

IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO PARA SUBSTITUIÇÃO DO USO DE ANIMAIS EM ESTUDOS COM MÚSCULO LISO

(Implementation of an alternative method for replacing the use of animals in studies with smooth muscle)

Débora de Menezes DANTAS¹; Cicero Pedro da SILVA-JÚNIOR²;
Roseli BARBOSA¹; Luís PEREIRA-DE-MORAIS^{3*}

¹Universidade Regional do Cariri (URCA), Lab. de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis, Campus Pimenta, Crato-Ce. CEP: 63.105-010; ²Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM - URCA); ³Rede Nordeste de Biotecnologia (UECE).

*E-mail: luispereira256@gmail.com

RESUMO

A grande maioria dos estudos que envolvem a investigação da ação de substâncias de origem natural terapeuticamente promissora associadas às fisiopatologias que acometem a musculatura lisa, utiliza-se de modelos de músculo liso isolados de animais de laboratórios, onde dependem unicamente desse método para o desenvolvimento de pesquisas. Na região do Cariri encontram-se inúmeras instituições de ensino que ainda dependem de animais para pesquisa, em especial a Universidade Regional do Cariri-URCA conta com programas de pós-graduação onde algumas linhas de pesquisa dependem unicamente desse método. Os aspectos éticos da utilização de animais em experimentos estimulam a adoção de métodos alternativos sempre que possível. O presente trabalho é um relato de experiência que pretende demonstrar como se encontra a situação da pesquisa científica frente aos métodos alternativos que estão sendo implementados no Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis da URCA, para substituição ao uso de animais laboratoriais, obedecendo assim, a regra dos 3Rs. São utilizados cordões umbilicais, obtidos de partos normais no bloco de obstetrícia do Hospital e Maternidade São Francisco de Assis, e órgãos suínos providos de animais abatidos para consumo de carne, obtidos do abatedouro Frigorífico Industrial do Cariri. Os experimentos estão sendo desenvolvidos com a técnica de banho de órgãos, verificando o efeito miorrelaxante de produtos naturais. Pesquisas como monografias, dissertações e teses estão sendo desenvolvidas. Os vasos umbilicais e bronquíolos de suínos estão substituindo respectivamente o uso de artéria aorta e traqueia de ratos. Com isso, vimos que é possível reduzir e substituir o número de animais eutanasiados com finalidade de pesquisa científica.

Palavras-chave: Métodos alternativos, músculo liso, banho de órgãos.

ABSTRACT

The great majority of the studies involving the investigation of the action of therapeutically promising natural substances associated to the pathophysiologicals that affect the smooth muscle, use of smooth muscle models isolated from laboratory animals, where they depend solely on this method for the development of researches. In the Cariri region there are numerous educational institutions that still depend on animals for research, in particular the Regional University of Cariri-URCA has postgraduate programs where some lines of research depend solely on this method. The ethical aspects of using animals in experiments

encourage the adoption of alternative methods whenever possible. The present work is an experience report that intends to demonstrate how the situation of the scientific research is faced with the alternative methods being implemented in the Laboratory of Physiopharmacology of Excitable Cells of URCA, to replace the use of laboratory animals, obeying the 3Rs rule. Umbilical cords, obtained from normal deliveries in the obstetric block of the São Francisco de Assis Hospital and Maternity Unit, and swine organs provided with animals slaughtered for meat consumption, obtained from the slaughterhouse Frigorífico Industrial do Cariri, are used. The experiments are being developed with the organ bath technique, verifying the myorelaxant effect of natural products. Researches such as monographs, dissertations and theses are being developed. The umbilical vessels and bronchioles of pigs are respectively replacing the use of the aorta and trachea of rats. With this, we have seen that it is possible to reduce and replace the number of euthanized animals for scientific research purposes.

Key words: Alternative methods, smooth muscle, organ bath.

