

Um método simples e confiável para a detecção da gestação em camundongos

KELVIN ANDRADE; ² **BIANKA MACHADO ZANINI**; ³ **JORGEA PRADIEE**;
⁴ **GABRIEL VEIGA**; ⁵ **CARLOS BARROS**; ⁶ **AUGUSTO SCHNEIDER**.

¹Universidade Federal de Pelotas – kelvinruan2@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – jorgeapradiee@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – gabrielbveiga@icloud.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – barroscapel@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estudos que examinam influências genéticas e ambientais sobre o desenvolvimento requerem gestações cronometradas para um estadiamento embrionário preciso. O início da gravidez, tipicamente referido como dia gestacional 0 (GD0), é detectado pela presença de um plug de cópula. No entanto, a presença de um tampão não é definitiva para prever a gravidez. De fato, em algumas linhagens de camundongos, a detecção de plugues após o acasalamento noturno determina a gravidez verdadeira com menos de 50% de precisão. (SILVER LM, 1995). Os métodos mais comumente utilizados para detectar a gravidez em camundongos incluem procurar por um tampão vaginal ou de cópula (MADER SL, 2009), ultrassonografia (Brown SD, et al., 2006) e ganho de peso (FINAY JB, 2015).

Os ciclos estrais de camundongos fêmeas também podem ser afetados pelas condições do alojamento do animal. Fêmeas alojadas em gaiolas, em regime de superpopulação, sem a presença de machos, podem exibir uma fase chamada de anestro, caracterizada pela ausência de ciclos estrais. Quando expostas aos machos ou a seus feromônios, começam a ciclar em 48 horas. (SANTOS B S, 2002). A gestação pode ser confirmada por inspeção visual pno GD15 ou antes, dependendo da tensão e idade da mãe e do número de gestações anteriores. (Silver LM. 1995). Após o GD10, é possível observar um aumento no abdômen, confirmando assim o acasalamento onde os animais costumam pesar em torno de 18-20 g. (ANDRADE, et al., 2002). A gestação de camundongos leva em torno de 19-21 dias (SANTOS B S, 2002).

O objetivo deste estudo é validar o ganho de peso como indicador de gestação, sendo um método preciso, confiável e econômico. O ganho de peso materno foi selecionado como o parâmetro por ser uma medida objetiva e facilmente obtida, requer pouco ou nenhum treinamento e induz estresse mínimo ao animal. Além disso, o peso tem se mostrado um indicador mais confiável da gravidez quando comparado com outros métodos, por exemplo a detecção do tampão vaginal. (MADER SL, 2009).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 14 camundongos fêmeas e 7 camundongos machos da linhagem C57BL/6 adultos, e mantidos em condições controladas de temperatura, luz e umidade (22 ± 2 °C, ciclos de 12 horas claro/12 horas escuro e 40%-60%

respectivamente). Os camundongos foram alojados em caixas com as seguintes características: medidas 65x25x15 cm, feita de prolipropileno com tampa em arame galvanizado, com bebedouro em prolipropileno com capacidade de 700 ml, rolha cônica de borracha e bico de aço inoxidável. O assoalho foi coberto por maravalha. Alojados em grupos de 03 (três) animais por gaiola (um macho e duas fêmeas) conforme recomendações, com presença de tubo PVC, colocados para o acasalados na proporção de 1 macho para duas fêmeas no mesmo intervalo de tempo em gaiolas separadas. Após a identificação de cópula as fêmeas foram separadas em outra caixa que recebeu água e dieta padrão *ad libitum*. Os camundongos foram pesados semanalmente para garantir à eficácia adequada do regime de alimentação.

A discriminação da gravidez foi de acordo com o ganho de peso, presença de plugues vaginais ou através de esfregaço contendo espermatozoides. Para a visualização de espermatozoides presentes no epitélio vaginal o dia do estro foi considerado dia zero. Diariamente, foi colhido material celular vaginal, com auxílio de uma micropipeta, inserindo a ponteira esterilizada com solução salina. O material colhido foi depositado em lâmina de vidro, previamente limpa e desengordurada, procedendo-se posteriormente à fixação do material e coloração celular por panótico rápido.

O processo iniciou-se com a imersão das lâminas na solução nº 1 (triarilmelano a 0,1%), mantendo-se um movimento contínuo para cima e para baixo por 5-10 s (5-10 imersões por 1 s cada). Em seguida, as extensões foram imersas na solução nº 2 (xanteno a 0,1%), repetindo o mesmo procedimento. Após escorrer, as lâminas foram imersas na solução nº 3 (tiazina a 0,1%), repetindo-se o mesmo procedimento. As lâminas foram enxaguadas com água destilada e deixadas ao ar livre para secagem. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico.

Fêmeas sem plugues de cópula ou sem a identificação de espermatozoides na lâmina, foram devolvidos à colônia de reprodução após serem pesadas.

Após o desmame (21 dias) a prole foi separada em machos e fêmeas. Receberam dieta normal *ad libitum* até os 5 meses de vida. O estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA), sob o número 8367-2018.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o teste de t no software GraphPad Prism 6, assumindo-se um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de peso dos camundongos fêmeas não prenhas no dia GD1 é de $18,9 \pm 0,4$ g já a média do peso das prenhas no GD1 é de $19,2 \pm 0,8$ g. No GD10 é possível ver a diferença de peso com aproximadamente 20 g de peso para as não gestantes e de 23 g para as gestantes no GD10. Nota-se uma diferença de aproximadamente 3g, observando o ganho de peso de três vezes mais no grupo de fêmeas gestantes ($P=0,01$, Figura 1).

