

## ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS EM RATOS DA LINHAGEM *wistar* SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE EUTANÁSIA: RESULTADOS PARCIAIS

GUSTAVO ANTÔNIO BOFF<sup>1</sup>; ALINE AMARAL<sup>2</sup>; ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO 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 – Amaralaline@gmail.com

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

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

Animais experimentais ainda são amplamente utilizados em pesquisas, por não ser viável substituir organismos vivos em parte dos estudos (DU SERT et al. 2020). Em contraponto, existem princípios e diretrizes metodológicas que viabilizam a redução do número de animais, o refinamento das metodologias e se possível a substituição dos organismos conscientes por modelos alternativos (CLARK, 2017).

Para tanto com o intuito de diminuir o estresse e o sofrimento durante a eutanásia, na maioria das vezes são utilizados agentes químicos inalatórios ou injetáveis, como isoflurano, sevoflurano, gás carbônico, anestésicos gerais, cetamina e xilazina, associados ou não a um método físico (CLARKSON et al. 2022). Porém, sabe-se que o gás carbônico causa lesão pulmonar, observada também com o uso de anestésicos inalatórios, mas em menor grau, enquanto os barbitúricos não causam alterações pulmonares, apesar de inflamarem os tecidos do abdômen (BOIVIN et al. 2017). Outro estudo também demonstra que a overdose de anestésicos, além de causar maior congestão nos tecidos, causa também um número maior de lesões frente a associação de sedação com o método físico de decapitação (DERAKHSHANFAR et al. 2022).

Nesse sentido, elucidar que alterações anatomopatológicas podem estar relacionadas com os métodos empregados, melhorará a qualidade dos resultados, especialmente quando estes dados necessitam ser confrontados aos resultados dos experimentos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar as alterações anatomopatológicas em ratos da espécie *rattus norvegicus* linhagem *wistar* submetidos a diferentes métodos de eutanásia.

### 2. METODOLOGIA

Após aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animais da Universidade Federal de Pelotas, foram solicitados 60 ratos da espécie *rattus norvegicus* da linhagem *wistar*, 30 fêmeas e 30 machos, com 78 ±6 dias de vida, que pesaram em média 312 ±84 gramas. Após recebimento e aclimação dos animais, foram realizadas as eutanásias na sequência de seis dias, um grupo por dia.

Os animais (n = 60) foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em seis grupos (n = 10), cada grupo foi submetido a um métodos de eutanásia, sendo eles: sedação com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (2,5 mg/kg) ou anestesia com propofol (250 mg/kg) seguidas de guilhotina, gás carbônico (50% seguido de 100%),

isoflurano (5% seguido < 11%), sevoflurano (8% seguido < 12%) e dose letal de cetamina (500 mg/kg) e xilazina (10mg/kg).

Imediatamente após a eutanásia foi realizada necropsia e coletados órgãos abdominais, torácicos e sistema nervoso central (SNC), colocados imediatamente após a coleta em solução tamponada com formol 10%. Após fixação dos órgãos, os pulmões, rins, adrenais, fígado, baço e SNC foram clivados, submetidos ao processamento histológico e a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE). Posteriormente, as lâminas histológicas foram avaliadas por microscópio óptico.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os achados macroscópicos mais significativos observados na mesma proporção na maioria dos animais em todos os grupos foram: fígado com superfície de corte clara e com acentuação do padrão lobular pelo parênquima hepático (Figura – 1a); Rins com dilatação da pelve renal, diminuição da demarcação cortico-medular e formações císticas, alterações observadas com maior frequência nas fêmeas (Figura – 1b).

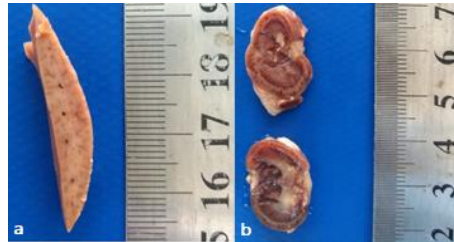


Figura – 1 a) Superfície de corte de lobo hepático acentuação do padrão lobular; b) Rins com dilatação da pelve renal, e formações císticas de ratos submetido a eutanásia com overdose de sevoflurano.

