

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E CLÍNICAS

CRISTINA ARAGÃO SILVA

IMPLEMENTAÇÃO DE BANCO DE EMBRIÕES MURINOS

SALVADOR
2006

CRISTINA ARAGÃO SILVA

IMPLEMENTAÇÃO DE BANCO DE EMBRIÕES MURINOS

Monografia apresentada ao curso de graduação em Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário

Orientador: Vitor Valério Mafilli

Salvador
Semestre I/2006


TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTINA ARAGÃO SILVA


IMPLEMENTAÇÃO DE BANCO DE EMBRIÕES MURINOS

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca
Examinadora:

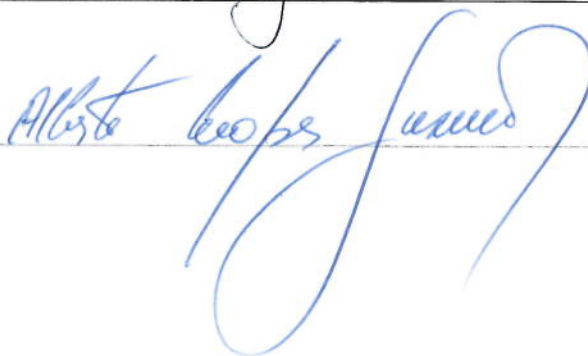
Vitor Valério Mafilli
Presidente da Banca



Fabienne Petitinga de Paiva
Membros da Banca



Alberto Lopes Gusmão
Membros da Banca



Apresentada em: 14 de Julho de 2006

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, exemplo de sabedoria, inteligência e fé para mim.

A evolução das espécies, cuja adaptação ao meio possibilitou a minha existência.

A minha mãe Leonora Aragão Silva, minha conselheira, amiga, contribuindo intensamente com a minha formação profissional e ética.

Ao meu pai Eugênio Antônio da Fonseca Silva, exemplo de Pai, Família, Lar, compreensão e respeito. Essa vitória é nossa!

A minha irmã Cristiani Aragão Silva e a turma de 2001.1, turma esta composta de amigos a quem estimo como irmãos.

Ao respeito à individualidade pessoal, ao carinho, companheirismo, amor e confiança proporcionado por Marcelo Anacleto Diniz, meu namorado.

A Vitor Valério Maffili não apenas pela competência em me orientar neste trabalho de conclusão de curso, como também pelo excelente conhecimento médico veterinário, exemplo de um profissional digno de exercer a profissão. Por conseguinte, a sua namorada Sheilla, que juntos são um casal de amigos aos quais destino uma grande admiração e respeito.

À Família FIOCRUZ: Drição, Josi, Marcinho, Simone, Wal e Fabienne. Em especial a Fabienne Petitinga de Paiva por também contribuir com seus conhecimentos científicos na confecção e revisão dessa monografia.

Ao biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, não só como excelente local para o desenvolvimento de pesquisas científicas, como também, por reunir profissionais

gabaritados para desempenhar suas tarefas, proporcionando um ambiente de trabalho exemplar pra o convívio mútuo.

Ao CNPq, Finep e a Fapesb pelas bolsas e pelo financiamento dos projetos de pesquisa dos quais participei.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, pesquisador do CPqGM, FIOCRUZ, Bahia, pela orientação

A minha ratinha Jurema Aragão Diniz, Juju, pela companhia durante as longas tardes de confecção deste trabalho.

Aos CDs dos Aviões do Forró, Saia Rodada e Forró Real por sonorizar as longas horas destinadas à escrita desta monografia.

A todos os meus amigos e amigas, que de alguma forma contribuíram com gestos, palavras, ações e, por simplesmente estarem presentes em minha vida.

“A vida vale a pena ser vivida intensamente. Afinal, o paraíso não foi perdido, nem fomos expulsos dele. Nós é que expulsamos o paraíso de nós próprios na medida em que perdemos a capacidade de sentir a vida em nós e à nossa volta e recusamos o presente que nos oferece todo dia esse mar, as florestas, o mundo.”

(Vilmar Berna)

RESUMO

A criação de protocolos operacionais para a padronização dos procedimentos atribuídos à implementação de um banco de embriões murinos são fundamentais para o seu pleno funcionamento. Os camundongos são considerados modelos para a experimentação animal devido a inúmeras características inerentes a esta espécie. Por outro lado, o desenvolvimento de forma exponencial de novas linhagens transgênicas tem demandado cada vez mais espaço nos biotérios. Ademais, o risco de contaminação genética e perda das linhagens são exemplificações de obstáculos encontrados na criação em biotérios não atribuíveis ao setor com a formação do banco. Sob esse contexto, o presente trabalho possui dois artigos científicos: **“Efeito da eutanásia por inalação de CO₂ ou deslocamento cervical sobre o número, qualidade, viabilidade e congelabilidade de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas”** e **“Utilização de diferentes doses de LH em programas de superovulação de fêmeas murinas”**. No primeiro trabalho pesquisou-se a forma como as fêmeas são sacrificadas interfere nos parâmetros estudados. Com base nos resultados encontrados recomenda-se o deslocamento cervical como método de eutanásia a ser utilizado na formação do banco. Já no segundo, procurou substituir o hormônio indutor da ovulação tradicionalmente utilizado pelo LH e sua influência nos parâmetros avaliados. O objetivo primário era o de minimizar a variância apresentada nos parâmetros avaliados. No entanto, concluiu-se que o LH não reduziu a variância porém recomenda-se a dose de 0,06mg em substituição a tradicional aplicação de 5UI da hCG.

Palavras Chaves: embriões, camundongo, CO₂, deslocamento cervical, hCG e LH

LISTA DE TABELAS

Introdução	01
Tabela 1. Agentes utilizados para eutanásia, sua classificação, seu modo de ação e as espécies animais que devem ser utilizados	06
Tabela 2. Percentual e respectiva forma de transporte do dióxido de carbono no sangue	08
Capítulo 01: Efeito da eutanásia por inalação de CO₂ ou deslocamento cervical sobre o número, qualidade, viabilidade e congelabilidade de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas	20
Tabela 1. Resposta das fêmeas submetidas ao tratamento superovulatório e sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO ₂	25
Tabela 2. Número, média e desvios-padrão (DP) de estruturas recuperadas de camundongas superovuladas e sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO ₂	25
Tabela 3. Número, média e desvios-padrão de estruturas recuperadas viáveis, degeneradas e ovócitos de fêmeas superovuladas, sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO ₂	26
Tabela 4. Porcentagem de desenvolvimento dos embriões obtidos de camundongas (<i>Mus musculus</i>), utilizando-se o método de deslocamento cervical ou por inalação de dióxido de carbono	26

CAPÍTULO 2: Utilização de diferentes doses de LH em programas de superovulação de fêmeas murinas	32
Tabela 1. Número de animais que responderam ao tratamento superovulatório e total de estruturas obtidas de camundongas tratadas com hCG e diferentes doses de LH	38
Tabela 2. Médias e respectivos desvios-padrão (DP) do número de estruturas recuperadas em função do número de camundongas superovuladas que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH	38
Tabela 3. Números, médias e respectivos desvios-padrão (DP) das estruturas recuperadas viáveis em função do número de camundongas superovuladas e que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH	40
Tabela 4. Números, médias e respectivos desvios-padrão (DP) das estruturas degeneradas recuperadas em função do número de camundongas superovuladas e que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH	41
Tabela 5. Porcentagem de desenvolvimento dos embriões obtidos de camundongas (<i>Mus musculus</i>), tratadas com hCG e diferentes doses de LH	41

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura	03
Figura 1. Principais eventos comportamentais e hormonais durante o ciclo estral murino.	11
Figura 2. Perfil de secreção hormonal dos hormônios LH, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de camundongas.	12
Capítulo 01: Efeito da eutanásia por inalação de CO₂ ou deslocamento cervical sobre o número, qualidade, viabilidade e congelabilidade de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas	20
Figura 1: Esquema ilustrando a forma como a palheta com o meio e os embriões são montadas	23
CAPÍTULO 2: Utilização de diferentes doses de LH em programas de superovulação de fêmeas murinas	32
Figura 1: Esquema ilustrando a forma como a palheta com o meio e os embriões são montadas	36
Figura 2. Número de embriões obtidos em função da dose de LH	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla ou abreviatura	Significado
µl	Microlitros
1,2 PROH	1,2 Propanodiol
20 α -OH-P	20 α -dihidroxiprogesterona
a.c.	Antes de Cristo
AVMA	American Veterinary Medical Association
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CEUA	Comitês de Ética no Uso de Animais de Laboratório
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
C.V.	Coefficiente de variação
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas (s)
G	Gauge
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotropina da menopausa humana
kg	Kilograma
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
M16	Meio de cultivo de embriões
M2	Meio de manipulação de embriões
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	milímetros
N ₂	Nitrogênio líquido
°C	Graus Celcius
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
UI	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O camundongo como modelo animal.....	3
2.2. Eutanásia de animais de laboratório (<i>Mus musculus</i>).....	4
2.2.1. Dióxido de carbono.....	7
2.2.2. Deslocamento cervical.....	9
2.3. Dinâmica folicular murina.....	10
2.4. Tratamento superovulatório.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
4. CAPÍTULO 1.....	20
Efeito da eutanásia por inalação de CO ₂ ou deslocamento cervical sobre o número, qualidade, viabilidade e congelabilidade de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas.....	20
4.1. RESUMO.....	20
4.2. INTRODUÇÃO.....	21
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.4. RESULTADOS.....	24
4.5. DISCUSSÃO.....	26
4.6. CONCLUSÃO.....	29
4.7. AGRADECIMENTOS.....	29
4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
5. CAPÍTULO 2.....	32
Utilização de diferentes doses de LH em programas de superovulação de fêmeas murinas.....	32
5.1. RESUMO.....	32
5.2. INTRODUÇÃO.....	33
5.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.4. RESULTADOS.....	37
5.5. DISCUSSÃO.....	41
5.6. CONCLUSÃO.....	44
5.7. AGRADECIMENTOS.....	44
5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

I. INTRODUÇÃO

A utilização de animais com objetivos científicos é uma prática relativamente comum e absolutamente necessária para que o ciclo do conhecimento se complete e se renove. Uma vez que o entendimento das bases genéticas ou dos mecanismos de patogênese das doenças e o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas são resultados da experimentação animal, justifica-se a importância do uso científico de tais modelos no avanço da pesquisa na área biomédica.

Assim, o avanço do conhecimento biológico está intimamente correlacionado com a utilização de modelos animais em pesquisas, sendo que em 1957, Russel e Burch descreveram o princípio dos 3Rs (Replace, Reduce e Refine) o qual norteia a ética na utilização de animais de laboratório (REMFRY, 1987).

Desta forma, qualquer técnica que refine um método pré-estabelecido e que reduza o número de animais a ser utilizado deve ser encorajada a fim de reduzir a demanda por animais de laboratório.

O camundongo passou a ser a espécie de eleição de várias áreas da investigação biomédica, a partir do desenvolvimento das primeiras linhagens consanguíneas, cujas características e anormalidades individuais foram proporcionalmente sendo conhecidas, o que possibilitou um paralelismo com diversas afecções apresentadas por outros animais, inclusive o homem (SOUZA, MERUSSE, 1996), sendo que, com o advento da técnica de transgenia, houve um aumento exponencial do número de modelos para o estudo das diferentes afecções que acometem ao homem e as espécies domésticas. Conjuntamente a este aumento houve um incremento na exigência da criação destes animais e do espaço destinado a isto.

Uma vez que a manutenção destas linhagens apresenta sempre um risco de perda das mesmas por contaminação genética, por acidentes, doenças ou por diminuição da fertilidade, além da grande demanda de espaço, a criação de camundongos é extremamente cara e laboriosa. Desta forma, a formação de um banco de embriões pode servir de salvaguarda em caso de acidentes que levem a extinção de uma ou mais colônias (PASSOS et al., 2002).

