



Influência de diferentes tipos de dieta sobre a obtenção de embriões coletados de camundongos fêmeas (*Mus musculus*) superovuladas

Influence of different diet types on embryo obtention from superovulated female mice (Mus musculus)

C.M.F. Sobrinho¹, J.B.P. Ferreira, T.M. Torres, L.J.C. Mendes, I.M. Folhadella Pires

Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

¹Correspondência: sobrinho@fiocruz.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi comparar a influência da administração, na fase pré-púbere, de diferentes dietas alimentares e formas de esterilização da ração sobre o número de embriões de duas células e a quantidade de estruturas coletadas de camundongos fêmeas superovuladas. Foram utilizados animais B6.129P2-Nos2, divididos em quatro grupos, conforme a ração comercial ingerida: G1- comum autoclavada; G2- comum não autoclavada; G3- para fins de reprodução e G4- comum irradiada. Os animais foram pesados semanalmente e alimentados com 184g da ração do grupo correspondente. Após duas semanas, as fêmeas foram superovuladas e acasaladas com machos férteis. Aquelas positivas tiveram sua tuba lavada com meio M2, e as estruturas embrionárias coletadas e classificadas. Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey. Fêmeas do G3 apresentaram maior ganho de peso do que as do G1 e do G4, mas semelhante às do G2. Já em relação à recuperação de embriões de duas células, as do G2 e do G4 obtiveram os melhores resultados, sem variação entre si. O grupo que apresentou as menores taxas de recuperação de embriões de duas células foi o G3. Conclui-se que o uso de ração comercial para reprodução na fase pré-púbere aumentou o ganho de peso dos animais, mas não o número de embriões de duas células em fêmeas superovuladas.

Palavras-chave: camundongos, dieta, embriões, esterilização.

Abstract

The aim of this study was to observe the influence, in prepuberal phase, of different diets and sterilization types on number of 2-cells embryos/ total quantity of structures recovered from superovulated female mice. B6.129P2-Nos2 animals were divided into 4 groups according to the commercial diet: G1-common autoclaved; G2- common not-autoclaved; G3-reproduction and G4-common irradiated. Animals were weighted weekly and fed with 184 g of corresponding diet. After two weeks, females were superovulated and mated with fertile males. Those positives had their tuba washed with M2 medium and the embryonic structures collected and classified. The results were analyzed by Variance Analysis and Tukey Test. G3 females had higher weight gain than G1 and G4, but similar to G2. In relation to recovery of 2 cells embryos, G2 and G4 had obtained the best results, without variation among themselves. The group that presented the smallest recovery rates of 2 cells embryos was G3. It was concluded that the use of reproduction diet in prepuberal phase increased animals' weight gain, but not number of 2-cells embryos in superovulated female mice.

Keywords: mouse, diet, embryo, sterilization.

Introdução

Os animais de laboratório representam modelos adequados ao estudo de diferentes modalidades da biologia e medicina experimentais, sendo um dos mais valiosos agentes biológicos a serviço da pesquisa biomédica. Recentemente, os avanços tecnológicos da genética molecular, especialmente na produção de animais transgênicos, têm permitido o desenvolvimento de um grande número de novos modelos animais, principalmente para estudos básicos e aplicados (Shaw e Nakagata, 2002; Landel, 2005), atendendo diretamente aos preceitos dos 3Rs (*Refine, Reduce, Replace*).

Estima-se que existam no mercado mundial mais de 2000 linhagens de camundongos geneticamente modificadas. A manutenção das características dessas linhagens é um ponto crucial dentro dos biotérios de criação e experimentação, haja vista que muitas podem apresentar problemas em sua reprodução. Estudos na área de biotecnologia têm sido desenvolvidos para solucionar essas dificuldades.

Poucos experimentos, contudo, foram realizados associando-se a nutrição e o desenvolvimento com a reprodução desses animais. Carvalho et al. (2003), em um estudo, acrescentam ainda que não apenas o fator nutricional como também a forma da ração ingerida afetam todos esses processos.