INTRODUÇÃO

A experimentação animal tem servido, ao longo de muitos anos, como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de diversas substâncias e produtos em inúmeras áreas (VICTAL *et al.*, 2015). Nesse sentido, a grande maioria dos estudos que envolvem a investigação da ação de substâncias de origem natural terapêuticamente promissora associadas às fisiopatologias que acometem a musculatura lisa, utiliza-se de modelos de músculo liso isolados de animais de laboratórios, onde dependem unicamente desse método para o desenvolvimento de pesquisas.

Entretanto, o uso disseminado desses seres vivos na pesquisa tem sido alvo de diversas discussões, principalmente de caráter ético, em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante os experimentos (WHITE, 2001). Por esse motivo, a reavaliação desse método nos experimentos é uma tendência mundial e cada vez mais vem se procurando por novas alternativas que substituam o uso de animais em instituições de ensino, tanto para aulas práticas como no âmbito da pesquisa científica.

Essas ações tiveram início a partir do surgimento do programa 3Rs, assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: redução (*Reduction*), refinamento (*Refinement*) e substituição (*Replacement*). Este programa foi iniciado pela federação das Universidades para o Bem-estar Animal (The Universities Federation for Animal Welfare – UFAW's), que de forma resumida significa reduzir o número de animais utilizados na pesquisa, refinar a metodologia de forma a diminuir a dor e desconforto sofrido por os mesmos, e buscar métodos alternativos que, por fim, substituam seu uso, sendo essa, a meta máxima a ser alcançada (RUSSEL e BURCH 1992; CAZARIN *et al.*, 2004).

O surgimento do princípio dos 3R's foi de extrema importância não somente para reavaliar a necessidade dos ensaios em animais, como também impulsionar pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas (MORALES, 2008).

No Brasil a Lei 11.794, conhecida como Lei Arouca aprovada em 2008, normatiza os procedimentos para o uso científico de animais, onde a partir da sua publicação foram criadas as comissões de ética para uso de animais (Ceua) em cada

instituição de pesquisa, assim como o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) que passou a ser responsável por todas as discussões relacionadas à criação e utilização de animais em laboratórios.

Dentre as inúmeras atribuições do Concea, a Lei Arouca traz em seu 5º artigo (3º parágrafo) a tarefa de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa. Destaca-se em seu artigo 14º (3º parágrafo) que as práticas de ensino deverão ser, sempre que possível, fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais. Ainda nesse artigo (8º parágrafo) proíbe-se a reutilização dos animais após obtenção do objetivo da pesquisa; recorrência a técnicas de sedação, analgesia ou anestesia adequadas à espécie animal quando os experimentos causarem dor ou angústia (parágrafo 5º e 6º), evidenciando dessa forma um grande avanço para a pesquisa brasileira, uma vez que se verifica na lei uma preocupação em obedecer aos princípios dos 3Rs experimentais (BRASIL, 2008).

Na região do Cariri encontram-se instituições de ensino que ainda dependem de animais para pesquisa, em especial a Universidade Regional do Cariri-URCA conta com programas de pós-graduação onde algumas linhas de pesquisa dependem unicamente desse método. Neste contexto, o Laboratório de Fisiofarmacologia das Células da URCA, vem ocorrendo à implementação do uso de artéria umbilical humana e de órgãos suínos providos de animais que foram abatidos para consumo de carne, com o propósito de substituir o uso de animais laboratoriais, obedecendo assim, a regra dos 3Rs.

Essa narrativa é um relato de experiência que pretende demonstrar como se encontra a situação da pesquisa científica frente aos métodos alternativos que estão sendo implementados nesse laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos da pesquisa respeitaram as recomendações propostas pelo Conselho Nacional de Saúde, por meio da resolução 466/12 (BRASIL, 2012), as quais apresentam diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa que envolve seres humanos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital e o Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Regional do Cariri-URCA com Número do Parecer: 1.962.667.

Para os experimentos utilizando tecido animal, foi seguido à resolução Normativa do Concea nº 30, de 02 de fevereiro de 2016, na qual, fica explícito que pesquisa utilizando cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo, fica isento de submissão na Comissão de Experimentação e Uso Animal (CEUA) para que sejam avaliados seus aspectos éticos.