Nos grupos propofol e sedação com cetamina e xilazina associados com o método físico de guilhotina, foram encontradas alterações macroscópicas nos pulmões, caracterizadas por áreas esbranquiçadas ou por vezes áreas enegrecidas (Figura – 2a). Enquanto que no grupo que utilizou propofol, os tecidos apresentaram coloração amarelada, especialmente vísceras abdominais e em regiões com maior quantidade de gordura (Figura – 2b).

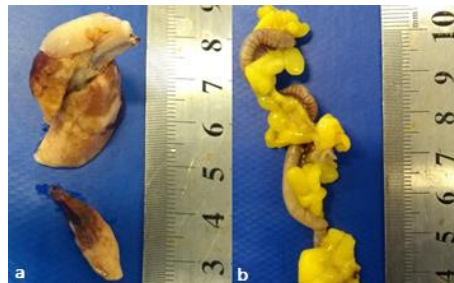


Figura – 2 a) Pulmões de rato submetido a guilhotina após sedação com cetamina e xilazina com áreas esbranquiçadas, áreas enegrecidas e áreas com aspecto normal; b) Útero, cornos uterinos, ovários e gordura com coloração amarelada de rata submetida a eutanásia com propofol seguido de guilhotina.

As alterações pulmonares dos grupos submetidos a guilhotina estão relacionadas com o método físico, por ser empregado enquanto haviam batimentos cardíacos, já que a distribuição do sangue nos pulmões não é uniforme. Por outro

lado, a coloração amarelada observada no grupo propofol está relacionada com a pigmentação dos tecidos pelo veículo do fármaco.

Microscopicamente havia diferentes graus de esteatose em todas as amostras de fígado em todos os animais de todos os grupos (Figura – 3). Esse achado também está relacionado com os achados macroscópicos do fígado. Contudo, na microscopia fica evidente a vacuolização do citoplasma das células, além da perda da arquitetura normal do fígado, alterações nucleares e necrose, que possivelmente possam estar relacionadas com a inflamação causadas pelo excesso de alimentação, falta de exercícios e acúmulo de ácidos graxos e glicogênio.

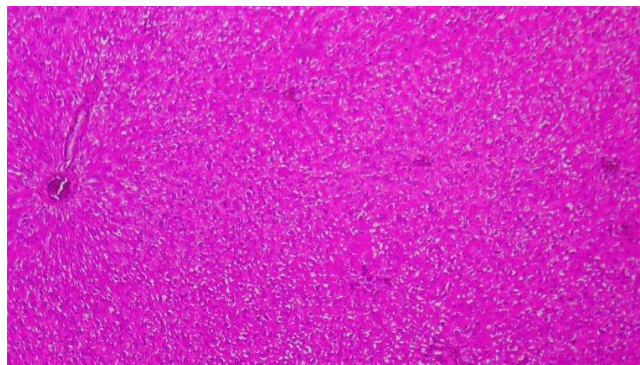


Figura – 3 Fígado de rato submetido a eutanásia com cetamina e xilazina em dose sedativa seguido de guilhotina com necrose difusa, vacuolização intracelular e perda da arquitetura normal do tecido. HE 10x.

Sobre as alterações relacionadas com o método de eutanásia podemos destacar: perda da borda em escova da porção espessa das alças de Henle e hemorragia da porção delgada das alças de Henle, observadas com maior frequência no grupo gás carbônico e com menor frequência nos grupos isoflurano e sevoflurano (Figura – 4). A região hemorrágica coincide com a região denominada vasa recta, acreditamos que a intensa diminuição do pH, causada pela overdose de gás carbônico, possa ter levado a lesão das membranas celulares dos vasos sanguíneos dessa região.