A ração na forma peletizada, além de oferecer o benefício de atender ao comportamento de roedor dos



camundongos (Ford, 1977), assegura que os animais não apresentem variações dos nutrientes ingeridos (Coates, 1986), proporcionando digestão semelhante entre eles. Em relação à composição, as proteínas são consideradas os principais nutrientes (Neves, 1996) para os animais na idade adulta, com sua necessidade aumentando ainda mais durante a gestação. Fêmeas gestantes com restrição proteica podem apresentar filhotes com baixo peso ao nascimento (Sharif et al., 2007).

Os desenvolvimentos embrionário e fetal em mamíferos, além de sensíveis às carências nutricionais, também são prejudicados pelo excesso de nutrientes e de substâncias tóxicas específicas. Esse excesso pode resultar em morte embrionária ou, em casos menos graves, na interrupção do crescimento do embrião normal (McEvoy et al., 2001).

Enquanto dietas hipoproteicas em fêmeas de camundongos gestantes afetam diretamente a sua prole (Millis e Offiah, 2006), a obesidade também traz um impacto negativo sobre a fertilidade (Igosheva et al., 2010; Mitchel et al., 2011). Em bovinos, o *status* nutricional da mãe é de grande importância para a sobrevivência dos embriões e a saúde dos filhotes, sendo este o fator a controlar a maior eficácia na reprodução (Webb et al., 2004, Fleming et al., 2012, Laguna-Barraza et al., 2013).

Com o intuito de melhorar a resposta reprodutiva nos animais de laboratório, aumentando a quantidade de embriões por fêmea, principalmente nas linhagens geneticamente modificadas, tem-se utilizado a superovulação. Essa técnica consiste na estimulação do desenvolvimento de um maior número de folículos e de ovulações mediante a aplicação de hormônios gonadotróficos (Jaume e Campos, 1992). A superovulação em camundongos tem sido estudada por vários autores (Kanter et al., 2004; Byers et al., 2006; Fortier et al., 2008; Merriman et al., 2012), e sua resposta varia de acordo com as linhagens e a idade das fêmeas utilizadas. Determinadas linhagens, tais como 129S1/SvImJ, BALB/cByJ, C57BL6/J, DBA/2J e NOD/LtJ, apresentam resposta positiva na recuperação de estruturas embrionárias, variando no número de embriões de duas células obtidos (Byers et al., 2006).

Outro fator a ser considerado quando se trata da dieta alimentar em roedores é a esterilização da ração. Alguns autores, como Reis (2008), afirmaram que o uso da autoclavagem como forma de esterilização é essencial para a eliminação de patógenos comuns em colônias de animais de laboratório. Entretanto, sabe-se que esta determina vários problemas relacionados à perda ou à diminuição do valor nutritivo, tendo um efeito acentuado sobre as proteínas (desnaturação) e algumas vitaminas (Wostman, 1975). Já a irradiação com raios gama apresenta efeitos adversos sobre o alfatocoferol e a tiamina, embora provavelmente seja a mais efetiva e a menos deletéria dos procedimentos de esterilização (CCAC, 1984; Neves, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi comparar como diferentes dietas comerciais e suas formas de esterilização, administradas na fase pré-púbere, podem afetar o número de embriões de duas células e a quantidade de estruturas recuperadas de fêmeas de camundongos superovuladas.

Material e Métodos

Rações

Foram utilizadas quatro rações comerciais, divididas de acordo com o grupo experimental: G1- ração comum autoclavada; G2 - ração comum não autoclavada; G3 - ração para fins de reprodução não autoclavada e G4 - ração comum irradiada. As rações foram mantidas em caixas plásticas previamente autoclavadas, conservadas à temperatura de 21°C, em ambiente controlado.

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem isogênica B6.129P2-*Nos2* (*Knock out*), criados em sistema convencional e pertencentes ao biotério de produção do Cecal/Fiocruz. Para cada grupo experimental (G1, G2, G3 e G4), foram utilizados cinco machos e cinco fêmeas. Ao iniciarem os experimentos, os machos apresentavam entre sete e oito semanas de idade, e as fêmeas entre três e quatro semanas. Os machos permaneceram no experimento, com a mesma dieta alimentar por oito semanas ($n = 5/\text{grupo}$). E as fêmeas foram eutanasiadas na terceira semana de alimentação. Realizaram-se três repetições por grupo experimental ($n = 15$).

