

# Efeito da aplicação repetida de *Cytinus hypocistis* em murganhos transgênicos (K14HPV16): avaliação de *humane endpoints*

Medeiros-Fonseca B. <sup>1,2\*</sup>, Segurado O. <sup>1,2\*</sup>, Costa D., Medeiros C., Medeiros R. <sup>3</sup> Pires, M.J. <sup>1,2</sup>, Bastos, M. <sup>4</sup>, Silva, A.R. <sup>5</sup>, Barros, L. <sup>5</sup>, Ferreira, I.C.F.R. <sup>5</sup>, Gil da Costa R. <sup>1,3</sup>, Oliveira P.A. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CITAB – CITAB - Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>3</sup>CI-IPOP – Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto, Porto, Portugal

<sup>4</sup>LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Meio Ambiente, Biotecnologia e Energia, Porto, Portugal.

<sup>5</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolonia, 5300-253 Bragança, Portugal.

\*ambos os autores contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.

FCT  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia

utad

CITAB  
Centro de Investigação e Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas

lepae

IPOPORTO

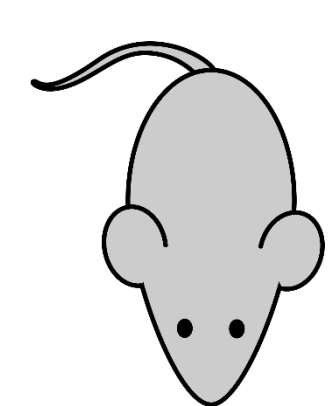
CIMO  
Centro de Investigação de Montanha

## INTRODUÇÃO

Em, 1959 Russel e Burch propuseram os 3Rs (*Reduce, Refine e Replacement*) em experimentação animal e desde então as diversas entidades envolvidas na temática têm feito esforços conjuntos para os aplicar (1). Nesse sentido foi gradualmente introduzida a avaliação e registo dos *humane endpoints* (HE) dos animais durante procedimentos experimentais, para monitorizar o seu sofrimento e tomar decisões sobre a necessidade, ou não, de finalizar o ensaio antes da data prevista (2). Contudo, apesar das exigências legais, observa-se grande escassez de publicações sobre a avaliação de HE nos procedimentos com animais de laboratório. Assim, é nosso objetivo com este trabalho apresentar os HE durante a aplicação diária de um creme com *Cytinus hypocistis* numa estirpe de murganhos transgênicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este ensaio experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (aprovação n.º 10/2013) e pela Direção de Veterinária Portuguesa (aprovação n.º 0421/000/000/2014), e realizado de acordo com a Diretiva Europeia 2010/63/EU. Os animais, transgênicos para o papiloma vírus, foram mantidos em biotério em condições controladas de luz (12h dia:12h noite), humidade relativa (45-65%), temperatura (20-24°C). No extrato de *Cytinus hypocistis* utilizado durante este trabalho foram identificados 17 compostos fenólicos, maioritariamente taninos hidrolisáveis (3). Para este ensaio experimental foram testadas três concentrações de *Cytinus hypocistis*: CH1- 3,1mg extrato g/ base creme; CH2-6,2mg extrato g/ base creme e CH3-12,4mg extrato g/ base creme. Estabeleceram-se seis grupos de murganhos constituídos cada um por cinco fêmeas com 33-37 semanas de idade.