Por conseguinte, o banco de embriões murinos possibilita a manutenção de linhagens que não estejam sendo utilizadas no momento, acarretando na diminuição dos custos de manutenção, espaço utilizado e mão-de-obra. Adicionalmente, o transporte de camundongos vivos é inconveniente, caro e sujeito aos problemas burocráticos, sanitários e de mau manuseio. Sendo assim, o envio interinstitucional de embriões criopreservados é uma alternativa relativamente fácil, segura, com baixo investimento financeiro e, que previne acima de tudo a transferência de patógenos entre biotérios (PASSOS et al., 2002).

O padrão de qualidade dos animais pode interferir substancialmente no resultado final de um experimento e, tendo em vista que a interpretação de um falso positivo em virtude do emprego de modelos inadequados, pode invalidar um projeto (HEDRICHI, 2004). Desta forma, a formação do banco de embriões murinos é um valioso progresso na área de bioterismo, uma vez que essa biotecnologia possibilita a obtenção de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free = SPF).

Assim, visando a implementação de um banco de embriões murinos no âmbito do CPqGM-FIOCRUZ, este trabalho consta de dois artigos científicos referentes ao estabelecimento de protocolos para a padronização dos procedimentos operacionais no tocante eutanásia e a superovulação das fêmeas murinas, contribuindo, conseqüentemente, para o desenvolvimento da ciência de animais de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O camundongo como modelo animal

A evolução das ciências biológicas passou por várias fases de desenvolvimento, e relaciona-se intimamente à utilização de animais em pesquisa. Nos primórdios da civilização, uma prática comum era a de utilizar seres humanos, geralmente escravos e condenados, para a realização de dissecções e necropsias. Tal procedimento foi aos poucos sendo abolido por interferências inicialmente religiosas, e posteriormente legais, o que levou os pesquisadores da época a adotarem animais para desvendar fenômenos biológicos.

Os primeiros relatos utilizando animais datam do século IV a.c., onde Aristóteles (384-322 a.c.) realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais. No decorrer do tempo, os trabalhos da área biológica, assumiram caráter mais experimental do que descritivo. Várias foram as espécies animais utilizadas com o passar dos anos, inclusive o camundongo. Não é preciso o momento no quais estes passaram a ser utilizados em experimentos, contudo no final do século XIX e início do XX formaram-se nos Estados Unidos as primeiras linhagens consangüíneas, cujas características e anormalidades individuais foram gradualmente sendo conhecidas, possibilitando um paralelismo com várias afecções apresentadas por outros animais, inclusive o homem. Some-se a esta, características biológicas favoráveis à manipulação laboratorial como: ciclo reprodutivo curto, grande diversidade de linhagens, facilidade de manipulação, facilidade de convívio em grandes populações, dentre outras (HEDRICH, 2004). Sendo assim, o camundongo passou a ser a espécie de eleição em várias áreas da investigação biomédica, como por exemplo, em pesquisas sobre o câncer.

Ainda, segundo Ozgunen et al. (2001), essa espécie é a mais comumente utilizada como modelo animal nas pesquisas na área reprodutiva para obter ovócitos maduros ou para investigar o desenvolvimento da pré-implantação de embriões.

2.2. Eutanásia de animais de laboratório (*Mus musculus*)

A utilização de animais em experimentação animal é uma prática relativamente comum e necessária para o desenvolvimento científico. Entretanto, para que seja moralmente aceitável, é fundamental a adoção de princípios éticos em todos os procedimentos com animais de experimentação (PAIVA et al., 2005).

Eutanásia etimologicamente significa “boa morte”, termo derivado do grego *eu* (boa) e *thanatos* (morte) (OLIVEIRA et al., 2006). Conforme padrões éticos humanitários, uma “boa morte” é aquela onde ocorre um mínimo de dor e estresse possível, a qual deve ser executada se forma a produzir inconsciência rápida e subsequente morte.

A utilização de agentes anestésicos em doses suficientes para produzir a perda indolor da consciência seguida da morte também devem ser considerada, todavia pesquisas e estudos algumas vezes envolvem dor que não pode ser atenuada com alguns agentes por que os mesmos podem interferir com os objetivos da pesquisa (INSTITUTIONAL..... 2006).

Neste contexto, os métodos comumente utilizados em pesquisas para eutanásia dos animais, devem ser indolores, que conduzam rapidamente à inconsciência e morte, que requeiram o mínimo de contenção, evitando desta forma a excitação dos animais e, que sejam apropriados

para a idade, espécie e ao estado de saúde do animal (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, o método a ser escolhido deve ser seguro para o operador, sendo na medida do possível eticamente aceitável para o executor e observador.

Segundo o 2000 Report of the AVMA (2001), os agentes eutanasiantes causam morte por três mecanismos básicos: (1) Hipóxia, direta ou indiretamente; (2) Depressão direta das células nervosas do cérebro e, (3) Rompimento físico da atividade cerebral e destruição de neurônios necessários para vida. Em geral, os agentes utilizados atuam em diferentes sítios de ação e resultam em perda da consciência sob diferentes maneiras, seguida, sempre, da morte do animal. A tabela 1 explana os principais métodos de eutanásia, suas características, modo de ação e espécies que podem ser submetidas com seu respectivo agente.

Tabela 1. Agentes utilizados para eutanásia, sua classificação, seu modo de ação e as espécies animais que devem ser utilizados

Agente	Classificação	Modo de ação	Espécies
Barbitúricos	Hipóxia atribuída a depressão dos centros vitais	Depressão direta do córtex cerebral, estruturas subcorticais e centros vitais; depressão direta do músculo cardíaco	Todas espécies em geral
Dióxido de carbono (gás engarrafado)	Hipóxia atribuída a depressão dos centros vitais	Depressão direta do córtex cerebral, estruturas subcorticais e centros vitais; depressão direta do músculo cardíaco	Pequenos animais de laboratório, passaros, coelhos, pequenos cães, anfíbios, gatos, peixe, alguns répteis, porco, animais zoológico
Monóxido de carbono (gás engarrafado)	Hipóxia	Combina-se com a hemoglobina impedindo a combinação desta com o oxigênio	Todas grandes espécies, incluindo cães, gatos, roedores, pássaros, répteis, anfíbios, coelhos, animais zoológico, chinchilas
Anestésicos inalantes	Hipóxia atribuída a depressão dos centros vitais	Depressão direta do córtex cerebral, estruturas subcorticais e centros vitais	Alguns anfíbios, passaros, gatos, cães, coelhos, alguns répteis, roedores e outros grandes mamíferos, peixe, animais zoológico
Cloreto de Potássio (intracardiaco ou endovenoso em conjunto com anestesia geral)	Hipóxia	Depressão direta do córtex cerebral, estruturas subcorticais, e centros vitais secundariamente a parada cardíaca	Todas espécies em geral
Deslocamento cervical	Hipóxia devido ao rompimento dos centros vitais	Depressão direta do cérebro	Aves, passaros, camundongos, ratos (< 200g), coelhos (< 1kg)
Decapitação	Hipóxia devido ao rompimento dos centros vitais	Depressão direta do cérebro	Roedores de laboratório, pequenos coelhos, pássaros, alguns peixes, anfíbios e répteis

Fonte: Adaptado de 2000 REPORT OF AVMA (2001).

Para a coleta de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas, a eutanásia é uma metodologia primordial e necessária. Adotar posturas éticas durante a eutanásia dos animais, procurando buscar melhores técnicas para a execução das mesmas que além à ética a eficiência da técnica são substanciais durante os estudos envolvendo as biotecnologias reprodutivas em murinos (HOWELL, et al., 2003).

Assim, a comparação entre dois métodos comumente empregados como o deslocamento cervical e a inalação de dióxido de carbono (CO_2), foi o objeto do presente estudo, tendo em vista que os mesmos podem influenciar de forma substancial a viabilidade dos embriões recém coletados (HOWELL et al., 2003).

2.2.1. Dióxido de carbono

O dióxido de carbono é um gás fisiologicamente importante, produzido pelo corpo como resultado do metabolismo celular (LANGFORD, 2005). Uma vez que o oxigênio tenha se difundido dos alvéolos para o sangue pulmonar, o mesmo é transportado para os capilares teciduais combinado principalmente com a hemoglobina. Nas células teciduais, pelos processos metabólicos, o oxigênio reage com vários substratos para formar grandes quantidades de dióxido de carbono que, por sua vez, entra nos capilares teciduais e é transportado de volta aos pulmões onde será excretado via expiração pulmonar.

O transporte deste gás pelo sangue aos pulmões se dá sob diferentes formas, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Percentual e respectiva forma de transporte do dióxido de carbono no sangue

Forma de transporte	Percentual
Gás dissolvido no sangue	7%
Íon bicarbonato	70%
Combinado à hemoglobina	23%

Fonte: Adaptado de: Souza e Elias (1995).

Uma vez nas hemácias, o gás carbônico sofre ação da anidrase carbônica e combina-se com a água, formando ácido carbônico. O íon hidrogênio resultante da reação é captado pela hemoglobina. Desta forma, os pulmões são importantes reguladores do equilíbrio ácido-básico, pois a administração do gás causa aumento da pressão parcial nos alvéolos, reduzindo conseqüentemente a sua eliminação do sangue. E, quando a pressão nos alvéolos ultrapassar a do sangue, o gás é absorvido, resultando em hipercapnia (aumento da pressão parcial do gás carbônico no sangue) e acidose respiratória (acúmulo de ácido volátil no organismo) (SILVA, 2002).

Assim, a inalação de altas concentrações do gás, resulta em aumento da frequência respiratória por estimular o centro respiratório a expeli-lo do organismo, aumentando concomitante a frequência cardíaca, por estimular o sistema nervoso autônomo simpático. A depender da concentração inalada podem ocorrer convulsões, coma e morte (LANGFORD, 2005; 2000 REPORT OF AVMA, 2001; SILVA, 2002).

Segundo o EUTHANASIA... (2006), a inalação de dióxido de carbono é um método seguro e humanamente aceito para eutanásia de pequenos roedores. O CO₂, por apresentar características como não ser explosivo; não ser inflamável; apresentar rápido efeito depressor e representar risco mínimo ao operador é dentre os métodos de eutanásia por inalação, o mais recomendado para pequenos roedores de laboratório.

Portanto, o uso do dióxido de carbono para eutanasiar fêmeas murinas superovuladas está perfeitamente de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal. Entretanto, como quando em altas concentrações o mesmo provoca ao nível celular uma

acidose, é sugestivo que este apresente um possível efeito negativo sobre o processo de coleta e sua influência na quantidade, qualidade e cultivo das estruturas embrionárias obtidas.

Vários estudos sugerem que a técnica utilizada para eutanasiar animais promovam alterações no metabolismo celular. Um decréscimo na função de células mediadoras de linfólise e na linfoproliferação *in vitro* foi observado por Howard, et al (1990), ao determinar os efeitos da eutanásia por inalação de CO₂ em camundongos. Alterações na excitabilidade cerebral (WOODBURY et al., 1957) e, na velocidade leucocitária macular (TOMIC et al., 2005), foram também observados como efeitos que a inalação desse gás provoca no organismo.

De forma semelhante, Lewin et al (1987) observaram um elevado grau de acidose celular em ratas submetidas à eutanásia por dióxido de carbono, sugerindo, desta forma, que mais estudos fossem realizados para analisar os efeitos desse procedimento sobre as células embrionárias.

2.2.2. Deslocamento cervical

O deslocamento cervical é um método físico de eutanásia muito utilizado em aves domésticas, pequenos pássaros, camundongos e ratos com peso inferior a 200 gramas (2000 REPORT OF AVMA, 2001). Trata-se de uma manobra rápida que induz a perda total da sensibilidade devido ao rompimento da medula espinhal e morte.

Por evitar quimicamente a contaminação tecidual, seu uso é indicado quando a adoção de outros métodos possa invalidar o resultado final de um determinado experimento (PAIVA et al., 2005). Esse método pode ser esteticamente desagradável para o executor, além de requerer domínio da técnica para indução rápida da perda de consciência.

As atividades elétricas no cérebro e muscular podem persistir por alguns segundos, entretanto, as contrações musculares presentes após o deslocamento tratam-se somente de movimentos reflexos, sem sensação dolorosa e vestígio de vida.

