

REVISÃO NARRATIVA: INFLUÊNCIA NA PESQUISA COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (*rodentia*) DOS MÉTODOS DE ANESTESIA E EUTANASIA UTILIZADOS

GUSTAVO ANTÔNIO BOFF¹; CRISTINA GHEVER FERNANDES²; MARTIELO IVAN GHERCKE³; FABIANE BORELLI GRECCO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – gustavo_boff@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – crisgevf@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – martielogehrcke@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fabianegrecco18@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa experimental ainda faz uso de animais de laboratório, como roedores, com objetivo de ampliar as fronteiras do conhecimento (Tveden-Nyborg et al. 2021). Apesar de existirem métodos alternativos que mimetizam um organismo vivo, esses são de acesso restrito pelo custo elevado e escassez de profissionais especializados (Wolf 2013; Huang et al. 2021). Contudo, com a implementação de diretrizes de bem-estar animal para animais de laboratório, houve redução significativa no número de animais utilizados, especialmente pela submissão prévia dos projetos a comissão de ética em experimentação animal (Tveden-Nyborg et al. 2021). Nesse sentido, entre os pontos mais importantes da pesquisa em relação ao bem-estar dos animais, estão os procedimentos que causam sofrimento, como indução a doenças, técnicas invasivas, coleta de amostras e método de eutanásia (Lewejohann et al. 2020).

A anestesia para realização de intervenções invasivas e método de eutanásia para finalização ou coleta de material biológico são fatores, que buscam amenizar o sofrimento animal, mas podem interferir nos parâmetros avaliados de uma pesquisa (Shomer et al. 2020; Mayer et al. 2020). Na anestesia, as alterações causadas pelos anestésicos podem interferir nas amostras coletadas (Arnold & Langhans 2010). Enquanto que na eutanásia, além dos fármacos e agentes utilizados, também os métodos físicos podem comprometer a avaliação *post mortem* dos tecidos (Shomer et al. 2020).

Atualmente, existem estudos avaliando os efeitos da eutanásia sobre modelos experimentais, principalmente de roedores (Shomer et al. 2020). Entre os agentes inalatórios destacam-se o gás carbônico, argônio e isoflurano, que podem ser utilizados de maneira isolada, ou em sequência (Boivin et al. 2017). Entre os agentes injetáveis, o padrão ouro de eutanásia é o pentobarbital, que é administrado por via intraperitoneal (Laferriere et al. 2019). Ainda, existem os métodos físicos como decapitação e torção cervical (Shomer et al. 2020). Além dos agentes supracitados, os animais experimentais são submetidos a anestesia com fármacos opioides, dissociativos, benzodiazepínicos e alfa-2 agonistas, para permitir a realização de intervenções cirúrgicas ou coleta de amostras (Parasuraman et al. 2010; Jiron, et al. 2019).

O objetivo do presente trabalho é apresentar e discutir brevemente, por meio de uma revisão narrativa, os efeitos dos agentes anestésicos e métodos de eutanásia, sobre os parâmetros e tecidos de animais de laboratório. Esta revisão faz parte de projeto e tese de doutorado envolvendo o tema.