GRUPO 1  
(G1)  
n=5  
K14HPV16, CH1

GRUPO 2  
(G2)  
n=5  
K14HPV16, CH2

GRUPO 3  
(G3)  
n=5  
K14HPV16, CH3

GRUPO 4  
(G4)  
n=5  
WILD-TYPE, CH3

GRUPO 5  
(G5)  
n=5  
K14HPV16, CONTROLO

GRUPO 6  
(G6)  
n=5  
WILD-TYPE, CONTROLO

O ensaio durou cinco semanas. Em todos os dias úteis fez-se aplicação tópica de creme com extrato de *Cytinus hypocistis* nas orelhas, e semanalmente foram registados: massa corporal individual, consumos de alimento e água e análise da tabela de HE. Na tabela de HE foram considerados como parâmetros a condição corporal; massa corporal; postura; aspeto do pele e *grooming*; cor das mucosas; aspeto dos olhos, aspeto das orelhas e bigodes; estado mental; comportamento; estado de hidratação; frequência respiratória e cardíaca; temperatura corporal; aspeto das fezes; convulsões e aparecimentos de tumores. A análise estatística foi realizada com o programa IBM SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 25 para Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois, EUA). Procedeu-se ao cálculo das médias e erros padrão da massa corporal, consumos de água e comida e dos HE. Para aferirmos as diferenças significativas entre grupos, em relação aos parâmetros anteriormente referidos, procedeu-se a uma análise estatística ANOVA seguida do teste de *Bonferroni*, e foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

No início do ensaio experimental, antes da aplicação do creme *Cytinus hypocistis*, analisaram-se os HE, bem como no final do ensaio (**Gráfico 1 e 2**). No entanto, nenhum dos animais atingiu a pontuação estabelecida pelo HE para ser eutanasiado. Comparamos os consumos médios de comida e água dos murganhos, e verificamos que no início do ensaio experimental os animais transgênicos (G1, G2, G3 e G5) são os que consomem mais comida e água (**Tabela 1**). No que diz respeito à média da massa corporal, todos os animais diminuíram a sua massa corporal desde o início do ensaio (**Tabela 2**). Nenhuma morte foi registada durante o ensaio experimental.

