



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Isabella Mendes Procópio

Análise comparativa do corpo cavernoso de ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com associação cetamina/xilazina ou isoflurano

Rio de Janeiro

2022

Isabella Mendes Procópio

Análise comparativa do corpo cavernoso de ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com associação cetamina/xilazina ou isoflurano

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P963 Procópio, Isabella Mendes.

Análise comparativa do corpo cavernoso de ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com associação cetamina/xilazina ou isoflurano / Isabella Mendes Procópio – 2022.
60f.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciência Cirúrgicas.

1. Pênis - Teses. 2. Ketamina – Uso terapêutico. 3. Xilazina – Uso terapêutico. 4. Isoflurano – Uso terapêutico. 5. Eutanásia - Teses. I Souza, Diogo Benchimol de. II. Costa, Waldemar Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 614.253:616-036.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Isabella Mendes Procópio

Análise comparativa do corpo cavernoso de ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com associação cetamina/xilazina ou isoflurano

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: sistema urogenital

Aprovada em 19 de janeiro de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra Gabriela Faria Buys Gonçalves

Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Emanoele e à minha avó, Vauster, por todo apoio e amor à mim concedido e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por toda sabedoria e pelas oportunidades.

À minha mãe, Emanoele, que sempre foi dedicada a mim, me incentivou e nunca me deixou desistir. Muito obrigada, mãe, por sempre acreditar no meu sucesso.

À minha avó, Vauster, que enquanto esteve entre nós, se dedicou e me amou. Obrigada por ter vibrado cada conquista comigo.

Ao Sávio por toda paciência, amor, compreensão, por todos nossos momentos juntos e incentivo que sempre me deu.

À minha família por todo incentivo e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus amigos de Rio Bonito, Silva Jardim e Niterói, por todas as horas de alegria, por todo carinho e companheirismo em todos esses anos. Aos amigos que fiz na Unidade de Pesquisa Urogenital, que sempre me ensinaram e me incentivaram desde quando eu fazia Iniciação Científica na mesma unidade. Obrigada por toda paciência e companheirismo.

Aos meus orientadores Doutor Diogo Benchimol de Souza e Doutor Waldemar Silva Costa pela confiança em mim depositada, por toda atenção, orientação e dedicação essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Alves Favorito, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, pela oportunidade de participar do curso de pós-graduação e a professora A Profa. Dra. Bianca Martins Gregório que contribuiu para confecção deste trabalho e pela confiança a mim depositada e ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio pelo ensinamentos e experiências compartilhados em aula.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa durante todo o meu curso do mestrado acadêmico, processo – 88887.489336/2020-00. E à Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo espaço cedido para o desenvolvimento deste trabalho.

...Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo.

Malala Yousafzai

RESUMO

PROCÓPIO, Isabella Mendes. **Análise comparativa do corpo cavernoso de ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com associação cetamina/xilazina ou isoflurano**: 2022. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a histomorfologia do pênis de ratos *Wistar* submetidos à eutanásia com cetamina e xilazina associadas ou isoflurano. Foram utilizados 14 ratos *Wistar* machos de 16 semanas de idade criados e mantidos em ambiente de biotério com ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 2 grupos: ISO –animais mortos sob anestesia inalatória com isoflurano, e K+X – animais mortos sob anestesia com cloridrato de cetamina 10% (150 mg/Kg) associado ao cloridrato de xilazina 2% (15 mg/Kg). Imediatamente após a morte dos animais, os pênis foram dissecados e coletados, sendo fixados em solução de formalina tamponada a 4% e processados para análise histomorfométrica. A densidade de superfície de estruturas do corpo cavernoso, área total do pênis, a área do corpo cavernoso com a túnica albugínea, a área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea, a área da túnica albugínea, foram avaliadas utilizando-se o software Image J. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste *t* de Student não pareado para comparação dos dados, considerando estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Com relação a densidade de tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinusoidal e as áreas do corpo cavernoso, não houve diferenças entre animais dos dois grupos. Por outro lado, animais submetidos à eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina ao cloridrato de xilazina, apresentaram um aumento de 24,8% na densidade das fibras elásticas, em relação aos animais submetidos à eutanásia com Isoflurano. O método de eutanásia afetou um dos parâmetros morfológicos do pênis de rato. A escolha do método deve ser padronizada para reduzir o viés e para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis.

Palavras-chave: Pênis. Eutanásia. Rato. Cetamina. Xilazina. Isoflurano.

ABSTRACT

PROCÓPIO, Isabella Mendes. **Comparative analysis of the corpus cavernosum of *Wistar* rats selected for euthanasia with ketamine/xylazine or isoflurane association**: 2022. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

To evaluate quantitatively and qualitatively the histomorphology of the penis of adult *Wistar* rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane. Fourteen 16 weeks old male *Wistar* rats were created and kept under normal conditions with commercial food and water *ad libitum*. The animals were divided into 2 groups: ISO - animals killed under inhalation anesthesia with isoflurane, and K+X - animals killed under anesthesia with 10% ketamine hydrochloride (150 mg / kg) associated with 2% xylazine hydrochloride (15 mg / kg). Immediately after the animals' death, the penises were dissected and collected, fixed in a 4% buffered formalin solution, and processed for histomorphometric analysis. The surface density of structures of the corpora cavernosa, total area of the penis, the area of the corpora cavernosa with the tunica albuginea, the area of the corpora cavernosa without the tunica albuginea, the area of the tunica albuginea, were evaluated using the software Image J. Statistical analyzes were performed using the un paired Student's t test to compare the data, considering it statistically significant when $p < 0.05$. Regarding the density of connective tissue, smooth muscle and sinusoidal space and the corpus cavernosum areas, there were no differences between animals in the two groups. On the other hand, animals killed with the association of ketamine and xylazine showed a 24.8% higher density of elastic fibers, in relation to animals euthanized with Isoflurane. The euthanasia method affected one of the morphological parameters of the rat penis. The choice of method should be standardized to reduce bias and for results to be considered and reproducible.

Keywords: Penis. Euthanasia. Rat. Ketamine. Xylazine. Isoflurane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Corte transversal do pênis humano.....	14
Figura 2 –	Divisão do pênis do rato.....	15
Figura 3 –	Fotomicrografia demonstrando as principais estruturas do corpo cavernoso de um rato <i>Wistar</i>	16
Figura 4 –	Aquisição do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no software <i>Image J</i>	24
Figura 5 –	Sobreposição da grade de 99 pontos no <i>Image J</i>	25
Figura 6 –	Recurso <i>cell counter</i> para quantificação	25
Figura 7 –	Mensuração da densidade do tecido conjuntivo, do músculo liso e do espaço sinusoidal	26
Figura 8 –	Mensuração da densidade das fibras elásticas.....	27
Figura 9 –	Régua milimetrada, objetiva de 2x	28
Figura 10 –	Calibração do software <i>Image J</i>	29
Figura 11 –	Utilização do resultado em pixel para calibrar o software <i>Image J</i>	20
Figura 12 –	Configuração do software <i>Image J</i>	31
Figura 13 –	Mensuração da área do corte transversal do pênis	32
Figura 14 –	Mensuração da área do corpo cavernoso com a túnica albugínea	32
Figura 15 –	Mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea	33
Figura 16 –	Análise subjetiva da presença de colágeno tipo I e colágeno tipo III	34
Figura 17 –	Fotomicrografias dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos	40
Figura 18 –	Fotomicrografias da área do corte transversal do pênis de ratos nos diferentes grupos	41
Figura 19 –	Fotomicrografias das fibras elásticas dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos	43
Figura 20 –	Fotomicrografias sob polarização dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Densidade de superfície do espaço sinusoidal no corpo cavernoso	35
Gráfico 2 –	Densidade de superfície do tecido conjuntivo no corpo cavernoso.....	36
Gráfico 3 –	Densidade de superfície do músculo liso no corpo cavernoso	36
Gráfico 4 –	Área do corte transversal do pênis	37
Gráfico 5 -	Área do corpo cavernoso com a túnica albugínea	38
Gráfico 6 -	Área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea	38
Gráfico 7 -	Área da túnica albugínea	39
Gráfico 8 -	Densidade de superfície das fibras elásticas no corpo cavernoso	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Corpo cavernoso
CE	Corpo esponjoso
pH	Potencial hidrogeniônico
NMDA	Receptor glutamatérgico ionotrópico de N-metil D-aspartato
PAS	Pressão arterial sistêmica
SNC	Sistema Nervoso Central
α	Alfa
<	Menor
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
ISO	Ratos <i>Wistar</i> eutanasiados com isoflurano
K+X	Ratos <i>Wistar</i> eutanasiados com a associação do cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina
CYP	citocromo P450 mono-oxigenase
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
Kg	Kilograma
Sv	Densidade de Superfície

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	21
1.1	Geral	21
1.2	Específicos	21
2	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1	Modelo experimental	22
2.2	Análises penianas	22
2.2.1	<u>Densidades de superfície espaço do sinusoidal, tecido conjuntivo e músculo liso</u>	23
2.2.2	<u>Densidade das fibras elásticas</u>	26
2.2.3	<u>Áreas do pênis</u>	27
2.3	Análise estatística	34
3	RESULTADOS	35
3.1	Densidade de superfície do espaço sinusoidal, tecido conjuntivo e músculo liso	35
3.2	Área do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea e da túnica albugínea	37
3.3	Densidade de superfície das fibras do sistema elástico	42
3.4	Análise qualitativa do colágeno no corpo cavernoso	42
4	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO - Comitê de ética em pesquisa	54
	APÊNDICE - Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane (Artigo científico)	55

INTRODUÇÃO

A realização de trabalhos experimentais para a pesquisa científica, utilizando animais como modelos experimentais tornou-se um meio indispensável para a conquista de resultados mais precisos, possibilitando a descoberta de medidas profiláticas, tratamentos de doenças e a compreensão das patologias (1).

A escolha do protocolo de desenvolvimento da pesquisa deve ser feita de maneira minuciosa, identificando e focando nas variações do projeto a ser estudado, possibilitando assim, maior controle de viés, resultando num aumento da confiabilidade dos resultados obtidos (2).

Os métodos de eutanásia necessitam continuamente de pesquisas e aprimoramento, visto que, os métodos existentes são críticos para a confiabilidade dos dados coletados e podem comprometer resultados por meio de alterações metabólicas e histológicas, afetando assim os resultados da pesquisa (3-5).

A utilização de agentes anestésicos inalatórios e injetáveis para a prática da eutanásia é muito comum. A eutanásia realizada por gases é uma prática frequente e que oferece vantagens aos operadores e aos animais, da mesma forma, agentes anestésicos injetáveis podem ser utilizados para a eutanásia, quando realizados em doses mais elevadas do que as usadas para anestesia, levando à sobredosagem. A associação cetamina e xilazina e a utilização do isoflurano são comumente utilizados na maioria dos laboratórios (6, 7).

Vários estudos utilizam o pênis de rato para estudar a disfunção erétil e outras condições que promovem alterações no pênis (8-10). Na maioria desses experimentos, o órgão é coletado após a eutanásia e analisado histologicamente. No entanto, nenhum estudo investigou a hipótese de que diferentes métodos de eutanásia, utilizando agentes anestésicos, podem estar associados a variações histomorfológicas do corpo cavernoso.

Anatomia e histologia do pênis

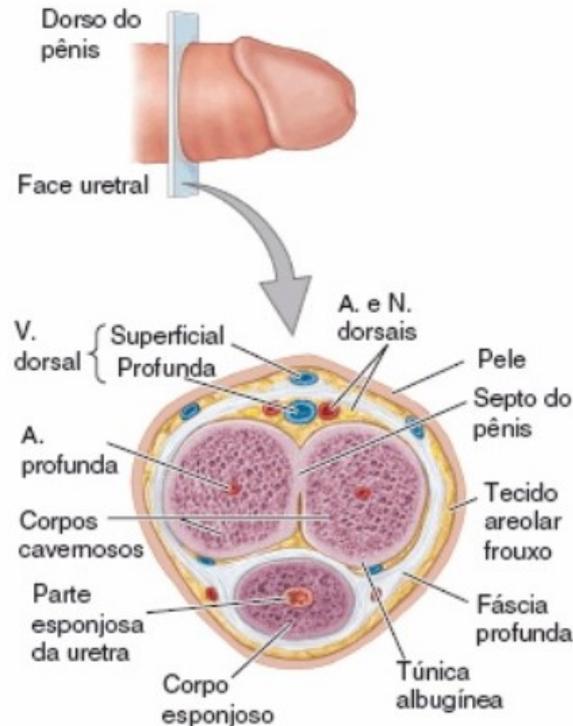
Anatomicamente o pênis do homem é dividido em raiz, corpo e glândula. É formado por corpos cilíndricos de tecido erétil: dois corpos cavernosos (CC), situados dorsalmente, sendo a principal estrutura envolvida na ereção, composta por fibras musculares lisas, colágeno, fibras do sistema elástico, vasos sanguíneos, lâmina vascular e nervos autônomos

não mielinizados e pré-terminais, e um corpo esponjoso (CE), localizado ventralmente que envolve a uretra, constituído pelo bulbo em seu segmento proximal e pela glândula no segmento distal, possuindo também (8, 11, 12). As estruturas eréteis são recobertas por uma túnica fibrosa, denominada túnica albugínea (13, 14), sendo uma estrutura de duas camadas em que as fibras da camada externa são dispostas longitudinalmente e a camada interna é disposta circunferencialmente, em que juntamente com os pilares intracavernosos sustentam os sinusóides (15) e, superficialmente, encontra-se a fáscia profunda do pênis (fáscia de Buck) cobrindo todas as estruturas descritas (16). Internamente, os CC no homem são divididos pelo septo vaginal porém, em alguns locais o septo é incompleto, possibilitando a intercomunicação dos CC (12).

A raiz do pênis localiza-se no espaço superficial do períneo, compreendendo o bulbo do pênis e os ramos direito e esquerdo do pênis. O corpo do pênis consiste em um corpo cilíndrico com parte pendular livre suspensa da sínfise púbica. No segmento distal, ocorre a expansão do CE formando a glândula do pênis, onde localiza-se o óstio externo da uretra e é recoberto pelo prepúcio do pênis, sendo compreendido por uma dobra retrátil de pele que contém tecido conjuntivo e músculo liso em seu interior, que cobre a glândula. (12, 17, 18)

A irrigação do pênis é feita pelas artérias cavernosa, dorsal e bulbouretral, que surgem de um ramo compartilhado da artéria pudenda interna, que por sua vez se origina da artéria ilíaca interna. Ramificações que se abrem para os espaços cavernosos do CC, são responsáveis pela ereção do pênis. A drenagem do pênis é feita por um plexo venoso que se une à veia dorsal profunda do pênis, que recebe drenagem dos dois terços distais dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso e pela veia dorsal superficial (19) (figura 1).

Figura 1 – Corte transversal do pênis humano



Legenda: Vista em corte transversal do pênis humano, demonstrando os dois corpos os dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso

Fonte: Moore; Dalley; Agur. 2014 (9).

