

## ASPECTOS CLÍNICOS DE DIFERENTES MÉTODOS DE EUTANÁSIA EM RATOS DA LINHAGEM WISTAR

GUSTAVO ANTÔNIO BOFF<sup>1</sup>; ALINE AMARAL<sup>2</sup>; ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPOLLO FELIX<sup>3</sup>; MARTIELO IVAN GEHRCKE<sup>4</sup>; FABIANE BORELLI GRECCO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Gusatavo\_boff@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Amaralaaline@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – Anelizecampellofelig@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – MartieloGehrcke@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – Fabianegrecco18@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A eutanásia de animais de laboratório utilizados para fins científicos vem sendo amplamente discutida nos últimos anos (HOLSON, 1992; CLARKSON et al. 2022). Ao longo do tempo aumentou a exigência em relação ao bem-estar dos pesquisadores e animais experimentais, sempre preponderando interferências relacionadas aos métodos (LEITÃO et al. 2021). Atualmente preconizam-se métodos que utilizam fármacos sedativos e anestésicos, para diminuir o estresse de intervenções invasivas, como o método físico de eutanásia (CATTANEO et al. 2015). Ainda, podem ser utilizadas doses letais desses mesmos fármacos (CICERO et al. 2018).

Cada método vai depender da disponibilidade de equipamentos e equipe treinada para realizar o procedimento (FAVORETTO et al. 2019). Uma das questões levantadas para escolher é a necessidade de coleta de material biológico, podendo ser *ante* ou *post mortem* (DAMY et al. 2010). A coleta de sangue por exemplo, por vezes é feita *ante mortem* com punção cardíaca ou vasos oculares, o que faz necessária sedação ou anestesia (CICERO et al. 2018). Outra questão, são as alterações que o método pode causar nos resultados da pesquisa, especialmente se a pesquisa está relacionada com algum marcador biológico que se altera rapidamente, como parâmetros genômicos e metabólicos (OVERMYER et al. 2015).

Entre os métodos já descritos na literatura e mais utilizados na rotina estão os físicos, inalatórios e injetáveis (SHOMER et al. 2020). Dentre os métodos físicos os mais utilizados são deslocamento cervical e guilhotina, que podem ser utilizados de forma única com justificativa, ou associados com sedação ou anestesia. Já entre os métodos inalatórios destacam-se o gás carbônico, isoflurano e sevoflurano. Por fim, entre os agentes injetáveis são mais utilizados os barbitúricos, anestésicos dissociativos e associações (SHOMER et al. 2020; LEITÃO et al. 2021). Outros anestésicos gerais como o propofol e alfaxalone são menos utilizados.

O objetivo deste resumo foi descrever os aspectos clínicos da eutanásia com propofol ou cetamina e xilazina seguidos de guilhotina, eutanásia com sevoflurano, isoflurano ou gás carbônico, e dose letal de cetamina e xilazina em ratos wistar provenientes do biotério central da UFPEL.

### 2. METODOLOGIA

Após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFPel e cadastro do projeto (5778) na UFPel, foram solicitados ao biotério central da UFPel 60 ratos da linhagem *Wistar*, 30 machos e 30 fêmeas, com  $78 \pm 6$  dias de vida que pesaram  $312 \pm 84$  gramas. Após o recebimento dos animais, esses foram adaptados e manipulados todos os dias por uma semana, afim de que houvesse

interação positiva com o pesquisador, além da manipulação foi oferecido amenities no momento do manejo. Ainda, foi treinado o posicionamento de aplicação intraperitoneal em todos os animais.

Os ratos permaneceram em caixas agrupados em cinco, separando fêmeas e machos. As caixas foram distribuídas em 4 colunas e 3 linhas. Para compor cada grupo experimental os animais foram escolhidos aleatoriamente, tomando o cuidado para que cada grupo contasse com animais de diferentes caixas, contemplando diferentes colunas e linhas. As eutanásias foram realizadas ao longo de seis dias, um grupo por dia e em cada dia um grupo diferente, na parte da manhã foram realizadas as eutanásias das fêmeas, na parte da tarde dos machos. O procedimento foi realizado em uma sala separada do local de alojamento e o próximo animal só foi trazido após finalizar o anterior com a sala já preparada.