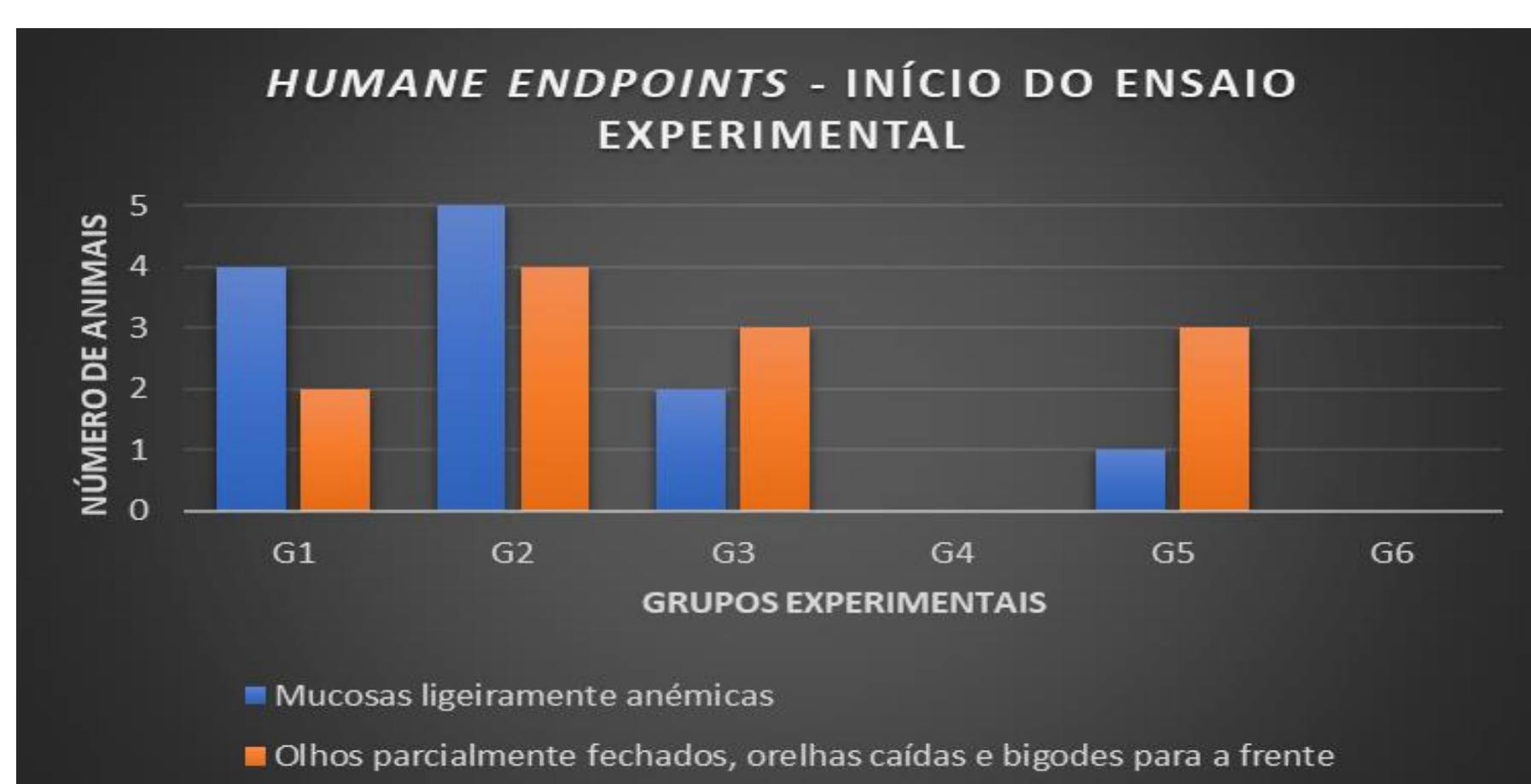


Gráfico 1. Humane Endpoints no início do ensaio experimental

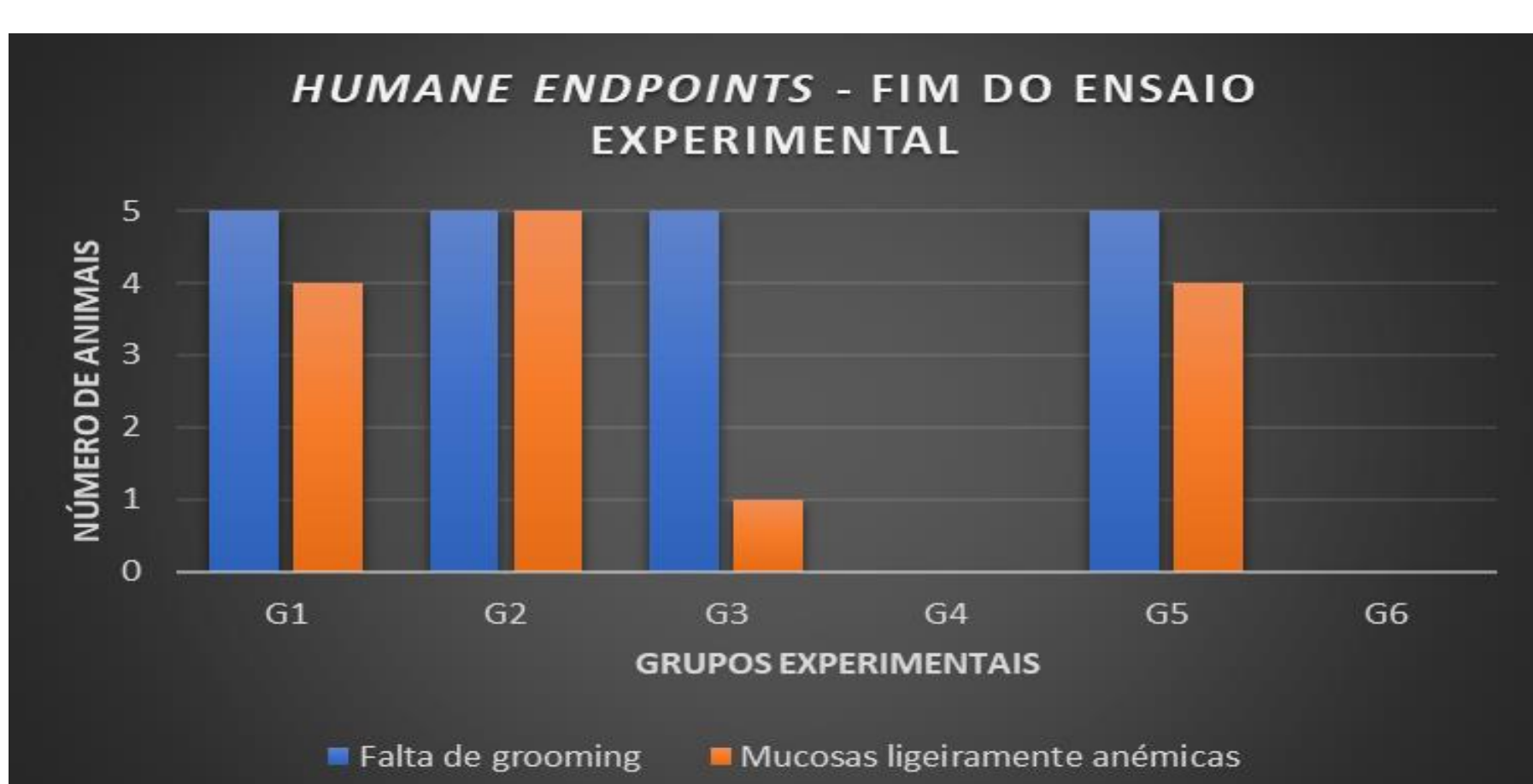


Gráfico 2. Humane Endpoints no fim do ensaio experimental

Tabela 1. Consumos médios de água e comida por grupo (grama)

Grupo (n=5)	Consumo de água (g)		Consumo de comida (g)	
	Semana 1	Semana 5	Semana 1	Semana 5
Grupo 1 HPV CH1	8,67	8,62	4,68	4,39
Grupo 2 HPV CH2	9,15	8,82	4,81	4,10
Grupo 3 HPV CH3	8,59	8,05	5,07	3,86
Grupo 4 Wild-type CH3	5,33	4,77	4,45	3,57
Grupo 5 HPV CTR	9,30	8,39	5,28	4,23
Grupo 6 Wild-type CTR	4,48	3,99	3,89	3,15

Tabela 2. Média da massa corporal (grama), e erro-padrão.

	Grupo 1 HPV CH1 (n=5)	Grupo 2 HPV CH2	Grupo 3 HPV CH3	Grupo 4 Wild-type CH3	Grupo 5 HPV CTR	Grupo 6 Wild-type CTR
Semana 0	29,17 ± 0,62	25,82 ± 0,47	26,60 ± 0,72	28,82 ± 1,78	26,45 ± 0,92	26,37 ± 1,11
Semana 5	27,30 ± 0,45	24,69 ± 0,66 <sup>c</sup>	24,20 ± 0,89 <sup>d</sup>	30,08 ± 1,69	25,54 ± 0,93 <sup>f</sup>	27,02 ± 0,75

## CONCLUSÃO

Os parâmetros de HE registados permitiram monitorizar o bem estar dos animais num ensaio com aplicação tópica de um creme com várias concentrações do extrato de *Cytinus hypocistis*. Nenhum animal apresentou alterações que justificasse o seu sacrifício antes do termo previsto para o ensaio, ou seja, a manipulação diária dos animais, com aplicação de um creme, não interfere no seu bem estar.

## REFERÊNCIAS

- (1) Russell W. M. S., Burch R. 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Methuen.
- (2) Richardson, C. 2021. Humane endpoints. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research.
- (3) Silva, A. R., Fernandes, Â., García, P. A., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. 2019. *Cytinus hypocistis* (L.) L. subsp. *macranthus* Wettst.: Nutritional Characterization. *Molecules*, 24(6), 1111.

## AGRADECIMENTOS

Financiamento nacional pela FCT, Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito da bolsa de doutoramento 2020.07675.BD de Beatriz Medeiros Fonseca.