

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

AMANDA GODOI NAVAREZI

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM NOD
(NONOBESE DIABETIC)**

CAMPO GRANDE
2022

AMANDA GODOI NAVAREZI

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM NOD
(NONOBESE DIABETIC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Gediendson Ribeiro de Araujo.

CAMPO GRANDE
2022

AMANDA GODOI NAVAREZI

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM NOD
(NONOBESE DIABETIC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Gediendson Ribeiro de Araujo.

Banca Examinadora:

Nota/Conceito

Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza – UFMS

Dra. Adriana Conceição Guércio Menezes – UFMS

Prof^a. Dra. Thyara de Deco Souza e Araujo – UFMS

Prof^a. Dra. Paula Felipe Martinez – UFMS

Dra. Telma Bazzano da Silva – UFMS

AVALIAÇÃO FINAL: () Aprovada

() Reprovada

Ao Biotério Central da UFMS
e seu compromisso com os
Animais.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar sempre o meu caminho, me dando forças para perseverar, superar as dificuldades e por me colocar na direção certa. Sem Ele eu nada seria.

Aos animais que participaram desta pesquisa, e os todos os outros que contribuem com a ciência ao lançar luz à tantos problemas que acometem diversas espécies, inclusive a humana.

Aos meu marido, Manoel, por cada palavra de incentivo, compreensão e pelo seu apoio incondicional nos meus dias mais difíceis, e por vibrar comigo a cada conquista.

Aos meus familiares, minha mãe Rose e meu irmão Alexandre, meu pai Emerson, à Luzia, que é mais que minha madrastra, meu irmão Lucas e minha cunhada Camila, que estão sempre comigo me apoiando.

Ao Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza, por me orientar e por ensinar estatística com maestria, e por todo seu trabalho e dedicação à Ciência de Animais de Laboratório.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Gediendson Ribeiro de Araújo, pelo seu dom em ensinar com facilidade as mais complexas técnicas de reprodução assistida, muito do que aprendi a respeito de reprodução dos animais de laboratório devo a ele.

Ao Biotério Central da UFMS, pelo comprometimento em produzir animais com qualidade, contribuindo com a pesquisa na nossa Instituição, além da sua dedicação no bem-estar dos animais. Tenho um orgulho imenso em fazer parte dessa equipe.

À minha chefe e mentora Telma Bazzano, por ter me ensinado tudo que sei a respeito de Ciência de Animais de Laboratório.

À Adriana, pela amizade, pelos conselhos, e por cada ensinamento sobre comportamento e bem-estar dos animais.

À Maria Paula e sua paciência inesgotável, pela amizade e por cada palavra de apoio e incentivo, e por não medir esforços em ajudar nossa equipe.

Aos meus amigos e companheiros da Área de Criação: Kely por podermos compartilhar nossas aflições e as melhores risadas; Jonas e Breno, pelas conversas divertidas e pela parceria todos os dias. E também à Mariazinha e Tuka, pela parceria e por todo apoio sempre.

À Sofia, que além de me auxiliar e me acompanhar em todos os procedimentos desse experimento, também se tornou uma amiga dentro e fora do laboratório.

Ao Ian, que além de primo, é um estagiário dedicado, e me acompanhou e ajudou muito desde o manejo dos animais até os procedimentos experimentais.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e à UFMS, pela oportunidade de aprendizado. Espero poder contribuir cada vez mais com essa instituição em que tenho um imenso orgulho em fazer parte.

“Que a tua vida não seja estéril.

Sê útil. Deixa rastro.”

(Josémaria Escrivá de Balaguer)

RESUMO

A demanda por novos modelos experimentais cresce proporcionalmente à medida que os ensaios pré-clínicos necessitam de resultados mais refinados e reprodutíveis, dessa maneira contribuindo também com um dos principais conceitos na Ciência de Animais de Laboratório: os 3 Rs, sendo eles a redução do número de animais, refinamento de biomodelos e técnicas que buscam amenizar o estresse e desconforto, e a substituição (*replacement*) de modelos experimentais por técnicas alternativas validadas. Um exemplo de biomodelo criado em laboratório é o camundongo NOD (Nonobese Diabetic), que tem contribuído principalmente para pesquisas que envolvem o diabetes mellitus tipo 1, uma vez que o processo autoimune ocorre de maneira muito semelhante aos humanos, além de outras diversas áreas que podem ser estudadas a partir desse modelo experimental. Tendo isso em vista, o Biotério Central da UFMS recebeu casais de NOD, que foram estabelecidos na Área de Criação, onde são produzidos para fornecimento aos pesquisadores da Instituição. Com o estabelecimento dessa nova linhagem, o presente trabalho buscou avaliar a reprodução do camundongo NOD mantidos na colônia de criação e comparar a capacidade de produção de oócitos e embriões de fêmeas superovuladas e sem estímulo hormonal. Para calcular os índices de produtividade foram utilizados dados de 4 partos de 20 casais mantidos em sistema de acasalamento monogâmico intensivo na área de criação. Para obtenção de oócitos e embriões, utilizou-se o efeito Whitten para sincronização do estro em todas as fêmeas do estudo. O protocolo hormonal foi feito em 20 fêmeas através da administração via IP de 7,5UI de PMSG no dia 0, e 48 horas depois 7,5UI de hCG seguido do acasalamento de 10 fêmeas com machos vasectomizados (n=10) para obtenção de oócitos, e as outras 10 com machos inteiros (n=10) para obtenção de embriões. No dia 4 observou-se a presença de tampões vaginais e coleta dos oócitos. No dia 5 foi feita a coleta dos embriões. O mesmo procedimento de acasalamento foi feito para o grupo das fêmeas sem o estímulo hormonal (n=40). Na colônia de criação foi observada uma média da ninhada de $7,50 \pm 0,68$; $5,25 \pm 0,95$; $2,85 \pm 0,88$ e $2,20 \pm 0,73$, do primeiro ao quarto parto respectivamente. Nas fêmeas que não receberam estímulo hormonal, foram obtidos uma média de $6,25 \pm 1,15$ oócitos e $2,90 \pm 0,86$ embriões em fase de 2 células (D2), enquanto as superovuladas obtiveram $79,20 \pm 8,43$ oócitos e $19,90 \pm 7,90$ embriões D2. Em relação a porcentagem de embriões viáveis (D2) sobre o total de embriões

observados, o grupo natural obteve em média $20,74 \pm 6,27$ e o grupo das fêmeas superovuladas apresentou $24,71 \pm 6,26$. Dessa maneira concluiu-se que em acasalamento monogâmico intensivo, a linhagem NOD apresenta uma queda significativa a partir do terceiro parto, e apresentam resposta satisfatória à superovulação quanto ao número de oócitos e embriões, mas em relação à porcentagem de embriões viáveis não houve diferença significativa entre os grupos. Portanto, a superovulação é uma opção viável para obtenção de oócitos e embriões com um número reduzido de animais, sendo uma ferramenta importante para a criação de um banco de germoplasma e reprodução assistida da linhagem NOD.

Descritores: superovulação; camundongos endogâmicos NOD; comportamento sexual animal; oócitos; embrião de mamíferos.

ABSTRACT

The demand for new experimental models grows proportionately as pre-clinical tests need more refined and reproducible results, thus also contributing to one of the main concepts in Laboratory Animal Science: the 3 Rs, which are the reduction of animals in research, refined biomodels and techniques who seek to alleviate stress and discomfort, and replacement of experimental models with validated alternative techniques. An example of a biomodel created in the laboratory is the NOD mice (Nonobese Diabetic), which has contributed mainly to research involving type 1 diabetes mellitus, since the autoimmune process occurs in a very similar way to humans, in addition to several other areas that can be studied from this experimental model. With this in mind, the UFMS Central Animal Facility received NOD couples, which were established in the Breeding Area, where they are produced for supply to the Institution's researchers. With the establishment of this new strain, the present work sought to evaluate the reproduction of NOD mice, mated in the breeding colony, and in obtaining oocytes and embryos with and without hormonal stimulation. Data from 4 births of 20 couples kept in intensive monogamous mating system in the breeding area were used to calculate the productivity indexes. To obtain oocytes and embryos, the Whitten effect was used to synchronize estrus in all females in the study. The hormonal protocol was performed in 20 females through the administration via IP of 7.5IU of PMSG on day 0, and 48 hours later 7.5IU of hCG followed by mating of 10 females with vasectomized males (n=10) to obtain oocytes and the other 10 with intact males (n=10) to obtain embryos. On day 4, the presence of vaginal tampons and oocyte collection were observed. On day 5, embryos were collected. The same mating procedure was performed for the group of females without hormonal stimulation (n=40). In the breeding colony, a litter average of 7.50 ± 0.68 was observed; 5.25 ± 0.95 ; 2.85 ± 0.88 and 2.20 ± 0.73 , from the first to the fourth delivery, respectively. In females that did not receive hormonal stimulation, an average of 6.25 ± 1.15 oocytes and 2.90 ± 0.86 embryos in the 2-cell phase (D2) were obtained, while the superovulated females obtained 79.20 ± 8.43 oocytes and 19.90 ± 7.90 D2 embryos. Regarding the percentage of viable embryos (D2) over the total number of embryos observed, the natural group obtained an average of 20.74 ± 6.27 and the group of superovulated females presented 24.71 ± 6.26 . Thus, it was concluded that in intensive monogamous mating, the NOD strain shows a significant drop from the third parturition, and they

present a satisfactory response to superovulation in terms of the number of oocytes and embryos, but in relation to the percentage of viable embryos there was no significant difference between groups. Therefore, superovulation is a viable option for obtaining oocytes and embryos with a reduced number of animals, being an important tool for the creation of a germplasm bank and assisted reproduction of the NOD strain.

