e interespecíficas etc.), mas permitiam livre movimentação. Inferimos que uma eventual ausência de tais picos seria provavelmente reflexo de modulação autonômica envolvendo elevação de influência simpática e concomitante redução parassimpática durante um distúrbio ou estado de alerta.

Além da conformidade entre nossos dados e a recente caracterização da HRV para esta espécie, a f_H média encontrada no repouso de nossos animais é condizente com os achados de experimentações similares. Animais acordados, em temperatura de 27 °C apresentam f_H média de $19,3 \pm 4,6$ bpm (PIERCY et al., 2015). Em temperatura mais baixa (25 °C), Zena e colaboradores (2016) encontram ~ 13 bpm. Condições seminaturais com livre movimentação e termorregulação (temperatura corporal 24 – 35°C), por sua vez, proporcionaram variação da f_H de 10-60 bpm (SANDERS et al., 2015).

A comparação com outras tentativas de descrição da HRV em lagartos (DE VERA; GONZÁLEZ, 1997, 1999), no caso, não é apropriada devido à identificação de erros metodológicos em tais protocolos experimentais. Em tais tentativas, o desenho experimental utilizava pouco tempo de recuperação pós instrumentação e/ou manuseio

dos espécimes. O intervalo RR assumido como estável (1,259s) é comparável com o valor que encontramos nas perturbações mais invasivas de nosso protocolo (Tabela 1).

Possivelmente, a manutenção inadequada, perturbações locais e/ou tempo de recuperação insuficiente não permitiriam constatações de recuperação semelhantes às que tivemos. Nestes casos, provavelmente, os animais teriam a f_H média elevada com imutabilidade característica da ausência de HRV; como exposto em um estudo sobre o efeito de anestésicos (BISETTO; MELO & CARREGARO, 2018). Neste trabalho, a f_H média, método de acompanhamento escolhido, não foi restaurada no período do experimento (24 horas). Portanto, a recuperação dos indivíduos, que no período experimental tiveram sua f_H elevada à 90bpm, não foi atestada.

A f_H média sofre alterações em resposta ao estado fisiológico do organismo e demandas metabólicas (JOYCE & WANG, 2020). Ajustes instantâneos estão relacionados também à eventos cíclicos como ajustes de pressão arterial, ventilação, ciclos de temperatura, ciclos de atividade e repouso configurando a HRV do indivíduo em questão (TAYLOR et al, 2014; ALTIMIRAS, 1999; TAYLOR et al., 2010). Como o SNA modula tanto a HRV quanto a f_H média, entendemos que os reestabelecimentos da HRV e f_H média podem ser entendidos como índices de recuperação das alterações causados por distúrbios. Assim, a compatibilidade de nossos achados com a referência da espécie somada à de oscilação de PSD acima do limite acordado (150.000ms²) durante 24 horas e à análise espectral característica da modulação plena, tipifica um quadro de recuperação completa e estado de repouso em nossa condição experimental.

5.2 Protocolo com perturbações pontuais controladas

O protocolo de perturbações abordou procedimentos de rotina em biotérios, laboratórios experimentais e instituições veterinárias. A sequência foi desenhada para promover desvios gradualmente maiores ao estado de repouso. Tal fato não pôde ser observado com o uso do PSD como índice, pois todas as manobras provocaram expressiva redução de valor (Tabela 1) no momento imediatamente posterior à manobra. Contudo, a análise espectral apresentou reduções de magnitudes diferentes quando comparadas as perturbações menos (I) e mais invasiva (IV) (Figura 4). Além da sinalização da análise

espectral, o tempo necessário para reestabelecimento da variabilidade também é afetado pelo grau do distúrbio.