Foi utilizado material biológico em pesquisas pré-clínicas, com ênfase em contração e relaxamento da musculatura lisa do sistema respiratório e circulatório. Para isso, foram utilizados vasos umbilicais, artéria coronária e brônquios de suínos.

Porções do cordão umbilical, de 10 a 12 cm, foram obtidos de partos normais no bloco de obstetrícia do Hospital e Maternidade São Francisco de Assis que está localizado no município de Crato-CE, os tecidos somente são coletados com o consentimento prévio das doadoras de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética do hospital e o Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Regional do Cariri-URCA.

Com relação aos órgãos suínos, estes foram obtidos do abatedouro Frigorífico Industrial do Cariri, localizado em Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil. Esses órgãos foram providos de animais abatidos para consumo de carne. Todos os animais, assim como sua carne e vísceras foram inspecionados por médicos veterinários antes e depois do abate, constatando a sanidade do animal.

Os cordões e vísceras de suínos foram colhidos e colocados em uma solução salina fisiológica, Tyrode modificado, foram utilizados um total de dezesseis fragmentos de cordões e de bronquíolos divididos em grupos de quatro para cada tipo de tecido, para realização das vias eletromecânica e farmacomecânica. Os experimentos estão sendo desenvolvidos com a técnica de banho de órgãos, verificando o efeito miorrelaxante de produtos naturais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas como projetos de iniciação científica, monografias, dissertações e teses estão sendo desenvolvidas com as novas linhas de métodos alternativos. Inicialmente foram padronizadas as técnicas, e os resultados desses estudos estão sendo bastante satisfatórios.

A exemplo de alguns estudos em desenvolvimento tem-se a investigação do efeito vasorelaxante de monoterpenos em artéria umbilical humana. O interesse na investigação de produtos naturais com propriedade relaxante relaciona-se ao fato de que essas substâncias miorrelaxante possuem uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, na Tab. 01 encontram-se citadas algumas substâncias com esse efeito em diversos órgãos de músculo liso. A maioria dos estudos para descoberta de novas substâncias com propriedade vasorelaxante ocorre em vasos de animais de laboratório (INGELFINGER, 2013). Nesse sentido, os vasos umbilicais e coronárias de suínos estão substituindo o uso de artéria aorta de ratos nos testes experimentais.

Tabela 01: Demonstrações de substâncias miorrelaxante em tecidos de pesquisas clássicas e tecidos alternativos.

Tecidos Clássicos	Agonista Contraturante	Efeito Miorrelaxante	Referências
Traqueia (rato)	Potássio e Acetilcolina	<i>Lippia alba</i>	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2018)
Artéria aorta (rato)	Potássio e Fenilefrina	<i>Lippia alba</i>	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2018)

Tecidos Alternativos	Agonista Contraturante	Efeito Miorrelaxante	Referências
Artéria umbilical	Potássio e Serotonina	Estrogênios	(MARQUES, 2008)
(humano)	Carbacol e Histamina	<i>Lippia dulcis</i>	(GÖRNEMANN <i>et al.</i> ,
Bronquíolo (porco)			2008)

Vale ressaltar que o cordão umbilical é um material biológico humano prontamente disponível, descartado após o parto, fonte abundante de tecido vascular humano e que possui baixo custo. Além disso, seu uso facilita ainda as pesquisas clínicas, uma vez que, o tecido utilizado é humano. Fernandes (2015) caracteriza o efeito vasodilatador de nitratos orgânicos em artéria e veia isoladas de cordão umbilical humano. Bariskaner *et al.* (2003), analisaram o efeito dos anestésicos bupivacaína e ropivacaína em tecido humano de artérias umbilicais isoladas, e concluiu que, embora a bupivacaína produzisse relaxamento, a ropivacaína produzia contração. Com isso, esses estudos consideram os vasos umbilicais bons modelos para avaliação de substâncias vasoativas.