Descriptors: superovulation; Inbred NOD Mice; animal mating behavior; oocytes; mammalian embryo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sexagem de camundongos adultos	20
Figura 2 – Aparelho reprodutivo de camundongo macho	21
Figura 3 – Aparelho reprodutivo de camundongo fêmea	21
Figura 4 – Plugue vaginal em uma fêmea NOD, produzido após a cópula	24
Figura 5 – Camundongo NOD	26
Figura 6 – Casal NOD com sua prole	27
Figura 7 – Animais alojados em caixas de polipropileno	33
Figura 8 – Ovário apresentando Corpo Lúteo e oviduto intumescido	35
Figura 9 – Ampola intumescida e ampola rompida	36
Figura 10 – Gráfico apresentando o total de filhotes, por sexo e no total, em cada parto/momento avaliado	40
Figura 11 – Complexo cumulus-oócitos íntegros e degenerados	41
Figura 12 – Embriões em fase de duas células (D2) e desintegrados	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da comparação entre sexos e entre partos/momentos, em relação à quantidade de filhotes por parto e média da ninhada.	39
Tabela 2 – Resultados referentes à taxa de fertilidade, índice de natalidade e taxa de prolificidade dos casais e filhotes avaliados neste estudo.	40
Tabela 3 – Resultados da comparação entre casais que receberam indução hormonal para a ovulação e aquelas que não receberam, em relação à quantidade de oócitos totais, embriões na fase D2, embriões degenerados, total de estruturas e percentual de embriões viáveis.	42

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CL	Corpo Lúteo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal
FIOCRUZ	Fundao Oswaldo Cruz
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (gonadotrofina coriônica humana)
IP	Intraperitoneal
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
LH	Hormônio luteinizante
NOD	<i>Nonobese Diabetic</i> (camundongo diabtico não obeso)
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin (hormônio foliculoestimulante obtido de guas prenhes)
SPF	<i>specific pathogen free</i> (animais livres de patógenos específicos)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

LISTAS DE SÍMBOLOS

β	Beta
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	O camundongo	18
2.2	Características reprodutivas dos camundongos.....	20
2.3	Linhagem NOD - “NONOBESE DIABETIC”	26
2.4	Superovulação e banco de germoplasma	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Tipo, local e período da pesquisa	32
4.2	Modelo experimental	32
4.3	Índices de produtividade	33
4.4	Vasectomia	34
4.5	Eutanásia	34
4.6	Obtenção de oócitos – monta natural	35
4.7	Obtenção de embriões – monta natural	36
4.8	Obtenção de oócitos após estimulação ovariana	37
4.9	Obtenção de embriões após estimulação ovariana	37
4.10	Análise estatística dos resultados	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Índices de produtividade	39
5.2	Estimulação hormonal x monta natural	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	47
8	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O camundongo tem sido a espécie mais utilizada como modelo experimental em pesquisas biomédicas desde o início do século XX (SIMMONS, 2004). Devido a características como ser de fácil criação e manejo, reprodução rápida e com uma ninhada numerosa, possuem um custo relativamente baixo para sua manutenção durante um experimento, além de poder apresentar uma grande diversidade genética (SOARES *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos, ocorreu um aumento na demanda por animais com um padrão genético mais definido, ou modificado, resultando na elaboração e expansão de linhagens isogênicas (inbreds), transgênicas, knockouts e mutantes (FRAJBLAT; AMARAL, 2017). O desenvolvimento de modelos específicos para cada linha de pesquisa vem ao encontro do princípio dos 3 Rs (Replacement/Refinement/Reduction) criado por Russell & Burch, que tem por objetivo a redução de animais produzidos, refinamento das pesquisas e substituição do uso de animais por métodos alternativos (RUSSELL; BURCH, 1959).

Atualmente estima-se que existam 133 instituições produtoras de animais de laboratório, distribuídas em 27 países, disponibilizando um número crescente de diferentes linhagens de modelos experimentais. A preservação genética e sanitária desses animais se torna um desafio para muitas instituições, que enfrentam restrição de espaço físico, limitação de recursos e de mão de obra capacitada, podendo interferir na reprodutibilidade de resultados. Além disso, muitas linhagens inbreds e geneticamente modificadas podem apresentar problemas reprodutivos, sendo vantajoso e em muitos casos necessário, a implementação de rotinas de reprodução assistida para sua manutenção (SALGADO; PASSOS, 2017).

Um exemplo de modelo experimental desenvolvido em laboratório é o camundongo da linhagem NOD (Nonobese Diabetic), desenvolvido em 1974 no Laboratório de Investigações de Shinogui (Osaka/Japão), derivado de uma linhagem para estudos da catarata. Essa linhagem tornou-se um modelo relevante para estudos de diabetes mellitus tipo 1, devido à similaridade do desenvolvimento da doença em humanos, marcada pela perda de células β no pâncreas e consequentemente implicação na produção de insulina (KIRSTEN, 2006).

A utilização de uma linhagem com predisposição genética para desenvolver o diabetes, evita o processo de indução por fármacos em um modelo convencional. Dessa maneira refinando a pesquisa experimental ao evitar a manipulação e estresse do animal, além de reduzir o tempo de duração do experimento, uma vez que não é necessário esperar o desenvolvimento da doença. Apesar da ocorrência de diabetes ser um fator marcante do camundongo NOD, a linhagem também pode ser um modelo experimental promissor para centenas de estudos envolvendo suas características bioquímicas, fisiológicas e reprodutivas, visando inclusive o aprimoramento de seu manejo e reprodução (SZKUDELSKI, 2001).

As fêmeas NOD são afetadas em torno da 30ª semana de vida (aproximadamente 7 meses), com incidência entre 60-90% dos casos, enquanto apenas cerca de 30% dos machos são afetados. A incidência da diabetes pode variar entre biotérios, pois o manejo e fatores ambientais externos podem influenciar na manifestação da doença. No entanto ainda existem poucos dados a respeito da capacidade reprodutiva do camundongo NOD, e se há relação direta com o desenvolvimento da doença, sendo importante avaliar tanto os índices reprodutivos de casais mantidos em colônias de criação, quanto na produção de gametas e embriões para criopreservação e demais protocolos de reprodução assistida (KIRSTEN, 2006).

Sob o aspecto da criação de camundongos NOD, é de grande relevância calcular os índices reprodutivos da linhagem, visando estabelecer um padrão para os animais mantidos sob determinadas condições, e acompanhar sua produção ao longo dos acasalamentos. Além disso, se faz necessário avaliar a produção de oócitos e embriões desse modelo, e sua resposta ao protocolo de superovulação, muito utilizado para criopreservação e outras rotinas de reprodução assistida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O camundongo

Desde o século XVII, o camundongo vem sendo utilizado como uma das principais espécies em pesquisas científicas, de Robert Hooke, em 1664, para investigar doenças infecciosas, ao século XIX em estudos da herança genética de mamíferos e aplicação das Leis de Mendel. Em meados do ano 1900, uma professora aposentada chamada Abbie C. E. Lathrop iniciou em uma fazenda no estado de Massachussetts, um centro de criação desses pequenos animais para fornecê-los como animais de estimação, no entanto surgiu a demanda de vários laboratórios de pesquisa também no Missouri e Nova York, inclusive para o Instituto Bussey, de William Ernest Castle (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

Em 1907, Clarence Cook Little, estudante de Harvard orientada por Castle, iniciou estudos a respeito da herança genética e sua relação com a cor da pelagem de camundongos, e dois anos depois deu início a criação de linhagens consideradas geneticamente puras, e após realizar o acasalamento desses animais entre irmãos por 20 gerações consecutivas, deu-se origem a primeira linhagem que conhecemos hoje por consanguínea ou isogênica (inbred), chamada nos dias de hoje de DBA (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Desde então, juntamente com a evolução da ciência biomédica e veterinária, o camundongo é considerado o mamífero mais usado na experimentação animal. Seu nome científico é *Mus musculus*, e pertence à Família *Muridae* e Ordem *Rodentia*. Eles são animais pequenos, de corpo fusiforme com o comprimento da cauda podendo ser maior que o próprio corpo, a coloração natural de sua pelagem é marrom escura na região dorsal e mais clara em seu ventre. Possuem os membros pélvicos e torácicos com 5 dedos em cada, e as glândulas sudoríparas são ausentes (SANTOS, 2002).

Outra característica marcante dessa espécie é a presença de uma audição sensível e apurada, fazendo deles muito sensíveis a ultrassons, ruídos e barulhos bruscos, que podem gerar consequências em casais reprodutores, como canibalismo de filhotes. Sua face é coberta por vibrissas, que também são altamente sensíveis e táteis, permitindo que o animal tenha percepção de seu microambiente. Em

contrapartida, eles apresentam uma visão deficiente incapaz de detectar algumas cores (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

De modo geral, características como seu pequeno porte, sua capacidade de adaptação em um ambiente artificial e ao manejo por um ser humano, os tornando animais de fácil manuseio, curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva com curta gestação e custo de manutenção baixo, o tornaram uma espécie promissora para a ciência. Além disso, pesquisas apresentaram homologia do DNA codificador de 70 a 90% entre o camundongo e o homem (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

As tecnologias na criação e manutenção desse animal cresceu à medida que as pesquisas biomédicas e veterinárias evoluíram. Esse fato resultou na demanda de estudos visando a definição dos padrões genéticos do camundongo. Dessa maneira, foram desenvolvidas linhagens geneticamente definidas, que podem ser classificadas quanto a seu status genético, como outbred e inbred. Os animais outbred, também chamados de heterogênicos ou não-consanguíneos, apresentam um índice de heterozigose de 99%, o que garante a variabilidade genética em uma colônia, reproduzindo o que ocorreria em uma população natural. Enquanto os animais inbred, que também podem ser conhecidos como isogênicos ou consanguíneos, possuem uma taxa de homozigose de 99%, garantindo uma maior padronização da colônia. O que determina a escolha da linhagem, é o tipo de experimento a ser realizado, dependendo do resultado que se espera ser alcançado (SANTOS, 2002).