De acordo com o parâmetro tempo de recuperação, vimos classes de alterações geradas pelos procedimentos aplicados. Os procedimentos envolvendo sedação e anestesia demandaram mais tempo de recuperação do que os que envolverem apenas contenção e aplicação de substâncias. Da mesma forma, a duração do tempo de manuseio para inspeção parece ser um fator de impacto mais relevante na resposta autonômica do que a administração de injeções, visto que o procedimento de inspeção demanda mais tempo médio de recuperação do que a injeção intraperitoneal de salina.

A injeção profilática apresentou a maior variação no tempo médio de recuperação, similar ao plano anestésico de 2 horas. Esse fato sinaliza uma característica possivelmente individual de resposta à profilaxia. Tal fato reforça a importância de uma análise eficaz e confiável para avaliação da condição do animal inclusive em procedimentos de rotina como essa administração.

A aplicação de anestésico inalável gerou tempo médio de recuperação equivalente ao tempo de manutenção dos anestésicos. Independente da supressão nervosa que o próprio procedimento cirúrgico cause em um indivíduo, um tempo estendido em plano anestésico pode facilmente prolongar a recuperação; visto que a anestesia, isoladamente, reduz a atividade autonômica geral (MOSLEY; DYSON & SMITH, 2004). Esse achado deve ser considerado no planejamento de procedimentos futuros que almejem rápida recuperação.

Em todos os procedimentos, tanto a f_H média quanto o PSD, acompanham a saída do padrão de repouso (indicada pelo tempo 0), causada pela perturbação e seu retorno a faixa de normalidade ao longo do tempo (Figura 5). Há recuperação simultânea de f_H média e PSD em perturbações de rápida recuperação. Contudo, em perturbações de maior impacto, a f_H média é recuperada antes da variabilidade de repouso (Figura 5). Essa observação corrobora o resultado indicado em outros estudos com uso de telemetria, nos quais a f_H retornou expressivamente antes do que a variabilidade (SANCHES et al., 2019; DURAN et al., 2020). Aparentemente, o retorno do tônus autonômico para definição da f_H média é mais rápido do que o retorno da modulação autonômica que promove a HRV. Esta observação é de grande relevância pois a f_H média é um dos indicadores fisiológicos

mais utilizados para atestar recuperação pós-procedimentos. Neste caso, há a possibilidade de subestimar o tempo necessário para retorno ao repouso e erro procedimental e/ou de interpretação dos resultados auferidos, se estes dependerem de modulação autonômica.

Durante a perturbação VI (sedação com CO₂ seguida de duas horas de anestesia), um dos lagartos sofreu uma lesão traqueal transiente no momento da intubação. O problema só foi observado minutos após a intubação. O indivíduo foi então avaliado e clinicamente amparado. Ele recebeu tratamento profilático padrão, foi recuperado da anestesia e retirado do grupo experimental. Ele foi recolocado na caixa experimental, visto que proporcionava um ambiente confortável de recuperação e isolamento e mantivemos o registro de ECG (Figura 7). Apesar dos cuidados recebidos e do comportamento compatível com todos os outros animais, este indivíduo só alcançou os valores de recuperação de variabilidade após 59 horas. O índice de PSD, como nos outros procedimentos, não apresentou valor especialmente baixo que permitisse a identificação de tal evento. A avaliação da recuperação, e reconhecimento de situação incomum, foi nítida através do tempo até o retorno do valor de variabilidade. A f_H , por sua vez, apresenta valor similar à média do grupo nas primeiras horas e então, aumenta seus valores por várias horas. O padrão apresentado nesse animal não é compatível com o pleno funcionamento do SNA. Devido a injúria, é provável que a modulação do arco simpático esteja suprimindo a modulação parassimpática o que, além de inibir a variabilidade, aumenta a f_H média.

A facilidade de obtenção da f_H média faz com que seja o método mais utilizado para acompanhamento – sua derivação é simples em sinais de ECG, pressão arterial, fluxo ou pulsação. Assim, se esse parâmetro pode indicar uma falsa recuperação dentro do grupo, os protocolos que utilizem a f_H média podem estar subestimando ou superestimando os fenômenos estudados. Argumentamos, portanto, que a recuperação concomitante observada em nosso trabalho não legitima o uso corrente e isolado da f_H média para atestar recuperação pós procedimento anestésico.