Estudos têm demonstrado que a técnica de deslocamento cervical pode afetar o metabolismo de determinados tecidos. Um rápido acúmulo de serotonina nos capilares pulmonares foi verificado por Yakamoto et al. (1988) em camundongos submetidos ao deslocamento cervical. Varki et al. (1979), verificaram que camundongos eutanasiados por deslocamento cervical apresentaram um aumento no número de células formadoras de colônias da medula óssea.

Por ser um método físico de rápida execução e por não resultar em resíduos teciduais no organismo do animal submetido a este, o deslocamento cervical merece ser objeto de estudo sobre seus possíveis efeitos sobre a qualidade e viabilidade embrionária.

2.3. Dinâmica folicular murina

O ciclo estral dos pequenos roedores é considerado curto quando comparado aos outros mamíferos, com duração média de quatro a cinco dias. O ciclo estral consiste de proestro (1 dia), estro (1 dia), e diestro (2 dias), sendo este, subdividido em diestro 1 (metaestro) e diestro 2 (MAEDA et al., 2000). Em camundongos, cada ciclo estral é caracterizado por uma onda de crescimento folicular por ciclo e a este processo se dá o nome de dinâmica folicular ovariana (Figura 1).

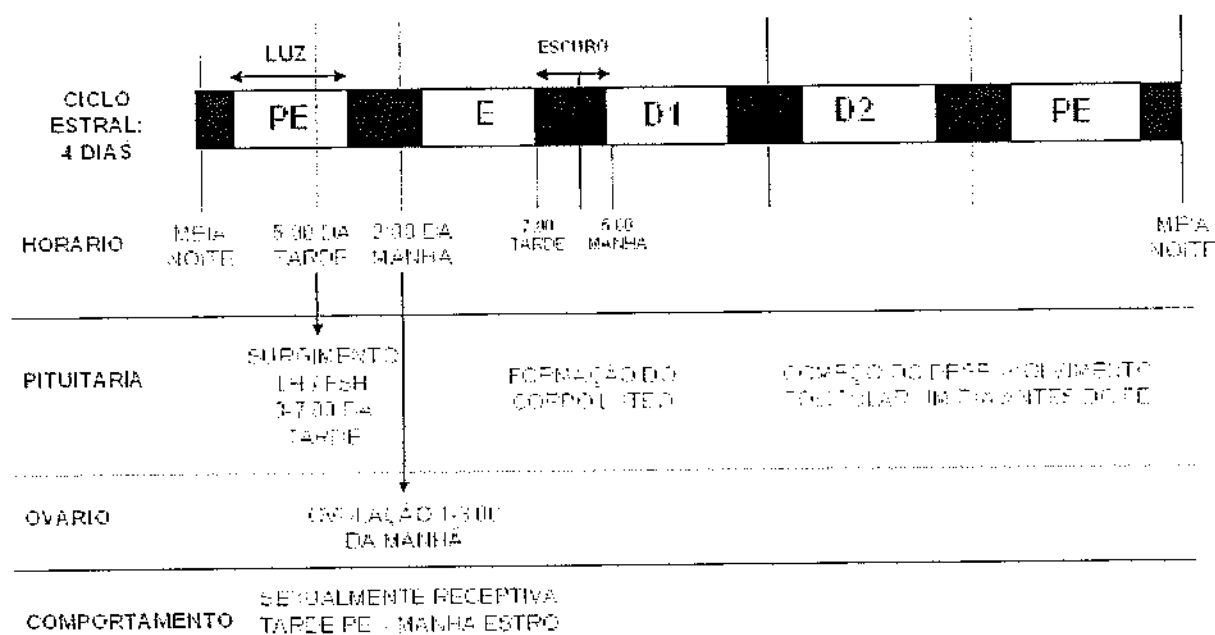


Figura 1. Principais eventos comportamentais e hormonais durante o ciclo estral murino.

PE: proestro; E: estró; D1: manhã diestro ou metaestro; D2: tarde de diestro.

Fonte: Adaptado de MAEDA et al. (2000).

Nos camundongos, a formação da população de folículos primordiais começa durante a vida fetal e está completa ao nascimento. Os mecanismos envolvidos no início do processo de seleção folicular ainda não são totalmente conhecidos. No entanto, uma vez que os folículos primários foram recrutados, estes são destinados a ovular ou entrar em processo de atresia durante toda a vida reprodutiva da fêmea. A dinâmica folicular pode ser definida como um processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Inicia-se pelo desenvolvimento sincrônico de um pool de folículos (*recrutamento*), que ao atingirem o tamanho entre 0,2-0,4 milímetros passam a depender das gonadotropinas para prosseguir seu crescimento. Dentre os folículos recrutados, alguns iniciam um rápido crescimento (*seleção e co-dominância*), enquanto os outros são simultaneamente impedidos de prosseguir o crescimento (folículos subordinados), e são, ativa ou passivamente, conduzidos à regressão e a atresia (GINTHER et al., 1996; HAFEZ, 1996).

A folículo-gênese pode ser dividida em dois estágios: um independente das gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)) e outro dependente destas. Naquela fase, um pool de folículos é recrutado da fase quiescente em que se encontra e começa um lento desenvolvimento. O estágio posterior é dependente de estímulos gonadotrópicos, ou seja, pequena elevação do nível do FSH promoverá rápido crescimento folicular e o aumento nos níveis de estrógeno que irá agir por "feed back" negativo, diminuindo os níveis de FSH. Nesta fase, os folículos que apresentarem receptores para LH continuarão a desenvolver e serão os futuros folículos dominantes e os demais entrarão em processo de atresia devido ao pequeno aporte de FSH. Sob o estímulo do LH o folículo continua o seu desenvolvimento até alcançar um pico (Figura 2) que irá induzir o eixo hipotalâmico hipofisário ("feed back" positivo) a secretar altos níveis de LH que culminará com o pico de LH pré-ovulatório (GINTHER et al., 1996). Ao contrário dos ruminantes, cada onda de crescimento folicular irá gerar a ovulação de vários folículos.

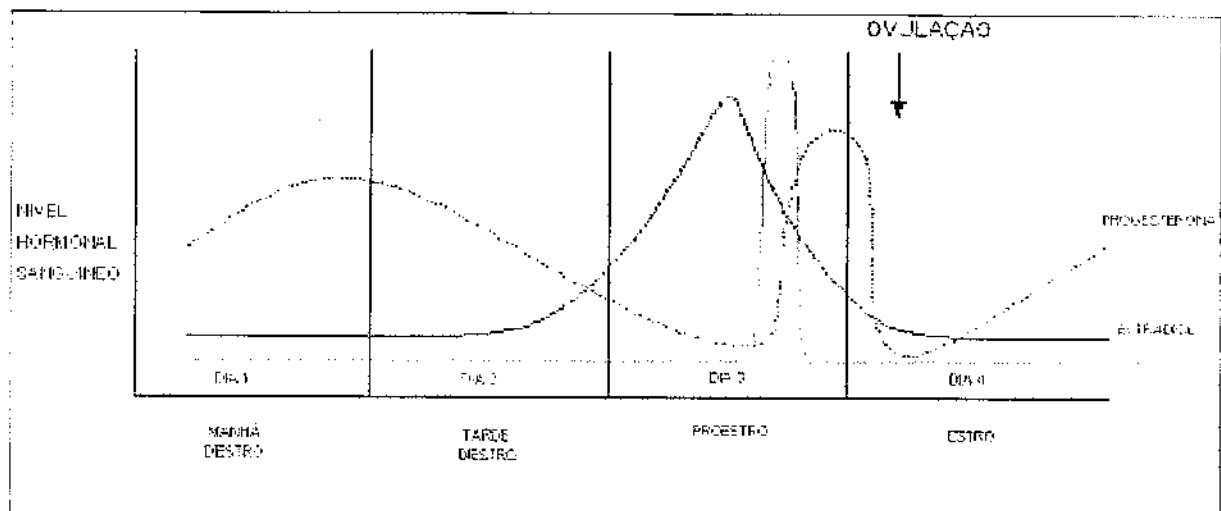


Figura 2. Perfil de secreção hormonal dos hormônios LH, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de camundongas.

Fonte: Adaptado de: Maeda et al. 2000.

Imediatamente após a ovulação dá-se início ao processo de luteinização dos folículos recém-ovulados, dando origem a formação do corpo lúteo. Ao contrário dos outros mamíferos, os pequenos roedores apresentam um corpo lúteo de curta duração. Outra particularidade é que a progesterona secretada é convertida pela ação da 20 α -hidroxiesteroide dihidrogenase,

convertendo a progesterona na forma inativa da progesterona (20 α -dihidroxiprogesterona ou 20 α -OH-P). Como resultado, o ciclo estral apresenta um alto nível plasmático de 20 α -OH-P. Por outro lado, caso a fêmea seja coberta, ocorre a secreção de prolactina que irá inibir a ação da 20 α -hidroesteroide dihidrogenase, evitando assim a conversão da progesterona em sua forma inativa. A ausência da forma inativa irá inibir a produção de PGE₂ e conseqüentemente o corpo lúteo permanecerá ativo durante toda a gestação da fêmea (MAEDA et al., 2000).

Diferentemente dos animais domésticos, a fêmea murina necessita ser coberta por um macho vasectomizado para induzir ao estágio de pseudogestação e assim estar apta a receber embriões.

2.4. Tratamento superovulatório

O tratamento superovulatório consiste na administração de uma gonadotrofina exógena, a fim de promover crescimento, maturação e rompimento de vários folículos (FONSECA E MAFFEI, 2002) apresentando, conseqüentemente estruturas embrionárias viáveis capazes de justificar tal investimento (BASILE et al., 1994). Assim, a taxa de ovulação pode ser aumentada mediante o uso de hormônios gonadotróficos exógenos proporcionando que um maior número de folículos se desenvolvam e resultem em múltiplas ovulações (SALLES, et al., 1998).

Os tratamentos superovulatórios mais comumente utilizados incluem os extratos hipofisários como o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) e, as substâncias com efeitos semelhantes a estes como a gonatotropina coriônica equina (eCG) e a gonadotropina coriônica humana (hCG). Têm-se relatado a utilização do hMG (gonadotropina da menopausa humana) como tratamento superovulatório de vacas (HERRERA ALVAREZ et al., 1987), camundongas (POZZIER et al., 1987) e cabras (ANDRIOLI, et al., 2000).

apresentando resultados satisfatórios em comparação com os protocolos tradicionais de superovulação.

O FSH tem função essencial no desenvolvimento dos folículos, responsável conseqüentemente pelo crescimento e maturação dos folículos ovários (GONZÁLEZ, 2002). A administração exógena desse hormônio para induzir a superovulação é baseado nessa função fisiológica. Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento estão presentes nos ovários e, grupos desses folículos pequenos crescem, maturam, degeneram ou ovulam. Assim, o FSH exógeno reverte a atresia de determinados folículos (BÉNYEI, BARROS, 2000). O LH, por conseguinte, induz a ovulação e, em conjunto com o FSH, estimular a secreção de estrógenos antes da ovulação e progesterona no corpo lúteo (GONZÁLEZ, 2002). Isto é devido ao LH estimular a produção de andrógenos nas células da teca e, estes são precursores para a produção de estrógenos pelas células da granulosa que foram estimuladas pelo FSH. Essa seqüência é essencial para recomençar a meiose nos óocitos imediatamente antes da ovulação e, o excesso de LH proveniente da administração do LH exógeno, causa a ativação prematura dos óocitos (BÉNYEI, BARROS, 2000).

O eCG e o hCG são gonadotropinas sintetizadas respectivamente pelas placentas da égua e da mulher, apresentam características similares às gonadotropinas hipófisárias. Esses hormônios atuam sobre as células gonadais da fêmea gestante estimulando a biossíntese dos hormônios esteroidais. Ambos possuem frações FSH e LH diferenciando, entretanto, na concentração destes. Assim, o eCG apresenta uma concentração de aproximadamente 75% de atividade FSH contra 25% de LH, conferindo a mesma característica folículo estimulante e, diferentemente, o hCG possui uma atividade de 25% de FSH contra 75% de LH, conferindo, ação luteinizante. Por possuírem maior quantidade de carboidratos em suas estruturas, o eCG e o hCG apresentam meia vida circulatória mais prolongada (BASILE et al., 1994) (GONZÁLEZ, 2002), conferindo menor freqüência de administração (SILVEIRA, KOZICKI, 2001).