Os camundongos podem ser usados em experimentos como testes toxicológicos e carcinogênicos, diabetes, doenças renais, comportamentais, obesidade (com ou sem manifestação de diabetes), síndrome metabólica, doenças autoimunes, desordens metabólicas e neuromusculares, avaliações de dietas, dentre outras possibilidades. Devido a facilidade de manipulação de seu genoma, muitas linhagens foram criadas em laboratório com finalidades específicas, o que também permite um profundo estudo de doenças genéticas humanas, sendo possível investigar a patologia de uma síndrome, acompanhando o desenvolvimento do animal ao longo de sua vida em um biotério (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

2.2 Características reprodutivas dos camundongos

O camundongo, como a maioria dos roedores, gera ninhadas numerosas. No entanto, a performance reprodutiva pode variar de acordo com a espécie e linhagem, sendo que alguns se reproduzem com mais dificuldade e outros podem se manter férteis ao longo de toda sua vida. Algumas linhagens apresentam em seu histórico um grau de infertilidade em ambos os sexos, e a maioria delas param de se reproduzir antes do fim de sua vida (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

A sexagem dos camundongos pode ser feita desde o nascimento, a partir da distância entre a papila genital e o ânus, sendo que nas fêmeas essa distância é mais curta e nos machos é maior (Figura 1). Além disso, na idade de desmama (21 dias) também é possível visualizar a presença do saco escrotal que abriga os testículos nos machos, e a cadeia mamária ao longo do ventre da fêmea (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017). Os machos não apresentam mamilos devido a destruição dos botões mamários pela regulação de hormônio andrógeno (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

Figura 1 – Sexagem de camundongos, com macho à esquerda e fêmea à direita.

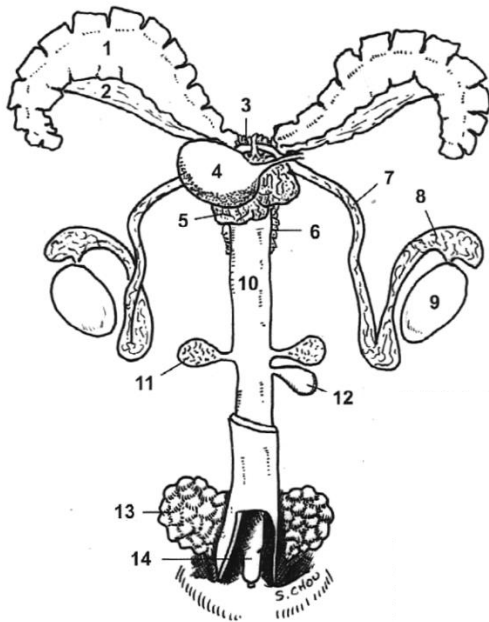


Fonte: Pritchett-Corning *et al.*, (2015) em Guidebook on Mouse and Rat Colony Management.

O aparelho reprodutor dos machos (Figura 2) é composto por um par de testículos, com o epidídimo e vaso deferente anexos, um pênis, um par de vesículas seminais com glândulas coagulantes aderidas, próstata, glândulas bulbouretrais e prepucciais, sendo esta subcutânea na porção ventral do abdome, e anéis inguiniais abertos. Já nas fêmeas (Figura 3), sua anatomia reprodutiva compreende um par de ovários envoltos pela bolsa ovariana que é aderida ao oviduto, e ligados a um útero

bicorno, seguido por uma vagina e vulva. A vulva é composta pela abertura vaginal, glândula clitoral e papila urinária (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

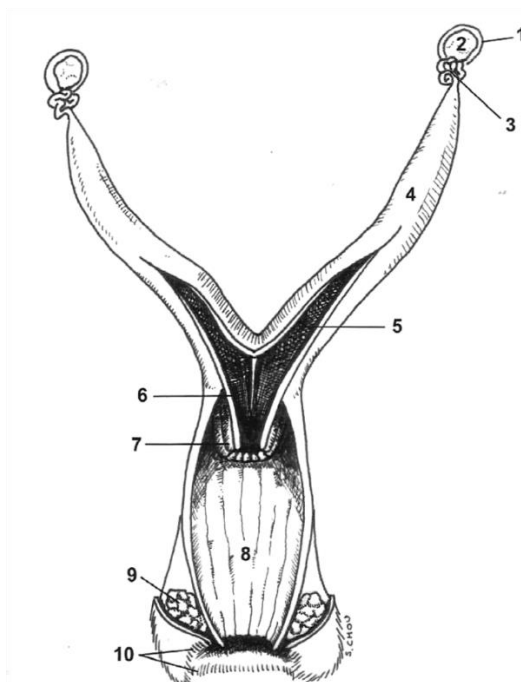
Figura 2 – Aparelho reprodutivo de camundongo macho.



1. Glândula Vesicular
2. Glândula Coagulante
3. Glândula Ampolar
4. Bexiga Urinária
5. Próstata Ventral
6. Próstata Dorsal
7. Vaso Deferente
8. Epidídimo
9. Testículo
10. Parte pélvica da uretra e músculo uretral
11. Glândula Bulbouretral
12. Divertículo
13. Glândula Prepucial
14. Pênis

Fonte: Adaptado de Pritchett-Corning *et al.*, (2015) em Guidebook on Mouse and Rat Colony Management.

Figura 3 – Aparelho reprodutivo de camundongo fêmea.



1. Bolsa Ovariana
2. Ovário
3. Oviduto
4. Corno Uterino
5. Lumén
6. Corpo Uterino
7. Colo do Útero
8. Vagina
9. Glândula Clitoral
10. Vulva

Fonte: Adaptado de Pritchett-Corning *et al.*, (2015) em Guidebook on Mouse and Rat Colony Management.

As fêmeas de camundongos, de maneira geral, possuem um período de gestação de 19 a 21 dias. Os filhotes são desmamados aos 21 dias de idade, e posteriormente atingem a maturidade reprodutiva a partir dos 60 dias. Em ambientes artificiais e controlados como o de um Biotério, o período de reprodução da espécie ocorre durante o ano inteiro, sendo apenas condicionado ao ciclo estral da fêmea, que só permite o acasalamento durante o estro (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

A regulação reprodutiva hormonal dessa espécie segue os padrões de interação típicos de um mamífero, com hormônios produzidos pelo cérebro e outros tecidos reprodutivos, que regulam o ciclo como um todo. O hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH – gonadotropin-releasing hormone) agindo na hipófise, que por sua vez libera o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios sinalizam os tecidos gonadais, que então produzem testosterona, estrogênio e progesterona, que geram uma resposta no hipotálamo. Na fêmea o FSH estimula o desenvolvimento dos oócitos nos ovários, que em resposta também produz estrogênio, causando alteração no estro (cio) e um pico de LH, maturando os oócitos. Após a liberação desses oócitos, é formado o corpo lúteo (CL), que produz progesterona que é responsável pela manutenção da prenhez (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

Em machos, o GnRH liberado pelo hipotálamo também sinaliza a hipófise, liberando o FSH e LH, hormônios necessários pela iniciação da espermatogênese, mas não são responsáveis pela continuação dela. Esses hormônios agem na estabilização de um complexo composto pelas células de Sertoli, Leydig e espermatogônias (ou células primordiais). A testosterona e FSH atuam na maturação das espermatogônias em espermátides (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015). Um camundongo macho atinge a puberdade entre 7 e 8 semanas de idade, quando ocorre a diferenciação das espermatogônias em espermátides, e posteriormente em espermatozoides. Nos testículos, em 3 meses, cada célula primordial pode produzir mais de 100 gametas, que vão amadurecer e serão capacitados no epidídimo e ducto deferente, e a diferenciação constante de células germinativas tornam esses animais férteis ao longo de toda sua vida, mesmo em idade avançada (SALGADO; PASSOS, 2017).

Uma camundonga nasce com todos os seus oócitos que permanecem quiescentes até a maturidade sexual, isso é em torno de 30.000 a 75.000 oócitos. A

cada ciclo estral, cerca de 6 a 16 oócitos são submetidos a ovulação e ficam disponíveis por 10 a 15 horas, e após acontecer a cópula entre o final do proestro e início do estro, a fertilização desses oócitos ocorrerá no oviduto. A grande maioria dos oócitos não são ovulados naturalmente durante a vida dessas fêmeas e acabam sendo degenerados (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

O ciclo estral compreende 4 fases, sendo elas proestro, estro, metaestro e diestro. Nas primeiras fases do ciclo (proestro e estro), ocorre o crescimento de células epiteliais no trato genital, resultando na ovulação, e também é o período em que a fêmea se torna mais receptiva ao macho para o acasalamento. Durante o metaestro, ocorre a troca de células epiteliais degeneradas por novas células, que crescem lentamente durante o diestro. Apesar da ovulação ocorrer de maneira espontânea, ela pode sofrer interferência dependendo dos fatores ambientais como o fotoperíodo, temperatura ou presença de ruídos. (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

Os camundongos apresentam um comportamento reprodutivo singular, que ocorre durante o período escuro. Primeiramente esse comportamento se dá pela perseguição do macho atrás da fêmea, demonstrando interesse insistente e contato físico cheirando-a. Depois começam a tentativa de monta, até a permissão da fêmea, que levanta a base da cauda colocando-a de lado, expondo a vulva. O macho repete o coito por diversas vezes, e no intervalo de cada cópula ambos realizam autolimpeza antes de uma próxima tentativa (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

Uma questão no manejo de uma colônia dessa espécie é que pode ocorrer de colocar um casal, com idade reprodutiva adequada, em uma gaiola e eles não copularem. O que pode ser feito para confirmar se houve ou não a cópula, é observar na fêmea a presença do plugue vaginal (Figura 4). Esse plugue, que também pode ser encontrado na literatura como “tampão”, é uma secreção branca amarelada produzida pela glândula coagulante, vesícula seminal e próstata do macho, que é expelida com a ejaculação. O plugue forma uma espécie de barreira mecânica, impedindo a cópula de outro macho, sendo uma maneira de garantir que seus genes sejam perpetuados (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

Figura 4 – Plugue vaginal em uma fêmea NOD, produzido após a cópula.



Fonte: Biotério Central da UFMS (2021).

O plugue deve ser observado o mais cedo possível na manhã seguinte ao acasalamento desses animais, uma vez que ele tem a capacidade de ser absorvido ou seus resquícios podem ficar grudados em algum lugar na gaiola onde estão alojados, inviabilizando sua identificação. É válido ressaltar que a presença do plugue garante que o macho ejaculou e os animais copularam, mas não garante que ocorreu a fertilização dos oócitos e conseqüentemente pode não ocorrer a gestação (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

Outra característica importante a ser observada, é a presença do estro pós-parto, que ocorre aproximadamente entre 14 e 28 horas após o parto. Na presença do macho, ocorre nova cópula, e no período previsto para desmame da primeira ninhada, poderá coincidir com o próximo parto, assim se faz necessário desmamar os primeiros filhotes antes, para evitar prejuízos e até mesmo a perda da próxima prole (KO; DE LUCA; OLIVEIRA, 2017).