Os ratos ( $n = 60$ ) foram distribuídos nos grupos ( $n = 10$ ): Sedação com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (2,5 mg/kg) (CXG) ou anestesia com propofol (250 mg/kg) (PG) seguidas de guilhotina. Câmara com os agentes inalatórios: gás carbônico (50% seguido de 100% após o decúbito) (CO<sub>2</sub>), isoflurano (5% seguido < 11% após o decúbito) (ISO) e sevoflurano (8% seguido < 12% após o decúbito) (SEV). E dose letal de cetamina (500 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) (CX). No caso dos anestésicos inalatórios é importante ressaltar que o analisador de gases utilizado marcava nos limites superiores supracitados e não houve como deixar em um valor específico após o decúbito, porquê além da vaporização foi utilizada gaze embebida com anestésico dentro do circuito para aumentar a concentração do agente. A sedação e anestesia nos grupos CXG e PG foram realizadas por via intraperitoneal, assim como no grupo CX. Os animais dos grupos CO<sub>2</sub>, ISO e SEV, foram colocados nas câmaras e após atingirem decúbito lateral, foram conectados a um circuito de anestesia por meio de máscara de tamanho adequado.

A partir da administração intraperitoneal nos grupos CXG, PG e CX, os animais foram colocados em uma caixa de idêntica a câmara de eutanásia com gases. Então, o tempo até atingirem decúbito lateral foi mensurado e a partir daí foram conectados ao eletrocardiograma (ECG). Os animais dos grupos CXG e PG, após apresentarem sedação profunda, caracterizada pela paralisia total de movimentos voluntários, foram submetidos a guilhotina. Já os animais do grupo CX foram monitorados até a parada cardíaca. Na mesma forma os animais dos grupos CO<sub>2</sub>, ISO e SEV, a partir do momento em que foram colocados na câmara de eutanásia, mensurou-se o tempo até atingirem decúbito lateral, então foram conectados ao ECG e monitorados até a parada cardíaca. Os eletrocardiogramas foram gravados para posterior avaliação e foi utilizado um estetoscópio (Littmann Classic II), para confirmar a parada cardíaca.

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 8.0. Nesse, foram realizados os testes de distribuição de Shapiro-Wilk, seguido de testes de ANOVA e Tukey nos dados paramétricos e Kruskal-Wallis e Dunn's para não-paramétricos. Por fim foi considerado um valor de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência cardíaca se manteve semelhante na maioria dos grupos, a não ser no grupo CO<sub>2</sub> que foi menor, sem diferir apenas do grupo CX (tabela – 1). Nesse sentido, possivelmente a frequência cardíaca do grupo CX, apesar de não haver diferença entre os demais grupos, se aproximou do grupo CO<sub>2</sub> pelo efeito da xilazina sobre a frequência cardíaca (GIROUX et al. 2015).

Tabela – 01 Parâmetros de frequência cardíaca média em batimentos por minuto (BPM), tempo da chegada a sala de eutanásia até a administração dos agentes, tempo até alcançar o decúbito lateral, tempo até a morte e tempo total do procedimento, todos os tempos foram mensurados em minutos.

Parâmetro	CXG	PG	CO2	ISO	SEV	CX
Frequência cardíaca (BPM)	278 ±56 <sup>a</sup>	286 ±81 <sup>a</sup>	100 ±50 <sup>b</sup>	273 ±31 <sup>a</sup>	274 ±40 <sup>a</sup>	197 ±40 <sup>ab</sup>
Administração (minutos)	3 ±1 <sup>abc</sup>	4 ±4 <sup>abc</sup>	1 ±1 <sup>ab</sup>	2 ±2 <sup>abc</sup>	2 ±1 <sup>ab</sup>	5 ±3 <sup>c</sup>
Decúbito (minutos)	2 ±1 <sup>ac</sup>	5 ±1 <sup>a</sup>	1 ±1 <sup>bc</sup>	1 ±0,3 <sup>b</sup>	1 ±0,5 <sup>b</sup>	1 ±0,3 <sup>b</sup>
Morte (minutos)	2 ±1 <sup>a</sup>	2 ±1 <sup>a</sup>	3 ±1 <sup>ab</sup>	17 ±8 <sup>c</sup>	20 ±10 <sup>c</sup>	8 ±5 <sup>bc</sup>
Total (minutos)	7 ±1 <sup>ac</sup>	11 ±4 <sup>abc</sup>	6 ±1 <sup>ac</sup>	20 ±8 <sup>b</sup>	22 ±11 <sup>b</sup>	14 ±7 <sup>abc</sup>

Letras iguais = sem diferença / letras diferentes = diferença estatística ≤ 0,05.

O tempo até administração se refere ao tempo que leva entre o animal chegar a sala de eutanásia até receberem os agentes de sedação ou eutanásia, seja por via intraperitoneal ou inalatória. No presente estudo, o maior tempo até administração foi observado no grupo CX, pois os fármacos foram calculados e administrados na hora e como eram dois fármacos, conseqüentemente levou mais tempo. Já o menor tempo foi notado no grupo CO2, que se deu por pudermos aumentar o fluxo de gás carbônico e oxigênio para preencher a câmara de eutanásia.