Entretanto, verifica-se uma elevada variabilidade da resposta ovariana ao tratamento superovulatório (HERRERA ALVARZ et al., 1987). Fatores como momento de iniciar o tratamento superovulatório, atividade biológica da gonadotropina, individualidade animal,

idade, preparado hormonal, dose da gonotropina (SANTOS FILHO et al., 1998), quantidade e tipo de dieta utilizada (YAAKUB et al., 1999), quantidade de oócitos susceptíveis a responder ao tratamento superovulatório, bem como tipo e forma de administração (LIMA et al., 1999), podem influenciar na resposta ovariana ao tratamento superovulatório.

Desta forma, a análise de diferentes tratamentos superovulatórios em decorrência da resposta ovariana qualitativamente e quantitativamente superior, bem como o entendimento do mecanismo fisiológico de controle hormonal reprodutivo merecem ser objetos de estudo, para a subsequente formação de um protocolo padrão de um banco de germoplasma murino.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2000 REPORT OF THE AVMA PANEL ON EUTHANASIA. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 669 – 696, 2001.
- ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; VISINTIN, J. A.; SOARES, A. T. Superovulação em caprinos da raça Moxotó com FSH-P. **Brasilian Journal Veterinary Research. Animal Science**, São Paulo, v. 37, p. 58 – 63, 2000.
- BASILE, J. R.; CHEBEL, R. J.; BASILE, L.F. Superovulação em vacas da raça Holandesa com FSH ou PMSG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p 131-136, 1994.
- BÉNYEL, B.; BARROS, C. C. W., Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importados de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p. 366-371, 2000.
- EUTHANASIA Guidelines. Use of CO₂ chamber for euthanasia of rodents - Resfarch Animal Resource. Disponível em: <<http://www.umn.edu/rar/euthanasia.html>>. Acessado em: 24/04/2006;
- FONSECA, J. F., MAFFILI, V. V., *Transferência de embriões*. Biotecnologias da Reprodução de Ruminantes. VII JOVET – UNIPAR, Umuarama-PR, p 17-25, 2002.
- GINTHER, O.J., WILT BANK, M.C., FRICHE, P.M., GIBBONS, J.R., KOF, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187 - 1194, 1996.
- GONZÁLEZ, F. H. D., Hormônios Hipotálamo-Hipofisários. In: _____, **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, 2002.
- HAFEZ, E.S.JE. Tecnologia Reprodutiva Assistida: Manipulação da Ovulação, Fertilização In Vitro / Transferência de Embrião (FIV / TE). In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1996, p.469-512.
- HEDRICH, H. **The laboratory mouse**, 1.ed. London: Elsevier Academic Press, 2004, 600p.
- HERRERA ALVARZ, R.; AGUIAR, F. F.; STRASSBURGER, J. Indução da superovulação com FSH-P ou hMG em gado Nelore. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, Belo Horizonte, v 11, n 4, p 187-191, 1987.

- HOWARD, H. L.; MCLAUGHLIN-TAYLO, R. E.; HILL, R. L. The effect of mouse euthanasia technique on subsequent lymphocyte proliferation and cell mediated lympholysis assays. *Laboratory Animal Science*, v.40, p. 510-514, 1990.
- HOWELL, R. L.; DONEGAN, C. L.; PINKERT, C. A. Mouse embryo yield and viability after euthanasia by CO₂ inhalation or cervical dislocation. *Comparative Medicine*, v. 53, p. 510 - 513, 2003.
- INSTITUTIONAL animal care and use commiteec guidebook. B-2-3. **Euthanasia**, p. 8-10.
Disponível em: <http://grants2.nih.gov/grants/olaw/iauc/guidebook/iauc_b.htm>.
Acessado em: 24/04/2006;
- LANGFORD, N. J. Carbon dioxide poisoning. *Toxicology Review*, v. 24, p. 229 -- 235, 2005.
- LEVIN, B. C.; MAYA PAABO, M. S.; JOSHUA, L.G.; HARRIS, S. E.; BRAUN, F. Toxicological interactions between carbon monoxide and carbon dioxide. *Toxicology*, v. 47, p. 135-164, 1987.
- LIMA, E. M.; CHIARI, J. R.; FRANCESCINI, P. H. Influência da somatotropina bovina (bST-r¹) sobre a resposta superovulatória e qualidade dos embriões colhidos de fêmeas bovinas. *ARS Veterinária*, v.15, p 21-25, 1999.
- MAEDA, K.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of Reproduction. In: KRINKIE, G.J. *The laboratory rat*, 1ed. Londres: Academic Press, 2000. p145-173.
- OLIVEIRA, H. P.; ALVES, G. E. S.; REZENDE, C. M. F. Eutanásia em medicina Veterinária. *UFMG*, 14p. Disponível em: <www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>. Acessado em: 01/03/2006.
- OZGUNEN, K. I.; ERDOGAN, S.; MAZMANOGLU N.; PAMUK, I.; LOGOGLU, G.; OZGUNEN, T. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated Balb/C mice. *Theriogenology*, v. 56, p. 435 - 445, 2001.
- PAIVA, F. P.; MAFFILL, V.V.; SANTOS, A.C.S. *Curso de manipulação de animais*. Salvador, 2005 (Apostila).
- PASSOS, L.A.C.; GUARALDO, A.M.A.; ALVES, D.P.; PIRES, L.A.; SANTANA, T.M.; DINI, T.H.C. Criopreservação de embriões murinos em biotério. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA R.S. *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. 1ed. Rio de Janeiro: Editora FioCruz, 2002. 225-246.

- REMFRY, J. Ethical aspects of animal experimentation. In: TUFFERY, A.A. **Laboratory Animals: an introduction for new experiments**. New York: Ed. Interscience, 1987. p. 5-9.
- SALLES, H. O., SOARES, A. T., ANDRIOLI, A., SOBRINHO, P. A. M., AZEVEDO, H. C., Diferentes posologias de flunixin meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. **Ciência Animal**, v.8, p. 69-74, 1998.
- SANTOS FILHO, A. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; ALMEIDA, R. R. Superovulação de vacas 5/8 Girolando com diferentes dosagens de FSHp. **Ciência Veterinária Tropical**, Recife, v.1, p.60-68, 1998.
- SILVA, P. **Farmacologia**, 6.ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2002. 1400p.
- SILVEIRA, K. B. X.; KOZICKI, L. E., Superovulação em ovelhas suffolk durante o anestro sazonal com FSH e PMSG. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, v.25, p. 339-341, 2001.
- SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. **Fundamentos da Circulação extracorpórea**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Centro Editorial Alfa Rio, 1995. 367p.
- SOUZA, N. L.; MI-RUSSE, J. L. B. A utilização de animais de laboratório. In: LUCA et al. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2ed. São Paulo: Ed. H.A. Rothschild, 1996. p.11-14.
- TOMIC, L.; BJARNHALL, G.; MAEPEA O.; SPERBER, G. O.; ALM, A. Effects of oxygen and carbon dioxide on human retinal circulation: an investigation using blue field simulation and scanning laser ophthalmoscopy. **Acta Ophthalmol Scand**, v. 83, p. 705 - 710, 2005.
- VARKI, A. P.; FRITZ, J. L.; DAVIS, R. B. Effects of cervical dislocation on colony-forming cells in murine marrow cultures. **Hematology**, v. 7, p. 397 - 400, 1979.
- WOODBURY, D.M.; ROLLINS, L. T.; GARDNER, M. D.; HIRSCHL, W. L.; HOGAN, J. R.; RALLISON, M. L.; TANNER, G. S.; BRODIE, D. A. Effects of carbon dioxide on brain excitability and electrolytes. **American Journal Physiology**, v. 192, p. 1245 - 1252, 1997.
- YAAKUB H.; CALLAGHAN, D. O.; BOLAND, M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v 51, p 1259-1266, 1999.

YAMAMOTO, Y.; HASEGAWA, H.; IKEDA, K.; ICHIYAMA, A. Cervical dislocation of mice induces rapid accumulation of platelet serotonin in the lung. *Agents Actions*, v. 25, p. 48 – 56, 1988).

4. CAPÍTULO I

Efeito da eutanásia por inalação de CO₂ ou deslocamento cervical sobre o número, qualidade, viabilidade e congelabilidade de embriões obtidos de fêmeas murinas superovuladas

(Effect of euthanasia by CO₂ or dislocation cervical on number, quality, viability and congelability of embryos obtained of superovulated mice)

SILVA¹, C. A., MAFFILI², V. V., PAIVA³, F. P.

¹ Estudante de graduação do curso de Medicina Veterinária da UFPA – cristumaragaosilva@yahoo.com.br

² Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal – UFV – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz

³ Médica Veterinária, Doutora em Nutrição Animal – UFV – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz

4.1. RESUMO

Objetivou-se comparar o efeito da eutanásia por inalação de CO₂ ou por deslocamento cervical sobre o número, qualidade e viabilidade das estruturas embrionárias coletadas de fêmeas doadoras de embriões, pré e pós- congelamento destes. Foram utilizadas 58 camundongas C57Bl/6, as quais foram aleatória e equitativamente distribuídas em dois tratamentos experimentais (T1 – deslocamento cervical, T2 – inalação de CO₂). Sessenta e sete horas após a cópula, foi realizada a coleta dos embriões no estágio de oito células e, as estruturas obtidas foram quantificadas e qualificadas com o auxílio de um estereomicroscópio (6.3X a 134X). Vinte e três (79,3%) e 19 (65,5%) camundongas responderam ao T1 e T2, respectivamente. Obteve-se 457 estruturas (15,8 ± 12,8) e 330 estruturas (11,3 ± 11,2) para T1 e T2, respectivamente. Não houve diferença quanto ao número de estruturas coletadas, viáveis, degeneradas e ovócitos entre os diferentes tratamentos (P>0,05). Os valores médios de estruturas recuperadas em função do número de camundongas que responderam foram de 19,9 ± 11,1 (T1) e 17,4 ± 9,3 (T2), apresentando uma média geral de 18,7 ± 10,27 para a linhagem. Embora os métodos de eutanásia estudados não tenham afetado o número de embriões obtidos, viáveis, degenerados e ovócitos, foi observada maior hiperemia nos ovidutos das fêmeas do T2, o que dificultou a técnica da coleta dos embriões. Embriões do T1 cultivados pós-descongelamento apresentaram maior taxa de desenvolvimento a blastocisto eclodido (71,3% vs 60,6; P>0,05). Estes resultados indicam que a inalação do dióxido de

carbono como método de eutanásia dificulta a coleta de embriões por meio da tuba uterina e interfere no cultivo embrionário pós-desequilamento.

PALAVRAS-CHAVE: CO₂ deslocamento cervical, embriões, camundongos

4.2. INTRODUÇÃO

O camundongo é o modelo animal mais utilizado em pesquisas biomédicas, dentre elas, aquelas na área da reprodução assistida. No entanto, diferentemente de outras espécies animais, em murinos, para a obtenção de embriões nas fases pré-implantação, faz-se necessária a morte da fêmea doadora. Isto se deve ao reduzido tamanho do animal, sendo necessária a total extirpação do seu trato genital para a coleta dos embriões, o que incapacita a fêmea a gestações futuras.

Uma vez que há a necessidade do descarte da fêmea doadora no processo da coleta de embriões, é importante que este procedimento seja realizado de forma a causar o mínimo de ansiedade e sofrimento ao animal, além de apresentar o mínimo de interferência sobre o procedimento experimental.

Assim, com base em padrões internacionais para a realização de eutanásia em pequenos roedores, como os publicados pela American Veterinary Medical Association (AVMA) e pelo Canadian Council on Animal Care (CCAC) Guides, os Comitês de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUAs) têm freqüentemente indicado o uso do dióxido de carbono (CO₂) como método apropriado para este fim, de forma a minimizar a dor e o desconforto dos animais.