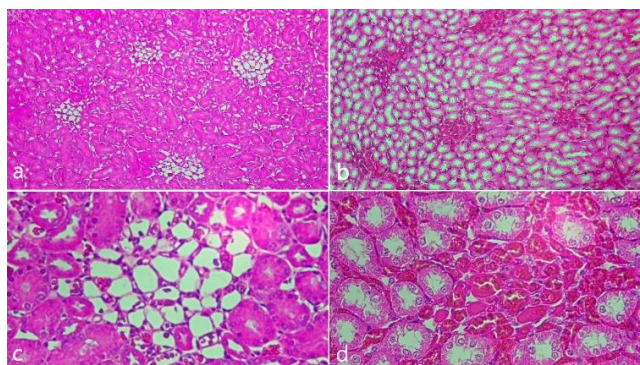


Figura – 04 a) Região medular de rim normal de rato submetido a eutanásia com propofol seguida de guilhotina; b) Região medular de rim com perda da borda em escova da porção espessa das alças de Henle e hemorragia nas porções delgadas das alças de Henle de rato submetido a eutanásia com gás carbônico; c & d) Maior aumento da região da porção delgada da alça de Henle. HE 10x e 40x.



Também foram observados edema pulmonar e hemorragia no grupo que utilizou propofol (Figura – 5a). Enquanto que no grupo que utilizou gás carbônico foi observado atelectasia, hemorragia e perda da arquitetura pulmonar (Figura – 5b). A hemorragia e edema pulmonar observados no grupo em que foi administrado propofol, pode estar relacionado com a congestão causada por esse fármaco, principalmente porque o propofol diminui a força de contração do miocárdio. Por fim, sabe-se que o gás carbônico causa lesão direta nos alvéolos, fato também observado nesse estudo.

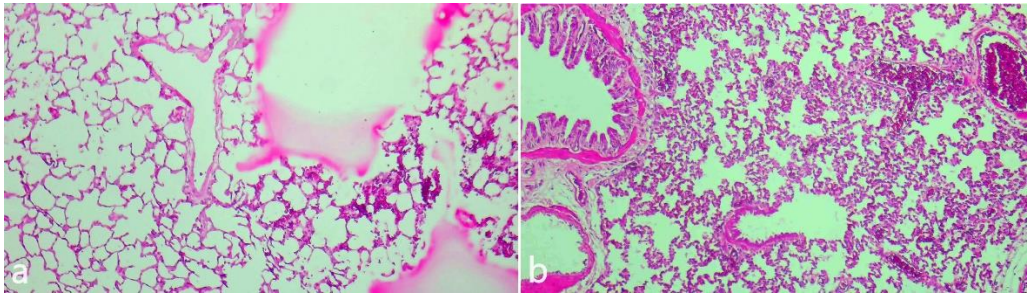


Figura – 5 a) Edema pulmonar e hemorragia em pulmão de rato submetido a eutanásia com propofol seguido de guilhotina; b) Atelectasia, hemorragia e perda da arquitetura pulmonar de rato submetido a eutanásia com gás carbônico. HE 10x.

#### 4. CONCLUSÕES

Concluimos que os métodos de eutanásia causam diferentes alterações macroscópicas e microscópicas nos tecidos renais e pulmonares. Aparentemente, o gás carbônico causa mais alterações microscópicas que os demais métodos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DU SERT, Nathalie Percie et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS biology**, v. 18, n. 7, p. e3000411, 2020.

CLARK, Judy MacArthur. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p. S1-S7, 2018.

BOIVIN, Gregory P. et al. Physiologic, behavioral, and histologic responses to various euthanasia methods in C57BL/6NTac male mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 56, n. 1, p. 69-78, 2017.

DERAKHSHANFAR, Amin et al. Comparison of the effects of two methods of euthanasia on post mortem changes in rats: histopathological and molecular findings. **Comparative Clinical Pathology**, v. 31, n. 5, p. 815-826, 2022.

CLARKSON, Jasmine M.; MARTIN, Jessica E.; MCKEEGAN, Dorothy EF. A review of methods used to kill laboratory rodents: issues and opportunities. **Laboratory Animals**, v. 56, n. 5, p. 419-436, 2022.