

## CAPÍTULO 5

# A PESQUISA EXPERIMENTAL E SUA ADESÃO AOS MÉTODOS ALTERNATIVOS COM O USO DE BRONQUÍOLOS SUÍNOS PROVENIENTES DE ABATEDOURO: RELATO DE EXPERIÊNCIA

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.814112402105>

*Data de submissão: 04/11/2024*

*Data de aceite: 06/11/2024*

### **Luís Pereira-de-Morais**

Universidade Regional do Cariri (URCA),  
Crato - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3425970032144286>

### **Andressa de Alencar Silva**

Universidade Regional do Cariri (URCA),  
Crato - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3144511152006306>

### **Renata Evaristo Rodrigues Duarte**

Universidade de Pernambuco (UPE),  
Ouricuri – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/9143816484570239>

### **Lindaiane Bezerra Rodrigues Dantas**

Universidade de Pernambuco (UPE),  
Serra Talhada – Pernambuco  
<http://lattes.cnpq.br/0395579865939862>

### **Marília Cavalcante Araújo**

Universidade Estadual do Ceará (UECE),  
Fortaleza - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/8813903233446787>

### **Romário Pinheiro Lustosa**

Universidade Estadual do Ceará (UECE),  
Fortaleza - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/2904584957218745>

### **Jane Lane de Oliveira Sandes**

Universidade Estadual do Ceará (UECE),  
Fortaleza - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/5709463385360128>

### **Bianca de Sousa Barbosa Ferreira**

Universidade Estadual do Ceará (UECE),  
Fortaleza - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/4062300174772931>

### **Raimundo Luiz Silva Pereira**

Universidade Regional do Cariri (URCA),  
Crato - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/3243461705511408>

### **Edvanildo De Sousa Silva**

Universidade Estadual do Ceará (UECE),  
Fortaleza - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/1160257257811776>

### **Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins**

Universidade Regional do Cariri (URCA),  
Crato - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/1256452602214240>

### **Isaac Moura Araújo**

Universidade Regional do Cariri (URCA),  
Crato - Ceará  
<http://lattes.cnpq.br/4804278307317640>

**RESUMO:** O uso de animais vertebrados na pesquisa médica é uma prática que persiste até os dias atuais, buscando desenvolver técnicas benéficas para a saúde humana. Dentre esses animais, o porco doméstico (*Sus scrofa domesticus*) é destacado por sua semelhança fisiológica com o ser humano, em aspectos como dentição, sistema cardiovascular e estrutura renal. Contudo, devido aos altos custos de manutenção, o uso de suínos em pesquisas foi inicialmente limitado, levando ao desenvolvimento de minipigs para facilitar estudos nas áreas de farmacologia e toxicologia. No contexto da Universidade Regional do Cariri (URCA), visando a redução de eutanásias experimentais e seguindo os princípios dos 3Rs (*Reduction, Replacement, Refinement*), o Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis (LFCE) realiza experimentos com bronquíolos de suínos obtidos de abatedouros locais. Fragmentos do pulmão são cuidadosamente coletados e transportados em solução fisiológica para evitar contaminações e preservar a viabilidade do tecido. Após um período de armazenamento, as amostras são preparadas para testes de contração e relaxamento muscular, registrando as respostas mecânicas via transdutor. Esse método demonstrou ser eficaz e já resultou em estudos sobre o efeito broncodilatador de substâncias como óleo essencial de *Lippia sidoides* e metil-eugenol, com potencial aplicação farmacológica. A técnica contribui para a tendência mundial de reduzir o uso de animais em laboratório, aproveitando tecidos provenientes de abatedouros para pesquisas científicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bronquíolos, Porco doméstico, Pesquisa científica

## EXPERIMENTAL RESEARCH AND ITS ADHERENCE TO ALTERNATIVE METHODS WITH THE USE OF PORCINE BRONCHIOLES FROM SLAUGHTERHOUSES: EXPERIENCE REPORT

**ABSTRACT:** The use of vertebrate animals in medical research remains a common practice today, aimed at developing techniques beneficial to human health. Among these animals, the domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) stands out due to its physiological similarities to humans in aspects such as dentition, cardiovascular system, and renal structure. However, due to high maintenance costs, the use of pigs in research was initially limited, leading to the development of minipigs to facilitate studies in pharmacology and toxicology. At the Regional University of Cariri (URCA), aiming to reduce experimental euthanasia and following the 3Rs principles (Reduction, Replacement, Refinement), the Laboratory of Physiology and Pharmacology of Excitable Cells (LFCE) conducts experiments with pig bronchioles obtained from local slaughterhouses. Lung fragments are carefully collected and transported in physiological solution to avoid contamination and preserve tissue viability. After a storage period, samples are prepared for muscle contraction and relaxation tests, recording mechanical responses via transducer. This method has proven effective and has led to studies on the bronchodilator effects of substances like *Lippia sidoides* essential oil and methyl eugenol, with potential pharmacological applications. The technique contributes to the global trend of reducing the use of laboratory animals by utilizing tissues from slaughterhouses for scientific research.

