



**MUSCULATURA LISA DE BRONQUÍOLOS DE *Sus scrofa domesticus* UM MÉTODO ALTERNATIVO AO ESTUDO DE ROEDORES EM ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS: OPINION PAPER**

**Kamilla Bezerra Cabral<sup>1</sup>, Luís Pereira-de-Morais<sup>2</sup>, Isaac Moura Araújo<sup>3</sup>,  
Marília Cavalcante Araújo<sup>4</sup>, Carla Mikevelly de Sena Bastos<sup>5</sup>, Andressa de  
Alencar Silva<sup>6</sup>, Roseli Barbosa<sup>7</sup>**

**Resumo:** A busca por modelos experimentais é antiga e sua utilização agrega desenvolvimento científico e tecnológico na sociedade. O uso de espécies com fisiologia, ou mesmo bioquímica, semelhante ao homem consiste em uma busca relevante no meio científico. Neste contexto, a espécie *Sus scrofa domesticus*, apesar de sua semelhança com os seres humanos é pouco empregada nos ensaios farmacofisiológicos nas universidades. Buscando adotar o princípio dos 3 Rs sugerido pelos comitês de ética e uso de animais de laboratório, o grupo de pesquisa Fisiofarmacologia das células excitáveis da Universidade Regional Cariri implementou a utilização de bronquíolo de suínos em experimentos com a técnica de banho de órgão em substituição do uso de traqueia de roedores (*Ratus norvegicus*). O presente trabalho consiste em um relato de experiência da adoção de um modelo alternativo, bronquíolo suíno em pesquisa com produtos naturais. Os artigos publicados avaliaram o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs), atualmente descrita como *L. origanoides*, e o fenilpropanóide metil-eugenol (ME). Em ambos os estudos verificou-se um efeito relaxante dos bronquíolos suínos em presença dos diferentes agonistas contráteis (KCl 60 mM e ACh 10 µM) sendo os valores de EC<sub>50</sub> para o OELs e ME de: 450.49 ± 5.73 µg/mL e 25.50±14.93 µM em presença das contrações evocadas por KCl. O resultado diferiu ao avaliar o efeito OELs e ME em presença das contrações evocadas por ACh, para a qual obteve-se 30% de relaxamento para os bronquíolos expostos ao OELs e 100% de relaxamento quando os mesmos foram expostos ao ME que obteve valor de EC<sub>50</sub> de 25.50±14.93 µM. Os dados obtidos nos dois artigos demonstram a eficácia do modelo para avaliação do efeito antiespasmódico de produtos naturais e ressaltam a importância pela adoção de métodos alternativos que busquem a minimização do uso de animais de laboratório.

**Palavras-chave:** Método Alternativo. Bronquíolos. Suínos

## 1. Introdução

Existem relatos de que desde o século V a.C. o homem utiliza animais em experimentos científicos. Alcmaeon (500 a.C.), Hipócrates (460 a.C.) e Aristóteles (384-322 a.C.), são exemplos de grandes filósofos que contribuíram para o entendimento da humanidade com estudos realizados a partir da prática da vivisseção (BAEDER, 2012).

Dentre esses animais, o porco doméstico (*Sus scrofa domesticus*) teve sua anatomia, fisiologia e fisiopatologia estudadas e comparadas ao homem (Bustard e McClellan, 1965). Nesse estudo, os autores encontraram semelhanças entre suínos e seres humanos, em relação a dentição, morfologia

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



e fisiologia renal, da pele, cardiovascular, digestiva, imunológica e estrutura do olho.

Apesar dessas semelhanças, o uso de suínos nas pesquisas era pouco comum, pois a sua criação e manutenção geravam muito custo para as instituições de pesquisa, foi quando na Universidade de Minnessota em 1949 iniciou-se um projeto voltado para o desenvolvimento de porcos em miniatura (Minipigs) a serem utilizados para a pesquisa (ENGLAND et al. 1954).

Os Minipigs possuem semelhanças fisiológicas com os humanos e constituem um modelo bem estabelecido nas áreas de farmacologia e toxicologia (BODE et al, 2010). No Brasil a linhagem Minipig BR-1 é a única disponível atualmente para pesquisas (STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, 2014).

Apesar dessa linhagem de porcos ter diminuído o custo de produção e manutenção desses animais. Algumas universidades e instituições de pesquisa possuem restrições em criar, reproduzir e manter os minipigs.

## 2. Objetivo

Relatar a experiência de um grupo de pesquisa da Universidade Regional do Cariri na implementação de métodos alternativos ao uso de animais, trabalhando com carcaças de animais de abatedouros.