Considerando que a regulação de estresse induz uma gama de mudanças fisiológicas e comportamentais (VON BORELL, 2001), essas duas classes de respostas tratadas separadamente estão intimamente relacionadas (KOVÁCS et al., 2014). Contudo, a interpretação de dados numéricos objetivos é mais assertiva e simples de ser

interpretada (na maioria dos casos) porque é menos suscetível a vieses de interpretação antropomorfizada, permite monitoramento remoto, registro e reanálises, de acordo com potenciais alterações de quadro e/ou ambiente. A análise de HRV foi eficiente em identificar eventos ou perturbações e apresentou relação com a magnitude desta. Assim, a análise porta-se como ferramenta eficiente de acompanhamento do estado de um teiú nessas condições. Além disso, tal ferramenta permite a comparação objetiva entre procedimentos e assim, fundamentar tomadas de decisão sobre implementação de processos e avaliação de protocolos com uso de animais.

A avaliação do pleno funcionamento do Sistema Autônomo ampara a garantia das cinco liberdades (BRAMBELL, 1965) e as iniciativas científicas atuais que almejam o estabelecimento do bem-estar animal sob a perspectiva do próprio animal SCOTT et al., 2003). De forma complementar, a instrumentação para o posicionamento de eletrodos superficiais disponibiliza uma solução simples de aquisição de dados relevantes para a análise de HRV.

6 Considerações finais

Nosso resultado destaca a disponibilidade e eficiência de uma ferramenta complementar de avaliação da condição animal de um réptil Squamata. A ferramenta pode ser usada para acompanhar processos de recuperação de diferentes graus de invasividade. A funcionalidade da análise de HRV abrange práticas tão triviais que tornam o emprego da ferramenta vantajosa em um amplo número de situações.

Para trabalhos futuros, seria interessante observar a eficácia e possíveis limitações no monitoramento de espécimes com menos restrição de comportamentos, como em instituições cativas que compreendam recintos amplos e de livre circulação. Ademais, a análise poderia ser praticada de forma concomitante com os métodos mais utilizados a fim de confrontar suas determinações.

7 Referências Bibliográficas

ALTIMIRAS, J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise?. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 124, n. 4, p. 447-460, 1999.

BENNETT, R. A. A review of anesthesia and chemical restraint in reptiles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 282-303, 1991.

BENNETT, R. A. Reptile anesthesia. In: **Seminars in avian and exotic pet medicine**. WB Saunders, 1998. p. 30-40.

BENN, A. L.; MCLELLAND, D. J.; WHITTAKER, A. L. A review of welfare assessment methods in reptiles, and preliminary application of the welfare quality protocol to the pygmy blue-tongue skink, *Tiliqua adelaidensis*, using animal-based measures. **Animals**, v. 9, n. 1, p. 27, 2019.

BERGAMASCO, L. et al. Heart rate variability and saliva cortisol assessment in shelter dog: Human–animal interaction effects. **Applied animal behaviour science**, v. 125, n. 1-2, p. 56-68, 2010.

BISETTO, Shayne P.; MELO, Cristiano F.; CARREGARO, Adriano B. Evaluation of sedative and antinociceptive effects of dexmedetomidine, midazolam and dexmedetomidine–midazolam in tegus (*Salvator merianae*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 45, n. 3, p. 320-328, 2018.

BOYER, T. H. Emergency care of reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 1, n. 1, p. 191-206, 1998.

BRAMBELL, F. W. R. et al. Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. 1965.

BYRD, C. J. et al. Nonlinear analysis of heart rate variability for evaluating the growing pig stress response to an acute heat episode. **Animal**, v. 14, n. 2, p. 379-387, 2020.