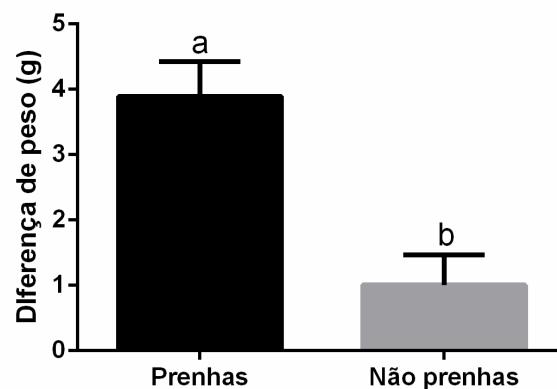


Figura 1 - Fêmeas que foram analisados após a exposição com machos.

O peso ganho no processo de gravidez assume grande importância, visto que o aumento ponderal durante a gestação é óbvio e esperado, provocado não só pela presença do feto em crescimento, mas também por retenção de água, aumento do volume de sangue circulante, ganho de gordura, aumento da massa muscular do útero e etc. O resultado encontrado no nosso estudo discrimina com precisão que animais gestantes, apresentam em torno de quatro gramas a mais que aquelas não gestantes. Ou seja, o peso corporal pode ser usado como indicador de prenhez em camundongos C57BL/6.

Esfregaço vaginal corado, em fase de Estro, representado por células superficiais, com aspecto anucleadas, poucas células nucleadas e ausência de polimorfonucleares, com todas as células apresentando coloração violeta, devido às fraturas do núcleo e penetração abundante de corante (Figura 2). (Aumento de 40 X). Sendo feita a observação após 5 minutos em microscopia de luz comum, apresentando os espermatozoides corados em azul intenso (seta). Nestas análises foi possível observar que na maioria das lâminas não foi observado a presença de espermatozóide. Apesar de não ser observado o espermatozóide, as fêmeas ganharam peso e ficaram gestantes. Isto indica que a análise do esfregaço vaginal não constitui um método efetivo de detecção da gestação em camundongos C57BL/6. Provavelmente, tanto o plug quanto a presença de esperma desaparecem no intervalo entre uma avaliação e outra. Apesar de não se observar a presença de espermatozoides, pode ser observados que as fêmeas gestantes permanecem na fase de diestro segundo as características do esfregaço, o que pode ser complementar a avaliação do ganho de peso e auxiliar na detecção da gestação.

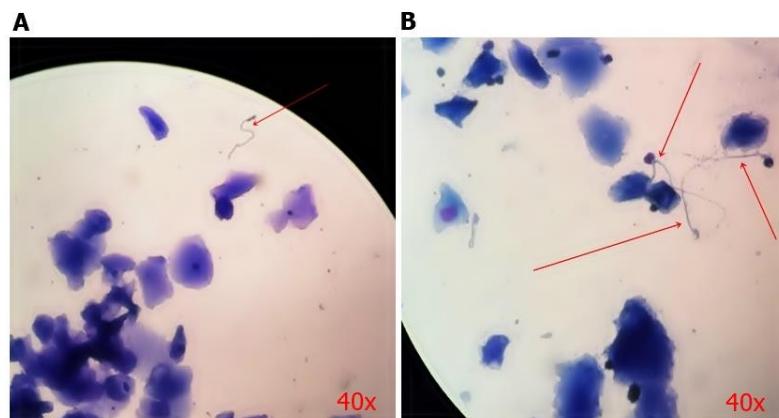


Figura 2 – A e B. Aumento de 40x. Fotomicrográfica de esfregaço vaginal - Identificação de espermatozoides em lâmina corada com panótico, após exposição a um macho.

4. CONCLUSÃO

Assim esse estudo demonstra que o ganho de peso pode ser usado para distinguir de forma confiável camundongos fêmeas gestantes de não gestantes. Em qualquer criação de animais experimentais, atender os preceitos legais e éticos é fundamental na produção de animais, através de controles reprodutivos e genéticos estritos, o número de animais poderá ser reduzido, evitando-se descartes desnecessários. Ao fornecer um método simples e confiável para aumentar a precisão da detecção da gestação em camundongos consanguíneos, os dados apresentados aqui podem ser usados para melhorar a eficiência e o custo-eficácia de estudos de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books . (<http://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-16.pdf>)

ANDRADE, A. P. (2002). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. RJ: FIOCRUZ

BROWN, Stephen D; Zurakowski, David; Rodriguez, Diana P; Dunning, Patricia S; Hurley, Richard J; Taylor, George A, **Comparative Medicine**, Volume 56, Number 4, August 2006, pp. 262-271(10) American Association for Laboratory Animal Science . **Ultrasound diagnosis of mouse pregnancy and gestational staging**.

FINLAY JB, Liu X e Ermel RW, Adamson TW. **Maternal weight gain as a predictor of litter size in Swiss Webster, C57BL / 6J and BALB / cJ mice**. Journal of the American Association of Laboratory Animal Science: JAALAS. 2015; 54 (6): 694-699.

MADER SL, Libal NL, Pritchett-Corning K, Yang R, Murphy SJ. **Refining timed pregnancies in two strains of genetically engineered mice**. *Lab animal*. 2009;38(9):305-310. doi:10.1038/lab.0909-305.

SANTOS B S, 2002. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. RJ: FIOCRUZ

SILVER LM. 1995. **Genetics of the mouse: concepts and applications**. New York (NY): Oxford University Press.