## 3. Metodologia

O grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis – LFCE, da Universidade Regional do Cariri - URCA visando a substituição de roedores, em seus experimentos, de contração e relaxamento da musculatura lisa, substituiu bronquíolos de roedores por bronquíolos de suínos, a partir de carcaças (*ex vivo*) de fragmentos de bronquíolos do lobo inferior do pulmão direito de suínos abatidos no Frigorífico Industrial do Cariri.

Foram adotadas as normas de biossegurança antes de entrar na sala da coleta, e seguido à risca uma série de procedimentos para garantir que não haja contaminação do ambiente e do material biológico. Ademais, por se tratar de produtos que servirá para alimentação humana, todos os animais e suas vísceras foram inspecionadas por médicos veterinários para verificação e constatação de sua sanidade.

Após o abate do suíno, as vísceras foram separadas e levadas a uma sala para preparação, onde foram realizadas as coletas. O órgão utilizado pelo grupo foram os bronquíolos, contudo, alguns critérios de exclusão foram adotados, pois, foi visto que características como tromboembolismo por broncoaspiração de sangue, abundância de secreções do epitélio brônquico, evidências de inflamação e presença de nódulos, cistos e tumoração no referido órgão, inviabilizavam a coleta, visto que são condições patológicas que podem interferir diretamente no resultado das pesquisas.

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



Após a coleta os fragmentos de órgão foram colocados em Tyrode modificado (TM) e refrigerado, com a seguinte composição em mM: NaCl, 136; KCl, 5.0; MgCl<sub>2</sub>, 0.98; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.36; NaHCO<sub>3</sub>, 11.9; CaCl<sub>2</sub>, 2.0 e glicose, 5.5 e pH= 7.4.

A solução fisiológica TM é utilizada em muitas preparações para protocolos com musculatura lisa do sistema respiratório de roedores em banho de órgão, isentando a utilização de Mistura Carbogênica (O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%), pois segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, ao elevar o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) promove o tamponamento da solução fisiológica (PEREIRA-DE-MORAIS, 2019), sendo assim ela também se mostrou eficaz para o transporte do material biológico coletado do Frigorífico até o laboratório e seu armazenamento em freezer (-8 °C), sendo essa temperatura necessária para reduzir o metabolismo celular, ajudando na conservação da viabilidade do tecido.

No laboratório os materiais biológicos foram manipulados em TM, onde foram retirados os tecidos adjacentes sendo conseguinte armazenados em freezer (12 a 24 horas) para posterior realização do protocolo. Observou-se que decorrido esse período se obteve a melhor resposta do tecido aos agentes contracturante e, quando o protocolo era realizado pouco tempo após a coleta não era observado uma resposta satisfatória. Isto pode estar relacionado com o processo que desencadeia o *rigor mortis*. Segundo Cristian (2019) este processo tem início no musculo liso em aproximadamente 2 horas após a morte, e está diretamente relacionado com a sinalização de cálcio para promover a contração muscular. Esse curto período para dar início a rigidez cadavérica coincide com o tempo levado do frigorifico ao laboratório, enfatizando a necessidade de deixar um tempo superior a 12 horas para que as fibras desfaçam essa contração relacionada a morte do animal e estejam prontas para iniciar os experimentos.

Após as 12h os fragmentos de bronquíolo foram transferidos a uma placa de petri, seccionados em anéis de 3 a 5 mm de comprimento, suspensos horizontalmente por duas hastes de aço inoxidável, sendo um fixo no equipamento e o outro móvel ligado ao transdutor de força, e montados em banho de órgãos isolados com capacidade para 10 mL de TM com aeração contínua, regulação de temperatura a 37 °C e pH 7.4 (DE ALENCAR SILVA, 2020).

Após os preparos os anéis foram submetidos a uma tensão 1.5 gf, e a estabilização foi mantida por um período de 1 h com renovação do TM a cada 15 min, tempo necessário para o tecido se adaptar as novas condições.

As respostas musculares mecânicas (contração e relaxamento) são transformadas em sinal elétrico pelo transdutor que está conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, EUA) e este a uma placa conversora analógica-digital (DATAQ DI-200) ligado a um computador, os dados coletados pelo WINDAQ (DATAQ Instruments, Inc. USA) foram armazenados para análise posterior.