CAMPBELL, H. A. et al. Evidence for a respiratory component, similar to mammalian respiratory sinus arrhythmia, in the heart rate variability signal from the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 14, p. 2628-2636, 2006.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA. Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. **Normativas do CONCEA**, v.2, 2015.

D'CRUZE, N. et al. Dropping the Ball? The Welfare of Ball Pythons Traded in the EU and North America. **Animals**, v. 10, n. 3, p. 413, 2020.

DE VERA, L.; GONZÁLEZ, J. Power spectral analysis of short-term RR interval and arterial blood pressure oscillations in lizard (*Gallotia galloti*): effects of parasympathetic blockade. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 3, p. 671-678, 1997.

DURAN, L. M. et al. Heart rate variability in the tegu lizard, *Salvator merianae*, its neuroanatomical basis and role in the assessment of recovery from experimental manipulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 240, p. 110607, 2020.

ESSEN, E. von; LINDSJÖ, J.; BERG, C. Instagranimal: Animal Welfare and Animal Ethics Challenges of Animal-Based Tourism. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1830, 2020.

EWING, David J. et al. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. **Diabetes care**, v. 8, n. 5, p. 491-498, 1985

FUNK, R. S. A formulary for lizards, snakes, and crocodilians. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 3, n. 1, p. 333-358, 2000.

GREUNZ, E. M. et al. Elimination of intracardiac shunting provides stable gas anesthesia in tortoises. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2018.

GUADARRAMA, S. S. et al. Hypoxia by altitude and welfare of captive Beaded Lizards (*Heloderma horridum*) in Mexico: Hematological approaches. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 23, n. 1, p. 74-82, 2020.

JOYCE, William; WANG, Tobias. What determines systemic blood flow in vertebrates?. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 4, 2020.

KAGAN, R.; CARTER, S.; ALLARD, S. A universal animal welfare framework for zoos. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 18, n. sup1, p. S1-S10, 2015.

KORTE, S. M.; RUESINK, W. I. M.; BLOKHUIS, H. J. Heart rate variability during manual restraint in chicks from high-and low-feather pecking lines of laying hens. **Physiology & behavior**, v. 65, n. 4-5, p. 649-652, 1998.

KOVÁCS, L. et al. Heart rate and heart rate variability in dairy cows with different temperament and behavioural reactivity to humans. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0136294, 2015.

KOVÁCS, L. et al. Welfare implication of measuring heart rate and heart rate variability in dairy cattle: literature review and conclusions for future research. **Animal**, v. 8, n. 2, p. 316-330, 2014.

LEARMONTH, M. J. Human–Animal Interactions in Zoos: What Can Compassionate Conservation, Conservation Welfare and Duty of Care Tell Us about the Ethics of Interacting, and Avoiding Unintended Consequences?. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2037, 2020.

LILLYWHITE, H. B. et al. Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited?. **Bioscience**, v. 67, n. 1, p. 53-61, 2017.

MELLOR, D. J. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”. **Animals**, v. 6, n. 3, p. 21, 2016.

MINGO, V. et al. Validating buccal swabbing as a minimal-invasive method to detect pesticide exposure in squamate reptiles. **Chemosphere**, v. 229, p. 529-537, 2019.

MONTEIRO, D. A. et al. Cardiorespiratory interactions previously identified as mammalian are present in the primitive lungfish. **Science Advances**, v. 4, n. 2, p. eaaq0800, 2018.

MOSLEY, C. AE. Anesthesia and analgesia in reptiles. In: **Seminars in avian and exotic pet medicine**. WB Saunders, 2005. p. 243-262.

MOSLEY, C. AE; DYSON, D.; SMITH, D. A. The cardiovascular dose–response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 31, n. 1, p. 64-72, 2004.

MOSZUTI, S. A.; WILKINSON, A.; BURMAN, O. HP. Response to novelty as an indicator of reptile welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 193, p. 98-103, 2017.