2. METODOLOGIA

A presente revisão foi realizada utilizando as plataformas digitais de pesquisa disponíveis no espaço da Comunidade Acadêmica Federada (CAFe) do site de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Ministério da Educação e Cultura (MEC). As plataformas de pesquisa utilizadas foram PubMed, Embase e Google Acadêmico. Os termos para pesquisa foram “animais de laboratório”, anestesia e eutanásia. A pesquisa foi realizada em inglês.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os artigos encontrados variaram entre revisão, *Guidelines* e pesquisa. Os fármacos utilizados na anestesia foram os inalatórios como isoflurano, sevoflurano e injetáveis como barbitúricos, dissociativos, benzodiazepínicos, agonistas alfa-2 e opioides, que quando utilizados de forma segura, promovem grau satisfatório de anestesia (Tsubokura et al. 2016). Contudo, na coleta de sangue, pensando em contagem celular, as alterações cardiovasculares de redistribuição da volemia, também alteram a distribuição das células no sistema circulatório (Parasuraman et al. 2010; Arnold & Langhans 2010). O que pode ser um fator de viés para pesquisas que querem quantificar o número de células ou componentes do sangue, mas utiliza fármacos anestésicos para realizar a coleta. Apesar disso, nos procedimentos cirúrgicos por exemplo, as alterações teciduais são mínimas e a anestesia geral é completamente aplicável (Jiron et al. 2019). Outro parâmetro que a anestesia possivelmente pode influenciar é a morfologia tecidual na histologia, já que também pelas alterações cardiorrespiratórias, os órgãos podem se tornar mais ou menos perfundidos durante a eutanásia. Nesse contexto, medicamentos como o propofol e o alfaxalone, são fármacos que tem potencial anestésico, mas que foram pouco estudados em animais de laboratório até o momento.

Como exposto por Shomer e colaboradores (2020), os métodos de eutanásia podem afetar os tecidos de várias maneiras. Os métodos físicos por exemplo, oferecem o potencial de uma morte rápida sem interferência de agentes químicos, mas também causam danos aos tecidos e podem tornar certas amostras inutilizáveis. Porque além do rompimento dos tecidos da região cervical, o sangue coletado por decapitação está sujeito à hemólise. Já métodos que utilizam agentes anestésicos na eutanásia, podem afetar a viabilidade dos tecidos e células que serão estudados, especialmente por causar hipóxia, comprometer a oxigenação celular e a viabilidade dos tecidos (Shomer et al. 2020). Como o pentobarbital, que altera os órgãos internos ao ser administrado por via intraperitoneal, ou ainda, as lesões respiratórias advindas da administração de gás carbônico durante a eutanásia (Boivin et al. 2017). Por isso, são fundamentais as padronizações e o conhecimento das alterações relacionadas com cada agente, fármaco e método utilizado, a fim de selecionar aquele que altera menos os parâmetros ou material que será coletado e analisado (Du Sert et al. 2020).

Ainda segundo Shomer e colaboradores (2020), os métodos de eutanásia podem ter também um efeito profundo direto ou indireto sobre as substâncias do sangue ou tecidos. Algumas substâncias analisadas são muito instáveis e são melhor preservados por métodos físicos que permitem uma coleta rápida das amostras. Além de que, os níveis de algumas substâncias podem mudar rapidamente em resposta aos hormônios relacionados ao estresse, como a corticosterona, portanto o manuseio, as técnicas e o tempo do procedimento são

uma forma importante de controlar a variabilidade experimental (Shomer et al. 2020). Sobre os agentes químicos utilizados na eutanásia, o gás carbônico causa acidose e o cloreto de potássio impede a análise dos níveis séricos de íons de potássio (Burkholder et al. 2010; Shomer et al. 2020). Para outros métodos de eutanásia, a literatura contém relatos conflitantes sobre o grau e a direção das alterações das substâncias, essa discrepância pode ser resultado de diferentes níveis de estresse dos animais e métodos de cada pesquisa (Shomer et al. 2020). Por fim, apesar de ser um dos métodos mais utilizados na eutanásia, o gás carbônico foi relacionado com estresse por aversão e agressão as vias aéreas, por isso se indica a associação ou substituição por anestésicos inalatórios como o isoflurano e sevoflurano (Boivin et al. 2017; Marquardt et al. 2018).