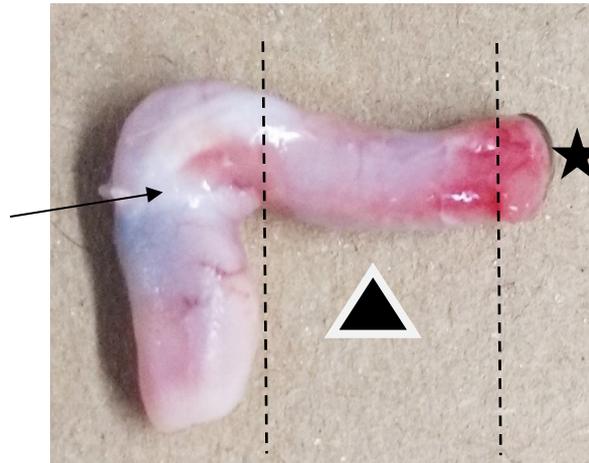
A inervação peniana compreende uma parte autônoma (parassimpática e simpática) e somática (sensorial e motora) que consiste nos nervos dorsal, cavernoso e perineal. Os nervos simpático e parassimpático se unem para formar os nervos cavernosos, que ao entrarem nos CC e no CE provocam os eventos neurovasculares da ereção e a detumescência. Já os nervos somáticos são os uns dos responsáveis pela sensação de contração dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso (19, 20).

Embora o pênis do rato não seja o modelo mais semelhante ao pênis do homem é um dos modelos mais utilizados para estudos de ereção e para o conhecimento de mecanismos patológicos, visto que contém as mesmas estruturas histológicas (músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusoidal). A composição e organização das estruturas intracavernosas possuem um papel relevante nos mecanismos de ereção (13).

O pênis do rato compreende uma porção proximal, média e distal (figura 2). O segmento proximal localiza-se próximo ao bulbo do pênis, com inserção nos ramos do ísquio

e púbis, onde os CC estão separados. A porção média do pênis do rato possui dois CC unidos entre si, localizados dorsalmente ao CE, sendo a erétil recoberta pela túnica albugínea e o segmento distal é constituído inicialmente por uma fibrocartilagem que posteriormente se torna ossificado. Assim, a região do pênis que apresenta maior semelhança ao pênis humano é a porção média (9, 13, 21).

Figura 2 – Divisão do pênis do rato

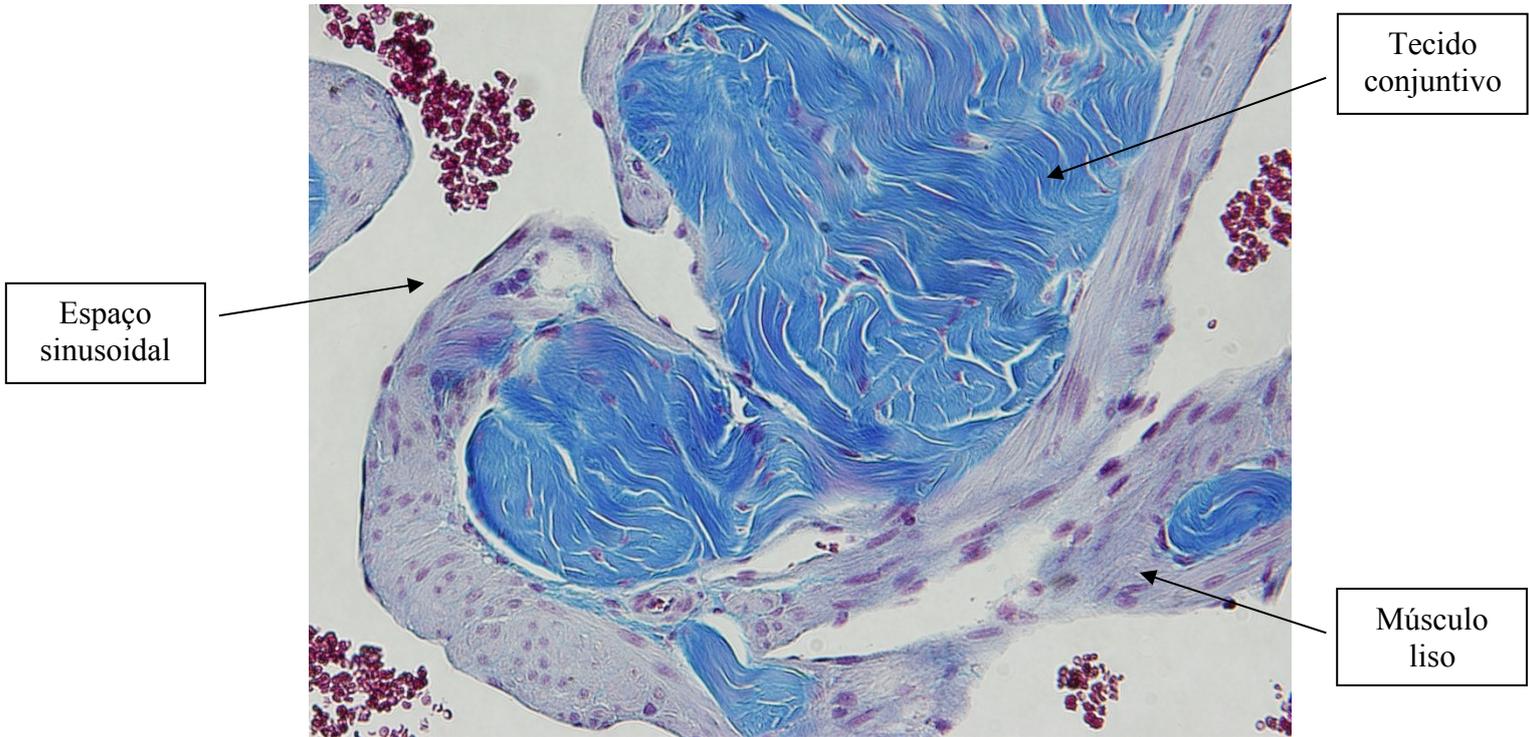


Legenda: Imagem do pênis de rato dissecado apresentando as divisões em três porções: proximal (seta preta), porção média (cabeça de seta) e porção distal (estrela). As linhas tracejadas indicam a região aproximada da divisão em porções.

Fonte: Da Silva MHA, 2018 (17).

A composição e organização do CC do pênis compreende o de tecido conjuntivo, correspondendo as fibras colágenas e fibras do sistema elástico, fibras musculares lisas, que envolvem os espaços sinusoidais, e espaço sinusoidal revestido por endotélio. O pênis do rato e o pênis do homem, compartilham da mesma estrutura histológica, que compreende a presença de músculo liso, tecido conjuntivo e espaço sinusoidal (figura 3). O músculo liso do pênis do rato encontra-se na região perissinusoidal, enquanto no homem o músculo liso se combina ao tecido conjuntivo e elástico para formar as trabéculas do CC. O CE, que possui em seu interior a uretra, também possui espaço sinusoidal e trabéculas, porém em proporções menores que as dos CC (14). No pênis do rato, o parênquima do corpo cavernoso, na maior parte é constituído de colágeno. A matriz do corpo cavernoso apresenta também as fibras elásticas em sua composição. O pênis do homem, no entanto, é constituído predominantemente de músculo liso (13, 14)

Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando as principais estruturas do CC de um rato *Wistar*



Legenda: Fotomicrografia de parte do corpo cavernoso, mostrando as trabéculas formadas por tecido conjuntivo (azul) que envolvem os espaços denominados de espaço sinusoidal (luz) e músculo liso (vermelho) localizado na região perissinusoidal.

Fonte: O autor, 2022.

Nota: Histoquímica Tricômico de Masson, 400x

Os métodos de eutanásia

Os métodos de eutanásia são frequentemente estudados e as metodologias mudam a partir de novas informações obtidas (22). A utilização de animais de laboratório para práticas experimentais é realizada em diversos campos da ciência para obtenção de respostas quanto aos processos biológicos e/ou patológicos que ocorrem nos seres humanos e para fins de pesquisa e cirurgia experimental (23).

Existem diversos modelos animais para fins científicos e a escolha certa de um modelo experimental implicará no bom andamento do trabalho e nos resultados. Dentre as opções de modelos experimentais, o rato se destaca, pois apresentam facilidade no manuseio e manutenção, alta disponibilidade, e economia (11).

O termo eutanásia retrata a morte sem o envolvimento de dor ou sofrimento. De modo geral, as técnicas de eutanásia devem seguir os requisitos de serem humanitárias sem oferecer terror ou sofrimento ao animal, não produzir alterações que prejudiquem a interpretação das

lesões, ser um método de fácil aplicação, ação rápida e ter um tempo mínimo para a perda da consciência (24).

Os procedimentos de eutanásia são divididos em dois métodos principais: químicos e físicos (25). Quando se trata de eutanásia por métodos químicos, há um risco de interferência e confusão nas variáveis de interesse, devido a utilização de diferentes agentes anestésicos e analgésicos, com distintas abordagens anestésicas, influenciando nas comparações de resultados e a reprodução em diferentes laboratórios (26-28).

Cetamina

A cetamina é uma aril-ciclo-alquilamina um derivado da fenciclidina parcialmente hidrossolúvel e altamente lipossolúvel, distingue-se da maioria dos outros anestésicos intravenosos pela capacidade de analgesia significativa. É utilizado como cloridrato em uma solução aquosa com pH 3,5–5,5 (29). A cetamina é transformada em norcetamina (metabolito ativo), a partir da N-desmetilação no sistema enzimático microsômico. Após hidroxilação a norcetamina se transforma em em hidroxinorcetamina, sendo posteriormente excretada pela bile e urina (29, 30).

A cetamina produz imobilidade na maioria das espécies e pode ser administrado pelas vias intramuscular, intraperitoneal e intravenosa. Causa apenas depressão respiratória moderada na maioria das espécies, porém em pequenos roedores causa depressão respiratória grave após altas doses necessárias para a cirurgia e aumenta a pressão sanguínea. Embora o grau de analgesia produzido possa variar, a cetamina é um antagonista não competitivo no receptor glutamatérgico ionotrópico de N-metil D-aspartato (NMDA), receptores excitatórios envolvidos no aprimoramento do processamento nociceptivo, em que foi demonstrado para evitar sensibilização a estímulos nocivos durante a cirurgia (31-33).

Seus efeitos sobre o sistema cardiovascular são: aumento transitório da pressão arterial sistêmica (PAS), aumento da frequência cardíaca, débito cardíaco e da estimulação simpática. Tais efeitos estão relacionados ao aumento da carga de trabalho pelo coração e do aumento do consumo de oxigênio (34). Esse fármaco constitui uma alternativa muito valiosa em determinadas circunstâncias, apesar de promover aumento do tônus muscular esquelético (31).

Xilazina

A xilazina é um agonista α_2 adrenérgico, apresenta propriedades analgésica, sedativas e relaxante muscular de ação central, além da sedação, sua associação com a cetamina é frequentemente utilizada para a indução e manutenção de anestesia. A estimulação destes receptores no sistema nervoso central (SNC) promove efeito hipotensor e tranquilizante. Os efeitos cardiovasculares são compreendidos por bradicardia, inicialmente aumento da pressão arterial seguida de queda moderada, aumento da pressão venosa central e pela redução da frequência respiratória e do volume corrente (35). A aplicação da xilazina por via extravascular não proporciona irritação nos tecidos (36) e quando administrada em altas doses os efeitos cardiovasculares e respiratórios podem ser significativos (31).

A administração da xilazina é considerada segura quando utilizado isoladamente ou em combinação com outros agentes anestésicos e analgésicos, como cetamina ou isoflurano em pesquisas com animais (28). A ativação dos receptores α_2 pós-sinápticos no músculo liso vascular periférico, promove o aumento inicial da pressão arterial provocando vasoconstrição periférica (37).

A associação de cetamina com xilazina é usada para induzir anestesia em animais, responsável por produzir uma profundidade anestésica e analgésica suficientes para procedimentos cirúrgicos e a combinação desses agentes causa rápida perda de consciência (34, 38). Em pequenos animais e em animais de laboratório a associação da cetamina com a xilazina é uma prática comum, a fim de reduzir os efeitos indesejáveis de ambos os agentes (35).

Isoflurano

O isoflurano é um éter metil-etílico halogenado, um anestésico inalatório que produz indução rápida da anestesia, e a profundidade da anestesia pode ser alterada com facilidade e rapidez. É não irritante, não explosivo e não inflamável. Todavia, o isoflurano produz depressão moderada do sistema respiratório e cardiovascular, o aumento da frequência cardíaca observado em alguns modelos experimentais. Além de promover o relaxamento do músculo liso vascular e de fornecer proteção a alguns órgãos contra lesões isquêmicas. Apesar de apresentar um custo elevado, a principal vantagem do uso de isoflurano em animais experimentais é que ele sofre menos biotransformação do que qualquer outro agente e é quase completamente eliminado no ar exalado. Isso sugere que haverá pouca interferência hepática

e, portanto, mínima interferência nos estudos de metabolismo ou toxicologia de medicamentos (31, 35, 38).

O isoflurano possui capacidades de induzir anestesia mais rapidamente, quando comparados com outros anestésicos inaláveis, como o halotano. No momento em que a oferta do gás anestésico é administrada ao animal, o mesmo é inalado até a respiração parar e ocorrer a morte. A prática da administração de um anestésico inalatório para procedimento de eutanásia pode ocorrer quando o mesmo é utilizado como um único agente de eutanásia ou também como parte de um processo em que envolve duas etapas, sendo o anestésico inalatório responsável, primariamente pela inconsciência do animal por meio da exposição e secundariamente são submetidos a eutanásia por algum outro método. Nos procedimentos de eutanásia, esse tipo de anestésico é útil em animais menores <7 kg ou nos animais em que a punção venosa é particularmente difícil (38).

Os anestésicos inaláveis são gases ou vapores que são administrados por via inalatória ocorrendo a transferência dos alvéolos pulmonares para a corrente sanguínea sendo distribuídos ao SNC e tecidos de acordo com a perfusão regional, sendo assim o anestésico é transferido do sangue para os tecidos a uma taxa determinada pelo gradiente de pressão parcial entre o sangue arterial e o tecido (39, 40). Possuem propriedades anestésicas definida pela amnésia, imobilidade, analgesia e inconsciência. Devido suas propriedades, como parte do seu metabolismo, os anestésicos inaláveis são eliminados em sua maior parte pela expiração, porém parte também é eliminada, depois de sofrer metabolismo da fase 1 (oxidação, redução ou hidrólise), pelas enzimas citocromo P450 mono-oxigenase (CYP), e da fase 2 (conjugação), pela enzima uridina 5'-difosfato glucuronosil-transferase, ocorrendo a eliminação dos metabolitos via urina ou bile.

Quando se faz a coleta do tecido, deve-se priorizar métodos que reduzem os artefatos e sejam capazes de proporcionar a morte de forma indolor. Assim, a técnica empregada deve levar em consideração avaliações técnicas, fisiológicas e comportamentais para precisão dos resultados (22).

Sabe-se que o pênis é um órgão altamente vascular, porém, ainda não há estudos sobre as possíveis alterações histomorfológicas desse órgão sob os efeitos vasculares imediatos e transitórios da associação anestésica cetamina e xilazina e sob os efeitos vasculares promovidos pelo isoflurano em ratos *Wistar*.

Poucas são as informações disponíveis a respeito das alterações teciduais provocadas pela eutanásia. Portanto, é essencial conhecer as diferenças entre os tipos de métodos de eutanásia, buscando a seleção e padronização no trabalho de pesquisa (5), visto que, os

métodos existentes são críticos para a confiabilidade dos dados coletados e podem comprometer os resultados provocando alterações metabólicas e histológicas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Comparar a histoarquitetura do pênis de ratos *Wistar* submetidos à eutanásia com isoflurano e com a associação do cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina

1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar quantitativamente, por meio de estudos histoquímicos, o tecido conjuntivo, muscular, espaço sinusoidal e fibras do sistema elástico no CC de ratos *Wistar* eutanasiados com isoflurano e com a associação do cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina;
- b) Analisar quantitativamente, por meio de estudos histoquímicos a área total do pênis, a área do CC com e sem a túnica albugínea e a área da túnica albugínea de ratos *Wistar* eutanasiados com isoflurano e com a associação do cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina;
- c) Analisar qualitativamente o componente colágeno no CC de ratos *Wistar* eutanasiados com isoflurano e com a associação do cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

Foram utilizados 14 ratos *Wistar* machos, mantidos em biotério, com temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, submetidos a controle de ciclo de 12 horas claro/escuro (luz artificial, 7:00 as 19:00 horas), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estado do Rio de Janeiro e aprovados sob o protocolo 004-2019 (Anexo 1).