Após a administração dos agentes, o tempo até os animais atingirem o decúbito foi maior no grupo PG frente aos grupos CO2, ISO, SEV e CX. Provavelmente isso se deu pelo tempo que leva para o propofol ser absorvido. Ainda, a alta dose de propofol não foi suficiente para causar a morte como verificado em estudo piloto e por isso foi decidido realizar a guilhotina no grupo PG. Acreditamos que isso aconteceu porquê a velocidade de distribuição e eliminação é semelhante a absorção peritoneal, o que impede o propofol de atingir concentrações plasmáticas necessárias para eutanásia. Nesse sentido, a baixa concentração (1%) e alta solubilidade lipídica podem estar relacionados com a baixa absorção, rápida distribuição e eliminação do propofol. Ainda, pode ser observado que a absorção da cetamina e xilazina se equivale a absorção dos agentes inalatórios, possivelmente isso acontece pela maior concentração desses medicamentos (10%).

Quando analisamos o tempo que levou para os animais morrerem observamos que os grupos SEV e ISO foram os que mais demoraram, enquanto que os grupos CXG e PG foram decapitados, e os animais do grupo CO2 morreram em menos de 5 minutos após alcançarem o decúbito lateral. Por outro lado, o grupo CX levou um tempo intermediário até a morte em comparação aos demais grupos. Acreditamos que o maior tempo até a morte observado nos grupos SEV e ISO, se deram pela capacidade dos roedores em mergulhar e pela diminuição da frequência respiratória após alcançarem a anestesia geral, já que para aumentar a concentração de anestésico é necessário manter a respiração. Além da diluição com oxigênio que possivelmente manteve por mais tempo as concentrações plasmáticas altas e possibilitou maior sobrevida após a administração.

Por fim, o tempo total até a eutanásia foi menor nos grupos CXG e CO2 frente aos grupos SEV e ISO, especialmente pelo maior tempo que os animais desses últimos levaram para morrer. Se o fator tempo for um fator significativo para a pesquisa, deve-se evitar a utilização de anestésicos inalatórios. Os métodos físicos

não incluem um agente químico, no entanto, o estresse gerado pela manipulação e execução da técnica, também causam alterações metabólicas (LEITÃO et al. 2021). Os métodos que utilizam sedação antes da realização do método físico, ou que usam agentes químicos para realização da eutanásia, diminuem o estresse dos animais experimentais (FAVORETTO et al. 2019). Contudo, mesmo com a utilização de fármacos, permanece o desconforto gerado aos pesquisadores.

#### 4. CONCLUSÕES

A eutanásia com cetamina e xilazina seguida de guilhotina e a utilização de gás carbônico teve um tempo total de procedimento menor quando comparada a utilização de anestésicos inalatórios.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CATTANEO, C.; MADERNA, E.; RENDINELLI, A.; GIBELLI, D. Animal experimentation in forensic sciences: How far have we come? **Forensic Science International**, v. 254, p.29-35, 2015.

CICERO, L.; FAZZOTTA, S.; PALUMBO, V.D.; CASSATA, G.; LO MONTE, A.I. Anesthesia protocols in laboratory animals used for scientific purposes. **Acta Biomedica**, v.89, n.3, p.337–342, 2018.

CLARKSON, J.M.; MARTIN, J.M.; MCKEEGAN, D.E.F. A review of methods used to kill laboratory rodents: issues and opportunities, **Laboratory Animals**, 2022.

DAMY, S.B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal aplicações em cirurgia experimental. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.56, n.1, p.103-111, 2010.

FAVORETTO, S.M.; SEABRA, D.I.; OLIVATO, M.C.M. Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa, 1st ed.; Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2019; 51p.

HOLSON, R.R. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v.14, n.4, p.253–257, 1992.

LEITÃO, S.A.T.; SOARES, D.S.; JUNIOR, N.C.; ZIMMER, R.; LUDWIG, N.F.; ANDRADES, M. Study of anesthetics for euthanasia in rats and mice: a systematic review and meta-analysis on the impact upon biological outcomes (SAFE-RM). **Life Sciences**, v.284, n.119916, p.1–9, 2021.

OVERMYER, K.A.; THONUSIN, C.; QI N.R.; BURANT, C.F.; EVANS, C.R. Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. **PLOS ONE**, v.10, n.2, p.e0117232, 2015.

Shomer, N.H.; Allen-Worthington, K.H.; Hickman, D.L.; Jonnalagadda, M.; Newsome, J.T.; Slate, A.R. Review of Rodent Euthanasia Methods. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.59, n.3, p.242–253, 2020.