Avaliação de ganho de peso e reprodução

Ao chegarem ao laboratório, os animais foram acondicionados em gaiolas microisoladoras; as fêmeas em grupo de cinco, e os machos individualmente. Avaliou-se o peso de cada um dos animais, quatro dias após a sua chegada, quando, então, foram colocados para se alimentarem com 184g da ração comercial do grupo correspondente. Esse volume foi fixado para facilitar o manejo, considerando-se o consumo de 20g de ração por camundongo/semana; dessa forma, a dieta foi fornecida *ad libitum*. Foram realizadas pesagens individuais em intervalos de uma semana. Após serem submetidas à dieta nutricional durante duas semanas, as fêmeas foram



superovuladas e acasaladas com os machos férteis. Aquelas que apresentaram tampão vaginal, ao final da terceira semana foram eutanasiadas para a coleta de seus embriões, Os machos permaneceram na colônia para os acasalamentos posteriores.

Superovulação e coleta de estruturas embrionárias

As fêmeas foram superovuladas com 7.5UI de eCG (Novormon® Schering-Plough/ 150µL/animal) e 7.5UI de hCG (Chorulon® Intervet/ 150µL/animal), na região intraperitoneal, com intervalo de 48 horas, no horário da tarde (16h). Após a aplicação do segundo hormônio, foram colocadas, de forma aleatória, na presença do macho do seu respectivo grupo, para a cópula. Na manhã seguinte, verificou-se a presença do tampão vaginal. Fêmeas positivas foram separadas em uma gaiola. Vinte e quatro horas após a verificação do tampão vaginal, foram eutanasiadas, por deslocamento cervical, e suas tubas uterinas coletadas e acondicionados em placas de petri (60x15mm).

Com o auxílio do microscópio estereoscópico (200x), a região do infundíbulo foi localizada e lavada com meio M2® (Sigma-Aldrich), utilizando-se agulha de 32 1/2G acoplada à seringa de 1mL. As estruturas embrionárias foram colocadas em gotas de 50µL de meio M2 para posterior classificação.

Após todas as fêmeas passarem pelo mesmo procedimento, as principais características morfológicas das estruturas embrionárias foram avaliadas e classificadas em: zona pelúcida rompida, zigoto, oócito não fecundado, embrião degenerado, embrião de duas células viável.

Análise estatística

Para avaliar a influência da dieta nutricional e a forma de esterilização sobre o ganho de peso dos animais e sobre o número de embriões de duas células/quantidade de estruturas embrionárias recuperadas, utilizou-se análise de variância (Ayres et al., 2007) com comparação de médias pelo teste de Tukey.

Considerações éticas

Este trabalho utilizou animais licenciados pela Ceua/Fiocruz nº LW-33/14 e está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

Resultados e Discussão

Fêmeas do G3, alimentadas com ração para fins de reprodução, apresentaram maior média de peso (G3:19,26 ± 1,91g) que as fêmeas do G1 e do G4 (G1:16,68 ± 1,66g /P < 0,01; G4:18,11 ± 2,58g/P < 0,05), mas semelhante às fêmeas tratadas com ração comum não autoclavada (G2:18,39 ± 1,94g). Embora as fêmeas do G4 tenham média de peso semelhante à observada no G2, esta foi superior à do G1, cujo desempenho foi significativamente inferior a todos os grupos (P < 0,01) (Tab.1).

Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso (g) de fêmeas de camundongos submetidas a diferentes tipos de ração comercial.

Tratamento	Peso (g) (Média ± SD)
G1	16,68 ± 1,66 ^a
G2	18,39 ± 1,94 ^{bc}
G3	19,26 ± 1,91 ^b
G4	18,11 ± 2,58 ^c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, P < 0.01 entre os grupos 1 e 2, 1 e 4 e P < 0.05 entre 3 e 4).

Os componentes que mais sofrem a ação de degradação durante o processo de autoclavagem são as proteínas e as vitaminas (Neves, 1996). E como estes são os componentes da ração que mais influenciam no desenvolvimento dos animais, possivelmente o que explicaria o menor ganho de peso de alguns camundongos é a qualidade proteica da ração que lhes foi fornecida (Reis, 2008).