Ao completarem 16 semanas de vida os animais foram divididos em dois grupos, contendo 7 animais cada: grupo K+X, composto por ratos submetidos a eutanásia com cloridrato de cetamina 10% (150mg/Kg, Cetamin, Syntec, Barueri, Brazil) associado ao cloridrato de xilazina 2% (15 mg/Kg, Xilazin Syntec), administrados por via intramuscular; e um grupo ISO, submetidos a eutanásia com isoflurano a 2% (Isoforine, Cristália, Itapira, Brazil) vaporizado em câmara de indução.

2.2 Análises penianas

Após a eutanásia, os pênis foram devidamente dissecados, a porção média dos pênis foram coletados e armazenados em uma solução de formalina tamponada a 4%. Em seguida, as amostras foram processadas para inclusão (imersão) em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5 μm de espessura. Em seguida, os cortes foram submetidos as seguintes colorações histológicas: Hematoxilina-Eosina, Picrosirius Red, Resorcina-Fucsina de Weigert com prévia oxidação e Tricrômico de Masson. Os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina foram utilizados para verificação da integridade do tecido. Os cortes corados pelo Tricrômico de Masson foram utilizados para mensurar e as densidades de superfície de tecido conjuntivo, músculo liso e o espaço sinusoidal no CC. Os cortes corados com a Resorcina-Fucsina de Weigert com prévia oxidação foram utilizados para quantificar as fibras do sistema elástico, e os cortes corados com Picrosirius Red foram utilizados para a análise qualitativa das fibras colágenas no CC.

Imagens de microscopia de luz convencional e polarizada foram capturadas por uma câmera DP70 acoplada ao microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.2.1 Densidades de superfície do espaço sinusoidal, tecido conjuntivo e músculo liso (Sv)

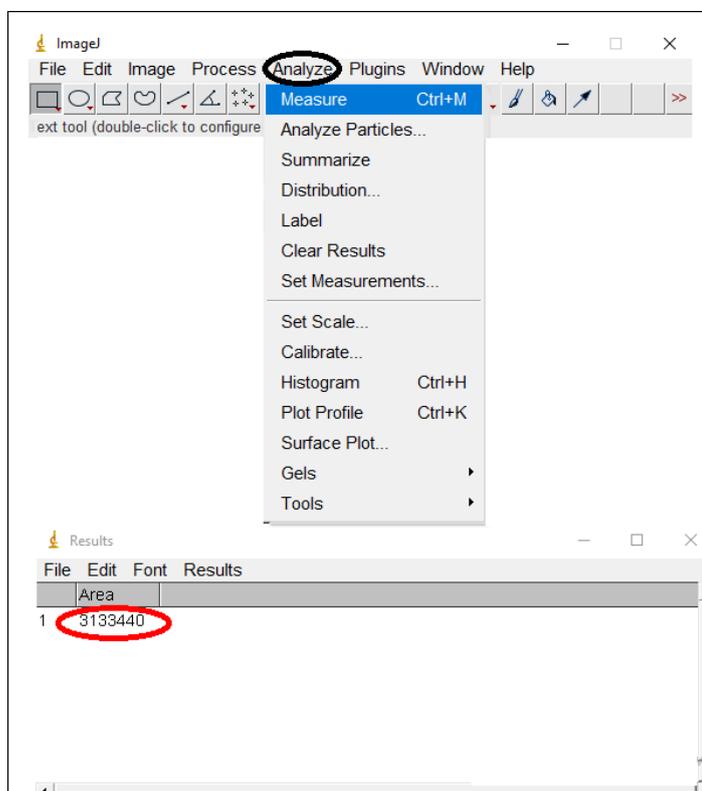
Em cortes corados pelo tricômico de Masson e fotografados sob magnificação de 400x, foram avaliadas as densidades de superfície do espaço sinusoidal, tecido conjuntivo e músculo liso do corpo cavernoso, expressas em porcentagem, pelo método de contagem de pontos (10). Foram analisadas 25 fotomicrografias do CC para cada animal (5 campos de 5 cortes de cada animal). Este procedimento foi utilizado para aferir a densidade de área das estruturas aqui analisadas.

O método de contagem de pontos é utilizado para obter a Sv das estruturas estudadas. De acordo com este método, o número de pontos que se sobrepõe a estrutura de interesse, dividido pelo número total de pontos na imagem, representa a densidade de área da estrutura.

Para isso, foi necessário mensurar a área da imagem utilizando a ferramenta *analyze* → *measure*, no *software Image J* (versão 1.45s, Instituto Nacional de Saúde, EUA). O valor da área encontrado foi utilizado para a distribuição dos pontos. Posteriormente, utilizando a ferramenta *grid* do *software Image J*, a grade de 99 pontos foi sobreposta a imagem a ser analisada. Ao selecionar a ferramenta *grid*, verifica-se que existem alguns formatos, o utilizado neste estudo foi o formato em cruz e para a contagem, foi considerado o quadrante superior direito de cada cruz.

Com o auxílio da ferramenta *cell counter* foram quantificados o tecido conjuntivo, músculo liso e espaço sinusoidal. Os pontos que tocavam as estruturas foram divididos pelo número total de pontos e multiplicado por 99 para então expressar os resultados em porcentagem. Tal ferramenta permite quantificar mais de uma estrutura na mesma imagem em que ficam registrados na janela *cell counter*, que deve ser escolhido um para cada estrutura a ser quantificada. Após selecionar o número e iniciar a quantificação, a quantidade de seleções em cada estrutura, que sobrepõem o ponto teste, ficará registrada na janela *cell counter* ao lado do seu número e as médias de cada animal utilizadas para análise estatística. As Figuras 4-7 mostram os passos para colocação da grade de 99 pontos no *Image J*.

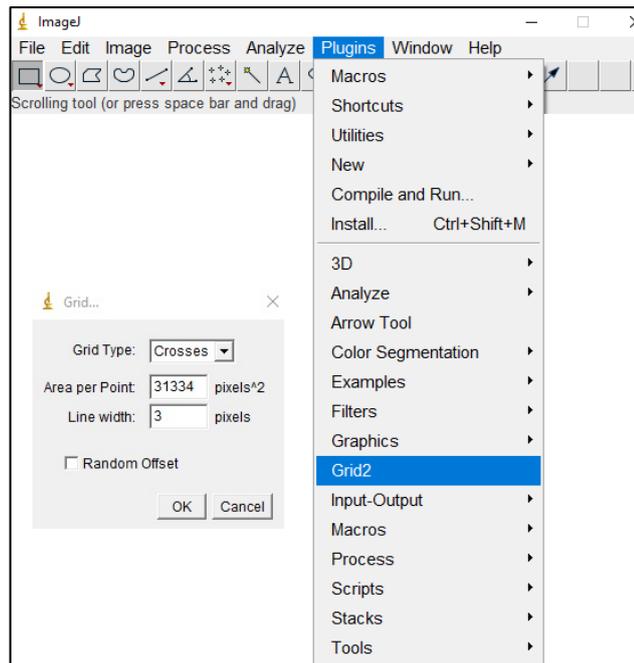
Figura 4 – Aquisição do resultado da área da imagem para realização do método de contagem de pontos no *software Image J*



Legenda: A figura mostra a mensuração da área da imagem, sendo necessária para utilização no sistema teste. Em seguida a figura demonstra a janela *results* aberta com o resultado da mensuração (círculo vermelho).

Fonte: A autora, 2022.

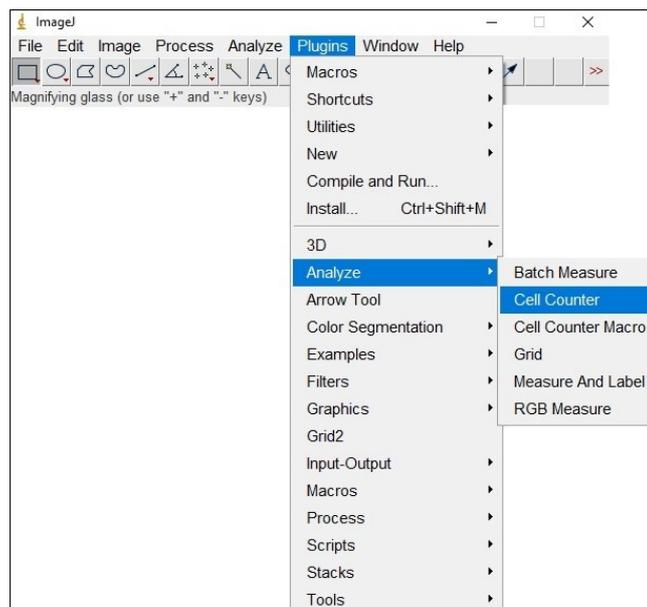
Figura 5 – Sobreposição da grade de 99 pontos no *ImageJ*.



Legenda: A figura mostra a seleção da ferramenta *plugins*, com posterior seleção da ferramenta *Grid2* para a utilização da área previamente mensurada dividida pelo número de ponto a ser colocado na grade e a seleção do tipo de grade, neste caso, escolhemos o tipo *crosses*.

Fonte: A autora, 2022.

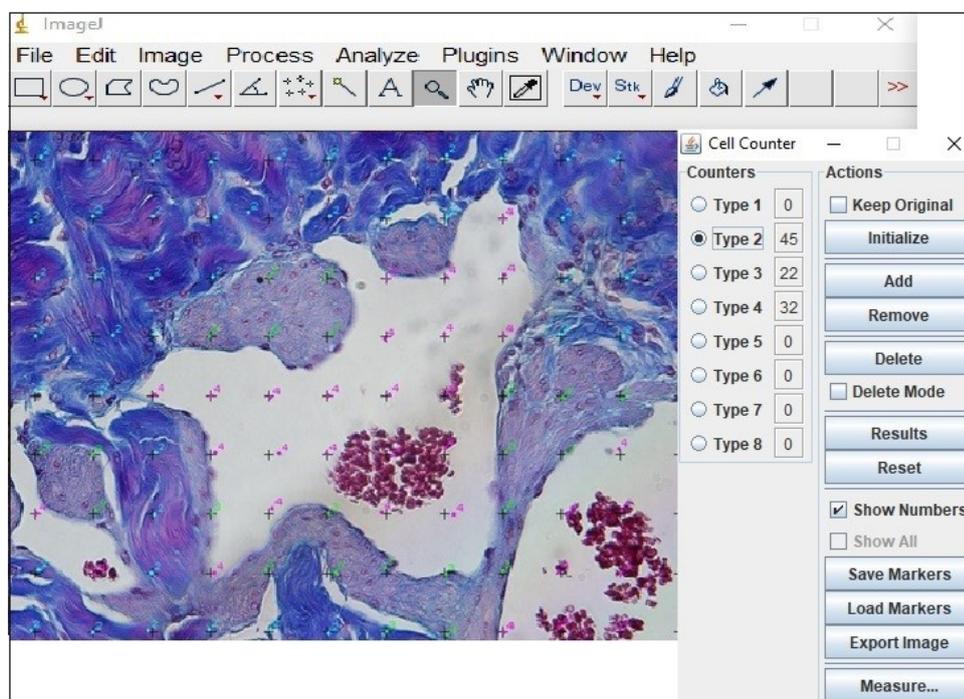
Figura 6 – Recurso *cell counter* para quantificação



Legenda: A figura mostra como abrir a ferramenta *cell counter*, clicando na ferramenta *plugins* com posterior seleção das ferramentas *analyze* e *cell counter* para a contagem das estruturas.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 7 – Mensuração da densidade do tecido conjuntivo, do músculo liso e do espaço sinusoidal



Legenda: A figura mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta a fotomicrografia, com a janela *cell counter* aberta, mostrando o resultado para a quantidade de cliques realizados em cada tipo de estrutura: Tipo 2 (azul) – Tecido conjuntivo, tipo 3 (verde) – músculo liso, tipo 4 (rosa) espaço sinusoidal.

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 40x

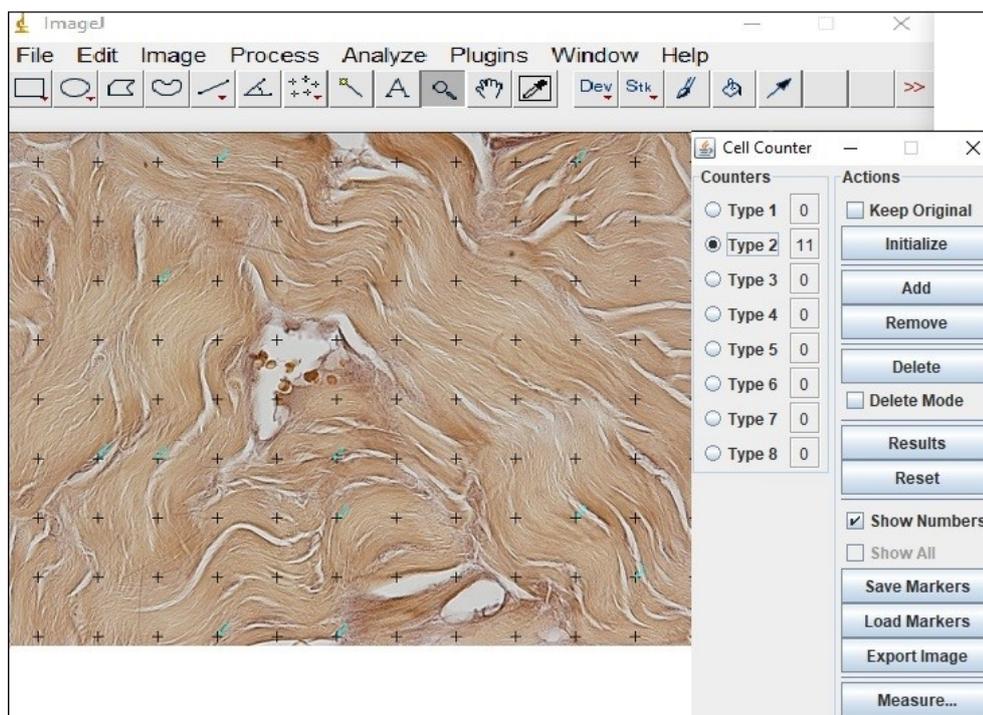
Fonte: A autora, 2022.

2.2.2 Densidades das fibras elásticas (Sv)

Cortes corados pela Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação e fotografados sob magnificação de 600x foram utilizados para análise das fibras do sistema elástico.

Foram analisadas 25 imagens de cada animal para a avaliação das densidades das fibras do sistema elástico, utilizando a mesma metodologia adotado para as densidades de tecido conjuntivo, espaço sinusoidal e musculo liso, como já mencionado (figura 8). Os resultados foram expressos em porcentagem.

Figura 8 – Mensuração da densidade das fibras elásticas



Legenda: A figura mostra a grade de 99 pontos (cruzes) sobreposta a fotomicrografia, com a janela *cell counter* aberta, mostrando o resultado para a quantidade de cliques realizados quando visualizado as fibras elásticas

Nota: Histoquímica de Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação, 600x

Fonte: A autora, 2022.