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



### 4. Resultados

Após a implantação da técnica já foram realizados e publicados 2 estudos analisando produtos naturais sobre a musculatura lisa de brônquios isolados de suínos. Pereira-de-Morais et al., (2020) observaram o efeito broncodilatador do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs), sendo realizadas as curvas de concentração dose-resposta tanto para contrações induzidas por KCl (acoplamento eletromecânico) quanto para Acetilcolina (ACh) (acoplamento farmacomecânico), obtendo a EC<sub>50</sub> de 450.49 ± 5.73 µg/mL para o acoplamento eletromecânico, no entanto, para o acoplamento farmacomecânico o OELs relaxou apenas 30 % da contração. Souza et al., (2021) demonstraram que o metil-eugenol também promoveu efeito broncodilatador em ambos os acoplamentos (KCl e ACh), com valores de EC<sub>50</sub> e 25.50±14.93 µM e 12.79 ±9.57 µM respectivamente, mostrando que sua substância possui uma alta potência farmacológica no relaxamento da musculatura lisa brônquica.

A utilização de tecidos provenientes de suínos de abate corrobora com a tendência mundial de reduzir e substituir o uso de animais de laboratório (KIRK, 2018). Foi observado que durante a coleta e realização dos experimentos existem vantagens em trabalhar com o tecido proveniente de abatedouro, contudo, como foi observado anteriormente essa técnica possui algumas peculiaridades importantes a serem discutidas.

### 5. Conclusão

A importância da consciência do uso animal para fins científicos tem sido visto constantemente pelos comitês de pesquisas com animais, normatizados e regidos pela lei 11.794 (Arouca). Existe, portanto um estímulo para adoção de métodos alternativos ao uso desses animais, que se utilize do princípio dos 3 Rs *Replacement*, *Reduction* e *Refine*. Neste aspecto, a utilização de brônquios de suínos, destinados ao consumo humano, propõe um avanço nas pesquisas experimentais que envolvem avaliação de aspectos fisiológicos respiratórios. A técnica já fora validada com elegibilidade metodológica em artigos anteriores que avaliam o uso de produtos naturais em brônquio de suínos. Os trabalhos desenvolvidos fortalecem a perspectiva de continuidade de uma linha experimental com material biológico alternativo, os mesmos demonstram a relevância de se optar por meios alternativos ao uso de animais de laboratório e evidenciam a segurança na realização de experimentos fisiológicos como os que envolvem o sistema respiratório.

### 6. Referências

BAEDER, Fernando M. et al. Percepção histórica da bioética na pesquisa com animais: possibilidades. *Bioethikos*, v. 6, n. 3, p. 313-20, 2012.

# VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

## Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



BODE, Gerd et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 62, n. 3, p. 196-220, 2010.

BUSTAD, L. K.; MCCLELLAN, R. O. Use of pigs in biomedical research. *Nature*, v. 208, n. 5010, p. 531-535, 1965.

CRISTIAN, Ortigoza Guerrero José. Mecanismos moleculares implicados en rigidez cadavérica (rigor mortis), 2019.

DE SOUZA, Mikael A. et al. Toxicity of methyl eugenol against *Drosophila melanogaster* and its myorelaxant activity in bronchioles isolated from *Sus scrofa domesticus*. *Biologia*, v. 76, n. 4, p. 1275-1283, 2021.

ENGLAND, David C.; WINTERS, Laurence M.; CARPENTER, Lawrence E. The development of a breed of miniature swine; a preliminary report. *Growth*, v. 18, n. 4, p. 207-214, 1954.

KIRK, Robert GW. Recovering the principles of humane experimental technique: the 3Rs and the human essence of animal research. *Science, Technology, & Human Values*, v. 43, n. 4, p. 622-648, 2018.

PEREIRA-DE-MORAIS, L.; Silva, A. A.; Silva, R. E. R.; Bastos, C. M. S.; Araújo, I. M.; Costa, R. H. S.; Cunha, F. A. B.; Leal-Cardoso, J. H. & Barbosa, R. Bronchodilator Activity of the essential oil from *Lippia sidoides* in bronchial isolated from swine *Sus scrofa domesticus*. *ANAIS da Academia Cearense de Ciências*, v. 4, n. 1, p.33-40, 2020.

STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, Roberta Targa et al. Brazilian minipig as a large-animal model for basic research and stem cell-based tissue engineering. Characterization and in vitro differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Applied Oral Science*, v. 22, n. 3, p. 218-227, 2014.

DE ALENCAR SILVA, Andressa et al. Pharmacological screening of the phenolic compound caffeic acid using rat aorta, uterus and ileum smooth muscle. *Chemico-Biological Interactions*, v. 332, p. 109269, 2020.

PEREIRA-DE-MORAIS, Luís et al. Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. *Chemico-biological interactions*, v. 297, p. 155-159, 2019.