Esse fato pode ser corroborado pelos estudos de Oliveira et al. (2003), nos quais se verificou que os animais desnutridos mostraram uma significativa diminuição no ganho de peso e na evolução ponderal durante o tratamento com uma dieta hipoproteica. Os relatos acima sugerem que houve uma deficiência, possivelmente qualitativa, em determinados componentes nutricionais da ração do G1, sendo esta a razão pela qual o ganho de peso desse grupo foi inferior aos demais.

Ao avaliar-se a efetividade do protocolo de superovulação utilizado, observou-se que 92,31% (12/13)



das fêmeas do G2 responderam positivamente a este, apresentando tampão vaginal. Nos G3 e G4, a resposta foi semelhante, uma vez que se verificaram 80,0% (12/15) e 86,7% (13/15), respectivamente. Já no G1, o percentual de fêmeas com tampão vaginal foi inferior aos demais grupos (66,7%; 10/15). Na literatura, são observadas variadas respostas ao protocolo de superovulação. Segundo Ferreira et al. (2014), as linhagens C.Cg-Tg (DO11.10) 10Dlo (DO11.10), BALB/c-TgN (APRIL) 2919Mh (APRIL) e B6.129SVEV-CCBP2 (D6) apresentaram resultados de 54, 60 e 81%, respectivamente, tendo a última linhagem resultado semelhante ao observado no G3.

Em relação ao número total de estruturas, não houve diferença entre os tratamentos utilizados (Tab.2). Entretanto, quando se trata de embriões de duas células, G2 e G4 obtiveram os melhores resultados (G2: 34,33 ± 13,05 e G4: 35,00 ± 4,58) (P < 0,05), sem, no entanto, variarem significativamente entre si. Os grupos que apresentaram as menores taxas de recuperação de embriões de duas células foram G1: 24,33 ± 3,51 e G3: 13,00 ± 7,93 (Tab. 2).

Tabela 2: Média e desvio-padrão do número total de estruturas e do número de embriões de duas células de fêmeas de camundongos submetidas a diferentes tipos de ração comercial.

Tratamento	Estruturas totais (média ± SD)	Embriões de duas células (média ± SD)
G1	31,33 ± 5,86 ^a	24,33 ± 3,51 ^a
G2	56,33 ± 11,24 ^a	34,33 ± 13,05 ^b
G3	47,67 ± 24,99 ^a	13,00 ± 7,93 ^c
G4	55,33 ± 6,42 ^a	35,00 ± 4,58 ^{bd}

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, P < 0.05).

Animais que receberam ração que não sofreu interferência do calor, como as rações não autoclavadas (G2) e irradiadas (G4), obtiveram os melhores resultados para a taxa de recuperação embrionária. Acredita-se que isso se deve ao fato de o calor promover perdas nutricionais, levando à diminuição do número de embriões de duas células produzidos.

Observa-se ainda que os animais do G3 foram os que apresentaram as melhores taxas para ganho de peso, no entanto menores taxas para recuperação de embriões de duas células. Provavelmente porque essa ração é formulada para as fêmeas que já se encontram em fase reprodutiva, o que não é o caso deste experimento, no qual as fêmeas usadas na superovulação eram pré-púberes. Considera-se ainda que o maior ganho de peso pode ter interferido negativamente no número de embriões de duas células dos embriões obtidos, já que não houve diferença no número total de embriões coletados.

Ao se analisarem esses dados, surge a necessidade de conhecimento mais aprofundado sobre como os fatores nutricionais agem, para o aprimoramento das biotecnologias, a fim de maximizar a eficácia da reprodução do camundongo e gerar conhecimento para a ciência de animais de laboratório.

Conclusão

O uso de ração comercial para fins de reprodução na fase pré-púbere levou a um maior ganho de peso, entretanto interferiu negativamente na recuperação de embriões de duas células em fêmeas superovuladas. Já as rações comuns não autoclavadas e comuns irradiadas interferiram positivamente nas taxas de recuperação de embriões de duas células.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao tecnólogo Dr. Adolpho Marlon Antoniol de Moura (Cecal/Fiocruz), pelo apoio prestado na aquisição de insumos; aos professores. Dra. Fabiana Batalha Knackfuss e Dr. Rafael Brandão Varela, pelo apoio na análise estatística; e à direção do Cecal/Fiocruz, pelo financiamento do experimento e pela publicação do artigo.