Em um Biotério de Criação, após o desmame os filhotes permanecem separados por sexo até o fornecimento quando há a demanda, ou até serem acasalados quando atingem a maturidade sexual. Nesse caso, as fêmeas entram em anestro, caracterizado pela ausência de ciclos estrais, e quando expostas aos feromônios dos machos, em 48 horas, inicia-se o ciclo estral. Esse fenômeno é

conhecido como “Efeito Whitten”, e pode ser induzido colocando as fêmeas nas gaiolas contendo maravalha usada pelos machos (SANTOS, 2002). Outra maneira de se induzir o ciclo estral da camundonga, é artificialmente por meio da administração de hormônios exógenos, e a resposta a este tipo de tratamento depende do background genético da linhagem e o tempo da administração dos hormônios (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

A superlotação de animais em uma gaiola pode gerar o “efeito Lee-Boot”, que resulta na prolongação do ciclo estral com as fêmeas permanecendo em diestro. Em alguns casos, o efeito Lee-Boot é combinado com o efeito Whitten, colocando fêmeas antes mantidas em aglomerações e com seu ciclo estral suprimido, em contato com a urina de machos, assim induzindo a sincronização e continuidade do ciclo estral desses animais. Outro efeito relacionado a reprodução dos camundongos é o “efeito Bruce”, que é marcado pela falha na implantação do embrião após a fêmea ser exposta à um macho que não é familiar (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2015).

2.3 Linhagem NOD - “NONOBESE DIABETIC”

Em 1974, no Laboratório de Investigações Shinogui, em Osaka - Japão, foi descoberta a linhagem de camundongos inbred NOD, que se tornou de grande relevância para estudos de diabetes mellitus e vem sendo utilizada até os dias atuais. O camundongo NOD surgiu da derivação da sublinhagem Jc 1 – ICR outbred, que desenvolvia catarata. Animais dessa mesma linhagem foram acasalados com fêmeas livres de catarata, porém com níveis elevados de glicemia em jejum. Após a 13ª geração, os pais foram isolados, e ao longo das gerações as proles foram separadas em animais com níveis plasmáticos de glicose elevados e animais com níveis plasmáticos de glicose normais. Até que na 20ª geração de acasalamentos, uma fêmea de glicemia normal desenvolveu espontaneamente diabetes mellitus, diminuição de insulina sérica e insulite. Então, a partir da seleção desta fêmea e seus sucessores, foi criada a linhagem NOD - “Nonobese diabetic” (Figuras 5 e 6), posteriormente sendo produzida também na Austrália e Estados Unidos (KIRSTEN, 2006).

Figura 5 – Camundongo NOD.



Fonte: Biotério Central da UFMS (2022).

Figura 6 – Casal NOD com sua prole.



Fonte: Biotério Central da UFMS (2022).

A linhagem NOD se tornou largamente utilizada para o estudo de diabetes mellitus tipo 1, devido a manifestação da doença em seu organismo ser semelhante ao que ocorre em humanos, caracterizada pela perda de células β no pâncreas, sendo estas responsáveis pela produção de insulina. (DOMINGUES FILHO, 2018). As fêmeas desta linhagem são afetadas em torno da 30^a semana de vida, com incidência entre 60-90% dos casos, enquanto apenas cerca de 30% dos machos são afetados. A incidência da diabetes pode variar entre biotérios, pois fatores externos ambientais e manejo podem influenciar na manifestação da doença (KIRSTEN, 2006). O início da diabetes nesses animais é marcado pela glicosúria e hiperglicemia, e ao longo das semanas começam a perder peso e apresentam polidipsia e poliúria (LEITER, 1993).

A utilização de uma linhagem com predisposição genética para desenvolver o diabetes, evita o processo de indução por fármacos, como a Alloxana e a Streptozotocina (STZ), em um modelo convencional. Dessa maneira é possível refinar a pesquisa experimental ao evitar a manipulação e estresse do animal, além de reduzir

o tempo de duração do experimento, uma vez que não é necessário esperar o desenvolvimento da doença (SZKUDELSKI, 2001).

Apesar da ocorrência de diabetes ser um fator marcante do camundongo NOD, a linhagem também é um modelo experimental promissor para centenas de outros estudos envolvendo suas características bioquímicas, fisiológicas e reprodutivas, visando inclusive o aprimoramento de seu próprio manejo e reprodução. Segundo SANTOS (2016), a hiperglicemia em fêmeas de camundongo NOD compromete o desenvolvimento placentário e fetal, além de desequilibrar reguladores do ciclo celular e fatores angiogênicos, que resultam na alteração da estrutura e funcionalidade da placenta, tornando esse modelo válido para estudar os impactos que o diabetes pode causar na gestação (SANTOS, 2016).

Outra questão relacionada a reprodução dessa linhagem, é que alguns estudos apontam que alterações moleculares nas fêmeas, em consequência do diabetes, resultam na formação de um endométrio não receptivo, provocando dificuldades na pré-implantação de embriões, tornando esse modelo promissor também para investigar restrições no crescimento uterino, implantação tardia de embriões e falha precoce na prenhez, e sua relação com o diabetes (ALBAGHDADI, 2012).

Um fator que influencia no desenvolvimento do diabetes em camundongos NOD de ambos os sexos, é o ambiente onde esses animais são mantidos. Sendo assim, o status sanitário do Biotério, tanto de criação quanto de experimentação, e a rigidez das barreiras de defesa adotadas, são de grande importância para gerar animais que influenciarão em resultados fidedignos em pesquisas. De acordo com Leiter (1993), o ambiente ideal dessa linhagem, são os SPF (specific pathogen free), ou seja, um local livre de patógenos que poderão afetar o sistema imunológico desses animais que, como consequência, se tornará mais “normalizado” e resistente ao desencadeamento do diabetes.

Os camundongos NOD mantidos em biotérios e laboratórios SPF devem atingir uma alta frequência de diabetes, cerca de 50% em fêmeas por volta de 18 a 20 semanas de idade, e de 40% a 70% em machos mais velhos, com 30 a 40 semanas (LEITER, 1997). No entanto, dados gerados em um Biotério de status sanitário convencional, representaram uma prevalência de diabetes de 51% em fêmeas com 8 meses de idade, e 27% de machos na mesma idade (KIRSTEN, 2006).

2.4 Superovulação e banco de germoplasma

No final do século XIX surgiu o interesse de investigar mecanismos da reprodução de organismos mais complexos, como o ser humano, o que deu início aos primeiros passos a caminho da manipulação de embriões. O primeiro animal considerado modelo experimental para esse fim foi o coelho, devido ao tamanho de seus óvulos serem relativamente grandes, o que permitiu serem manipulados com mais facilidade, e a possibilidade de induzir a ovulação e mensurar a idade mais aproximada dos embriões (PASSOS *et al.*, 2002).

Dentre as vantagens de se ter uma rotina de manipulação de embriões, está a formação de um banco de germoplasma das linhagens de um biotério. Esse banco pode garantir mais segurança e apoio às rotinas de criação, evitando os riscos de acidentes que podem levar a perda de matrizes, como incêndios e contaminações, e caso ocorra alguma eventualidade, é possível fazer o repovoamento de uma colônia utilizando menos animais e evitando gastos (PASSOS *et al.*, 2002). O banco de germoplasma também associado a técnicas de engenharia reprodutiva também contribuem na manutenção de linhagens tanto tradicionais, quanto geneticamente modificadas, principalmente àquelas que apresentam dificuldade de se reproduzir (SALGADO; PASSOS, 2017).

Em laboratórios de reprodução assistida, normalmente a superovulação é utilizada como meio de reduzir o número de animais a serem utilizados, além de induzir o cio para favorecer o acasalamento dos animais. Essa técnica também é utilizada antes de ser feita a fertilização *in vitro* (FIV) e a criopreservação, que nada mais é do que um conjunto de procedimentos aplicados na conservação de embriões e gametas a temperaturas extremamente baixas, em nitrogênio líquido a -196°C, por tempo indeterminado (SALGADO; PASSOS, 2017).

A superovulação é dada após a administração, normalmente uma dose de 7,5 UI via intraperitoneal (IP), de hormônios gonadotrópicos e luteinizantes nas fêmeas de camundongo, com idade entre 8 e 12 semanas. Primeiramente é aplicado o hormônio foliculoestimulante obtido de éguas prenhes (PMSG – pregnant mare's serum gonadotropin), que irá promover o aumento na quantidade de oócitos. Depois de 48-52 horas, é injetada a gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio luteinizante que inicia a ovulação e formação do corpo lúteo, e logo em seguida as

fêmeas são acasaladas com os machos reprodutores para obtenção de embriões, ou com vasectomizados para obtenção de oócitos. Na manhã seguinte, o mais cedo possível, deve ser feita a inspeção das fêmeas e observar a presença do plugue vaginal (SALGADO; PASSOS, 2017).

Existem fatores que influenciam diretamente na superovulação, como a qualidade e dose dos hormônios, idade e background genético da fêmea, dieta adequada, macroambiente com um fotoperíodo bem regulado, e controle de agentes que podem causar estresse, principalmente em linhagens que são mais sensíveis (SALGADO; PASSOS, 2017). Segundo o estudo de Bortolatto *et al.* (2012), “a resposta à superovulação é um fenômeno linhagem específico, além disso, dentro da particularidade de cada linhagem, os embriões que se diferenciaram em duas células são capazes de ser gerados em fêmeas receptoras e se desenvolverem até o nascimento”.

No mundo todo encontram-se centros produtores de animais de laboratório, com uma perspectiva de 133 instituições dispersas em 27 países. E a cada ano, com o avanço na ciência biomédica e veterinária, cresce também a demanda por novas linhagens, principalmente de roedores, com características e perfil genético muito específicos, tornando impraticável manter esses modelos experimentais na forma de colônias. Um meio facilitador na manutenção e preservação dessas linhagens é a criação de redes colaborativas de criopreservação e bancos de germoplasma, essenciais e estratégicos na qualidade e desenvolvimento da Ciência de Animais de Laboratório (SALGADO; PASSOS, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os índices reprodutivos de camundongos da linhagem NOD (NONOBESE DIABETIC) produzidos no Biotério Central da UFMS.