2.2.3 Áreas do pênis

Para a realização das análises das áreas do pênis, foram analisados 5 cortes por animal, utilizando fotomicrografias dos cortes corados em Tricrômico de Masson, utilizando a objetiva de 2x. Nestas imagens foi possível observar todo o corte transversal do pênis. As áreas foram mensuradas em mm^2 , com a realização da calibração do *software* com a fotomicrografia da lâmina histológica com a régua milimetrada. Estas mensurações foram realizadas no *software ImageJ*.

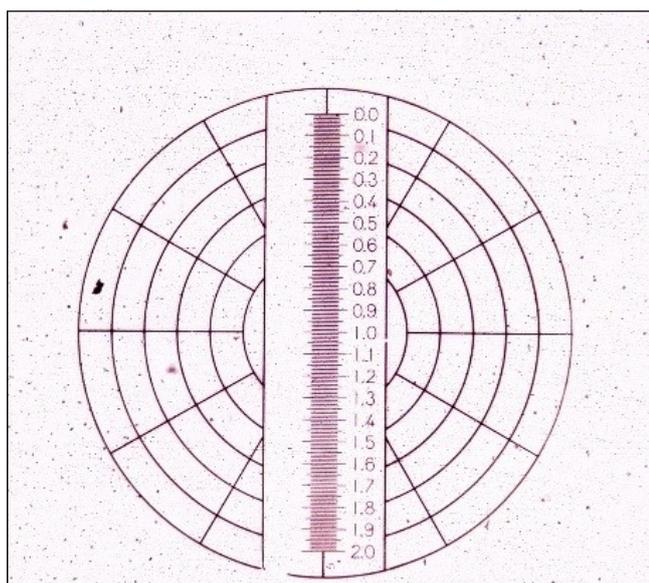
Para isso, após abrir a imagem da régua milimetrada no *Image J*, selecionamos a ferramenta *Straight line selections* e na imagem selecionamos uma distância (comprimento) conhecida na régua (0,0 a 0,5). Para realizar uma marcação correta é necessário que a linha esteja em angulo reto. Ao clicar em *analyze* e depois em

measure, obtemos o resultado da distância marcada em pixels. O *software* nos fornece a distância em pixels, e nós informamos ao *software* que aquela distância (comprimento) corresponde 0,5 mm.

Posteriormente, ao clicar em *analyze* e *set scale*, vamos obter o comprimento, que foi marcado pela linha reta, em pixel. Preenchemos então a distância conhecida, *known distance*, que representa o valor numérico do comprimento da reta selecionado na régua (0,5), colocamos a unidade de medida (mm), *unit of length*.

Utilizando a ferramenta “*Polygon*”. Após a calibração, foram quantificadas a área do pênis e em seguida as áreas do CC com e sem a túnica albugínea. A mensuração da área da túnica albugínea foi obtida pela diferença entre a área do CC com túnica albugínea à área do CC sem túnica albugínea (figura 9-15).

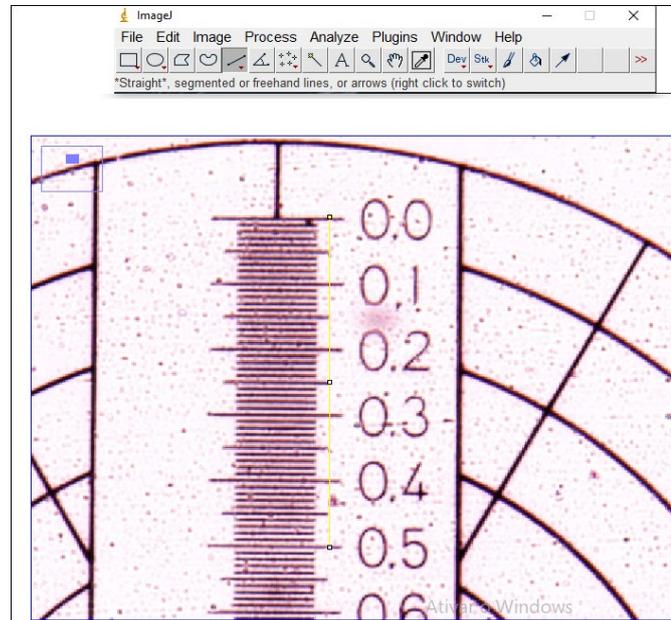
Figura 9 – Régua milimetrada, objetiva de 2x



Legenda: A figura mostra a régua milimetrada utilizada para calibrar o *software Image J*, necessária para que o *software* forneça resultados em milímetros.

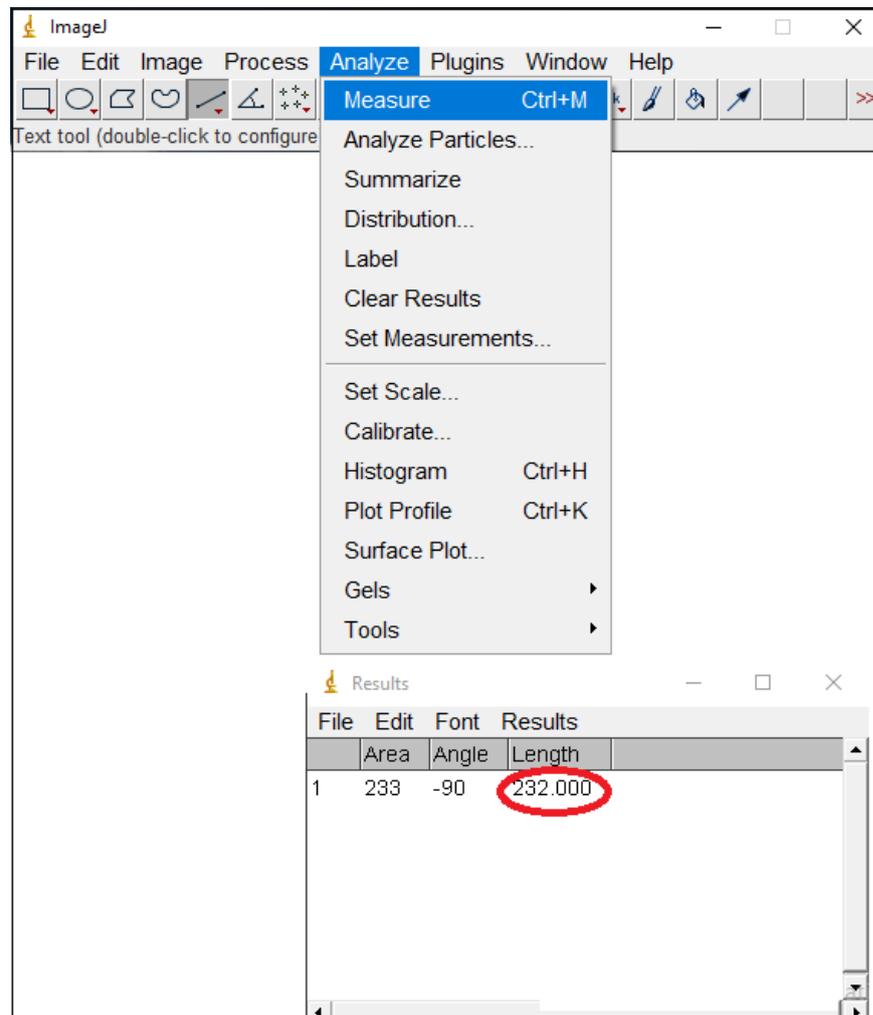
Fonte: A autora, 2022.

Figura 10 – Calibração do *software Image J*



Legenda: A figura mostra o primeiro passo para calibrar o *software* em mm com a seleção da distância conhecida na régua (0,0 a 0,5 mm). Em amarelo a linha reta, com a distância de 0,5mm, selecionada.

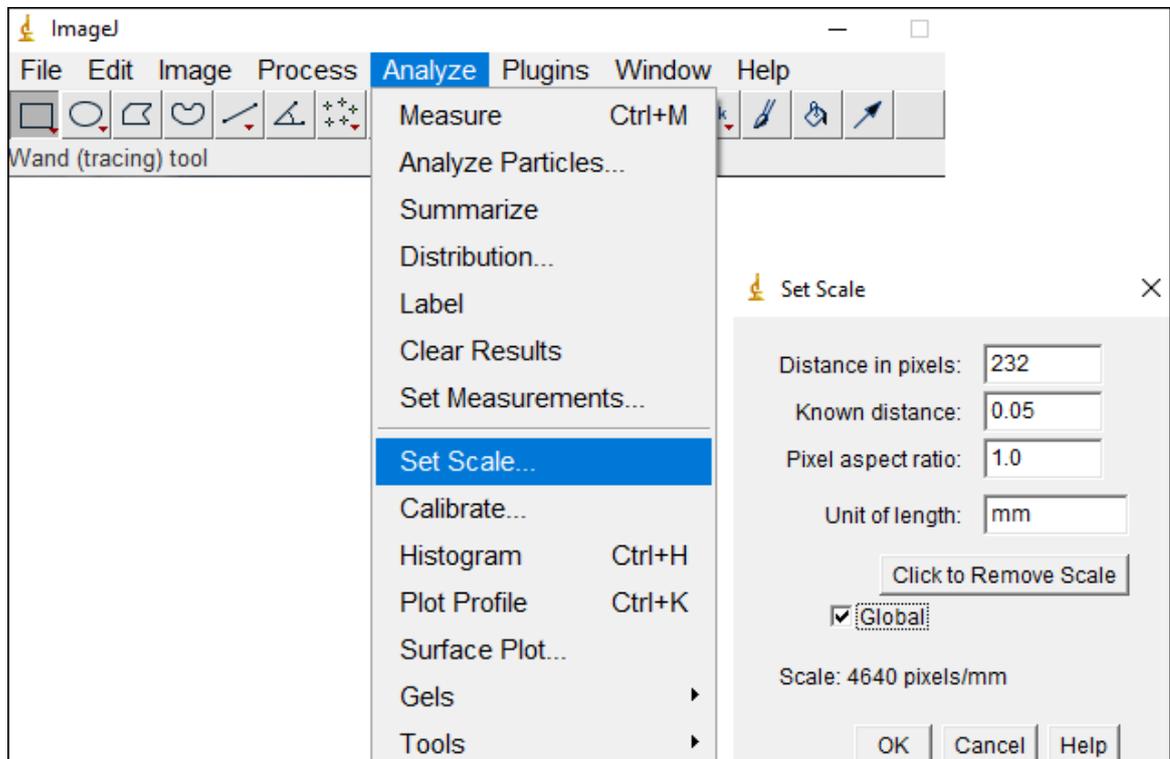
Fonte: A autora, 2022.

Figura 11 – Utilização do resultado em pixel para calibrar o *software Image J*

Legenda: A figura mostra os passos para a mensuração do comprimento em pixels da linha reta, clicando na ferramenta *analyze* e em seguida *measure*. Posteriormente, a figura mostra a janela *results* com o valor em pixels, 232 (círculo vermelho), da linha reta mensurada, marcado na distância de 0,5 mm na fotomicrografia da régua milimetrada.

Fonte: A autora, 2022.

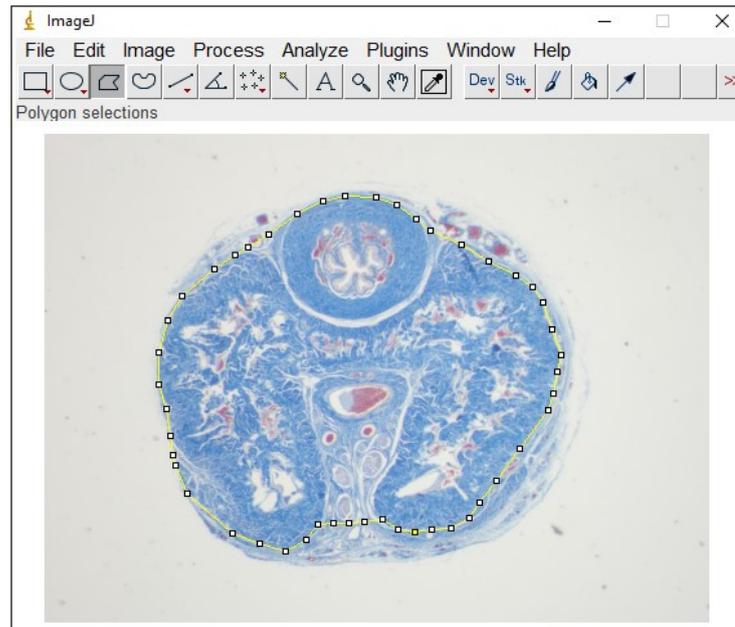
Figura 12 – Configuração do *software Image J*



Legenda: A imagem mostra a seleção da ferramenta *analyze* com posterior seleção da ferramenta *set scale*, para que possamos configurar o *software*. Em seguida o preenchimento da janela *Set Scale*. A opção *distance in pixels* é preenchida automaticamente com o valor encontrado anteriormente, a opção *Known distance* é preenchida com o valor da distância marcada na régua (0,5) e a unidade de medida, *unit of length*, em mm. A seleção da opção *box Global* é realizado ao final de todo processo.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 13 – Mensuração da área do corte transversal do pênis

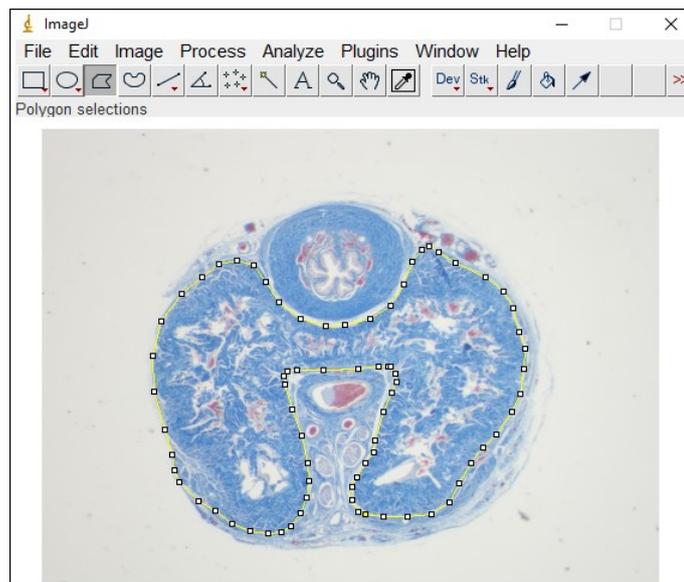


Legenda: A figura mostra a utilização da ferramenta *polygon selections* para mensuração da área do corte transversal do pênis em que envolvemos a área total do corte transversal do pênis.

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 2x

Fonte: A autora, 2022.