Outro método de eutanásia muito utilizado nessas espécies é o deslocamento cervical, entretanto, segundo os documentos que norteiam a atuação dos comitês de ética institucionais, a utilização do deslocamento cervical somente deve ser permitida após a justificativa da sua

necessidade, em detrimento dos resultados experimentais, uma vez que depende da prática do operador para a sua realização de forma correta.

Independentemente do método de escolha, é de conhecimento que em maior ou em menor grau, o método de eutanásia empregado nos animais de experimentação podem modificar algumas características *post mortem*, as quais podem alterar os resultados experimentais.

Tendo em vista as possíveis alterações causadas pelo método empregado na eutanásia e visando minimizar o sofrimento das fêmeas doadoras, torna-se imperativa a busca por um método humano, que apresente efeitos menores sobre a viabilidade dos embriões coletados, tanto antes quanto após o processo de congelamento dos embriões.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 58 camundongas (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6 com 6 a 7 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FioCruz), mantidas à temperatura média de 21°C, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e, recebendo ração¹ e água *ad libitum*. As fêmeas foram subdivididas em dois tratamentos, onde se testou o efeito da eutanásia por deslocamento cervical (T1-29 animais) ou por inalação de CO₂ (T2-29 animais) sobre o número, qualidade e viabilidade das estruturas embrionárias coletadas das fêmeas doadoras de embriões.

As camundongas foram superovuladas com 5 UI de eCG² (gonadotrofina coriônica eqüina) e 5 UI de hCG³ (gonadotrofina coriônica humana). Deste modo, a superovulação consistiu de duas aplicações, uma de eCG e outra de hCG intervaladas de 48hs (Jebens, 1975 *apud* Pozzer et al., 1987), por via intraperitoneal. Imediatamente após a aplicação da hCG, as fêmeas foram acasaladas com machos na proporção de 1:1, sendo que na manhã seguinte ao acasalamento, os machos foram removidos e as fêmeas verificadas quanto a presença de tampão vaginal, correspondente às secreções seminais do macho, comprovando a ocorrência da monta natural.

¹ Bio-base - Biotécnicas

² Novormon® 5000, Syntex S.A., Indústria Bioquímica e Farmacêutica, Buenos Aires, Argentina.

³ Vetecor®, Laboratórios Calier do Brasil Ltda.

Sessenta e sete horas após ocorrida a cópula, foi realizada a eutanásia das fêmeas doadoras de embriões, sendo estas distribuídas ao acaso entre os dois tratamentos. Após a eutanásia, foi efetuada a abertura da cavidade abdominal e a retirada da tuba uterina, a qual foi transferida para uma placa de Petri de 60mm contendo meio de manipulação de embriões M2¹ (HOGAN et al., 1994). A lavagem do oviduto foi efetuada a partir do infundíbulo, com o auxílio de uma agulha polida com diâmetro de 32G, adaptada a uma seringa de 1 mL.

Após a coleta, os embriões foram quantificados e qualificados de acordo com KENNEDY (1983), com o auxílio de um estereomicroscópio (6.3X a 134X), classificando-os de acordo com o grau de desenvolvimento embrionário. Após a coleta e avaliação das estruturas, os embriões classificados como Graus I e II foram imersos em soluções de 1.5M de 1.2 Propanodiol (PROH), por 15 minutos. Para o congelamento dos embriões foram utilizadas palhetas de 0,25mL, e montadas conforme demonstrado na Figura 1, utilizando-se às soluções de 1.5M de 1.2 PROH em meio M2¹ e a sacarose na concentração de 1.0M em meio M2¹.

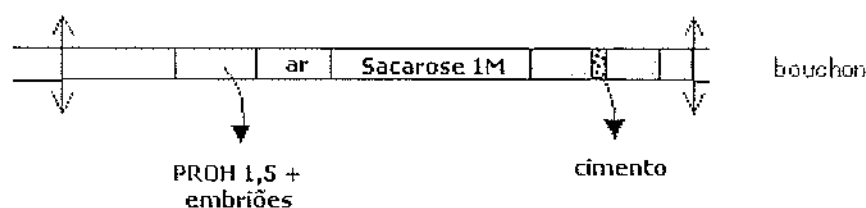


Figura 1: Esquema ilustrando a forma como a palheta com o meio e os embriões são montadas

As palhetas, com as extremidades devidamente lacradas, foram transferidas para o aparelho de congelamento a temperatura de -7°C por 5 minutos. Após este período, realizou-se o *seeding* e estabilização por 5 minutos. Ao término deste procedimento, foi imposta uma curva de resfriamento de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -30°C e imersão em nitrogênio líquido.

¹ Sigma-Aldrich do Brasil Ltda

As palhetas contendo os embriões congelados foram descongeladas, primeiramente, à temperatura ambiente durante 40 segundos e colocadas em banho-maria à temperatura ambiente até que o gelo no seu interior se deslizesse. Após este período, o conteúdo do interior da palheta foi expelido em uma placa de petri, onde permaneceu por cinco minutos. Findo este período, os embriões foram transferidos para outra gota contendo meio M2¹.

Imediatamente após o descongelamento, os embriões foram testados quanto a viabilidade embrionária, mediante a realização do cultivo *in vitro*. Utilizou-se para tal o meio M16¹, em placas de Petri com diâmetro de 35mm, contendo cinco gotas de 50µl do meio em 2ml. de óleo mineral¹. As placas foram colocadas em estufa a 37° C contendo uma mistura gasosa composta de 5% de CO₂ em ar, com circulação contínua e 95% de umidade relativa do ar, durante 48 horas (HOGAN et al.,1994). Findo este período, os embriões foram avaliados quanto ao número de estruturas eclodidas (taxa de eclosão) (KENNEDY et al. 1983).

As variáveis foram analisadas primeiramente pelo teste de Lilliefords a fim de se verificar a normalidade dos dados. Uma vez que as variáveis não seguiram uma distribuição normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o efeito do tratamento sobre o desenvolvimento após o cultivo *in vitro*, os dados foram confrontados em tabela de contingência e testados pelo teste do qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

4.4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo, quanto à resposta das fêmeas ao tratamento superovulatório podem ser visualizados na Tabela 1. Das 58 fêmeas superovuladas, 42 responderam ao tratamento superovulatório, obtendo-se um total de 787 estruturas e média de 13,6 ± 12,1 (Tabela 2).

Tabela 1. Resposta das fêmeas submetidas ao tratamento superovulatório e sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO₂

Tratamentos	Número de animais que responderam
1 – Deslocamento cervical	79,3% (23/29) ^a
2 – CO ₂	65,5% (19/29) ^a
Média Geral	72,4% (42/58)

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste do Qui-quadrado

Observou-se que as camundongas do T1 obtiveram médias de $15,8 \pm 12,8$ e $19,9 \pm 11,1$ estruturas recuperadas em função do total de camundongas superovuladas e que responderam, respectivamente: contra $11,3 \pm 11,2$ e $17,4 \pm 9,3$ do T2 ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Número, média e desvios-padrão (DP) de estruturas recuperadas de camundongas superovuladas e sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO₂

Tratamentos	Média \pm DP de estruturas recuperadas em função do total de camundongas superovuladas	Média \pm DP de estruturas recuperadas em função do número de camundongas que responderam
1 – Deslocamento cervical	$15,8 \pm 12,8$ (n = 29) ^a	$19,9 \pm 11,1$ (n = 23) ^a
2 – CO ₂	$11,3 \pm 11,2$ (n = 29) ^a	$17,4 \pm 9,3$ (n = 19) ^a
Média Geral	$13,6 \pm 12,1$ (n = 58)	$18,7 \pm 10,27$ (n = 42)
Coefficiente de variação (C.V.) (%)	89,4	54,8

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis

Com relação ao número médio de embriões viáveis, degenerados e ovócitos coletados, não se observou diferença ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos (Tab. 3). Entretanto, houve uma grande variação no número de estruturas coletadas por fêmea, variando de três a 42, demonstrando falta de uniformidade nas respostas ao tratamento superovulatório.

Tabela 3. Número, média e desvios-padrão de estruturas recuperadas viáveis, degeneradas e ovócitos de fêmeas superovuladas, sacrificadas por deslocamento cervical ou por inalação de CO₂

Tratamentos	Estruturas Viáveis		Estruturas Degeneradas		Ovócitos	
	Total	Média±DP	Total	Média±DP	Total	Média±DP
1	258	7,94±5,40 ^a	79	1,30±2,20 ^a	120	4,1 ± 4,5 ^a
2	208	12,20±10,4 ^a	56	2,00±2,66 ^a	66	2,3 ± 3,8 ^a
Total	466	7,41 ± 8,68	135	1,67± 2,42	186	3,2 ± 3,8
C.V. (%)	84,2		92,1		100,4	

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis

Das 466 estruturas consideradas viáveis, foram cultivadas 208, 170, 23 e 25 para o T1, T2, controle de T1 e controle de T2, respectivamente, totalizando 426 estruturas cultivadas. Destas, 149 (71,3%), 21 (91%), 103 (60,6%) e 20 (80%) desenvolveram até o estágio de blastocisto eclodido para T1, controle de T1, T2 e controle de T2, respectivamente (Tab. 4). O método de eutanásia influenciou ($P < 0,05$) a taxa de desenvolvimento dos embriões congelados até o estágio de blastocisto eclodido (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de desenvolvimento dos embriões obtidos de camundongas (*Mus musculus*), utilizando-se o método de deslocamento cervical ou por inalação de dióxido de carbono

Tratamentos	Embriões Cultivados	Porcentagem de Desenvolvimento
1 Deslocamento cervical	208	71,3% (149/208) ^a
Controle (não congelado)	23	91% (21/23) ^a
2 Inalação de dióxido de carbono	170	60,6% (103/170) ^b
Controle (não congelado)	25	80% (20/25) ^a
Média Geral	426	66,7% (252/378)

^a Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado

^b Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado

4.5. DISCUSSÃO

Com a descoberta de que os hormônios sexuais poderiam ser utilizados para promover a superovulação, veio também a observação de que os resultados do tratamento superovulatório

variam grandemente entre indivíduos. No presente estudo não foi diferente, onde se observou um grande desvio padrão nas médias obtidas e a conseqüente falta de normalidade e homogeneidade das variáveis estudadas. Resultados semelhantes quanto a variação na resposta superovulatória foram notadas por MAFFILI et al. (2003). Ainda, estudos realizados por VIANA et al. (2006) (dados não publicados) demonstraram que o número de embriões viáveis recuperados de fêmeas doadoras superovuladas não diferem do número de fetos nascidos por monta natural sem estimulação hormonal. Estas observações abrem o questionamento sobre a validade do uso dos protocolos de superovulação universalmente adotados no tocante ao número final de neonatos obtidos.

É ainda interessante observar que o presente estudo foi conduzido em animais consangüíneos, advindos de um mesmo ancestral por meio de acasalamentos entre irmãos há mais de 20 gerações, e que apresentavam a mesma faixa etária no momento da aplicação da eCG. Com estas observações, podemos inferir que a variação na resposta ao tratamento superovulatório é algo relacionado à complexa cadeia de eventos que desencadeiam a ovulação na fêmea, bem como o efeito da administração de eCG exógeno e não puramente ao efeito da variabilidade da população, como muitos atestam.

Embora não tenha sido observada diferença ($P > 0.05$) entre as estruturas coletadas dos animais, é importante ressaltar que foi verificada durante a coleta das estruturas embrionárias uma maior hiperemia no infundíbulo dos animais do T2 quando comparadas aos do T1. Notou-se ainda, que a hiperemia observada nos ovidutos dos animais do T2 dificultou sobremaneira a coleta dos embriões. Assim, indiretamente, o método de eutanásia empregado pode apresentar efeito sobre o número de estruturas coletadas, influenciando este de forma negativa quando se opta pela inalação de CO₂.