PARÉ, J. A.; LENTINI, A. M. Reptile geriatrics. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 15-25, 2010.

PENNINGTON, P. M. et al. Ovulation induction in anovulatory southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) without altrenogest. **Conservation physiology**, v. 7, n. 1, p. coz033, 2019.

PIERCY, Joanna et al. The relationship between body temperature, heart rate, breathing rate, and rate of oxygen consumption, in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*) at various levels of activity. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, n. 8, p. 891-903, 2015.

PLEWS, D. J. et al. Training adaptation and heart rate variability in elite endurance athletes: opening the door to effective monitoring. **Sports medicine**, v. 43, n. 9, p. 773-781, 2013.

READ, M. R. Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 4, p. 547-552, 2004.

ROUTLEDGE, H. C.; CHOWDHARY, S.; TOWNEND, J. N. Heart rate variability—a therapeutic target?. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 85-92, 2002.

SANCHES, P. VW et al. Respiratory sinus arrhythmia is a major component of heart rate variability in undisturbed, remotely monitored rattlesnakes, *Crotalus durissus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 9, 2019.

SANDERS, C. E. et al. Daily and annual cycles in thermoregulatory behaviour and cardio-respiratory physiology of black and white tegu lizards. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, n. 8, p. 905-915, 2015.

SCOTT, E. M. et al. Evaluation of welfare state based on interpretation of multiple indices. **Animal welfare**, v. 12, n. 4, p. 457-468, 2003.

SHERWEN, S. L. et al. An animal welfare risk assessment process for zoos. **Animals**, v. 8, n. 8, p. 130, 2018.

SIEGFORD, J. M. Multidisciplinary approaches and assessment techniques to better understand and enhance zoo nonhuman animal welfare. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 16, n. 4, p. 300-318, 2013.

SLADKY, Kurt K.; MANS, Christoph. Clinical anesthesia in reptiles. **Journal of exotic pet medicine**, v. 21, n. 1, p. 17-31, 2012.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Circulation**, v.93, n.5, p. 1043-1063, 1996.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological reviews**, v. 79, n. 3, p. 855-916, 1999.

TAYLOR, E. W.; LEITE, C. A. C.; SKOVGAARD, N. Autonomic control of cardiorespiratory interactions in fish, amphibians, and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 7, p. 600-610, 2010.

TAYLOR, E. W. et al. The phylogeny and ontogeny of autonomic control of the heart and cardiorespiratory interactions in vertebrates. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 5, p. 690-703, 2014.

THAYER, J. F. et al. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 2, p. 747-756, 2012.

UMETANI, K. et al. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, n. 3, p. 593-601, 1998.

VON BORELL, E. H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. suppl_E, p. E260-E267, 2001.

VON BORELL, E. et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals—A review. **Physiology & behavior**, v. 92, n. 3, p. 293-316, 2007.

WARWICK, C. et al. Future of keeping pet reptiles and amphibians: animal welfare and public health perspective. **Veterinary Record**, v. 181, n. 17, p. 454-455, 2017.

WARWICK, C. et al. Assessing reptile welfare using behavioural criteria. **In Practice**, v. 35, n. 3, p. 123-131, 2013.

WARWICK, C.; ARENA, P.; STEEDMAN, C. Spatial considerations for captive snakes. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 30, p. 37-48, 2019.

WOLFE, A. K.; FLEMING, P. A.; BATEMAN, P. W. Surveying attitudes toward reptiles on roads: Questionnaire responses do not directly translate to behavioral action. **Anthrozoös**, v. 32, n. 3, p. 333-346, 2019.

ZENA, L. A. et al. Winter metabolic depression does not change arterial baroreflex control of heart rate in the tegu lizard *Salvator merianae*. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 5, p. 725-733, 2016.

ZENA, L. A. et al. Hormonal correlates of the annual cycle of activity and body temperature in the South-American tegu lizard (*Salvator merianae*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 285, p. 113295, 2020.