Figura 14 – Mensuração da área do corpo cavernoso com a túnica albugínea

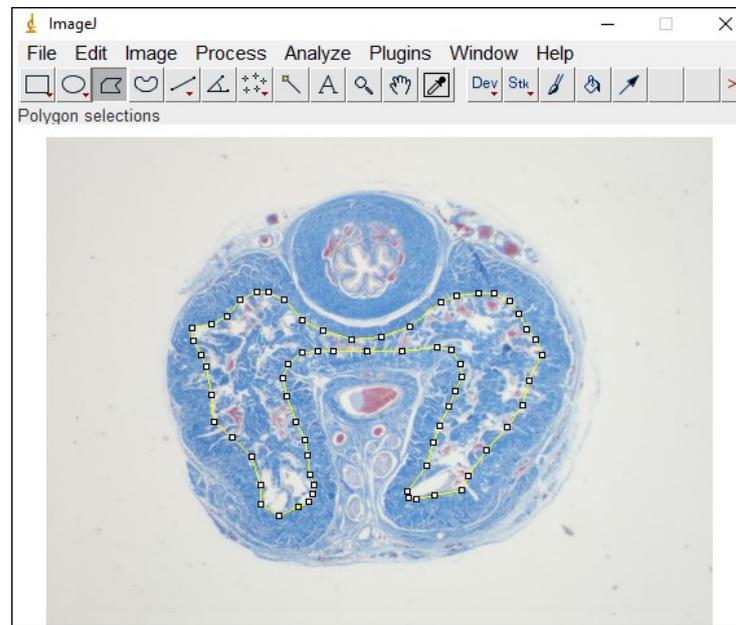


Legenda: A figura mostra a utilização da ferramenta *polygon selections* para mensuração da área do corpo cavernoso com a túnica albugínea.

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 2x

Fonte: A autora, 2022.

Figura 15 – Mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea



Legenda: A figura mostra a utilização da ferramenta *polygon selections* para mensuração da área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea.

Nota: Histoquímica de Tricrômico de Masson, 2x

Fonte: A autora, 2022.

Em cortes corados pelo Pricosirius red e fotografados sob magnificação de 400x e sob luz polarizada foi analisado subjetivamente a presença de colágeno tipo I e colágeno tipo III (figura 16).

Figura 16 – Análise subjetiva da presença de colágeno tipo I e colágeno tipo III



Legenda: Fotomicrografia do corpo cavernoso do pênis de rato corado com picrosírius red e observado sob polarização, identificando a presença de colágeno tipo I e III.

Nota: PicroSírius Red polarizado, 400x

Fonte: A autora, 2022.

2.3 Análise estatística

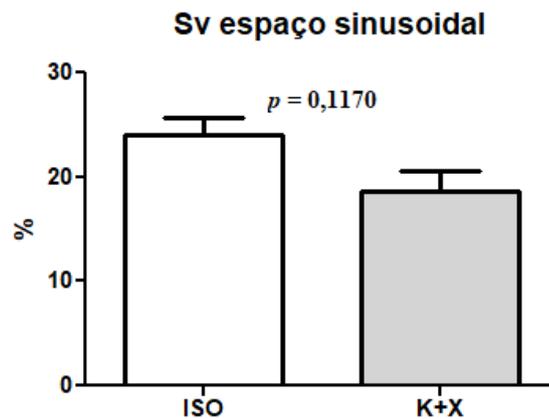
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da distribuição normal dos dados e o teste *t* de Student não pareado para aquisição de dados, considerando $p < 0,05$ como resultado significativo.

3 RESULTADOS

3.1. Densidade de superfície do espaço sinusoidal, tecido conjuntivo e músculo liso

Quando analisadas as densidades de superfície do espaço sinusoidal ($p = 0,1170$), tecido conjuntivo ($p = 0,2195$) e do músculo liso do CC ($p = 0,2747$) nenhuma diferença estatística foi observada quando comparados o grupo ISO e o grupo K+X. Estes resultados estão demonstrados nos gráficos 1-3, na figura 16 e na tabela 1.

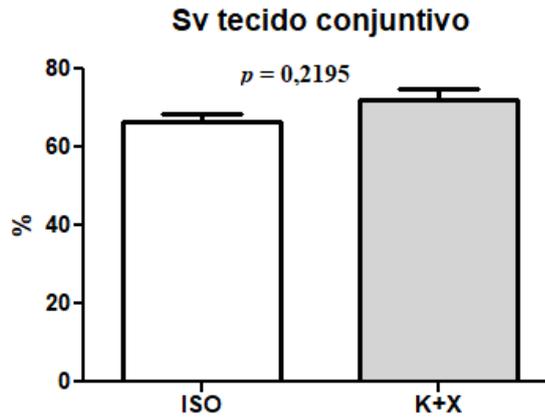
Gráfico 1 - Densidade de superfície do espaço sinusoidal no CC



Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.

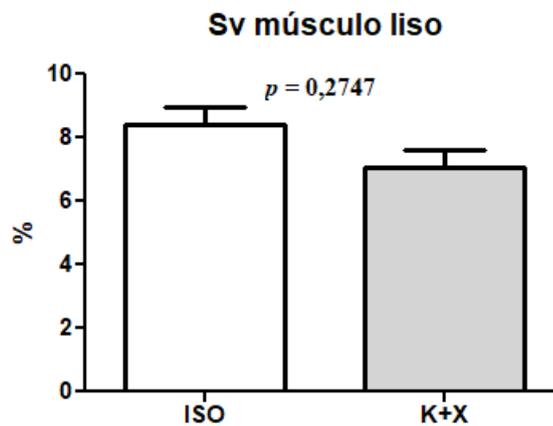
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 2 - Densidade de superfície do tecido conjuntivo no CC



Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 3 - Densidade de superfície do músculo liso no CC

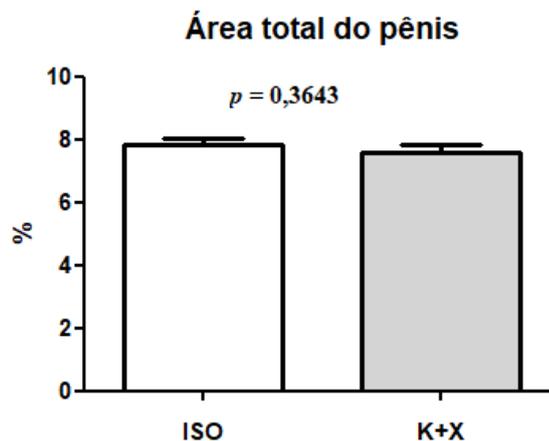


Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.
Fonte: A autora, 2022.

3.2 Área do corte transversal do pênis, do CC com e sem a túnica albugínea e da túnica albugínea

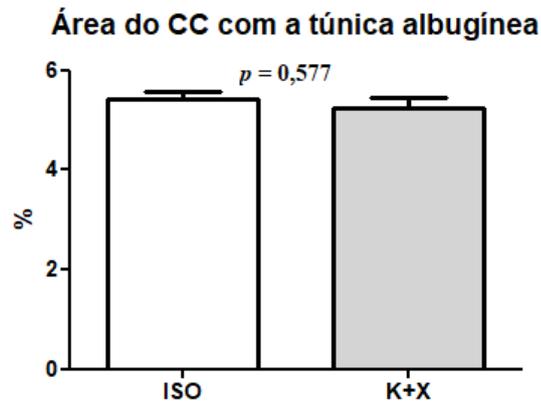
Nenhuma alteração foi observada em relação à área total do pênis ($p = 0,3643$), área do CC com a túnica albugínea ($p = 0,577$), área do CC sem a túnica albugínea, ($p = 0,3660$) e a área da túnica albugínea, ($p = 0,7629$) entre os grupos analisados. Estes resultados estão demonstrados nos gráficos 4-7, na figura 17 e na tabela 2.

Gráfico 4 - Área do corte transversal do pênis



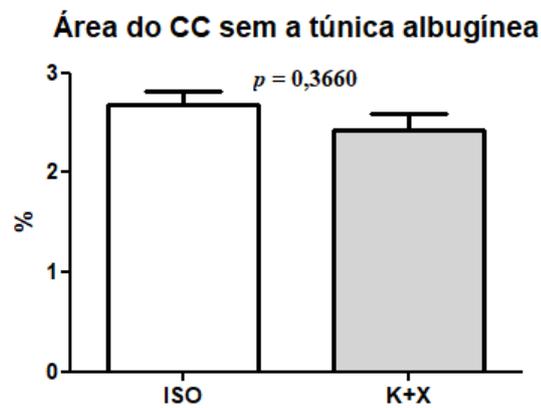
Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 5 - Área do CC com a túnica albugínea



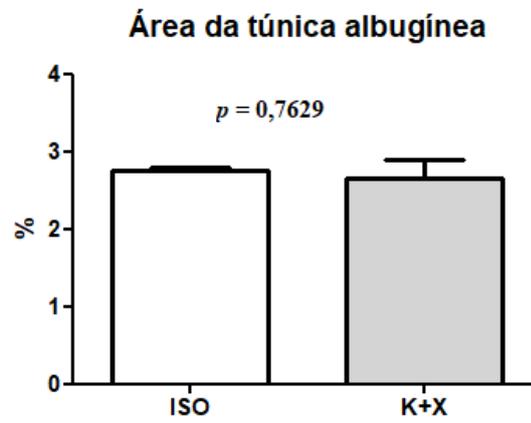
Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.
Fonte: A autora, 2022.

Gráfico 6 - Área do CC sem a túnica albugínea



Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.
Fonte: A autora, 2022.

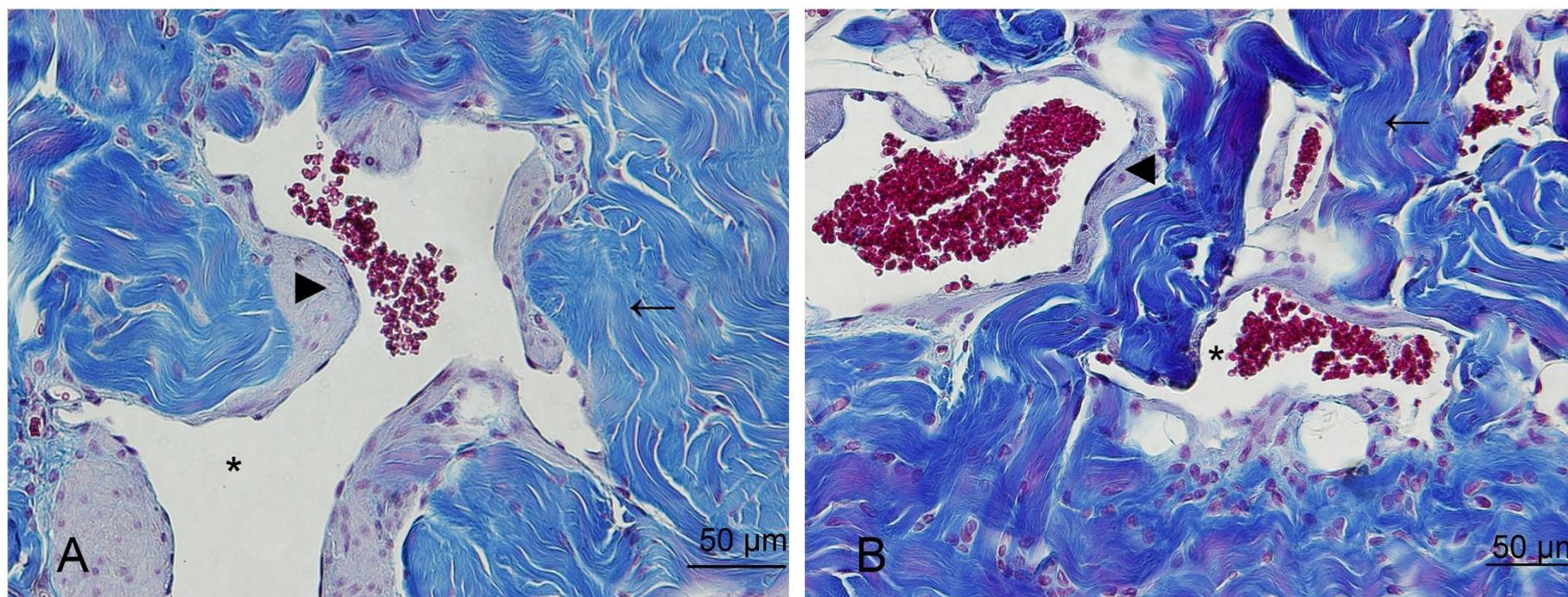
Gráfico 7 - Área da túnica albugínea



Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 17 – Fotomicrografias dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos

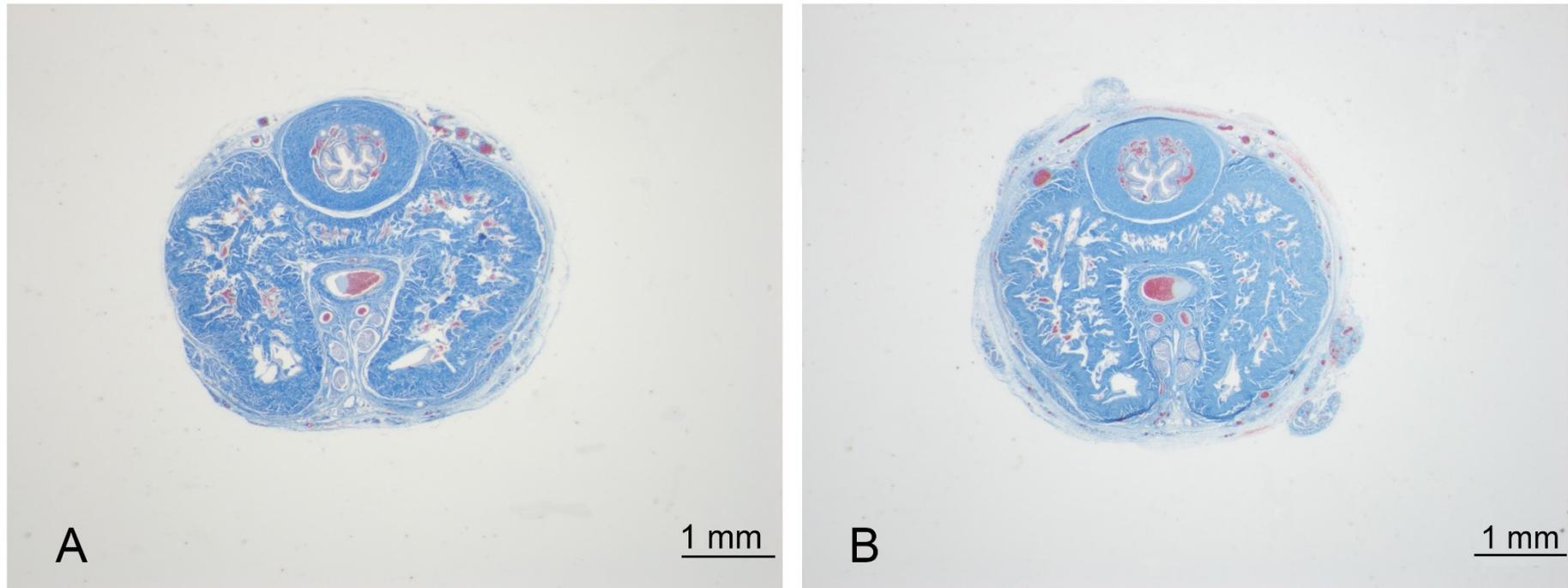


Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis. Em (A), ratos submetidos a eutanásia com Isoflurano 2%, (B) ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%. As setas indicam o tecido conjuntivo; as pontas das setas indicam as fibras musculares lisas; asteriscos indicam espaço sinusoidal.

Fonte: A autora, 2022.

Nota: Tricômico de Masson, 400x

Figura 18 – Fotomicrografias da área do corte transversal do pênis de ratos nos diferentes grupos



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de ratos. Em (A), ratos submetidos a eutanásia com Isoflurano 2%, (B) ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%.