Essa hiperemia nos ovidutos é provavelmente mais uma das alterações *pos mortem* causadas pelo CO₂. Segundo WOODBURY et al. (1957) e LEVIN et al. (1987), a exposição contínua ao CO₂ resulta em um alto grau de acidose celular, uma vez que cerca de 70% do dióxido de carbono é transportado pelo sangue aos pulmões e que os íons hidrogênio restantes são captado pela hemoglobina (SOUZA, ELIAS, 1995). Devido à hipercapnia acompanhada de

hipóxia, a concentração plasmática elevada de CO_2 resulta no seu acúmulo, com conseqüente retenção de íons hidrogênio, levando à acidose (SILVA, 2002). Como o íon hidrogênio está captado pela hemoglobina das hemácias, possivelmente este é o responsável pelo estado hiperêmico do oviduto das fêmeas mortas por inalação de dióxido de carbono.

O número de estudos disponíveis na literatura correlacionando o método de eutanásia à qualidade dos embriões obtidos das fêmeas doadoras é pequeno, embora haja um número maior de pesquisas descrevendo alterações *pos mortem* observadas em roedores mortos pela inalação de CO_2 (FELDMAN, GUPTA, 1976), (BUTLER et al., 1990), (HOWARD et al., 1990), (PECAUT et al., 2000).

Comparando o efeito da eutanásia de camundongas por deslocamento cervical ou por inalação de CO_2 sobre a qualidade dos embriões coletados e sobre as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, Howell, et al.(2003), não observaram efeito de tratamento, concluindo que a viabilidade embrionária independente do método de eutanásia utilizado. Estes resultados corroboram o presente estudo no tocante à avaliação dos embriões mantidos a fresco, tanto no momento da coleta quanto após o cultivo *in vitro*, no qual não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

No entanto, quando realizado o congelamento dos embriões dos dois tratamentos, pode-se observar uma redução na taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto eclodido daqueles embriões advindos de fêmeas mortas por inalação de CO_2 .

Embora não haja na literatura trabalhos a respeito do efeito do método de eutanásia sobre a congelabilidade de embriões murinos, é possível que o estresse tecidual observado em estudos utilizando o CO_2 como método de eutanásia (FELDMAN, GUPTA, 1976), (BUTLER et al., 1990), (HOWARD et al., 1990), (PECAUT et al., 2000) e dos achados macroscópicos na tuba uterina no presente estudo, ocasionem danos à membrana celular das células embrionária, de tal forma que altere a permeabilidade destas aos crioprotetores, influenciando negativamente as taxas de desenvolvimento embrionário após o processo de congelamento-descongelamento.

4.6. CONCLUSÃO

A eutanásia de camundongas doadoras de embriões por deslocamento cervical ou por inalação de CO₂ não afeta o número, a qualidade e a viabilidade, após cultivo *in vitro*, das estruturas embrionárias coletadas, mas a inalação de CO₂ pela fêmea doadora afeta a congelabilidade dos embriões. Adicionalmente, a hiperemia resultante da acidose celular verificada em fêmeas sacrificadas por inalação de CO₂ dificulta a coleta dos embriões por meio da tuba uterina.

4.7. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos técnicos Márcio Ferreira dos Santos e Alexandre Jader, pelo auxílio nos procedimentos de superovulação das fêmeas doadoras de embriões.

4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUTLER, M. M.; GRIFFEY, S. M.; CLUBB F.J. JR.; GERRITY, L. W. ; CAMPBELL, W.B. The effect of euthanasia technique on vascular arachidonic acid metabolism and vascular and intestinal smooth muscle contractility. **Laboratory Animal Science**, v.40, p. 277-283, 1990.
- FELDMAN, D. B.; GUPTA, B. N. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. **Laboratory Animal Science**, v. 26, p. 218-221, 1976.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CONSTANTINI, F., LACY, E., **Manipulating the mouse embryo**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. 188p.
- HOWARD, H. L.; MCLAUGHILIN-TAYLO, R. E.; HILL, R. L. The effect of mouse euthanasia technique on subsequent lymphocyte proliferation and cell mediated lympholysis assays. **Laboratory Animal Science**, v.40, p. 510-514, 1990.
- PECAUT, M. J.; SMITH, A. L.; JONES, T.A.; GRIDLEY, D.S. Modification of immunologic and hematologic variables by method of CO₂ euthanasia. **Comparative Medicine**, v.50, p. 595-602, 2000.
- HOWELL, R. L.; DONEGAN, C. L.; PINKERT, C. A. Mouse embryo yield and viability after euthanasia by CO₂ inhalation or cervical dislocation. **Comparative Medicine**, v.53, p. 510 - 513, 2003.
- KENNEDY, L., G., BOLAND, M. P., GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. **Theriogenology**, v.19, p. 823-832, 1983.
- LEVIN, B. C.; MAYA PAABO, M. S., JOSHUA, L.G.; HARRIS, S. E.; BRAUN, E. Toxicological interactions between carbon monoxide and carbon dioxide. **Toxicology**, v. 47, p. 135-164, 1987.
- MAFFILL, V.V.; TORRES, C.A.A.; CARVALHO, G.R.; AMORIM, L.S.; MORAES, E.A.; FURST, R. Efeito do horário de aplicação e dosagem de somatotropina bovina recombinante sobre o número, qualidade e taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões obtidos de camundongas superovuladas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p.684-689, 2003.

- POZZER, M. A.; MATTOS, A.L.G.; FERRARRI, A. N.. Efeito da superovulação em *Mus Musculus* com hMG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.11, p.143-147, 1987.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2002. 1400p.
- SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. **Fundamentos da Circulação extracorpórea**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Centro Editorial Alfa Rio. 1995. 367p.
- WOODBURY, D.M.; ROLLINS, L. T.; GARDNER, M. D.; HIRSCH, W. L.; HOGAN, J. R.; RALLISON, M. L.; TANNER, G. S.; BRODIE, D. A. Effects of carbon dioxide on brain excitability and electrolytes. **American Journal Physiology**, v. 192, p. 1245 - 1252, 1997.

5. CAPÍTULO 2

Utilização de diferentes doses de LH em programas de superovulação de fêmeas murinas

(Utilization of different dosages of LH in superovulation programs of murines females)

SHIVA¹, C. A., MAFILLI², V. V., PAIVA³, F. P.

¹ Estudante de graduação do curso de Medicina Veterinária da UFBA - cristinaaragaosilva@yahoo.com.br

² Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal - UFV - Centro de Pesquisas Gonçalo Montz - Uberiz

³ Médica Veterinária, Doutora em Nutrição Animal - UFV - Centro de Pesquisas Gonçalo Montz - Uberiz

5.1. RESUMO

Avaliou-se a resposta superovulatória de fêmeas murinas a diferentes dosagens de LH. Foram utilizadas 60 camundongas C57Bl/6, as quais foram aleatoriamente distribuídas em seis tratamentos experimentais, sendo a gonadotrofina coriônica humana (hCG) o controle (T6 = 5UI), e cinco doses crescentes de hormônio luteinizante (LH) (T1 = 0,02mg, T2 = 0,04mg, T3 = 0,06mg, T4 = 0,08mg, T5 = 0,10mg). Utilizou-se a eGC (5UI) para promover o recrutamento folicular em todos os tratamentos. Os embriões foram coletados no estágio de oito células (67 horas após a cópula) e as estruturas obtidas quantificadas e qualificadas com o auxílio de um estereomicroscópio (6,3X a 134X). Os resultados obtidos referentes ao número de camundongas que responderam aos tratamentos (70%; 80%; 80%; 80%; 70%; 80%), total de estruturas obtidas (127; 160; 212; 159; 127; 192), embriões recuperados em função do número de fêmeas superovuladas (Média = 12,7; 14,8; 21,2; 15,9; 12,7; 9,2) e do número de fêmeas que responderam (Média = 18,1; 18,5; 26,5; 19,9; 18,1; 11,5) aos tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente, não demonstraram diferença significativa nestas variáveis ($P > 0,5$). O tratamento T3 diferiu significativamente ($P < 0,05$) dos demais tratamentos analisados, no tocante às estruturas recuperadas viáveis em função do número de camundongas que responderam ao tratamento superovulatório (137 estruturas, com uma média e desvio padrão de $17,1 \pm 5,3$).

PALAVRAS-CHAVE: LH, camundongas, embrião, superovulação

5.2. INTRODUÇÃO

A superovulação em animais é geralmente realizada por meio do uso de extratos hipofisários, como o do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), ou ainda, com substâncias de efeitos similares a estes, como a gonadotropina coriônica eqüina (eCG) e a gonadotropina coriônica humana (hCG). Estas substâncias promovem maior desenvolvimento folicular, maturação do ovócito e ovulação em um maior número de folículos que em um ciclo normal (POZZER et al., 1987).

O FSH e o LH são glicoproteínas pertencentes ao ciclo fisiológico reprodutivo dos animais e estão sob controle do eixo hipotalâmico-hipofisário. A administração exógena desses hormônios promove, respectivamente, o desenvolvimento simultâneo de vários folículos e a ovulação desses. Já a eCG e a hCG, são gonadotropinas com características similares às gonadotropinas hipofisárias, produzidas pela placenta da égua e da mulher, respectivamente. Esses hormônios atuam sobre as células gonadais da fêmea gestante, estimulando a biossíntese dos hormônios esteroidais (GONZÁLEZ, 2002). Em camundongas, estes dois hormônios são utilizados para induzir a superovulação, onde primeiro se aplica a eCG e aproximadamente 48 horas após aplica-se a hCG, seguida da exposição da fêmea ao macho e à coleta dos embriões até o quinto dia pós-cobertura.

VIANA et al. (2006) (dados não publicados), comparando o número de embriões viáveis recuperados das linhagens Balb-c, C57Bl-6, Swiss Webster e CBA de fêmeas superovuladas, ao tamanho das ninhadas obtidas por monta natural, não observou aumento do número de embriões viáveis utilizando os métodos de superovulação comumente empregados, demonstrando que o procedimento de superovulação em camundongas é uma mera forma de sincronização da ovulação e não um meio de elevação do rendimento embrionário, como se espera.

Segundo MAFFILI et al. (2001) e MAFFILI et al. (2003), ocorre uma grande variabilidade na resposta quando se utiliza a combinação eCG e hCG para induzir a superovulação. Dados

semelhantes foram obtidos em camundongos por SILVA et al. (2006) (dados não publicados), quando se comparou o método de eutanásia de fêmeas murinas sobre a viabilidade dos embriões coletados. OPAVSKY E ARMSTRONG (1989) descreveram que a alta atividade LH da eCG, aliada a sua longa meia vida é o principal fator exógeno responsável por esta variabilidade. Por outro lado, a hCG apresenta atividade biológica seis vezes superior ao LH e seu uso está associado a efeitos indesejados devido principalmente a expressão, produção e secreção do fator de crescimento endotelial vascular o que leva à hiperestimulação ovariana e a conseqüente variabilidade na resposta ovariana (GOMEZ et al. 2004).

O hormônio luteinizante (LH) é uma glicoproteína secretada pela hipófise, em resposta ao GnRH. O LH atua sobre o ovário promovendo a maturação folicular, a ovulação e a luteinização das células da granulosa e da teca (Hoff et al., 1983). Trabalho realizado em ratos por Kaur e Guraya (1991), utilizando LH suíno, demonstrou aumento no número de ovulações por reduzir o número de folículos pré-ovulatórios destinados a atresia e facilitar a ruptura destes por meio do aumento da quantidade de enzimas proteolíticas, as quais degradam a parede folicular (GÓMES et al., 2004). Por outro lado, a eficiência deste hormônio em promover a ovulação em camundongas superovuladas e sua função em normalizar a resposta carece de maiores estudos.

Assim, o objetivo deste estudo foi o de testar a eficiência de diferentes dosagens de LH sobre a resposta superovulatória das fêmeas murinas, para, assim, determinar um protocolo eficiente de superovulação em camundongas, que produza uma maior quantidade de embriões viáveis.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 60 camundongas (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6 com 6 a 7 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz), mantidas à temperatura média de 21°C, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e, recebendo ração¹ e água “*ad libitum*”. As fêmeas foram subdivididas em seis tratamentos, sendo a

¹ Bio-base - Biotécnicas

gonadotrofina coriônica humana (hCG¹), o controle, e cinco doses crescentes de hormônio luteinizante (LH) sobre o número, qualidade e viabilidade das estruturas embrionárias coletadas das fêmeas doadoras de embriões.