3.2 Objetivos específicos

- a) Calcular a Taxa de Fertilidade, Índice de Natalidade e Taxa de Prolificidade da colônia de camundongos NOD, estabelecida na Área de criação do Biotério Central;
- b) Comparar a produção de oócitos obtidos por meio de acasalamento natural e após estimulação hormonal;
- c) Comparar a produção de embriões obtidos por meio de acasalamento natural e após estimulação hormonal da atividade ovariana seguida de acasalamento.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo, local e período da pesquisa

Trata-se de pesquisa experimental, realizada no Laboratório de Reprodução Assistida do Biotério Central/DICT/PROPP da UFMS, onde ocorreram durante o mês de novembro de 2021, os procedimentos de vasectomia dos machos, acasalamentos e obtenção de oócitos e embriões de camundongos da linhagem NOD.

O presente experimento faz parte do projeto intitulado “Implementação de banco de germoplasma no Biotério Central/INBIO – UFMS”, aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o Protocolo N° 1.176/2021.

4.2 Modelo experimental

Foram utilizados 80 exemplares de *Mus musculus*, da linhagem NOD (NONOBESE DIABETIC), sendo 60 fêmeas e 20 machos, adultos em idade reprodutiva, aproximadamente 60 dias, de padrão sanitário convencional monitorado, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Do total de fêmeas, 20 foram utilizadas para obtenção de oócitos de forma natural, 20 para obtenção de embriões de forma natural, 10 para a obtenção de oócitos após estimulação ovariana, e 10 para obtenção de embriões após estimulação ovariana. Em relação aos machos, 10 foram vasectomizados para os procedimentos de obtenção de oócitos com e sem estimulação ovariana, e os outros 10 para obtenção de embriões com e sem estimulação ovariana.

Durante o experimento, os animais foram mantidos no Laboratório de Reprodução Assistida do Biotério Central, em gaiolas individuais de polipropileno com as dimensões 30x20x13cm (Figura 7), forradas com maravalha, próprias para animais de laboratório, com água e ração *ad libitum* até o momento da eutanásia para obtenção de oócitos e embriões. O ciclo de luz do macroambiente onde os animais foram alojados, foi de 12/12 horas, claro e escuro respectivamente, a temperatura ambiente ($21\pm 1,5^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar de 55 a 60% foram controlados e monitorados para garantir o bem-estar dos animais.

Figura 7 – Animais alojados em caixas de polipropileno, com água e ração à vontade.



Fonte: Biotério Central da UFMS (2021).

4.3 Índices de produtividade

Avaliou-se a produtividade da colônia de camundongos NOD, com base no número de filhotes nascidos do primeiro ao quarto parto, de 20 casais mantidos em acasalamento monogâmico intensivo. Os dados obtidos referem às matrizes obtidas na segunda geração (F2), dos animais provenientes do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA.

Calculou-se a média de machos, fêmeas e o total de filhotes nascidos em cada parto, entre os meses de abril a junho de 2021. Os índices de produtividade avaliados neste estudo foram (MATTARAIA; LAPCHIK; KO, 2017):

Taxa de Fertilidade: $\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas prenhes}}{\text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas acasaladas}}$

Índice de Natalidade: $\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de filhotes nascidos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de fêmeas acasaladas}}$

Taxa de Prolificidade: $\frac{\text{N}^{\circ} \text{ filhotes nascidos}}{\text{N}^{\circ} \text{ fêmeas prenhes}} \times 100$

4.4 Vasectomia

Os machos (n=10) foram vasectomizados para a obtenção de oócitos no acasalamento natural e após estimulação ovariana. Para a execução da vasectomia, os machos foram anestesiados com a associação anestésica de Cetamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal. Para a analgesia foi utilizado o protocolo de Meloxicam (2 mg/kg) e Tramadol (20 mg/kg) trinta minutos antes da cirurgia por via subcutânea. Após a tricotomia da região abdominal, foi feita a incisão de pele e peritônio. O ducto deferente foi localizado e cauterizado. O mesmo procedimento foi realizado no ducto deferente contralateral. Após a devolução da estrutura para sua região anatômica, foi realizado o procedimento de síntese da cavidade em dois planos: Plano 1 com fio de categute número 4-0 utilizando a sutura de Reverdin abrangendo além do peritônio, as fâscias, os músculos da região e tecido subcutâneo. Plano 2 com a sutura de pele através de pontos isolados simples com fio náilon 4-0 (Nylon®, Ethicon, São Paulo). Em seguida, o animal ficou em observação em placa aquecedora a 37°C até sua completa recuperação da anestesia, e por três dias recebeu analgesia com Meloxicam (2 mg/kg) e Tramadol (20 mg/kg) (BID). Em torno de três semanas após o procedimento cirúrgico, foram utilizados para o acasalamento com as receptoras (pseudoprenhes), tanto para o grupo com estimulação hormonal, quanto para o grupo natural.

4.5 Eutanásia

Para coleta de oócitos e embriões, as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical, realizada com supervisão do médico veterinário responsável. Método aceito com restrição segundo a Resolução Normativa nº 37 de 27/01/18 do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

4.6 Obtenção de oócitos – monta natural

O procedimento de obtenção de oócitos do grupo controle foi realizado da mesma maneira em duas semanas, sendo 10 fêmeas em cada semana. Na manhã do que consideramos o dia 0, 10 fêmeas foram colocadas em caixas sujas de machos para indução do estro (efeito Whitten), e na tarde do dia 3 foram acasaladas com os machos vasectomizados, na proporção de um macho para uma fêmea. Na manhã do dia 4, observou-se a presença de tampão vaginal (+/- 12h pós-acasalamento), e as fêmeas foram eutanasiadas por meio de deslocamento cervical para a retirada dos ovidutos (Figura 8). Os ovidutos foram colocados em placa de petri descartáveis, com gotas de 1000 μ L de meio M2 (@Sigma-Aldrich), previamente aquecidos a 37°C em mesa aquecedora. Em seguida a ampola de cada oviduto foi rompida, para liberação dos complexos cumulus-oócitos, e contagem das estruturas obtidas (Figura 9).

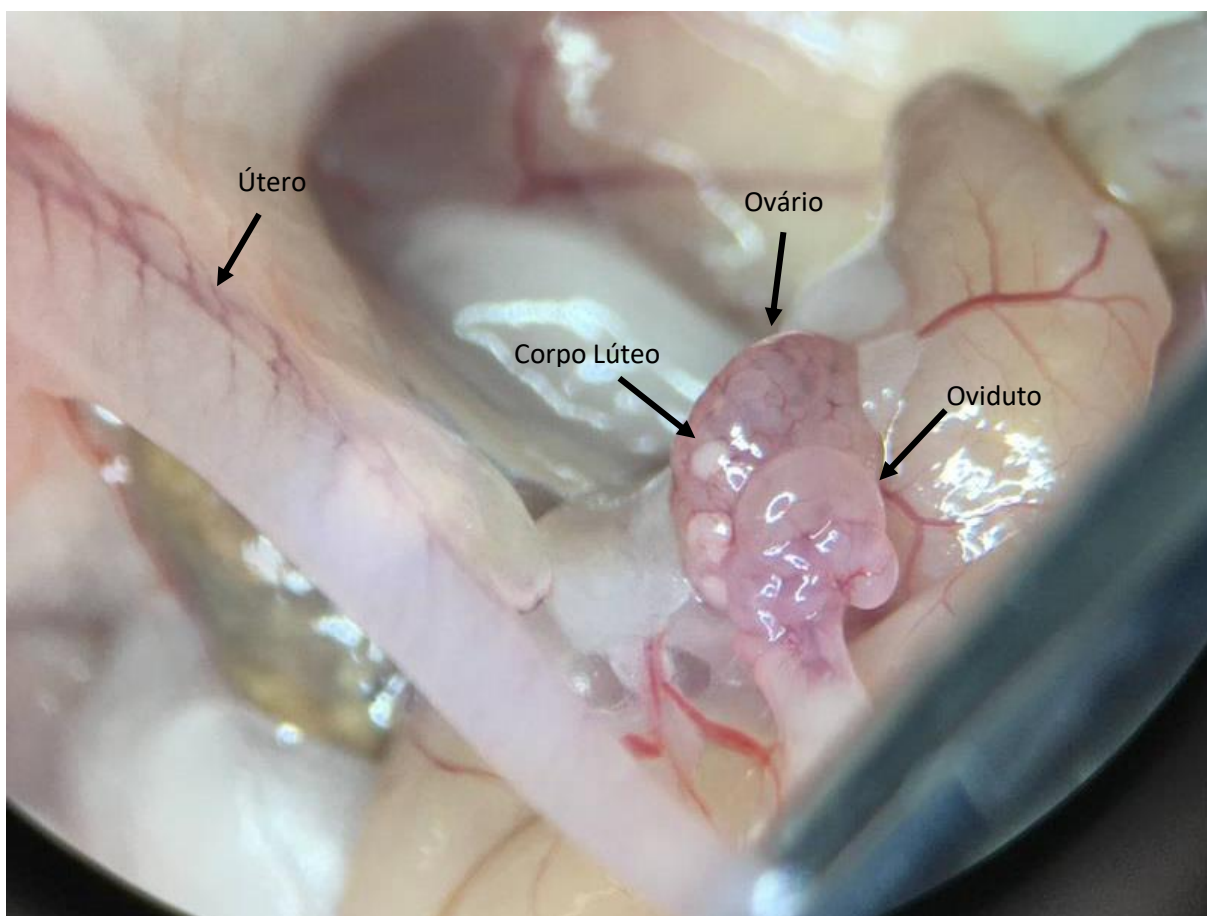


Figura 8 – Ovário apresentando Corpo Lúteo e oviduto intumescido. Aumento em 2x.
Fonte: Laboratório de Reprodução Assistida – Biotério Central (2021).