**KEYWORDS:** Bronchioles, Domestic pig, Scientific research

## INTRODUÇÃO

O uso de animais, vertebrados, esteve presente desde o início da medicina experimental até os dias atuais, que continuam sendo utilizadas como objeto de pesquisa para o desenvolvimento de métodos e técnicas que beneficiem o homem (MARIANO 2003).

Dentre esses animais, o porco doméstico (*Sus scrofa domesticus*) teve sua anatomia, fisiologia e fisiopatologia estudadas e comparadas ao homem. No ano de 1965 pesquisadores encontraram semelhanças entre suínos e seres humanos, quanto a dentição, morfologia e fisiologia renal, da pele, cardiovascular, digestiva, imunológica e estrutura do olho. (Bustard e McClellan, 1965)

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

Os minis porcos ou *Minipigs* possuem semelhanças fisiológicas com os humanos e constituem de um modelo bem estabelecido nas áreas de farmacologia e toxicologia (BODE et al, 2010). No Brasil o *Minipig* BR-1 é a única linhagem de porco miniatura desenvolvida para pesquisa (STRAMANDINOLI-ZANICOTTI, 2014).

Apesar do desenvolvimento desses porcos em miniatura, o que barateou o custo de produção e manutenção desses animais, algumas universidades não possuem condições de reproduzir e os acondicionar.

## RELATO DE EXPERIÊNCIA

Pensando nisso, o grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis-LFCE da Universidade Regional do Cariri-URCA situada na cidade de Crato-CE, na macrorregião do Cariri, visando a substituição de animais de laboratório, seguindo os princípios dos 3Rs, *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (substituição), pelo grupo *The Universities Federation for Animal Welfare – UFAW's*, buscaram utilizar bronquíolos de porcos em seus experimentos, de contração e relaxamento da musculatura lisa, no intuito de reduzir as eutanásias de animais apenas para fins experimentais.

Para que houvesse os experimentos foram realizadas coletas de fragmentos de bronquíolos do lobo inferior do pulmão direito de suínos abatidos no Frigorífico Industrial do Cariri.

Para tanto, foram adotadas todas 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 animal, as vísceras foram separadas e levadas a uma sala para preparação, onde os pesquisadores realizaram a coleta. A parte usada pelo grupo foram os brônquios, para tanto, 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, interferem diretamente na viabilidade do tecido.

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, sendo assim ela também se mostrou eficaz para o transporte do material biológico coletado ao laboratório e seu armazenamento em freezer (-8 °C), sendo essa temperatura necessária para reduzir o metabolismo celular, ajudando na conservação da viabilidade do tecido, em seguida é transportado em caixa térmica para o laboratório.

No laboratório os materiais biológicos foram manipulados em TM, onde foram limpos para retirada de tecidos adjacentes e armazenados em freezer para realização do protocolo após 12 a 24 horas de armazenamento, pois foi observado que dentro desse período se obteve a melhor resposta do tecido aos agentes contraturante e, quando o protocolo era realizado pouco tempo após a coleta não era observado uma resposta satisfatória. Isto pode estar relacionado com o processo de *rigor mortis*, pois segundo Cristian (2019), este processo tem início no musculo liso em aproximadamente 2 horas após a morte, o *rigor mortis* 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 frigorífico 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 esse período os fragmentos de brônquiólo foram transferidos a uma placa de petri e em seguida 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.

Após os preparos os anéis foram submetidos a uma tensão 1.5 gf, e a estabilização foi mantida por um período de 1h 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.

Após a implantação da técnica já foram realizados e publicados 2 estudos analisando produtos naturais sobre a musculatura lisa de bronquíolos 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  $EC_{50}$  de  $450.49 \pm 5.73 \mu\text{g/mL}$  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  $EC_{50}$  e  $25.50 \pm 14.93 \mu\text{M}$  e  $12.79 \pm 9.57 \mu\text{M}$  respectivamente, mostrando que sua substância possui uma alta potência farmacológica no relaxamento da musculatura lisa brônquica.

## CONCLUSÃO

A utilização de tecidos provenientes de porcos de abate vai de encontro 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 que existem vantagens de se trabalhar com o tecido proveniente de tecidos advindos do abatedouro, contudo, essa técnica possui algumas especificidades importantes.

## REFERENCIAS

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 domestica*. **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.

MARIANO, Mario. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 387-391, 2003.

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.