As camundongas foram superovuladas com 5 UI de eCG² (gonadotrofina coriônica eqüina). Para a indução da ovulação, as fêmeas foram subdivididas conforme o desenho experimental:

- Tratamento 01 → 0.02mg de LH.
- Tratamento 02 → 0.04mg de LH.
- Tratamento 03 → 0.06mg de LH.
- Tratamento 04 → 0.08mg de LH.
- Tratamento 05 → 0.10mg de LH.
- Tratamento 06 → 5UI de hCG

Deste modo a superovulação consistiu de duas aplicações, uma de eCG e outra de hCG ou LH (a depender do tratamento) intervaladas de 48hs. por via intraperitoneal. Imediatamente após a aplicação da hCG ou do LH, as fêmeas foram acasaladas com machos na proporção de 1:1, sendo que na manhã seguinte ao acasalamento, os machos foram removidos e as fêmeas verificadas quanto a presença de tampão vaginal, correspondente às secreções seminais do macho, comprovando a ocorrência da monta natural.

Sessenta e sete horas após ocorrida a cópula, foi realizada a eutanásia das fêmeas doadoras de embriões por deslocamento cervical, sendo estas distribuídas ao acaso entre os dois tratamentos. Após a eutanásia, foi efetuada a abertura da cavidade abdominal e a retirada da tuba uterina, a qual foi transferida para uma placa de Petri de 60mm contendo meio de manipulação de embriões M2³ (HOGAN et al., 1994). A lavagem do oviduto foi efetuada a partir do infundíbulo, com o auxílio de uma agulha polida com diâmetro de 32G, adaptada a uma seringa de 1mL.

¹ Vetecor®, Laboratórios Calier do Brasil Ltda.

² Novormon® 5000, Syntex S.A., Indústria Bioquímica e Farmacêutica, Buenos Aires, Argentina.

³ Sigma-Aldrich do Brasil Ltda

Após a coleta, os embriões foram quantificados e qualificados de acordo com KENNEDY (1983), com o auxílio de um estereomicroscópio (6,3X a 134X), classificando-os de acordo com o grau de desenvolvimento embrionário. Após a coleta e avaliação das estruturas, os embriões classificados como Graus I e II foram imersos em soluções de 1,5M de 1,2 PROH, por 15 minutos. Para o congelamento dos embriões foram utilizadas palhetas de 0,25mL, e montadas conforme demonstrado na Figura 1, utilizando-se as soluções de 1,5M de 1,2 PROH em meio M2¹ e a sacarose na concentração de 1,0M em meio M2¹.

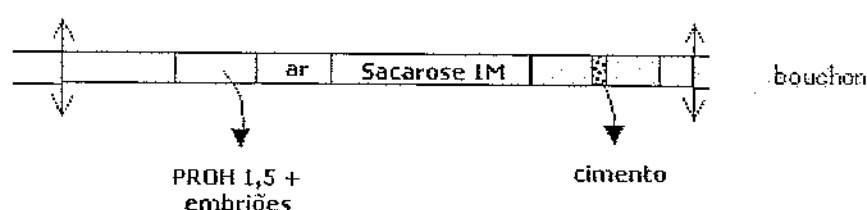


Figura 1: Esquema ilustrando a forma como a palheta com o meio e os embriões são montadas

As palhetas, com as extremidades devidamente lacradas, foram transferidas para o aparelho de congelamento a temperatura de -7°C por 5 minutos. Após este período, realizou-se o *seeding* e estabilização por 5 minutos. Ao término deste procedimento, foi imposta uma curva de resfriamento de $0,3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$ até -30°C e imersão em nitrogênio líquido.

As palhetas contendo os embriões congelados foram descongeladas, primeiramente, à temperatura ambiente durante 40 segundos e colocadas em banho-maria à temperatura ambiente até que o gelo no seu interior se desfizesse. Após este período, o conteúdo do interior da palheta foi expelido em uma placa de petri, onde permaneceu por cinco minutos. Findo este período, os embriões foram transferidos para outra gota contendo meio M2¹.

Imediatamente após o descongelamento, os embriões foram testados quanto a viabilidade embrionária, mediante a realização do cultivo *in vitro*. Utilizou-se para tal o meio M16¹, em

¹ Sigma-Aldrich do Brasil Ltda

placas de Petri com diâmetro de 35mm, contendo cinco gotas de 50µl do meio em 2ml de óleo mineral¹. As placas foram colocadas em estufa a 37° C contendo uma mistura gasosa composta de 5% de CO₂ em ar, com circulação contínua e 95% de umidade relativa do ar, durante 48 horas (HOGAN et al.,1994). Fimdo este período, os embriões foram avaliados quanto ao número de estruturas eclodidas (taxa de eclosão) (KENNEDY et al. 1983).

As variáveis foram analisadas primeiramente pelo teste de Lilliefords a fim de se verificar a normalidade dos dados. Uma vez que as variáveis não seguiram uma distribuição normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o efeito do tratamento sobre o desenvolvimento após o cultivo *in vitro*, os dados foram confrontados em tabela de contingência e testados pelo teste do qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

5.4. RESULTADOS

Conforme demonstrado na Tabela 1, as diferentes doses de LH não aumentaram a porcentagem de animais que responderam ao tratamento superovulatório, bem como, o número de estruturas totais recuperadas, quando se compara com o controle (hCG). Diferentemente do que os números sugerem quanto ao número total de estruturas obtidas, não houve diferença entre tratamentos quando se aumentou a dose de LH. Da mesma forma, ao se confrontar os dados das diferentes doses com o controle, não se observa diferença ($P > 0.05$) entre os tratamentos. Embora tenha-se observado uma diferença numérica superior a 100 estruturas entre o T3 e o T6 (controle) e, na média, uma diferença de aproximadamente 10 estruturas, não se observou efeito ($P > 0.05$) do tratamento sobre o número de estruturas coletadas (Tabela 1). Tal fato deve-se basicamente à alta variabilidade observada na resposta, onde obteve-se um total variando de quatro a 45 estruturas por fêmea doadora.

Tabela 1. Número de animais que responderam ao tratamento superovulatório e total de estruturas obtidas de camundongas tratadas com hCG e diferentes doses de LH

Tratamentos	Número de animais que responderam	Total de estruturas obtidas
1 - 0.02mg de LH	70.0% (7/10)	127
2 - 0.04mg de LH	80.0% (8/10)	160
3 - 0.06mg de LH	80.0% (8/10)	212
4 - 0.08mg de LH	80.0% (8/10)	159
5 - 0.10mg de LH	70.0% (7/10)	127
6 - 5UI de hCG	80.0% (8/10)	92
Média Geral	76.7% (46/60)	877

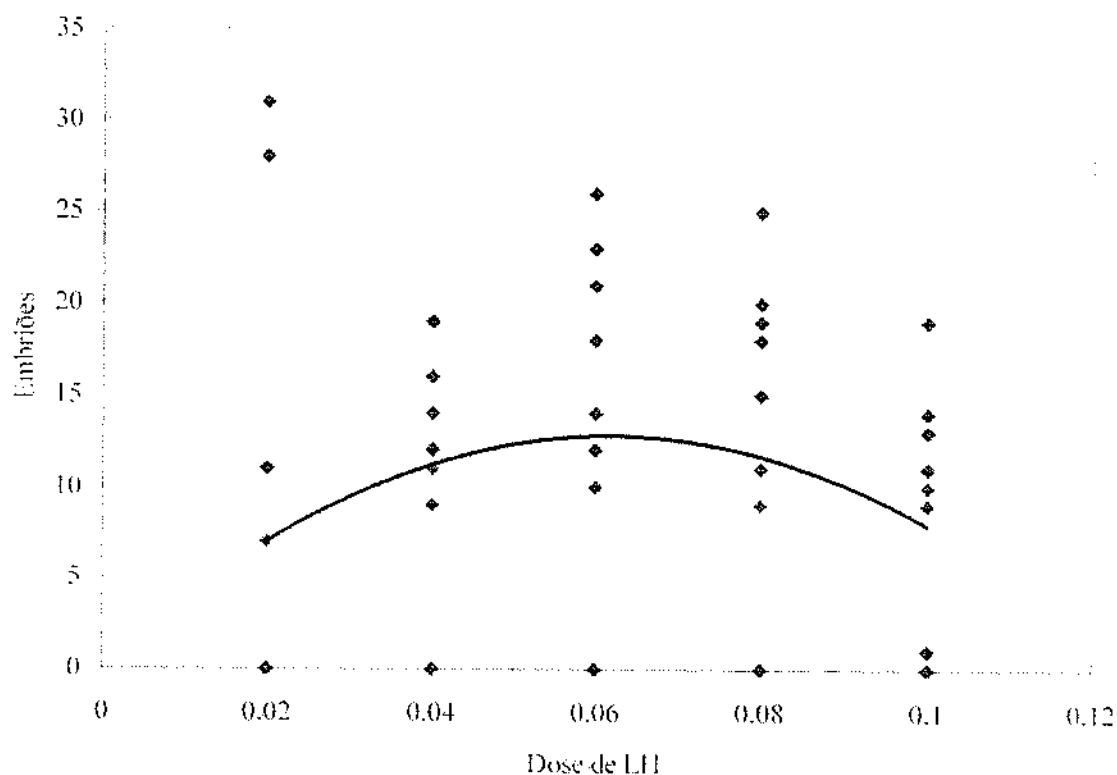
O número médio de estruturas recuperadas em função do total de camundongas superovuladas não diferiu significativamente ($P > 0.05$) com o aumento da dose empregada (Tab. 2). Resultado semelhante foi observado no número médio de estruturas recuperadas em função do total de fêmeas que responderam ao tratamento superovulatório.

Tabela 2. Médias e respectivos desvios-padrão (DP) do número de estruturas recuperadas em função do número de camundongas superovuladas que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH

Tratamentos	Média \pm DP de estruturas recuperadas em função do total de camundongas superovuladas	Média \pm DP de estruturas recuperadas em função do número de camundongas que responderam
1 - 0.02mg de LH	12.7 \pm 12.4 (n = 10) ^d	18.1 \pm 10.8 (n = 7) ^d
2 - 0.04mg de LH	14.8 \pm 9.7 (n = 10) ^d	18.5 \pm 6.6 (n = 8) ^d
3 - 0.06mg de LH	21.2 \pm 13.7 (n = 10) ^d	26.5 \pm 9.07 (n = 8) ^d
4 - 0.08mg de LH	15.9 \pm 11.1 (n = 10) ^d	19.9 \pm 8.2 (n = 8) ^d
5 - 0.10mg de LH	12.7 \pm 10.8 (n = 10) ^d	18.1 \pm 7.7 (n = 7) ^d
6 - 5UI de hCG	9.2 \pm 7.1 (n = 10) ^d	11.5 \pm 5.9 (n = 8) ^d
Média Geral	14.4 \pm 11.2 (n = 60)	18.8 \pm 8.9 (n = 46)
Coefficiente de variação	124.85%	79.3%

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis

Quando avaliou-se somente a dose de LH por meio da análise de regressão, observou-se uma tendência ao efeito quadrático do número de estruturas obtidas em função da dose de LH utilizada. Contudo, deve-se salientar que o baixo valor do coeficiente de determinação (R^2) observado, reforça a instabilidade da variável estudada (Figura 2).



$$y = -3321.4x^2 + 410.57x + 0.1 \quad (R^2 = 0.063)$$

Figura 02. Número de embriões obtidos em função da dose de LH.

Houve aumento significativo ($P < 0.05$) no número de embriões viáveis recuperados quando se utilizou a dose de 0.06mg de LH (Tab. 3) nas fêmeas que responderam. Por outro lado, quando a análise é realizada em função do número de fêmeas superovuladas, tal efeito não foi observado.