O modelo para a avaliação das atividades miorrelaxantes do músculo liso das vias aéreas utilizado no laboratório dependia do uso de traqueia de ratos, por se tratar de uma técnica já conhecida, porém, esses estudos estão sendo substituídos por a utilização de bronquíolos extraídos de suínos que são abatidos para o consumo da carne. Uma das pesquisas em desenvolvimento envolve a avaliação de óleos essenciais de espécies vegetais nas alterações fisiológicas do órgão citado.

Corroborando com nosso trabalho, Görnemann *et al.* (2008), demonstraram que, o óleo essencial de *Lippia dulcis* relaxa a musculatura lisa de bronquíolos isolados de porcos. Em outro estudo, Shimokawa *et al.* (1988) observaram que, a prostaciclina relaxa a artéria coronária de suínos; neste estudo também pode ser constatado que, o uso de animais de abatedouros não é algo iniciado recentemente, contudo ainda é uma prática pouco executada nas instituições de pesquisa.

Os aspectos éticos da utilização de animais em experimentos estimulam a adoção de métodos alternativos sempre que possível e o uso desses seres vivos em situações de absoluta imprescindibilidade (BRASIL, 2008). Além da relevância em se adequar as questões éticas, a substituição por métodos alternativos ainda diminui os gastos gerados na criação e manutenção desses seres vivos em biotérios, o que vem a reduzir gastos para a universidade.

CONCLUSÕES

O uso de artéria umbilical humana apresenta-se como um excelente modelo para se avaliar substâncias vasoativas. Assim como os bronquíolos de suínos, para avaliação de substância com propriedades relaxantes na musculatura lisa do sistema respiratório. Percebemos que é possível reduzir e substituir o número de animais eutanasiados com finalidade de pesquisa científica.

REFERÊNCIA

BARISKANER, H.; TUNCER, S.; TANER, A.; DOGAN, N. Effects of bupivacaine and ropivacaine on the isolated human umbilical artery. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, v.12, n.4, p.261-265, 2003.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm

CARVALHO, P.M.M.; MACÊDO, C.A.; RIBEIRO, T.F.; SILVA, A.A.; DA SILVA, R.E.; DE MORAIS, L.P.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A.; BARBOSA, R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. *Biotechnology Reports*, v.17, p.31-34, 2018.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.3, p.0289-299, 2004.

DA SILVA, R.E.R.; DE MORAIS, L.P.; SILVA, A.A.; BASTOS, C.M.S.; PEREIRA-GONÇALVES, Á.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; BARBOSA, R. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.108, p.792-798, 2018.

FERNANDES, M.C.A. Caracterização Do Efeito Vasodilatador Dos Nitratos Orgânicos GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF Em Artéria E Veia Isoladas De Cordão Umbilical Humano. Porto Alegre: UFPB, 2015. 174p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

GÖRNEMANN, T.; NAYAL, R.; PERTZ, H.H.; MELZIG, M.F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *Journal of Ethnopharmacology*, v.117, n.1, p.166-169, 2008.

MARQUES, B.J.S. Estudo dos mecanismos implicados na vasorelaxação induzida pelos estrogénios na artéria umbilical humana. 2008. 82p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR); CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União [da] República Federativa do Brasil*, v.150, n.112, p.1-11, 2013.

MORALES, M.M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade. *Ciência e Cultura*, v.60, n.2, pp.33-36. 2008. ISSN 0009-6725.

INGELFINGER, J.R. Experimental models of hypertension and their relevance to human hypertension. *Pediatric Hypertension: Clinical hypertension and Vascular Diseases*, v.8, p.121-128, 2013.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), v.238, 1992.

SHIMOKAWA, H.; FLAVAHAN, N.A.; LORENZ, R.R.; VANHOUTTE, P.M. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *British Journal of Pharmacology*, v.95, n.4, p.1197-1203, 1988.

VICTAL, J.C.; VALÉRIO, L.B.; OSHIRO, M.C.; BAPTISTA, S.C.; PINHEIRO, F. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.7, n.2, p.37-57, 2015.

WHITE, W.J. The use of laboratory animals in toxicologic research. On: HAYES, A. W. *Principles and methods of toxicology*, v. 4, p. 773-818, 2001.