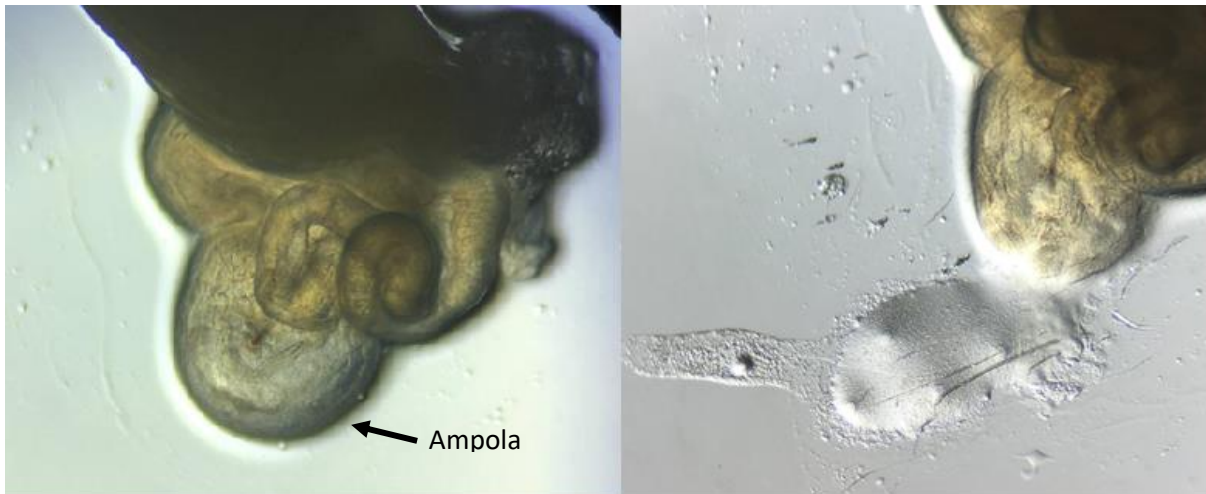


Figura 9 – Do lado esquerdo: Ampola intumescida, podendo-se visualizar os oócitos em seu interior. Do lado direito: Ampola rompida com liberação dos complexos cumulus-oócitos. Aumento 4x.

Fonte: Laboratório de Reprodução Assistida – Biotério Central (2021).

4.7 Obtenção de embriões – monta natural

O procedimento de obtenção de embriões do grupo controle foi realizado da mesma maneira em duas semanas, sendo 10 fêmeas em cada semana. Para a obtenção de embriões de forma natural foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, sendo que ao invés de utilizar machos vasectomizados, utilizamos machos inteiros. No dia 4, as fêmeas com tampão vaginal foram identificadas e na manhã do dia 5, eutanasiadas para a obtenção de embriões.

Após a eutanásia, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, por meio de incisão de pele e peritônio, e em seguida as tubas uterinas foram retiradas com auxílio de uma pinça e tesoura de ponta fina. Em seguida, foram colocadas em placas de Petri com meio M2 para realização da lavagem interna (flushing) e obtenção dos embriões. Para esta lavagem, 0,5 ml de meio M2 foram injetados, com auxílio de agulha 32G, pelo infundíbulo. As estruturas foram contabilizadas e os embriões classificados em íntegro, sendo possível visualizar as duas células, ou degenerados, com seu interior desintegrado.

4.8 Obtenção de oócitos após estimulação ovariana

Fêmeas (n=10) com oito semanas de idade receberam doses de 7,5 UI, por via Intraperitoneal (IP), de Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) e Human Chorionic Gonadotropin (hCG) para avaliação da quantidade de oócitos produzidos. Na tarde do dia 0 foi administrado via intraperitoneal, o hormônio PMSG. Após 48 horas (dia 2), foi realizada a administração, via IP, do hormônio hCG, também ao final da tarde. Logo após a aplicação deste segundo hormônio, as fêmeas foram acasaladas com machos vasectomizados (uma fêmea para cada macho). Na manhã do dia seguinte ao acasalamento, verificou-se o tampão vaginal para confirmação da cópula, sendo considerado o dia 3 do experimento e o dia 0,5 de gestação. Nesse momento, as fêmeas positivas foram eutanasiadas por deslocamento cervical para a obtenção dos oócitos. Os procedimentos de obtenção de oócitos foram iguais aos descritos na obtenção de oócitos de forma natural.

4.9 Obtenção de embriões após estimulação ovariana

As fêmeas (n=10) receberam o mesmo protocolo hormonal descrito acima, sendo que na tarde do dia 2 foram acasaladas com machos inteiros. Na manhã do dia 3 foram avaliadas quanto a presença de tampão vaginal, e as fêmeas positivas foram identificadas e separadas dos machos. Na manhã do dia 4, essas fêmeas foram eutanasiadas para a obtenção de embriões. Para a obtenção dos embriões foi utilizado o mesmo protocolo para a obtenção dos embriões de forma natural.

4.10 Análise estatística dos resultados

A comparação entre sexos, em relação à quantidade de filhotes por parto/momento e tamanho médio da ninhada, foi realizada por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon, uma vez que a maior parte das amostras não passaram no teste de Shapiro Wilk. O mesmo teste foi ainda utilizado na comparação entre matrizes que receberam indução hormonal para a ovulação e aquelas que não receberam, em relação à quantidade de oócitos totais, embriões na fase D2, embriões degenerados, total de estruturas e percentual de embriões viáveis. Já a comparação entre partos/momentos, em relação à quantidade de filhotes por parto, foi realizada por meio do teste de Friedman, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os demais resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráfico. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Índices de produtividade

Os dados reprodutivos da colônia de *Mus musculus* NOD, estabelecida na área de criação do Biotério Central, foram coletados e analisados durante 4 partos dos 20 casais mantidos em sistema de acasalamento monogâmico intensivo. Em cada momento, foram calculados a média de filhotes por sexo e total, taxa de fertilidade, índice de natalidade e taxa de prolificidade. Esses dados podem ser observados nas Tabelas 1 e 2.

Em cada parto, apesar da diferença não ser significativa na proporção de machos para fêmeas, do primeiro ao terceiro parto, nasceram mais machos do que fêmeas, e o contrário ocorreu no quarto parto, tendo uma quantidade ligeiramente maior de fêmeas.

Tabela 1: Resultados da comparação entre sexos e entre partos/momentos, em relação à quantidade de filhotes por parto e média da ninhada.

Parto/Momento	Sexo		Valor de p	Total
	Machos	Fêmeas		
Primeiro	4,05±0,52a	3,45±0,41a	0,380	7,50±0,68a
Segundo	2,85±0,54ab	2,40±0,48ab	0,375	5,25±0,95ab
Terceiro	1,85±0,56ab	1,00±0,35b	0,016	2,85±0,88b
Quarto	1,00±0,35b	1,20±0,41b	0,438	2,20±0,73b
Valor de p	<0,001	<0,001		<0,001
Média da ninhada	2,44±0,35	2,01±0,28	0,065	4,45±0,61

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valor de p no teste de Wilcoxon (entre sexos) ou no teste de Friedman (entre partos/momentos). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os partos/momentos (pós-teste de Dunn, $p < 0,05$).

Um fator importante a ser observado, é que ocorreu queda na média de filhotes nascidos ao longo de cada momento, sendo 7,50±0,68 no primeiro, 5,25±0,95 no segundo, 2,85±0,88 no terceiro e 2,20±0,73 no quarto parto. Na Figura 8 observa-se a média da ninhada por sexo e no total, ao longo de cada parto/momento dos mesmos casais representados nas Tabelas 1 e 2.

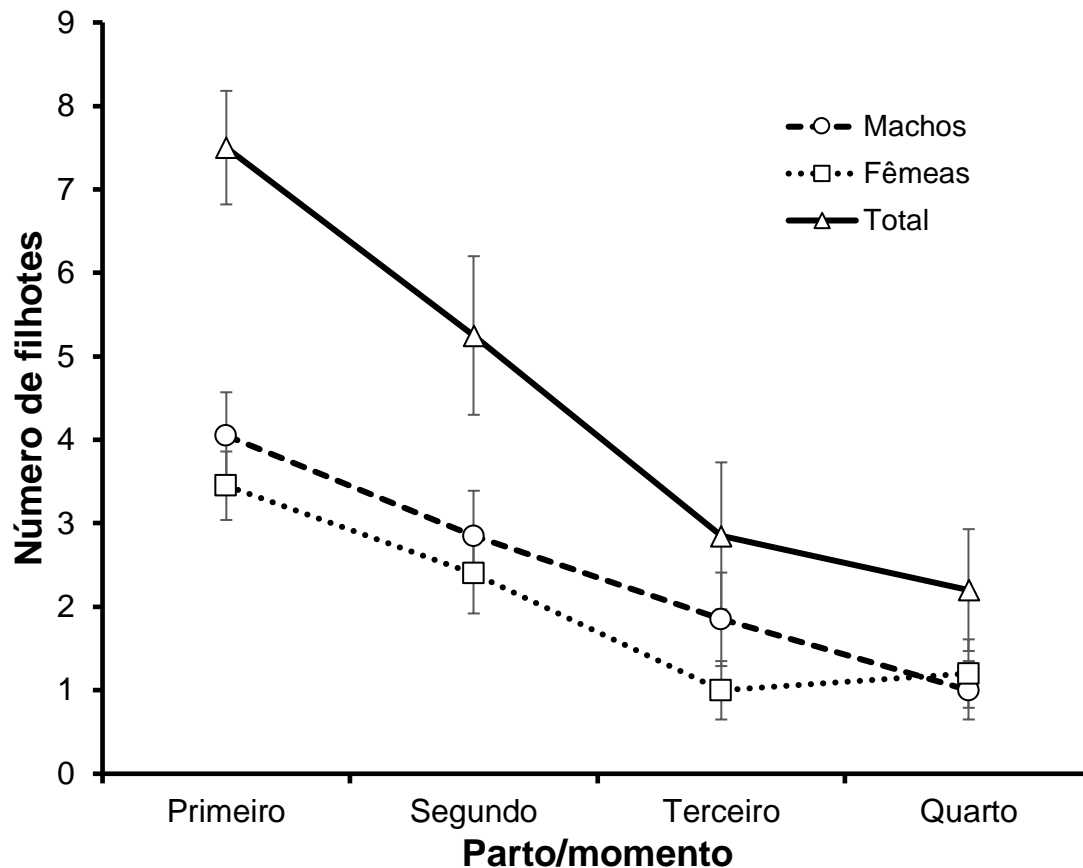


Figura 10: Gráfico apresentando o total de filhotes, por sexo e no total, em cada parto/momento avaliado. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

Para os mesmos casais, também foi avaliada a produtividade com base nos cálculos da Taxa de Fertilidade, Índice de Natalidade e Taxa de Produtividade em cada parto. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados referentes à taxa de fertilidade, índice de natalidade e taxa de prolificidade dos casais e filhotes avaliados neste estudo.