Tabela 3. Números, médias e respectivos desvios-padrão (DP) das estruturas recuperadas viáveis em função do número de camundongas superovuladas e que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH

Tratamentos	Estruturas Viáveis por doadora		Estruturas viáveis por fêmea que respondeu	
	Total	Média ± DP	Total	Média ± DP
1 - 0.02mg de LH	77	5,0 ± 6,2 ^a	77	9,2 ± 12,0 ^a
2 - 0.04mg de LH	50	13,7 ± 8,6 ^a	50	10,0 ± 5,0 ^a
3 - 0.06mg de LH	137	10,7 ± 8,5 ^a	137	17,1 ± 5,3 ^b
4 - 0.08mg de LH	107	7,2 ± 6,7 ^a	107	15,3 ± 5,2 ^a
5 - 0.10mg de LH	69	7,7 ± 12,1 ^a	69	11,5 ± 4,8 ^a
6 - 5UI/mg de hCG	56	5,6 ± 4,8 ^a	56	8,0 ± 3,5 ^a
Total	496	8,3 ± 8,4	496	13,4 ± 6,8
C.V. (%)		102,0		50,4

^a Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis

A dose de LH não influenciou o número de embriões degenerados ou o número de estruturas não fecundadas (Tab. 4). Das 496 estruturas consideradas como viáveis, foram cultivadas 381, sendo 72, 48, 132, 106, 62 e 55 para os T1, T2, T3, T4, T5 e T6 respectivamente. Destas, 72,3%; 68,6%; 86,4%; 67,9%; 42,8% e 72,7% desenvolveram até o estágio de blastocisto eclodido (Tab. 5). Verificou-se ainda que os embriões do T3 apresentaram maior taxa de desenvolvimento ($P < 0,05$) quando comparados aos outros tratamentos. Pode-se observar que o aumento na dose de LH influenciou de forma negativa ($P < 0,05$) o desenvolvimento embrionário, onde somente 24 dos 56 embriões cultivados alcançaram o estágio de blastocisto eclodido.

Tabela 4. Números, médias e respectivos desvios-padrão (DP) das estruturas degeneradas recuperadas em função do número de camundongas superovuladas e que responderam, tratadas com hCG e diferentes doses de LH

Tratamento	Estruturas degeneradas/doadora superovulada ¹		Estruturas degeneradas/doadora que respondeu	
	Total	Média±DP	Total	Média DP
1 – 0,02 de LH	50 (n=10)	5,0 ± 4,5 ^a	50 (n=7)	7,1 ± 3,5 ^a
2 – 0,04 de LH	110 (n=10)	11,0 ± 10,9 ^a	110 (n=8)	13,7 ± 10,1 ^a
3 – 0,06 de LH	75 (n=10)	7,5 ± 5,9 ^a	75 (n=8)	9,4 ± 4,9 ^a
4 – 0,08 de LH	52 (n=10)	5,2 ± 4,8 ^a	52 (n=7)	7,4 ± 4,0 ^a
5 – 0,10 de LH	54 (n=10)	5,8 ± 5,4 ^a	54 (n=7)	8,3 ± 4,5 ^a
6 – 5UI de hCG	40 (n=10)	3,7 ± 3,6 ^a	40 (n=7)	5,1 ± 3,2 ^a
Total	441 (n=60)	6,3 ± 6,5	381 (n=44)	8,6 ± 6,2
C.V. (%)		102,9		71,2

¹Foram consideradas como degenerados os ovócitos e embriões classificados como degenerados

²Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 5. Porcentagem de desenvolvimento dos embriões obtidos de camundongas (*Mus musculus*), tratadas com hCG e diferentes doses de LH

Tratamentos	Embriões Cultivados	Porcentagem de Desenvolvimento
1 – 0,02 de LH	72	72,3% (47/75) ^a
2 – 0,04 de LH	48	68,6% (33/48) ^a
3 – 0,06 de LH	132	86,4% (114/132) ^b
4 – 0,08 de LH	106	67,9% (72/106) ^a
5 – 0,10 de LH	62	42,8% (24/56) ^c
6 – 5UI de hCG	55	72,7% (40/55) ^a
Total	475	69,5% (330/475)

^{a-c} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste do qui-quadrado

5.5. DISCUSSÃO

Observou-se uma elevada variação nos parâmetros avaliados em todos os tratamentos experimentais, demonstrando falta de uniformidade nas respostas ao tratamento superovulatório. Uma vez que o início do tratamento superovulatório ocorre em momentos desconhecidos do ciclo estral, isto pode ser um dos fatores que acarretam nesta alta

variabilidade (MAFFILI et al., 2003). Embora variabilidade seja observada também em animais de produção (HAIN, 1992), deve-se ressaltar que os hormônios indutores da superovulação, nestas espécies, são aplicados em momentos conhecidos do ciclo estral e que o protocolo adotado difere completamente do preconizado em pequenos roedores.

A eCG, por apresentar uma longa meia vida e uma alta atividade LH tem sido incriminada como uma das grandes responsáveis por esta variabilidade. Opavsky e Armsrong (1989) descreveram que baixas taxas de ovulação observadas são sugestivo da alta atividade LH inerente a molécula da eCG. Estudos anteriores reforçam esta tese, onde se observou ovulações na segunda e terceira noite pós-aplicação da hCG. Por outro lado, observações realizadas por Watson et al. (1983) indicaram a existência de ovulações precoces em ratos, em resposta a aplicação de 40UI da eCG e que ovulações podem ocorrer gradualmente em um considerável período de tempo. A hCG apresenta afinidade por receptores de LH, apresentando atividade biológica semelhante a este, porém com potência seis vezes superior ao LH. Esta característica aliada a sua maior meia vida tem promovido efeitos indesejados quando combinada com a eCG.

Estudo realizado por VIANA et al. (2006) (dados não publicados) levantou questionamentos sobre a real capacidade deste protocolo de superovulação sobre a produção de número significamente maior de embriões viáveis. Em seu estudo, comparando o número de embriões viáveis obtidos de fêmeas superovuladas e o número de camundongos nascidos, não observou aumento naquele quando se utilizou a combinação eCG - hCG para superovulação.

Em função da variação encontrada neste estudo e em estudos anteriores conduzidos em nosso laboratório, tentou-se substituir a hCG pelo LH visando a obtenção de uma resposta mais efetiva e homogênea. Pode-se constatar que a utilização do LH exógeno para promover a superovulação em fêmeas murinas doadoras de embriões é uma prática relativamente incomum nesta espécie. Isto resulta em um ínfimo acervo bibliográfico contendo dados sobre a melhor dose-resposta dessa gonadotropina hipofisária sobre a indução da ovulação em camundongas. Segundo Gómez et al. (2000), a dose de 10UI de LH resultou em melhoria da indução de ovulação em ratas, simultaneamente prevenindo a hipermeabilidade vascular e da expressão do fator de crescimento endotelial vascular nas células ovarianas. Em adição, os

autores desse experimento concluíram que entre as doses utilizadas, baixas concentrações de LH são mais efetivas para promover uma melhor indução de ovulação. Greve et al. (1983) e Callesen et al. (1986), também obtiveram melhores resultados, com fêmeas bovinas, em preparações com baixa concentração de LH, concluindo que, altas concentrações de LH para promover ovulação em fêmeas superovuladas causam ovulação prematura ou luteinização de folículos ocasionando, conseqüentemente, em baixa resposta superovulatória. Adicionalmente, segundo Picazo, 1996, em ovelhas, a administração do LH induziu um significativo aumento na freqüência de múltiplas ovulações.

No presente estudo, não se observou variação na resposta quando se utilizou diferentes doses de LH, com exceção no número de embriões viáveis obtidos das fêmeas que responderam. Os objetivos primários deste estudo eram o de obter a melhor dose resposta e a diminuição da variabilidade. Com base nos resultados obtidos, observou-se claramente que a alta variabilidade apresentada em estudos conduzidos em nosso laboratório e por outros autores não foi diminuída pela substituição da hCG pelo LH. Este resultado indica que fatores outros e não a hCG apresentam papel primordial nesta variabilidade.

A proporção de embriões que desenvolveram *in vitro* variou com a dose de LH e a hCG (controle). A dose de 0,06 de LH refletiu de forma positiva no número de embriões viáveis obtido das fêmeas que responderam. A proporção de embriões que desenvolveram em fêmeas tratadas com 0,10mg de LH foi inferior aos demais tratamentos, inclusive o controle, sugerindo que a competência de desenvolvimento foi influenciada pelo aumento da dose de LH. Tem sido reportado que tratamento com gonadotrofinas exógenas aumenta a freqüência de anormalidades cromossômicas e é possível que isto leve ao menor desenvolvimento embrionário (Ertzeid e Storeng, 2001; Van der Auwera e D'Hooghe, 2001). Embora este estudo não tenha avaliado o efeito de tratamentos sobre o número de células presentes no blastocisto, estudos realizados por Edward et al. (2005) em camundongos tem demonstrado que a eCG em alta dose diminui o número de células presentes e que este efeito seja provavelmente devido a atividade LH presente na molécula daquele hormônio. Assim sendo, é de se esperar que aplicações de LH em altas doses apresentem o mesmo efeito. Ainda, segundo estes autores, diferentes mecanismos ainda não completamente elucidados pode interferir nesta redução.

5.6. CONCLUSÃO

A administração de 0,06mg de LH para a superovulação de fêmeas doadoras de embriões levou a melhoria na qualidade e no desenvolvimento *in vitro* dos embriões murinos, além de incrementar os resultados quanto a indução da ovulação em camundongas doadoras de embriões.

5.7. AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Márcio Ferreira e Alexandre Jader, pela ajuda na superovulação das fêmeas doadoras de embriões.

5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, v. 25, p. 71 - 86, 1986.
- EDWARDS, L.J.; KIND, K.L.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 288, p. 845 - 851, 2005.
- ERTZEID, G.; STORENG, R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*, v. 16, p. 221 - 225, 2001.
- GÓMEZ, R.; LIMA, I.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction Research*, v. 127, p. 483 - 489, 2004.
- GOMEZ, R.; LIMA, I.; SIMON, C.; PELLICER, A. Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Theriogenology*, v. 54, p. 507 - 521, 2000.
- GONZÁLEZ, F. H. D. Hormônios Hipotálamo-Hipofisários. In: _____, **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, 2002
- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nordisk Veterinaer Medicin*, v. 35, p. 408 - 21, 1983.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, v. 38, p. 269 - 275, 1992.
- HOFF, J.D.; QUIGLEY, M.E.; YEN, S.S.C. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 57, p. 792 - 796, 1983.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CONSTANTINI, F., LACY, E. **Manipulating the mouse embryo**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 188p.
- KAUR, C.; GURAYA, S.S. Enhancement of ovulation by luteinizing hormone in cyclic albino-rats. *International Journal of Fertility*, v. 36, p. 238 - 242, 1991.
- KENNEDY, L., G., BOLAND, M. P., GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, v. 19, p. 823 - 832, 1983

- MAFFILL, V.V.; TORRES, C.A.A.; SOARES FILHO, P.M.; SILVA, M.R.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; AMORIM, L.S.; SANTOS, A.D.F.; MORAES, E.A. Efeito da somatotropina bovina na resposta superovulatório e taxa de clivagem de zigotos de camundongas (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.377 - 379, 2001.
- MAFFILL, V.V.; TORRES, C.A.A.; CARVALHO, G.R.; AMORIM, L.S.; MORAES, E.A.; FURST, R. Efeito do horário de aplicação e dosagem de somatotropina bovina recombinante sobre o número, qualidade e taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões obtidos de camundongas superovuladas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p.684-689, 2003.
- OPAVSKY, M.A.; ARMSTRONG, D.T. Effects of luteinizing hormone on superovulatory and steroidogenic responses of rat ovaries to infusion with follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 15 - 25, 1989.
- PICAZO, R. A.; COCERO, M. J.; BARRAGÁN, M. L.; LOPEZ SEBASTIAN, A. Effects of LH administration at the end of na FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. **Theriogenology**, v. 45, p. 1065 - 1073, 1996.
- POZZER, M. A., MATTOS, A.L.G., FERRARRI, A. N., Efeito da superovulação em *Mus Musculus* com hMG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 11, p. 143-147, 1987.
- VAN DER AUWERA, I; D'HOOGHE, T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1237 - 1243, 2001.
- WATSON, E.A.; EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulated. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 67, p. 91 - 96, 1983.