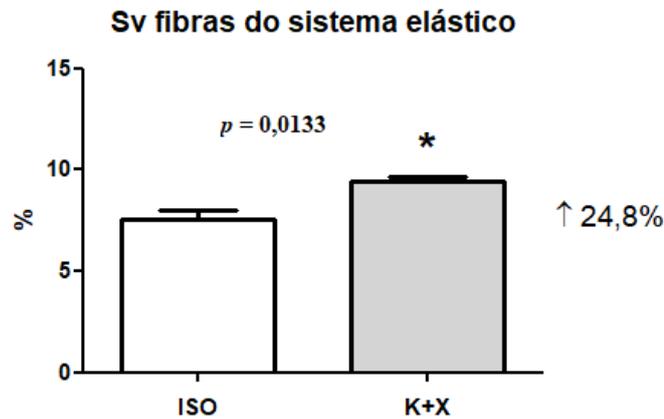
Fonte: A autora, 2022.

Nota: Tricômico de Masson, 2x

3.3 Densidade de superfície das fibras do sistema elástico

A densidade de superfície das fibras elásticas no grupo K+X foi 24,8% maior do que a do grupo ISO. Obtendo nesta análise um valor de $p = 0,0133$ (Gráfico 8, Figura 18, tabela 1).

Gráfico 8 - Densidade de superfície das fibras elásticas no CC



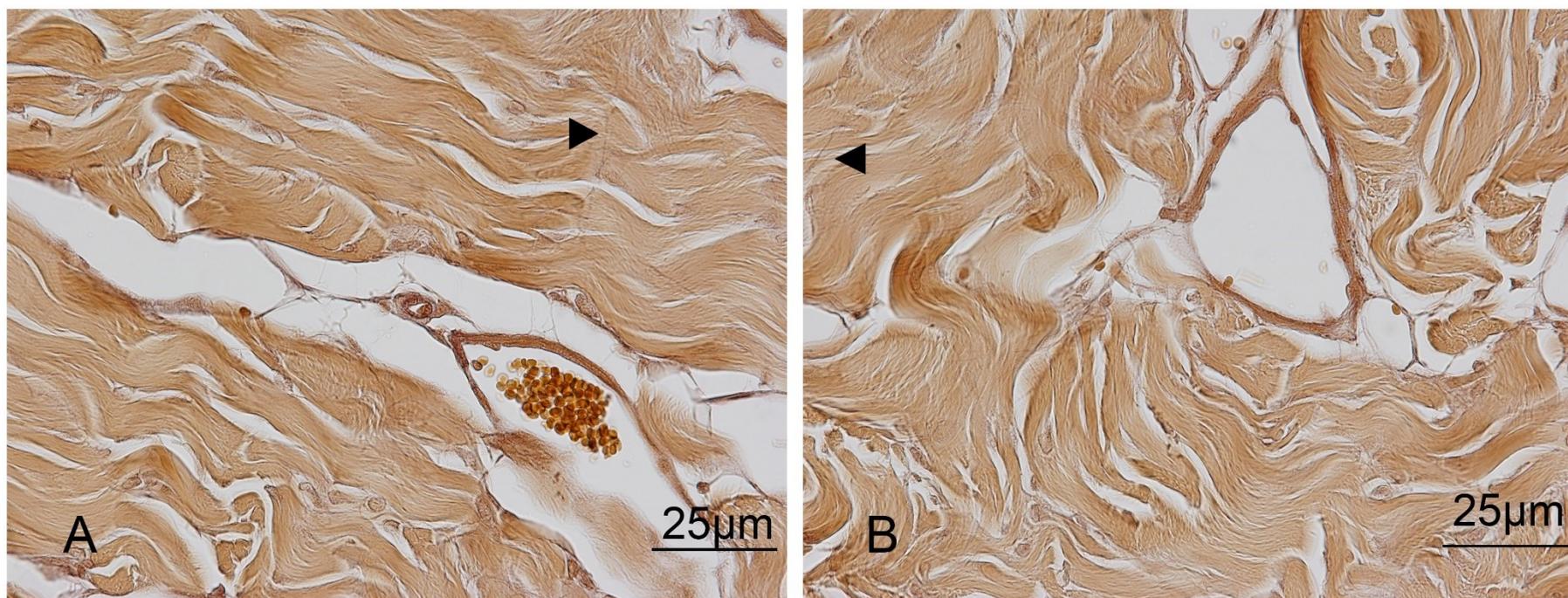
Legenda: Legenda: ISO - ratos submetidos a eutanásia com isoflurano a 2%; K+X – ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%; * - representa diferença estatística de K+X

Fonte: A autora, 2022.

3.4 Análise qualitativa do colágeno no corpo cavernoso

A análise qualitativa dos diferentes tipos de colágeno demonstrou que ambos os grupos tiveram predomínio do colágeno tipo I (Figura 19).

Figura 19 – Fotomicrografias das fibras elásticas dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos

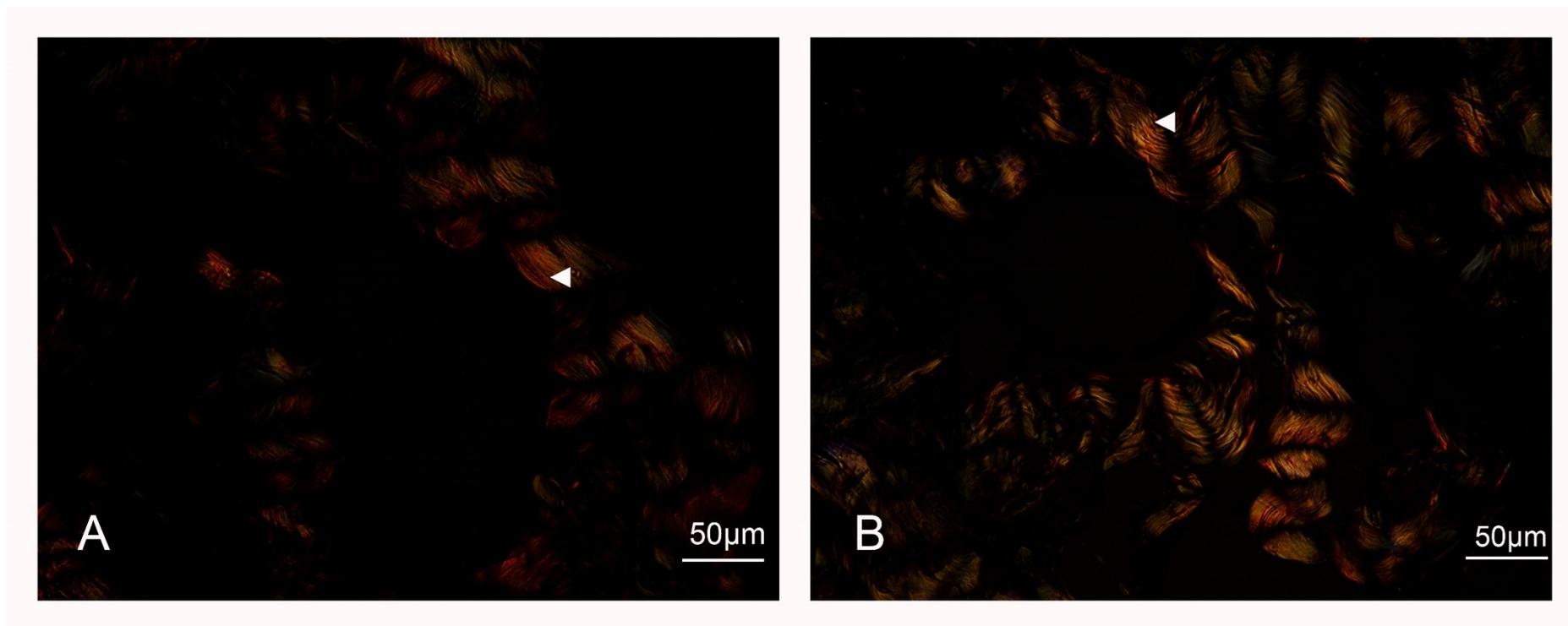


Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de ratos. Em (A), ratos submetidos a eutanásia com Isoflurano 2%, (B) ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%. As pontas das setas indicam as fibras elásticas.

Fonte: A autora, 2022.

Nota: Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação, 600x

Figura 20 – Fotomicrografias sob polarização dos corpos cavernosos de ratos nos diferentes grupos



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso do pênis de ratos corados com picrosirius red e observados sob polarização. Em (A), ratos submetidos a eutanásia com Isoflurano 2%, (B) ratos submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%. As pontas das setas indicam as fibras de colágeno.

Fonte: A autora, 2022.

Nota: PicroSírius Red polarizado, 400x

Tabela 1 – Dados histológicos e morfométricos dos corpos cavernosos dos animais dos diferentes grupos

	ISO	K+X	Valor de <i>p</i>
Sv do espaço sinusoidal (%)	24,03 ± 4,47	18,63 ± 5,03	0,1170
Sv do tecido conjuntivo (%)	66,49 ± 5,40	72,08 ± 7,82	0,2195
Sv do músculo liso (%)	8,42 ± 1,37	7,07 ± 1,38	0,2747
Sv das fibras elásticas (%)	8,20 ± 0,41	9,56 ± 0,61 ^a	0,0133
Área total do pênis (mm ²)	7,83 ± 0,52	7,59 ± 0,55	0,3643
Área do corpo cavernoso com a túnica albugínea (mm ²)	5,42 ± 0,34	5,25 ± 0,49	0,577
Área do corpo cavernoso sem a túnica albugínea (mm ²)	2,68 ± 0,31	2,42 ± 0,40	0,3660
Área da túnica albugínea (mm ²)	2,74 ± 0,13	2,65 ± 0,58	0,7629

Legenda: ISO: Ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com isoflurano 2%; K+X: Ratos *Wistar* submetidos a eutanásia com a associação do cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina a 2%. a: grupo estatisticamente significativos. Dados expressos com a média ± desvio padrão

Tabela 2 - Dados estatísticos dos ratos *Wistar* avaliados no grupo ISO e K+X

Dados estatísticos dos ratos avaliados no grupo ISO.

	Espaço sinusoidal	Tecido Conjuntivo	Músculo liso	Fibra Elástica	Area total do pênis	Área do CC com a túnica albugínea	Área do CC sem a túnica albugínea	Área da túnica albugínea
Rato 1	27,90	61,40	9,70	8,44	7,64	5,52	2,93	2,59
Rato 2	21,60	67,90	9,40	7,48	8,79	5,86	2,98	2,88
Rato 3	28,10	62,80	8,10	8,24	7,99	4,85	2,11	2,73
Rato 4	19,90	72,50	6,50	8,44	7,50	5,43	2,77	2,66
Rato 5	26,10	62,70	10,10	8,40	7,78	5,24	2,59	2,65
Rato 6	17,04	75,00	6,96	5,64	7,31	5,64	2,71	2,93
Rato 7	27,60	63,16	8,24	6,24				

Dados estatísticos dos ratos avaliados no grupo K+X.

	Espaço sinusoidal	Tecido Conjuntivo	Músculo liso	Fibra Elástica	Area total do pênis	Área do CC com a túnica albugínea	Área do CC sem a túnica albugínea	Área da túnica albugínea
Rato 1	17,40	79,50	5,10	9,96	8,21	5,49	2,50	2,99
Rato 2	25,30	58,30	6,50	9,56	7,87	5,40	2,33	3,06
Rato 3	10,80	81,60	8,50	9,04	7,90	5,86	3,06	2,80
Rato 4	21,90	68,60	8,70	8,88	7,76	5,40	2,29	3,11
Rato 5	21,30	68,90	7,92	10,36	6,94	4,89	2,51	2,38
Rato 6	16,04	75,04	5,72	8,90	6,85	4,46	1,80	1,59
Rato 7	20,64	72,64	7,07	9,30				

4 DISCUSSÃO

Pouco se sabe a respeito da interferência dos métodos de eutanásia nos órgãos do trato reprodutor de animais de laboratório. Por isso, existe o risco de que a utilização de drogas anestésicas possam causar interferências nos fatores experimentais das variáveis de interesse, alterando assim, os resultados da pesquisa. Cria-se então, a necessidade de uma padronização da eutanásia para todos os animais de experimentação, a fim de se obter resultados precisos.

Estudos histológicos e morfométricos sobre a estrutura do pênis de ratos submetidos aos efeitos dos agentes anestésicos para eutanásia não foram encontrados. Os estudos existentes até então, tinham como objetivo a investigação de outros parâmetros fisiológicos (3, 25, 41-44). No nosso conhecimento, não existe ainda estudo científico que demonstre os efeitos na morfologia do pênis após administração de cetamina/xilazina e isoflurano na eutanásia.

Como já descrito anteriormente, a cetamina é um antagonista não competitivo no receptor NMDA, promove aumento da estimulação simpática e aumento do tônus muscular esquelético. A Xilazina é um agonista α_2 adrenérgico, apresenta propriedades analgésica, sedativas e relaxante muscular de ação central. A ativação dos receptores α_2 pós-sinápticos no músculo liso vascular periférico, promove o aumento inicial da pressão arterial provocando vasoconstrição periférica (37), promovendo contração do músculo liso no CC (45). O isoflurano é um éter metil-etílico halogenado que produz depressão moderada do sistema respiratório e cardiovascular, e o aumento da frequência cardíaca observado em alguns modelos experimentais, além de promover o relaxamento do músculo liso vascular.

Este estudo demonstrou que a utilização de diferentes protocolos de eutanásia, não mostrou alterações significativas no CC de ratos da linhagem *Wistar*. Nenhuma alteração foi observada quando analisados tecido conjuntivo, musculo liso, espaço sinusoidal e as áreas do corpo cavernoso e da túnica albugínea.

De acordo com as análises feitas, conseguimos demonstrar que ratos eutanasiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, apresentaram maior densidade de superfície das fibras elásticas, enquanto os outros componentes do CC não mostraram alterações. O motivo por que isso ocorre ainda é desconhecido

Desta forma se esses fossem os únicos parâmetros a serem investigados, não haveria motivo que condenasse o uso de um dos métodos. Por outro lado, como as fibras elásticas

foram também objeto de estudo, deve-se atentar para uma escolha adequada do método a ser utilizado.

A utilização da associação do cloridrato de cetamina ao cloridrato de xilazina em alguns estudos, demonstrou que, em coelhos submetidos à eutanásia com cetamina, não foram observadas alterações histopatológicas em alguns tecidos (cérebro, coração, pulmões, fígado baço, rins, estômago, intestinos delgado e grosso, bexiga urinária, ovário, útero e colo do útero) (46). Por outro lado, um outro estudo demonstrou que a anestesia com uma combinação de cetamina e xilazina foi capaz de provocar alteração histológica na córnea de camundongos (alteração consistente com ceratopatia em banda) (47).

As fibras do sistema elástico compreendem fibras eulaunínicas e fibras oxitalânicas além das fibras elásticas propriamente ditas. São abundantes no CE, ao redor dos vasos sanguíneos e ao redor do sinusóide do CC. As fibras elásticas e elaunínicas são compostas por um núcleo central de material amorfo e homogêneo, a elastina, rodeada por microfibrilas. As fibras oxitalânicas no entanto só apresentam microfibrilas que foram reveladas pelo processo de oxidação no método de Weigert para o sistema elástico (48, 49).

O papel das fibras elásticas no mecanismo da ereção não está claro. Poucas são as informações sobre a relação entre as fibras elásticas e a ereção (9). Já foi demonstrado alterações na quantidade das fibras elásticas em algumas situações patológicas (disfunção erétil e diabetes mellitus) e no processo de envelhecimento (8, 50, 51).

Outros estudos mostraram diferentes concentrações de fibras elásticas no CC utilizando diferentes modelos experimentais. Coelhos adultos mostraram ter uma concentração maior, do que aquela encontrada em homens em condições normais ou em condições de impotência como também já foi demonstrado em ratos adultos (8, 13, 52, 53).