Segundo o *Guidelines* da Sociedade Americana de Mamíferos (2016) os protocolos métodos adequados para eutanásia, constam com a utilização de barbitúricos, anestésicos dissociativos com suas combinações e anestésicos inalatórios, destacando a presença adicional de riscos ao investigador e estresse aos animais. Nesse mesmo *Guidelines*, o deslocamento cervical e a compressão torácica, são técnicas aceitáveis em casos de animais de pequeno porte e tamanho compatível com a incapacidade de inspiração pela compressão, técnicas sempre realizadas por um profissional experiente. Por outro lado, o *Guidelines* da Associação Americana de Medicina Veterinária (AMVA), traz como adequados os barbitúricos e dissociativos com combinações, e considera aceitável dentro de determinadas condições, a utilização de etanol, dióxido e monóxido de carbono, deslocação cervical, anestésicos inalatórios, irradiação por micro ondas e contusão craniana forçada. Enquanto que, argônio, nitrogênio, óxido nítrico, exsanguinação e compressão torácica, são inaceitáveis como métodos únicos pela AMVA (2019).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os métodos de anestesia para coleta de amostras de material biológico, assim como métodos de eutanásia, interferem de maneira distinta no organismo, sendo indispensável a escolha correta do método, para que este não seja um fator de confusão nos resultados das pesquisas experimentais com animais de laboratório.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD M.; LANGHANS, W. Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and corticosterone in the rat. **Physiol Behav.** v.99, n.5, p.592-598, 2010.

BOIVIN, G. P. et al. Physiological, behavioral, and histological responses of male C57BL/6N mice to different CO₂ chamber replacement rates. **J Am Assoc Lab Anim Sci.** v.55, n.10, p.451-461, 2017.

BURKHOLDER, T. H. et al. Comparison of carbon dioxide and argon euthanasia: effects on behavior, heart rate, and respiratory lesions in rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci.** v.49, n.6, p.448-453, 2010.

DU SERT N. P. et al. Reporting animal research: Explanation and Elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS Biol.** v.18, n.7, p.1-65, 2020.

HUANG, H. J. et al. Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing. **Int J Mol Sci.** v.22, n.8, p.1-14, 2021.

JIRON, J. M. et al. Comparison of Isoflurane, Ketamine-Dexmedetomidine, and Ketamine-Xylazine for General Anesthesia during Oral Procedures in Rice Rats (*Oryzomys palustris*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.** v.58, n.1, p.40-49, 2019.

LAFERRIERE, C.; PANG, D. Review of Intraperitoneal Injection of Sodium Pentobarbital as a Method of Euthanasia in Laboratory Rodents. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.** v.59, n.3, p.254-263, 2020.

LEARY, S. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: **2020 edition**, 2020.

LEWEJOHANN, L. et al. Impulse for animal welfare outside the experiment. **Lab. Anim.** v.54, n.2, p.150-158, 2020.

MARQUARDT, N. et al. Euthanasia of laboratory mice: Are isoflurane and sevoflurane real alternatives to carbon dioxide? **PLoS ONE.** v.13, n.9, p.1-29, 2018.

MEYER, N. et al. Impact of three commonly used blood sampling techniques on the welfare of laboratory mice: Taking the animal's perspective. **PLoS ONE.** v.15, n.9, p.1-23, 2020.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R.; KESAVAN, R. Blood sample collection in small laboratory animals. **J Pharmacol Pharmacother.** v.1, n.2, p.87-93, 2010.

SHOMER, N. H. et al. Review of Rodent Euthanasia Methods. **J. Am. Assoc. Laboratory Animal Sci.** V.59, n.12, p.242-253, 2020.

SIKES, R. S. et al. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. **J Mammal.** v.97, n.3, p.663-688, 2016.

TSUBOKURA, Y. et al. Effects of pentobarbital, isoflurane, or medetomidine-midazolam-butorphanol anesthesia on bronchoalveolar lavage fluid and blood chemistry in rats. **J Toxicol. Sci.** v.41, n.5, p.595-604, 2016.

TVEDEN-NYBORG P. et al. BCPT policy for experimental and clinical studies. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v.128, n.1, p.4-8, 2021.

WOLF, J. C. Alternative Animal Models. In: BOLON, B. et al. (eº ed.) **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology 3rd Edition.** New York: Academic Press, 2013. Cap.14, p.47 -618.