

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ISOFLURANO PRÉVIA À EUTANÁSIA NA CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS

MARINA ZANIN¹; MARIA EDUARDA BICA DODE²; JULIA EISENHARDT DE MELLO²; ROSÉLIA MARIA SPANEVELLO²; MARTIELO IVAN GEHRCKE²; CARINE DAHL CORCINI³

¹Universidade Federal do Rio Grande – mariinazanin@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – dudadode@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A experimentação animal é uma importante etapa da ciência, principalmente no que tange o conhecimento acerca de doenças, fármacos e metabolismo. Atualmente, os camundongos caracterizam um importante modelo experimental, e sua introdução como animal de laboratório se deve, principalmente, ao seu tamanho, sua prolificidade, fácil manutenção e similaridade genética aos seres humanos. Hoje, são os mamíferos mais usados na experimentação (SANTOS, 2002). A manutenção e manipulação destes indivíduos deve, obrigatoriamente, respeitar regras e normas de bem-estar animal, de modo que os mesmos não sejam expostos a sofrimento desnecessário. Ao fim da realização dos experimentos, estes animais devem ser eutanasiados.

Segundo Andrade & Oliveira (2002), eutanásia significa morte sem dor. Para tanto, diversas técnicas podem ser utilizadas, de modo que não causem sofrimento e não produzam alterações as quais prejudiquem a interpretação das lesões experimentais. Os métodos utilizados para realização da eutanásia dividem-se em físicos e químicos (Animal Welfare Institute, 1968). Os primeiros são normalmente indicados em experimentações nas quais métodos químicos possam interferir nos resultados. No entanto, nestes casos, o empirismo deve ser substituído por dados científicos e concretos que barrem ou corroborem a utilização de fármacos no momento da eutanásia.

O isoflurano é um agente anestésico volátil que tem sido frequentemente utilizado em procedimentos anestésicos e de eutanásia na pesquisa (HOERAUF et al., 1996). Normalmente, este é utilizado em sobredose até que leve o animal à morte. No entanto, a sua potencial interferência nos resultados ainda é incerta, limitando a segurança experimental da sua utilização.

Os efeitos adversos da utilização do isoflurano nos diversos sistemas orgânicos não são completamente elucidados. Alguns trabalhos consideram a interferência no cenário oxidativo, visto que este anestésico é metabolizado através da ação da CYP2E1 (enzima citocromo P450, isoforma 2E1) que, por sua vez, gera espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (BEZERRA et al, 2010).

Neste caso, a utilização deste anestésico como agente de eutanásia em camundongos utilizados em experimentos que visem avaliar marcadores de estresse oxidativo estaria contraindicado. No entanto, não existem dados concretos que correlacionem a utilização de isoflurano prévia à eutanásia com alteração no cenário oxidativo hepático.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a exposição de camundongos ao isoflurano, previa à eutanásia por deslocamento cervical, interfere na concentração de espécies reativas de oxigênio no tecido hepático destes indivíduos.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos do presente estudo foram executados em acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Camundongos machos, *Swiss Albina*, com seis semanas de idade, foram obtidos no biotério da UFPel. Os animais foram submetidos à aclimação pelo período de uma semana antes do início do experimento. No biotério de roedores, eram mantidos em caixas de polipropileno com maravalha, sendo 10 indivíduos por caixa; neste ambiente, eram mantidos em um ciclo de luminosidade de 12C/12E, temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $55 \pm 5\%$, com ração comercial peletizada específica para camundongos e água à vontade. Ao fim do experimento, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

Os camundongos foram divididos em dois grupos. Um grupo, G1, correspondendo ao grupo controle; neste, os indivíduos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, sem quaisquer manipulações ou exposições prévias. O segundo grupo, G2, foi exposto ao isoflurano previamente à eutanásia. Para tal, um algodão embebido de anestésico foi alocado no fundo de um recipiente de vidro arredondado (Becker) e, um a um, os camundongos foram colocados em contato com o anestésico. Os animais foram mantidos em contato com o anestésico até que apresentassem decúbito, perda da consciência e ausência de resposta ao pinçamento; período médio de 30 segundos. Na sequência, submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