Parto/Momento	Taxa de Fertilidade	Índice de Natalidade	Taxa de Prolificidade
Primeiro	0,90	7,50	833,33
Segundo	0,65	5,25	807,69
Terceiro	0,40	2,85	712,50
Quarto	0,35	2,20	628,57

Para o cálculo da produtividade da colônia, utilizou-se em cada parto/momento dos casais: Taxa de Fertilidade = n° de fêmeas prenhes no período/ n° de fêmeas acasaladas no período; índice de Natalidade = n° de filhotes nascidos/ n° de fêmeas acasaladas; Taxa de Prolificidade = (n° de filhotes nascidos/ n° de fêmeas prenhes) x100.

5.2 Estimulação hormonal x monta natural

Os dados obtidos da contagem de oócitos (Figura 11) e embriões (Figura 12) em fase de células, ou D2, dos casais com e sem o protocolo de estimulação hormonal, estão representados na Tabela 3, onde observa-se que houve uma quantidade maior de estruturas observadas no grupo que recebeu a estimulação hormonal em comparação com o grupo que não recebeu.

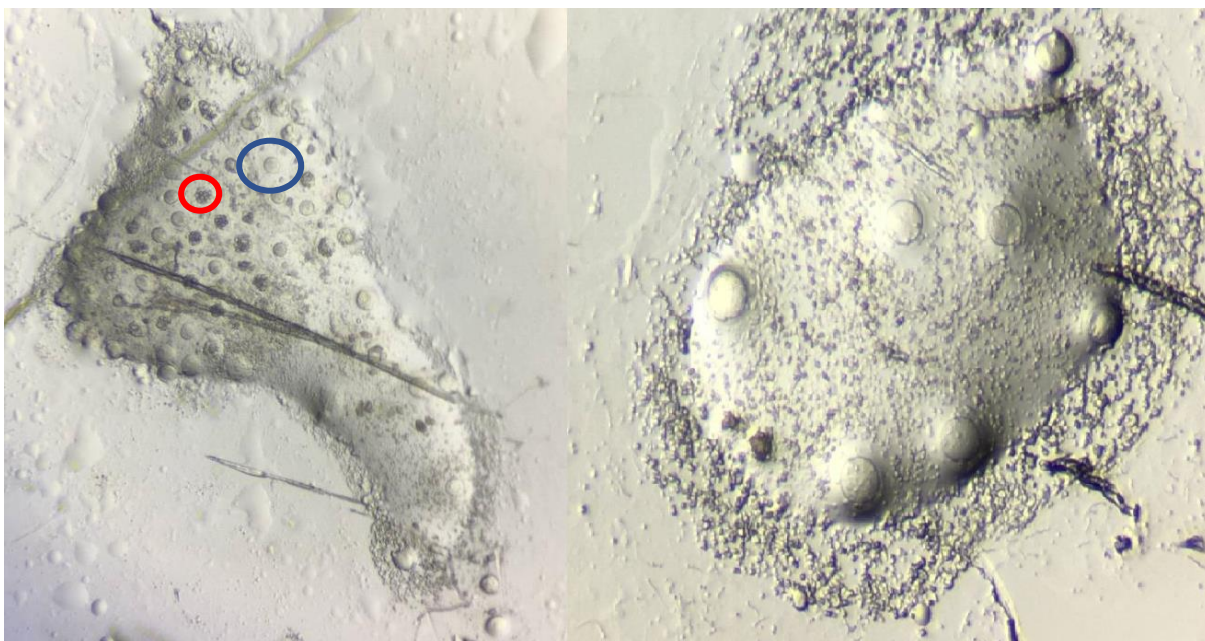


Figura 11 – À esquerda: complexo cumulus-oócitos, com estruturas íntegras (exemplo circulado em azul) e degeneradas (exemplo circulado em vermelho), em aumento 4x. À direita: complexo cumulus-oócitos íntegros, em aumento 5x.

Fonte: Laboratório de Reprodução Assistida – Biotério Central (2021).

No grupo com indução hormonal, a média de oócitos e embriões D2 obtidos foi de $79,20 \pm 8,43$ e $19,90 \pm 7,90$, respectivamente, enquanto no grupo sem o protocolo, a média de oócitos foi de $6,25 \pm 1,15$ e a média de embriões D2 foi de $2,90 \pm 0,86$. Também foram contabilizados embriões degenerados em cada grupo, sendo uma média de $35,30 \pm 9,40$ no grupo com indução hormonal da ovulação, e $6,80 \pm 1,37$ no grupo sem indução hormonal da ovulação.

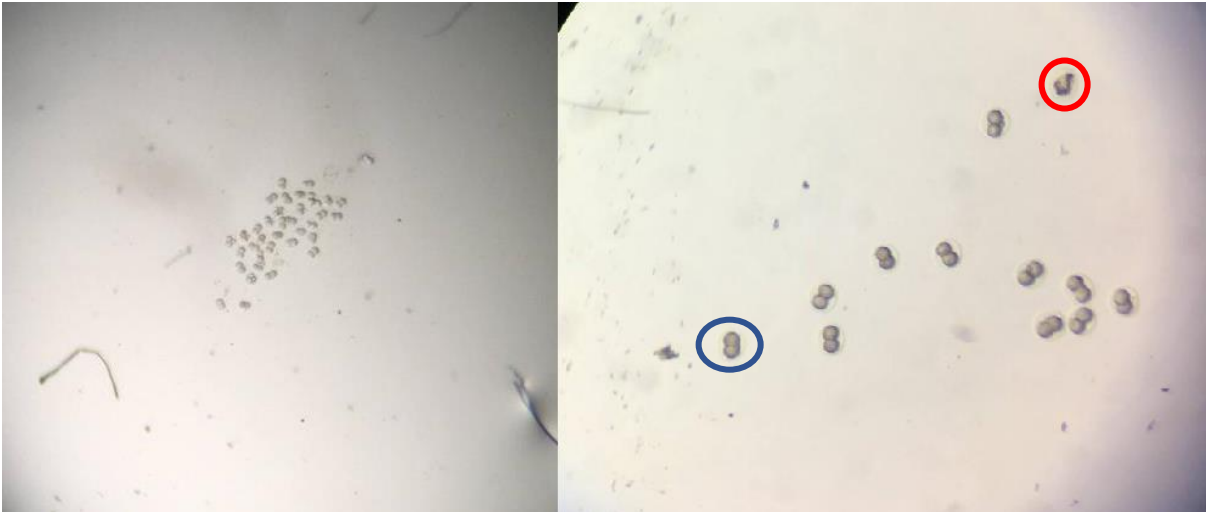


Figura 12 – À esquerda: embriões em fase de duas células (D2) e desintegrados, em aumento 4x. À direita: embriões D2 (exemplo circulado em azul) e desintegrados (exemplo circulado em vermelho), em aumento 5x.

Fonte: Laboratório de Reprodução Assistida – Biotério Central (2021).

Tabela 3: Resultados da comparação entre casais que receberam indução hormonal para a ovulação e aquelas que não receberam, em relação à quantidade de oócitos totais, embriões na fase D2, embriões degenerados, total de estruturas e percentual de embriões viáveis.

Variável	Indução hormonal da ovulação		Valor de p
	Sem	Com	
Oócitos totais	6,25±1,15	79,20±8,43	<0,001
Embriões em D2	2,90±0,86	19,90±7,90	0,022
Embriões degenerados	6,80±1,37	35,30±9,40	0,003
Embriões totais	9,70±1,63	55,20±15,15	0,009
% de embriões viáveis	20,74±6,27	24,71±6,26	0,347

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valor de p no teste de Wilcoxon.

6 DISCUSSÃO

Este estudo apresenta a descrição dos índices reprodutivos de camundongos da linhagem NOD criados em sistema convencional com barreiras. Observou-se que a média de filhotes sofreu uma queda significativa de 7,50 no primeiro parto, 5,25 no segundo, 2,85 no terceiro e 2,20 no quarto parto. Essa queda drástica na produção já no terceiro parto pode estar relacionada ao stress da amamentação e procriação, e com a incidência do diabetes, uma vez que as fêmeas dessa linhagem podem desenvolver a doença por volta de seus 7 meses de vida (LEITER, 1993).

O comportamento reprodutivo de camundongos é diretamente influenciado pelas condições ambientais das instalações onde os animais estão alojados, bem como sua integridade física e fatores nutricionais. Partindo desse princípio, faz parte da rotina de criação de um Biotério, acompanhar ao longo da vida reprodutiva dos animais, o número de filhotes nascidos e desmamados, correlacionando com a quantidade de fêmeas acasaladas. Também se acompanha individualmente cada casal mantido na colônia ao longo das semanas, para observar casos de comportamentos atípicos, intervalo entre os partos acima da média, e índices reprodutivos fora do padrão da colônia (BRAGA, 2017).

Com o registro semanal desses dados, é possível fazer uma avaliação dos casais ao longo de um determinado período, através dos cálculos dos índices de produtividade, que permitem conhecer os parâmetros reprodutivos e estabelecer padrões para a colônia em questão, uma vez que as linhagens de ratos ou camundongos podem apresentar características específicas, dependendo do seu background genético. Com esses padrões estabelecidos, podemos identificar possíveis complicações na colônia, como doenças ou alterações genéticas dos animais, além de avaliar o método de acasalamento adotado (MATTARAIA; LAPCHIK; KO, 2017).