Diante deste achado, nossos resultados mostram a importância da escolha do método apropriado de eutanásia para determinado objetivo do estudo, evitando assim, que efeitos potenciais da pesquisa sejam mascarados.

Futuros estudos deverão ser realizados para adicionar conhecimento sobre as possíveis alterações no CC sob efeito de agentes utilizados para eutanásia, oferecendo assim, maiores informações quanto a padronização do modelo a ser utilizado e do protocolo de eutanásia a ser adotado.

O presente estudo apresenta limitações, que foram assumidas no momento da escolha do modelo experimental. Deve-se destacar que as alterações encontradas são alterações imediatas e pontuais e são restritas a apenas dois métodos de eutanásia. Os dados deste estudo não devem ser transpostos para outros modelos experimentais.

CONCLUSÃO

A escolha do método da eutanásia afeta a validade dos dados da pesquisa. A escolha do melhor método é desafiadora e deve ser levada em consideração com o propósito de reduzir o viés e alcançar resultados reproduzíveis.

Embora os parâmetros analisados, com exceção das fibras elásticas, não tenham sido alterados, destaca-se a importância da padronização do método de eutanásia em experimentos cujo objetivo seja a análise da histologia do corpo cavernoso do rato,

REFERÊNCIAS

1. Chorilli M, Michelin D.C, Salgado H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2007 Jan; 28 (1):11-23.
2. Everitt JI. The future of preclinical animal models in pharmaceutical discovery and development: a need to bring in cerebro to the in vivo discussions. *Toxicol Pathol*. 2015 Jan;43(1):70-7.
3. Pierozan P, Jernerren F, Ransome Y, Karlsson O. The Choice of Euthanasia Method Affects Metabolic Serum Biomarkers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Aug;121(2):113-8.
4. Seymour TL, Nagamine CM. Evaluation of Isoflurane Overdose for Euthanasia of Neonatal Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2016 May;55(3):321-3
5. Brooks SP, Lampi BJ, Bihun CG. The Influence of Euthanasia Methods on Rat Liver Metabolism. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 1999 Nov;38(6):19-24
6. Valentim AM, Guedes SR, Pereira AM, Antunes LM. Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents. *Laboratory Animals*. 2016 Aug; 50(4):241–53
7. Wellington D, Mikaelian I, Singer L. Comparison of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2013 Jul;52(4):481-7.
8. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int*. 2006 Mar;97(3):567-9.
9. Da Silva MHA, Costa WS, FJ BS, De Souza DB. The corpus cavernosum after treatment with dutasteride or finasteride: A histomorphometric study in a benign prostatic hyperplasia rodent model. *Asian J Androl*. 2018 Sep-Oct;20(5):505-10.
10. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. 2012 Jul-Aug;33(4):735-9.
11. Seyam RM, Kattan SA, Assad LW, El-Sayed RM, Almohanna FH. Penile autotransplantation in rats: An animal model. *Urol Ann*. 2013 Oct;5(4):255-8.
12. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Pelve e Péríneo. In: Moore KL, Dalley AF, Agur AMR, editors. *Moore Anatomia Orientada para a Clínica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.

13. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol*. 2000 Nov;164(5):1802-6.
14. Goldstein AM, Meehan JP, Zakhary R, Buckley PA, Rogers FA. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology*. 1982 Sep;20(3):259-66.
15. Hsieh CH, Liu SP, Hsu GL, Chen HS, Molodysky E, Chen YH, et al. Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: clinical implications for physicians and surgeons. *Med Sci Monit*. 2012 Jul;18(7):RA118-25.
16. Fernandes MAV, de Souza L, Cartafina LP. Ultrasound evaluation of the penis. *Radiol Bras*. 2018 Jul-Aug;51(4):257-61.
17. Alfredo RL, Latarjet M. Tomo 2 Sistema genital Masculino. In: Alfredo RL, Latarjet M, Anatomía humana. 4a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2011.
18. Junqueira LC, Carneiro J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: Junqueira LC, Carneiro J, editors. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
19. Yiee JH, Baskin LS. Penile embryology and anatomy. *ScientificWorldJournal*. 2010 Jun 29;10:1174-9.
20. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005 Nov;32(4):379-95, v.
21. Murakami R. A histological study of the development of the penis of wild-type and androgen-insensitive mice. *J Anat*. 1987 Aug;153:223-31.
22. Shomer NH, Allen-Worthington KH, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, et al. Review of Rodent Euthanasia Methods. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2020 May 1;59(3):242-53.
23. Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit*. 2000 Jan-Feb;6(1):171-80.
24. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006.
25. Mohamed AS, Hosney M, Bassiony H, Hassanein SS, Soliman AM, Fahmy SR, et al. Sodium pentobarbital dosages for exsanguination affect biochemical, molecular and histological measurements in rats. *Sci Rep*. 2020 Jan 15;10(1):378.
26. Prando S, Carneiro CG, Otsuki DA, Sapienza MT. Effects of ketamine/xylazine and isoflurane on rat brain glucose metabolism measured by (18) F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Eur J Neurosci*. 2019 Jan;49(1):51-61.

27. Das G, Vernunft A, Gors S, Kanitz E, Weitzel JM, Brussow KP, et al. Effects of general anesthesia with ketamine in combination with the neuroleptic sedatives xylazine or azaperone on plasma metabolites and hormones in pigs. *J Anim Sci*. 2016 Aug;94(8):3229-39.
28. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Nov;230(10):777-84.
29. Mion G, Villevieille T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS Neurosci Ther*. 2013 Jun;19(6):370-80.
30. Adams JD, Jr., Baillie TA, Trevor AJ, Castagnoli N, Jr. Studies on the biotransformation of ketamine. 1-Identification of metabolites produced in vitro from rat liver microsomal preparations. *Biomed Mass Spectrom*. 1981 Nov;8(11):527-38.
31. Flecknell P. Laboratory animal anesthesia. *Anaesthesia; Anaesthesia of Common Laboratory Species: Special Considerations*. 3 ed. London (UK): Academic Press; 2009.
32. Chizh BA. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol*. 2007 May;21(3):259-71.
33. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003 Oct;97(4):1108-16.
34. Rodrigues SF, de Oliveira MA, Martins JO, Sannomiya P, de Cassia Tostes R, Nigro D, et al. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci*. 2006 Sep 20;79(17):1630-7.
35. Spinosa HS, Górnica SL, Bernardi MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
36. Ascher JM, Bates W, Ng J, Messing S, Wyatt J. Assessment of xylazine for euthanasia of anoles (*Anolis carolinensis* and *Anolis distichus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012 Jan;51(1):83-7.
37. Murrell JC, Hellebrekers LJ. Medetomidine and dexmedetomidine: a review of cardiovascular effects and antinociceptive properties in the dog. *Vet Anaesth Analg*. 2005 May;32(3):117-27.
38. American Veterinary Medical Association. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. Schaumburg: AVMA, 2020
39. Minkovich L, William CK. Metabolism and Toxicity of Inhalational General Anesthetics (IGA). *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. 2017 Oct; 1-19
40. Evers AS, Maze M, Kharasch ED. *Anesthetic Pharmacology*. 2ed. Cambridge University Press, 2ª edição; 2011.

41. Traslavina RP, King EJ, Loar AS, Riedel ER, Garvey MS, Ricart-Arbona R, et al. Euthanasia by CO₂ inhalation affects potassium levels in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010 May;49(3):316-22.
42. Slott VL, Linder RE, Dyer CJ. Method of euthanasia does not affect sperm motility in the laboratory rat. *Reprod Toxicol*. 1994 Jul-Aug;8(4):371-4.
43. Overmyer KA, Thonusin C, Qi NR, Burant CF, Evans CR. Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. *PLoS One*. 2015 Feb;10(2):e0117232.
44. Boivin GP, Bottomley MA, Schiml PA, Goss L, Grobe N. Physiologic, Behavioral, and Histologic Responses to Various Euthanasia Methods in C57BL/6NTac Male Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2017 Jan 1;56(1):69-78.
45. Traish AM, Kim NN, Goldstein I, Moreland RB. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J Androl*. 1999 Nov-Dec;20(6):671-82.
46. Baneux PJ, Garner D, McIntyre HB, Holshuh HJ. Euthanasia of rabbits by intravenous administration of ketamine. *J Am Vet Med Assoc*. 1986 Nov 1;189(9):1038-9.
47. Koehn D, Meyer KJ, Syed NA, Anderson MG. Ketamine/Xylazine-Induced Corneal Damage in Mice. *PLoS One*. 2015 Jul;10(7):e0132804
48. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan;20(1):15-27.
49. Hsu GL, Brock G, von Heyden B, Nunes L, Lue TF, Tanagho EA. The distribution of elastic fibrous elements within the human penis. *Br J Urol*. 1994 May;73(5):566-71.
50. Mostafa ME, Senbel AM, Mostafa T. Effect of chronic low-dose tadalafil on penile cavernous tissues in diabetic rats. *Urology*. 2013 Jun;81(6):1253-9.
51. Hota T, Lorenzini F, Melchiorretto EF, Zeni M, Veronez D, Fraga R. Stereological analysis of elastic fibers of the corpus cavernosum of rats during the aging process. *Acta Cir Bras*. 2019 Jul;34(8):e201900803.
52. Maia RS, Babinski MA, Figueiredo MA, Chagas MA, Costa WS, Sampaio FJ. Concentration of elastic system fibers in the corpus cavernosum, corpus spongiosum, and tunica albuginea in the rabbit penis. *Int J Impot Res*. 2006 Mar-Apr;18(2):121-5.
53. Sattar AA, Wespes E, Schulman CC. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol*. 1994;25(2):142-4.

ANEXO - Comitê de ética em pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do estresse crônico na preferência alimentar e na morfologia do sistema urogenital de ratos wistar adultos", registrada com o nº 004/2019, sob a responsabilidade de **Bianca Martins Gregório** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 26/03/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/03/2023
Especie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200 g / 10 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2019.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

APÊNDICE – Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane (Artigo científico)



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

<https://doi.org/10.1590/ACB361103>

ORIGINAL ARTICLE
Experimental Surgery

Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane

Isabella Mendes Procópio¹ , Marco Aurélio Pereira-Sampaio² , Waldemar Silva Costa³ , Francisco José Barcellos Sampaio⁴ , Diogo Benchimol de Souza^{4*} 

1. Fellow Master degree. Urogenital Research Unit – Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro (RJ), Brazil.
2. PhD. Department of Morphology – Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro (RJ), Brazil
3. PhD. Urogenital Research Unit - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro (RJ), Brazil.
4. PhD. Urogenital Research Unit - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To compare the penile histoarchitecture of rats euthanized with isoflurane or with ketamine and xylazine. **Methods:** Fourteen male rats were divided into two groups: ISO, with animals euthanized with isoflurane; and K+X, with animals euthanized with ketamine (150 mg/kg) associated with xylazine (15 mg/kg). Immediately after the death, the penises were dissected, fixed in a 4% buffered formalin solution, and processed for histomorphometric analysis. The surface densities (S_v) of the corpus cavernosum structures (connective tissue, smooth muscle, sinusoidal space, and elastic fibers) were evaluated using Image J software. The distribution of collagen types I and III was qualitatively assessed. Statistical analyses were performed using the Student's t test for data comparison, considering it statistically significant when $p < 0.05$. **Results:** Regarding the S_v of connective tissue, smooth muscle and sinusoidal space, there were no differences between animals in both groups. On the other hand, the animals euthanized with the association of ketamine and xylazine showed the S_v of elastic fibers 24.8% higher in relation to animals euthanized with isoflurane. **Conclusion:** The euthanasia method affected one of the morphological parameters of the rat penises. The choice of euthanasia method must be standardized to reduce bias and to obtain reliable and reproducible results.

Key words: Euthanasia. Penis. Models, Animals. Rats.

*Corresponding author: diogobenchimol@gmail.com | (55 21)2868-8399

Received: July 12, 2021 | Review: Sept 11, 2021 | Accepted: Oct 09, 2021

Conflict of interest: Nothing to declare.

Research performed at Urogenital Research Unit, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro-RJ, Brazil.



■ Introduction

Despite efforts to reduce the use of animals in experimentation, in many studies they are still necessary to obtain answers regarding biological and/or pathological processes¹. Experiments often involve euthanasia of the animals, either for collection, to alleviate a condition of suffering, or to terminate the study. In this sense, anesthetic practices for performing euthanasia and its different methods are frequently studied, and recommendations for euthanasia change based on new information, always refining the experiments, and reducing the animals' discomfort².

The term euthanasia depicts the induction of death without pain or suffering. In general, euthanasia techniques must be effective in promoting death, producing rapid loss of consciousness, not causing terror or suffer to the animal, and being easy to apply^{3,4}. However, one other utmost characteristic to maintain adequate experimental conditions is that euthanasia methods shall not produce parametric changes that may impair the study results and interpretations.

The methods are divided into two main ones: chemistry and physics⁵. When it comes to euthanasia by chemical methods, there is a risk of interference and confusion in the variables of interest, due to the use of different anesthetic and analgesic agents, with distinct anesthetic approaches, influencing comparisons of results and reproduction in different laboratories⁶⁻⁸.

When tissue collection and analyses are necessary, methods that reduce the occurrence of artifacts and ensure painless death induction should be prioritized^{9,10}. Little information is available about tissue changes associated with euthanasia methods. Therefore, it is essential to know the differences between the types of anesthetics and euthanasia methods, seeking selection and standardization in the research work.

Several studies use the rat penis to study erectile dysfunction and other penile medical conditions. In most of these experiments, the organ is collected after euthanasia and analyzed histologically. However, no study investigated the hypothesis that different methods of euthanasia may be associated with some histomorphological variation of the corpus cavernosum.

Thus, the present study aimed to compare the histoarchitecture of the corpus cavernosum of rats euthanized with isoflurane or with the association of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride (two of the most commonly used methods).

■ Methods

This project was approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocol 004-2019).

Fourteen male Wistar rats were used for this study. All animals were bred in our laboratory and kept in a room with controlled temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and an artificial light-dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.). Rats had free access to standard food and water. All experiments were performed according to national and international law for the scientific use of animals.

All animals were kept under standard conditions, without any intervention being performed up to the 16th week of life, when they were submitted to euthanasia. At that time, the animals were randomly divided into two groups of seven animals each. The K+X group was composed by rats euthanized by intramuscular injection of 10% ketamine hydrochloride (150 mg/kg, Cetamin, Syntec, Barueri, SP, Brazil) associated with 2% xylazine hydrochloride (15 mg/kg, Xilazin, Syntec, Barueri, SP, Brazil). The ISO group was euthanized by the administration of 2% isoflurane (Isoforine, Cristália, Itapira, SP, Brazil) vaporized in an induction chamber.

After euthanasia, the penises were collected, and the skin-denuded middle part of the penile shaft was fixed in 4%-buffered formaldehyde solution and processed for paraffin embedding. Penile cross-sections (5- μm thick) were obtained and used for histomorphometric evaluations.

Sections stained by Weigert's Resorcin-fuchsin (with previous oxidation) were photographed under x600 magnification and used to analyze the surface densities (Sv) of the elastic system fibers. In other sections, stained by Masson's trichrome and photographed under x400 magnification, the Sv of the sinusoidal space, connective tissue and smooth muscle of the corpus cavernosum were evaluated. In sections stained with picosirius red and photographed under polarized light at x400 magnification, the distribution of collagen type I and type III was analyzed¹¹. All photomicrographs were captured by a camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) attached to the microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan).