Referências

- Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM, 364p, 2007.
- Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). Theriogenology, v.65. p.1716-1726, 2006.
- Carvalho RA, Carvalho SA, Mourão FRP, Brito MVH. Avaliação nutricional de ração comercial para camundongos (*Mus musculus*). Rev Para Med, v.17, p. 23-28, 2003.
- Canadian Council On Animal Care (CCAC). Guide to the care and use of experimental animals. Canadian



Council on Animal Care, Ottawa, v.2, 208p, 1984.

Coates ME. The influence of the diet of laboratory animals on experimental results. In: Rothschild HA, Rosenkranz A, Duarte F A, Moura. Laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. São Paulo, Brasil, 1986. p.13-21.

Ferreira JBP, Folhadella-Pires IM, Sobrinho CMF. Avaliação da resposta de fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) geneticamente modificados B6.129SVEV-CCBP2(D6), C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo(DO11.10) E BALB/c-TgN(APRIL)2919Mh(APRIL) submetidas a protocolo de superovulação, 2014. Disponível em: http://www.cobea.org.br/download/download?ID_DOWNLOAD=38.

Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ, Lucas ES, Watkins AJ. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. Anim Reprod Sci, v.130, p.193-197, 2012.

Ford DJ. Influence of diet pellet hardness and particle size on food utilization by mice, rats and hamsters. Lab Anim, v.11, p.241-246, 1977.

Fortier A, Lopes FL, Darricarrère N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. Hum Mol Gen, v.17, p.1653-1665, 2008.

Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchen MR, McConnell J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. Obes Embryo Metab, v.5, p.1-8, 2010.

Jaume CM, Campos AL. Efeito do "PMSG" de diferentes origens na superovulação de camundongos. Pesq Agrop Bras, v.27, p.41-45, 1992.

Kanter M, Yildiz C, Meral I, Koc A, Tasal I. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. Theriogenology, v.61, p.393-398, 2004.

Laguna-Barraza R, Bermejo-Álvarez P, Ramos-Ibeas P, de Frutos C, LópezCardona AP, Calle A, Fernández-Gonzalez R, Pericuesta E, Ramírez MA, Gutierrez-Adan A. Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability. Reprod Fertil Dev, v.25, p.38-47, 2013.

Landel C.P. Archiving mouse strains by cryopreservation. Lab Anim, v.34, p.50-57, 2005.

McEvoy TG, Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Sinclair KD. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. Theriogenology, v.55, p.113-129, 2001.

Merriman JA, Jennings PC, McLaughlin EA, Jones KT. Effect of Aging on Superovulation Efficiency, Aneuploidy Rates, and Sister Chromatid Cohesion in Mice Aged Up to 15 Months. Biol Reprod, v.86, p.1-6, 2012.

Millis RM, Offiah GU. Dietary protein deficiency in pregnant mice offspring. Life Sci, v.80, p.1184-1188, 2006.

Mitchell M, Bakos HD, Lane M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. Fertil. Steril, v. 95, n. 4, 2011.

Neves SP. Nutrição. In: Manual para técnicos em bioterismo. 2.ed. São Paulo: COBEA 1996, p. 87-107.

Oliveira JC, Silva APS, Barbosa FB. Avaliação da evolução ponderal e homeostasia glicídica de ratos submetidos à desnutrição proteica lactacional. Universidade do Rio Grande do Norte. Expressão, Mossoró, v.34, p.53-60, 2003.

Reis KT. Comparação do desenvolvimento de camundongos alimentados com ração comercial autoclavável de diferentes marcas. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2008.

Sharif J, Nakamura M, Ito T, Kimura Y, Nagamune T, Mitsuya K, Okamura K. Food restriction in pregnant mice can induce changes in histone modifications and suppress gene expression in fetus. Nucleic Acids Symp, v.51, p.125-126, 2007. Abstract.

Shaw JM, Nakagata N. Cryopreservation of transgenic mouse lines. Methods Mol Biol, v.180, p.207-228, 2002.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular interactions and nutritional influences. J Anim Sci Suppl, v.82, p.63-74, 2004.

Wostman BS. Guide for the care and use of laboratory animals. 1975. Portuguese, Edition, 1996.