Após a eutanásia, os indivíduos foram submetidos à laparotomia e abordagem para remoção de fígado; este foi coletado de cada indivíduo de forma asséptica, acondicionado em um falcon e levado ao freezer. Posteriormente, o material foi processado em laboratório para que a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) fosse determinada de acordo com o método empregado por Ali et al. (1992). Neste ensaio, a oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) em diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi medida para a detecção de ROS intracelulares, e os níveis de ROS foram expressos como $\mu\text{mol DCF/mg}$ de tecido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a utilização do isoflurano como método de sedação previa à eutanásia por deslocamento cervical não altera os níveis de espécies reativas de oxigênio no tecido hepático dos camundongos expostos.

Após ensaio de oxidação de DCFH-DA em DCF, os níveis de ROS obtidos foram de $13,53 \mu\text{mol DCF/mg}$ e $11,18^{ns} \mu\text{mol DCF/mg}$ de tecido, para grupo controle e grupo tratado, respectivamente, não sendo evidenciada diferença estatística nos testes realizados.

Por definição, o estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes. As espécies reativas podem dar início a uma cascata de reações com moléculas biológicas, levando a

lipoperoxidação, dano proteico e danos oxidativos em ácidos nucleicos. O anestésico isoflurano tem sido relacionado ao estresse oxidativo devido ao seu metabolismo através da enzima Citocromo P450, no fígado, a qual gera espécies reativas de oxigênio.

No entanto, a presente pesquisa evidencia que a exposição a esse fármaco anestésico, por período reduzido previamente à eutanásia, não interfere nos valores de espécies reativas de oxigênio expressas em $\mu\text{mol DCF/mg}$ de tecido hepático. Como abordado acima, para que se estabeleça um ambiente de estresse oxidativo evidenciado pelo aumento na concentração das ROS, deve haver equilíbrio entre a produção destas e a atuação das defesas antioxidantes.

De acordo com Dal Molin (2005), antioxidantes são quaisquer substâncias que retardam ou inibem a oxidação, e dividem-se em dois grandes grupos. Os antioxidantes não enzimáticos compreendem substâncias exógenas como vitaminas, betacarotenos e flavonóides; enquanto que as defesas antioxidantes enzimáticas são constituídas por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Este maquinário complexo é presente em diversos organismos, a exemplo dos camundongos, e é responsável pela manutenção do equilíbrio oxidativo, uma vez que atua decompondo e eliminando espécies reativas (GAETANI et al., 1989).

Deste modo, é possível sugerir que, muito embora reações fisiológicas de metabolização hepática do isoflurano possam culminar em produção de espécies reativas de oxigênio, os componentes antioxidantes tenham agido no seu controle, culminando na ausência de aumento na concentração das mesmas. No entanto, considera-se a importância da realização de experimentos complementares, que visem avaliar a atividade do maquinário antioxidante, a exemplo, do enzimático, para que a hipótese considerada acima possa ser confirmada.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, a partir do exposto, que a exposição de camundongos ao isoflurano, prévia a eutanásia por deslocamento cervical, não interfere na concentração de espécies reativas de oxigênio em tecido hepático, o que possibilita a sua utilização em experimentos que possuam este foco de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**. n. 13, p. 637–648. 1992.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 388 p. 2002.

ANIMAL WELFARE INSTITUTE. **Basic Care of Experimental Animals**. New York: Academic Press. 1968.

BEZERRA, F.J.L. et al. Avaliação de Parâmetros Antioxidantes em Ratos Tratados com Sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.60, n.2, p.162-169. 2010.

DAL MOLIN, S. Z. F. Anestésicos inalatórios e seu efeito sobre o dano de isquemia e reperfusão: comparação entre isoflurano e sevoflurano em modelo experimental em fígado de ratos. 2005. 72f. **Dissertação (Mestrado em Gastroenterologia)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Faculdade de Medicina, Porto Alegre.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v.73, p. 334-339, 1989.

HOERAUF, K.H.; KOLLER, C.; JAKOB, W.; et al. Isoflurane waste gas exposure during general anaesthesia: the laryngeal mask compared with tracheal intubation. **British Journal of Anaesthesia**. v.77, p.189-93. 1996.

SANTOS, B.F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.115-8. 2002.