The Sv of the different structures were evaluated by the point-counting method¹². Twenty-five photomicrographs of the corpus cavernosum were analyzed for each animal, for each structure. Briefly, a 100-point grid was superimposed over the images using the Image J software (National Institutes of Health, United States of America), and each point touching a structure of interest (elastic fibers, smooth muscle, connective tissue, or sinusoidal space) was counted to determine a percentual value which corresponded to the Sv of each structure.

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software, the Kolmogorov-Smirnov test to verify the normal distribution of data and the paired Student's t test for data acquisition, considering $p < 0.05$ as a significant result. All results are presented as mean \pm standard deviation.

Results

There was significant difference between the groups regarding the Sv of elastic system fibers ($p = 0.0057$). Animals in the K+X group had 24.8% higher values in comparison to the animals in the ISO group (Fig. 1).

There were no significant differences in Sv of connective tissue, sinusoidal space, and smooth muscle between the groups (Fig. 2). All numerical data are shown in Table 1.

When comparing the different types of collagen, through a qualitative analysis, it was observed that both groups similarly showed predominance of type

I collagen, without remarkable disparities among the groups (Fig. 3).

Table 1 - Histomorphometrical data of the corpus cavernosum of rats euthanized with ketamine and xylazine (K+X) or isoflurane (ISO)*.

	K+X	ISO	p value
Sv of sinusoidal space (%)	18.63 \pm 5.03	24.03 \pm 4.47	0.1170
Sv of connective tissue (%)	72.08 \pm 7.82	66.48 \pm 8.40	0.2195
Sv of smooth muscle (%)	7.07 \pm 1.38	8.42 \pm 1.37	0.2747
Sv of elastic fibers (%)	9.42 \pm 0.56 [†]	7.53 \pm 1.16	0.0057

Sv: Surface density; *data expressed as mean \pm standard deviation; [†]statistically different from group ISO. The data expressed in the table for each group was obtained through Kolmogorov-Smirnov test, to verify the normal distribution of data, and the paired Student's t test for data acquisition, considering $p < 0.05$ as a significant result.

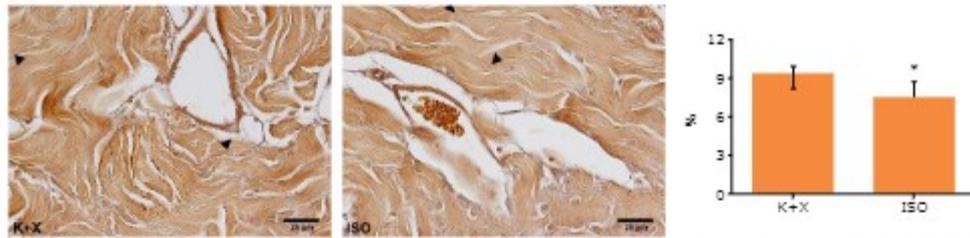


Figure 1 - Photomicrographs of corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine (K+X) or isoflurane (ISO); and graphic representation of surface density of elastic fibers results. Arrow heads indicates some elastic fibers. Weigert's Resorcin-fuchsin (with previous oxidation), magnification x600.

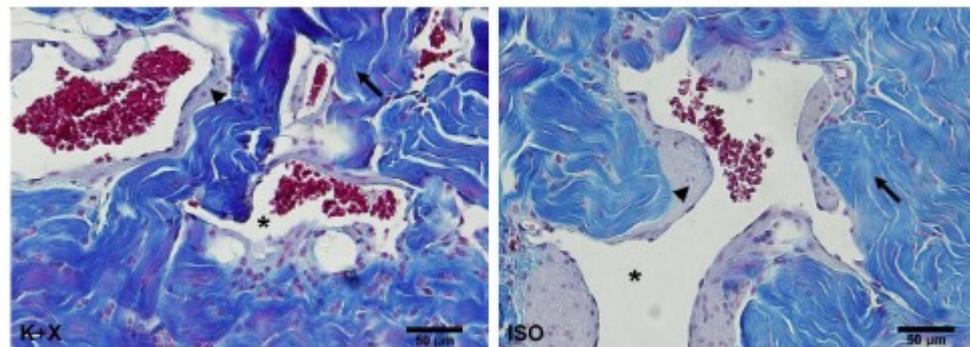
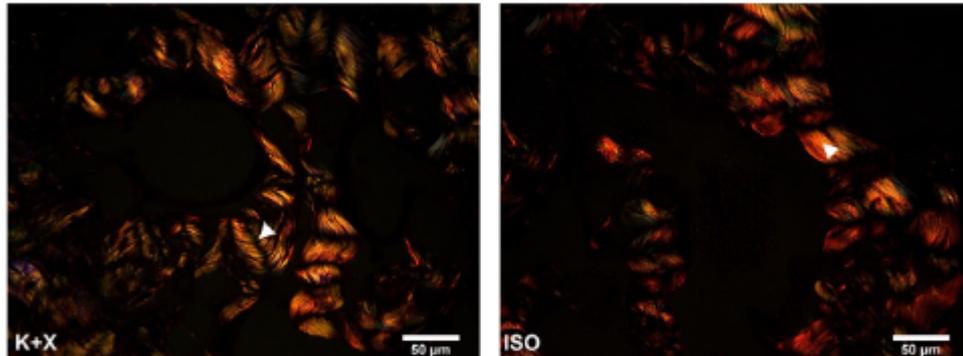


Figure 2 - Photomicrographs of corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine (K+X) or isoflurane (ISO). Arrows indicate the connective tissue; arrow heads point the smooth muscle fibers; asterisk indicates the sinusoidal space. Masson's trichrome, magnification x400.



K+X: animals submitted to euthanasia with ketamine and xylazine; ISO: animals submitted to euthanasia with isoflurane.

Figure 3 - Photomicrographs of corpus cavernosum of rats stained with picosirius red and observed under polarized light microscopy. Arrow heads indicate the collagen fibers. Magnification x400.

Discussion

Little is known about the interference of euthanasia methods in the reproductive tract organs of laboratory animals. Histological and morphometric studies on the structure of the penis of rodents subjected to the effects of anesthetic agents were not found. Existing studies on the anesthetic and euthanasia protocol sought to investigate physiological and morphological parameters in other organs^{24,22-25}. The present study is the first one to demonstrate and compare the effects of different euthanasia methods on the morphology of the rat penis.

The combination of ketamine and xylazine injection produces excellent anesthesia and analgesia, and its use is common as an anesthesia and euthanasia protocol. Ketamine is a non-competitive antagonist at the ionotropic glutamatergic receptor of N-methyl D-aspartate (known as NMDA). These are excitatory receptors involved in the enhancement of nociceptive processing, which has been shown to avoid sensitization to harmful stimuli during surgery. Ketamine is also associated to transient increases in systemic blood pressure, heart rate, cardiac output, sympathetic stimulation, and skeletal muscle tone^{14,17}.

Xylazine is an α_2 adrenergic agonist with analgesic, sedative, and centrally acting muscle relaxant properties. The action of xylazine in the activation of postsynaptic α_2 receptors in peripheral vascular smooth muscle promotes an initial increase in blood pressure causing peripheral vasoconstriction¹⁴, promoting smooth muscle contraction in the corpus cavernosum¹⁹. The administration of xylazine is considered safe when used alone or in combination with

other anesthetic and analgesic agents, such as ketamine, in animal research⁴.

Isoflurane is a halogenated methylethyl ether that has anesthetic properties defined by amnesia, immobility, analgesia, and unconsciousness, producing moderate depression of the respiratory and cardiovascular system, with increased heart rate²⁰. It is also associated with vascular smooth muscle relaxation.

According to Baneux *et al.*²¹, rabbits that were anesthetized with a combination of ketamine and xylazine and subsequently euthanized with ketamine did not demonstrate histopathological changes in the tissues that were evaluated in the study (brain, heart, lungs, liver, spleen, kidneys, stomach, small and large intestines, urinary bladder, ovary, uterus, and cervix). By the other hand, Koehn *et al.*²² showed that anesthesia with a combination of ketamine and xylazine caused histological alterations in the cornea of mice.

The proper choice of anesthetics in experiments is challenging and must be carefully adapted depending on the model and the end points, avoiding directly affecting the tissue's viability or parameters².

Modifications in the proportion of one of the components of the corpus cavernosum (elastic fibers) were identified in this study. However, the general histoarchitecture of the corpus cavernosum did not change when using isoflurane or the association of ketamine and xylazine as agents for euthanasia.

In the present study, the different euthanasia protocols presented similar outcomes for the smooth muscle area density, sinusoidal space, and connective tissue of the corpus

cavernosum of rats. Thus, if these are the only parameters to be investigated, there would be no difference that would justify or condemn the use of one of the methods.

On the other hand, if elastic fibers are the object of study, attention should be paid to standardize the method of euthanasia. According to the analyses of this study, rats killed with ketamine and xylazine, compared to animals killed with isoflurane, had higher density of elastic fibers, while the other components of the corpus cavernosum have not been shown to undergo changes. The reason for this is still unknown. The role of elastic fibers in the erection mechanism is not clear, and there is controversial information about the relationship between elastic fibers and erection²³. Changes in the number of elastic fibers have already been demonstrated in some pathological situations (erectile dysfunction and diabetes mellitus)^{24,25}, however it has never been associated with euthanasia protocol.

It is supposed that, to have a production or depletion of connective tissue, elastic fibers or smooth muscle fibers in penile tissue, there should be more time (weeks or months) from the studied stimuli. For such a short-term influence of the studied treatment (as observed in the present study) on the elastic fibers, probably there was no turnover of this component. One hypothesis to explain this observed difference is that the used anesthetic agent could promote different muscle relaxation and/or fluid distribution among the tissues. The higher smooth muscle relaxation promoted by isoflurane could lead to augmented smooth muscle Sv and sinusoidal space Sv (by non-significant levels), reducing the proportional connective tissue Sv (also by a non-significant level). As elastic fibers are part of the connective tissue, this component proportional area was also reduced (what was statistically confirmed).

The present study has some limitations that must be considered. Different methods of euthanasia (rather than the studied ones here) are used, and the information of the present study is limited to only two methods. Further, other parameters (both morphological and physiological) that were not analyzed could be affected by the euthanasia method used.

Future studies should be carried out to add knowledge about possible changes in the corpus cavernosum under the effect of anesthetic agents used for euthanasia, thus offering more information on the standardization of the model to be used and the protocol to be adopted.

Conclusion

The agent used to perform euthanasia in rats interferes on the Sv of elastic fibers. Although the other parameters have not been changed, the importance of standardizing the euthanasia method in experiments whose histology of the corpus cavernosum will be analyzed should be highlighted.

Author's contribution

Conception and design of the study: Procópio IM, Pereira-Sampaio MA, Costa WS, Sampaio FJB and Souza DB; **Acquisition and interpretation of data:** Procópio IM, Pereira-Sampaio MA and Costa WS; **Interpretation of data:** Sampaio FJB and Souza DB; **Manuscript preparation:** Pereira-Sampaio MA, Costa WS, Sampaio FJB and Souza DB; **Final approval of the version to be published:** Procópio IM, Pereira-Sampaio MA, Costa WS, Sampaio FJB and Souza DB.

Data availability statement

Data will be available upon request.

Funding

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

[<https://doi.org/10.13039/501100004586>]

Grant no. xxx

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

[<https://doi.org/10.13039/501100002322>]

Grant no. xxx

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

[<https://doi.org/10.13039/501100003593>]

Grant no. xxx

Acknowledgments

Not applicable.

References

- Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit.* 2000;6:171-80.
- Shomer NH, Allen-Worthington KH, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, Valentine H, Williams AM, Wilkinson M. Review of rodent euthanasia methods. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59:242-53. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000084>
- Pierozan P, Jerneren F, Ransome Y, Karlsson O. The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017;121:113-8. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12774>
- Valentim AM, Guedes SR, Pereira AM, Antunes LM. Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents. *Lab Anim.* 2016;50:241-53. <https://doi.org/10.1177/0023677215618618>

5. Mohamed AS, Hosney M, Bassiony H, Hassanein SS, Soliman AM, Fahmy SR, Gaafar K. Sodium pentobarbital dosages for exsanguination affect biochemical, molecular and histological measurements in rats. *Sci Rep.* 2020;10:378. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57252-7>
6. Prando S, Carneiro CG, Otsuki DA, Sapienza MT. Effects of ketamine/xylazine and isoflurane on rat brain glucose metabolism measured by (18) F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Eur J Neurosci.* 2019;49:51-61. <https://doi.org/10.1111/ejn.14252>
7. Das G, Vernunft A, Gors S, Kanitz E, Weitzel JM, Brüssow KP, Metzges CC. Effects of general anesthesia with ketamine in combination with the neuroleptic sedatives xylazine or azaperone on plasma metabolites and hormones in pigs. *J Anim Sci.* 2016;94:3229-39. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0365>
8. Saha JK, Xia J, Grandin JM, Engle SK, Jakubowski JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230:777-84. <https://doi.org/10.1177/153537020523001012>
9. Brooks SP, Lampi BJ, Bihun CG. The influence of euthanasia methods on rat liver metabolism. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1999;38:19-24.
10. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996;20:15-27. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0004>
11. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl.* 2012;33:735-9. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014225>
12. Traslavina RP, King EJ, Loar AS, Riedel ER, Garvey MS, Ricart-Arbona R, Wolf FR, Couto SS. Euthanasia by CO₂ inhalation affects potassium levels in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49:316-22.
13. Boivin GP, Bottomley MA, Schiml PA, Goss L, Grobe N. Physiologic, behavioral, and histologic responses to various euthanasia methods in C57BL/6NTac male mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017;56:69-78.
14. Slott VL, Linder RE, Dyer CJ. Method of euthanasia does not affect sperm motility in the laboratory rat. *Reprod Toxicol.* 1994;8:371-4. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90053-1)
15. Overmyer KA, Thonusin C, Qi NR, Burant CF, Evans CR. Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. *PLoS One.* 2015;10:e0117232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117232>
16. Chizh BA. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol.* 2007;21:259-71. <https://doi.org/10.1177/0269881105062484>
17. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg.* 2003;97:1108-16. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000081061.12235.55>
18. Murrell JC, Hellebrekers LJ. Medetomidine and dexmedetomidine: a review of cardiovascular effects and antinociceptive properties in the dog. *Vet Anaesth Analg.* 2005;32:117-27. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2005.00233.x>
19. Traish AM, Kim NN, Goldstein I, Moreland RB. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J Androl.* 1999;20:671-82.
20. Hemmings HC, Jr., Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA, Harrison NL. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26:503-10. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.08.006>
21. Baneux PJ, Garner D, McIntyre HB, Holshuh HJ. Euthanasia of rabbits by intravenous administration of ketamine. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:1038-9.
22. Koehn D, Meyer KJ, Syed NA, Anderson MG. Ketamine/xylazine-induced corneal damage in mice. *PLoS One.* 2015;10:e0132804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132804>
23. Da Silva MHA, Costa WS, Sampaio FJB, De Souza DB. The corpus cavernosum after treatment with dutasteride or finasteride: a histomorphometric study in a benign prostatic hyperplasia rodent model. *Asian J Androl.* 2018;20:505-10. https://doi.org/10.4103/aja.aja_28_18
24. Costa WS, Carrerete FB, Horta WG, Sampaio FJ. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU Int.* 2006;97:567-9. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05917.x>
25. Mostafa ME, Senbel AM, Mostafa T. Effect of chronic low-dose tadalafil on penile cavernous tissues in diabetic rats. *Urology.* 2013;81:1253-9. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.12.068>