Segundo Leiter (1997), os animais dessa linhagem são considerados naturalmente ótimos reprodutores, com uma média da ninhada entre 11 e 14 filhotes, mantidos em sistema SPF (livres de patógenos específicos). Em um biotério de padrão sanitário convencional, há registro de uma média de ninhada de 8 a 9 filhotes (KIRSTEN, 2006), dados semelhantes ao encontrado no presente estudo, onde obtivemos no primeiro parto uma média entre 7 e 8 filhotes na primeira prole, corroborando que mesmo para uma linhagem isogênica como a de camundongos

NOD, criada em um ambiente convencional monitorado, camundongos NOD podem manter seus padrões reprodutivos com qualidade.

Ao longo dos partos, observou-se também uma queda drástica na Taxa de Fertilidade, de 0,9 no primeiro parto, para 0,35 no quarto parto, representando que ao longo de cada momento alguns casais eventualmente se tornaram inférteis, parando de reproduzir. O Índice de Natalidade calculado também sofreu uma queda de 7,5 no primeiro parto para 2,2 no quarto parto. Também foi observado uma queda brusca da Taxa de Prolificidade de 833,33 para 628,57, do primeiro para o quarto parto, respectivamente.

Os índices reprodutivos obtidos neste estudo estabelecem uma base para compreender como se comporta a reprodução desse modelo experimental, mantido em um ambiente convencional monitorado com barreiras, apontando para uma prole mais numerosa nos dois primeiros partos, e uma queda na média de filhotes a partir do terceiro parto. Conseqüentemente, os índices de produtividade calculados nesta ocasião também caíram a partir do terceiro parto.

Os resultados foram obtidos da segunda geração das matrizes obtidas do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, com animais adaptados ao sistema de criação convencional monitorado. Portanto, os índices apresentados neste estudo podem ser utilizados como um parâmetro para análise de acasalamentos futuros, contribuindo com o planejamento da colônia, considerando que há uma queda significativa na produção a partir do terceiro parto de casais da linhagem NOD.

Além da reprodução da linhagem NOD na Área de Criação do Biotério Central, também foi avaliada a capacidade de obtenção de oócitos e embriões, totais e viáveis, através do acasalamento natural e após superovulação, dada pela administração dos hormônios gonadotróficos PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), responsável pelo aumento do número de folículos produzidos nos ovários, e hCG (Human Chorionic Gonadotropin), hormônio luteinizante, que promove a ovulação e formação do corpo lúteo (SALGADO; PASSOS, 2017).

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, considerado o principal método em estudos de reprodução em camundongos, devido sua eficácia na melhor qualidade de oócitos e embriões. Em camundongos, Roustan *et al.* (2012) avaliaram a qualidade de oócitos recuperados de fêmeas eutanasiadas por deslocamento cervical e inalação de Isoflurano, e obtiveram 93% de oócitos intactos

pelo deslocamento cervical contra 63% pelo Isoflurano. Segundo estes autores, a eutanásia por deslocamento cervical em camundongos é o melhor para obtenção de oócitos (ROUSTAN *et al.*, 2012). Estudos também foram realizados para verificar a qualidade de oócitos e embriões de camundongos eutanasiados por deslocamento cervical e inalação de CO₂, e observaram que o método por deslocamento cervical foi o de melhor qualidade para fertilização in vitro (WURI *et al.*, 2019). Nesse mesmo sentido, Hazzard *et al.* (2014) obtiveram melhor taxa de fertilização in vitro de oócitos obtidos de animais eutanasiados por deslocamento cervical (HAZZARD *et al.*, 2014).

Nos resultados deste estudo, foi observado que o grupo que não recebeu o protocolo hormonal, apresentou média de oócitos entre $6,25 \pm 1,15$, enquanto o grupo de fêmeas superovuladas, a média obtida foi entre $79,20 \pm 8,43$ oócitos, cerca de 12,7 vezes maior que o grupo anterior, uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre os grupos avaliados.

Um padrão semelhante foi observado na obtenção de embriões, no qual o grupo que não recebeu a estimulação hormonal resultou em uma média de $9,70 \pm 1,63$ de embriões totais, sendo $2,90 \pm 0,86$ em fase D2 e $6,80 \pm 1,37$ degenerados, enquanto que no grupo de fêmeas superovuladas a média de embriões totais foi de $55,20 \pm 15,15$, sendo $19,90 \pm 7,90$ em fase D2 e $35,30 \pm 9,40$ degenerados.

Ao comparar a porcentagem de embriões viáveis, considerados os que estão em fase D2, não houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,347$), com cerca de 20,74% de embriões viáveis obtidos do acasalamento natural, e 24,71% de embriões obtidos de fêmeas que receberam o protocolo hormonal de superovulação.

Considerando a quantidade de oócitos e embriões, podemos observar que houve uma resposta positiva das fêmeas de camundongos da linhagem NOD ao protocolo hormonal de superovulação. Além disso, também há que se considerar que a porcentagem de embriões viáveis obtidos através do acasalamento natural, sobre o total de embriões do mesmo grupo, não difere muito da porcentagem obtida do grupo de fêmeas superovuladas.

É amplamente conhecido que a superovulação é uma rotina essencial nos protocolos de reprodução assistida e criopreservação. Com esses resultados, podemos considerar que o protocolo hormonal de estimulação ovariana utilizado é vantajoso para rotinas de reprodução assistida de camundongos NOD, uma vez que se obteve maior quantidade de oócitos e embriões mesmo com um número reduzido

no grupo de fêmeas superovuladas. Neste caso, com a resposta positiva da produção de oócitos e embriões, podemos diminuir a quantidade de animais utilizados em pesquisas.

Tecnologias de reprodução assistida tem um papel de grande importância no suporte à criação e manejo de colônias de animais de laboratório. Principalmente em linhagens transgênicas, com sistema imunológico comprometido e com o desenvolvimento de doenças autoimunes, como é o caso dos camundongos NOD. Esses animais podem ser afetados por fatores externos como, macroambiente, dieta, estresse, contaminações ou manejo inadequado. Quando esses animais são expostos a condições desfavoráveis, seu sistema imunológico acaba sendo estimulado, o tornando mais normalizado e menos susceptível à diabetes, prejudicando o propósito de manter essa linhagem, e se fornecidos aos pesquisadores, podem gerar resultados alterados (KIRSTEN, 2006).

A superovulação é uma ótima ferramenta e, aliada à produção de camundongos NOD em um biotério de padrão sanitário convencional monitorado, potencializa a capacidade reprodutiva dessa linhagem. Desta forma, possibilita a criação de um banco de germoplasma, que além de economizar espaço, previne a perda da linhagem por diversas causas. Além de reduzir a quantidade de animais utilizados, contribuindo com o princípio dos 3 Rs, com bem-estar e ética.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

Casais da linhagem NOD, mantidos em acasalamentos de sistema monogâmico intensivo são prolíficos no primeiro e segundo parto, tendo sua produtividade comprometida a partir do terceiro parto.

Fêmeas da linhagem NOD produzem uma maior quantidade de oócitos e embriões quando submetidas ao protocolo hormonal de superovulação.

Não houve diferença significativa na porcentagem de embriões viáveis entre os grupos de acasalamento natural e grupos em que a fêmea teve superovulação induzida.

8 REFERÊNCIAS

ALBAGHDADI, Ahmad JH; KAN, Frederick WK. Endometrial receptivity defects and impaired implantation in diabetic NOD mice. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 2, p. 30, 1-16, agosto, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100016>.

ALMEIDA, Renata dos Santos. **Similaridades entre o Transcriptoma Humano e Murino Focando Genes Situados em Regiões de Susceptibilidade ao Diabetes *mellitus* do Tipo 1**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ALVES, Delma Pegolo *et al.* Gnotobiologia. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 211-224.

ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, 2006.

ANDRADE, Antenor. O Bioterismo: evolução e importância. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 19-22.

ANTIORIO, Ana Tada Fonseca Brasil *et al.* Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 1, p. 53-54, junho, 2016. Disponível em: <https://revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/31108>.

BORTOLATTO, Juliana *et al.* Núcleo de desenvolvimento em fertilização in vitro I. Estudo da resposta à superovulação e viabilidade embrionária. **R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab.**, São Paulo, v.1, n.1, p. 14-23, jan./fev./mar, 2012. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-1878>.

BRAGA, Luisa Maria Gomes de Macedo. Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **R. bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 41, n.1 p. 105-109, jan./mar., 2017. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/P105-09%20\(RB932\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/P105-09%20(RB932).pdf)

BRAGA, Mariana Rodrigues Davanso. **Efeitos dos ácidos graxos na função de macrófagos de camundongos com diabetes tipo I induzido**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BRAGGIO, M. M.; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 149-153, abr./jun., 2003. Disponível em: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arg/V70_2/braggio.pdf.

CARDOSO, Celia Virginia Pereira. Classificação de Biotérios quanto à Finalidade. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 29-31.

CARISSIMI, André Silva; PASSOS, Luiz Augusto Corrêa. Desenho Arquitetônico e Tecnologias para Alojamento. *In*: LAPCHIK, Valderez Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 49-60.

CHEN, Yi-Guang; MATHEWS, Clayton E.; DRIVER, John P. The role of NOD mice in type 1 diabetes research: lessons from the past and recommendations for the future. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 51, fevereiro, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00051/full>.

CHORILLI, Marlus; MICHELIN, Daniel C.; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e**

Aplicada, v. 28, n. 1, p. 11-23. abr./jul., 2007. Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/531>.

COLUCCI, Juliana Almada. **Sistema renina-angiotensina em tecidos de camundongos espontaneamente diabéticos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista e Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

COUTO, Sebastião Enes Reis. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Sanitário. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 59-64.

DE OLIVEIRA, Gabriel Barbosa. **Estudo do perfil genético de linhagens de camundongos mantidos nos biotérios de criação de duas instituições parceiras na Rede Mineira de Bioterismo**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

DEMETERCO, Carla; LEVINE, Fred. Terapia gênica para o diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 1, p. 96-107, janeiro, 2001. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/abem/a/DXpYcbLvRFg8QLmsRgW3R4w/?format=pdf&lang=pt>

DICK, John E. *et al.* Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. **Stem cells**, v. 15, n. S2, p. 199-207, 1997. Disponível em: <https://stemcellsjournalsonline.wiley.com/doi/epdf/10.1002/stem.5530150826>

DOMINGUES FILHO, Robson Laroca. **Determinação da curva glicêmica e alterações histológicas de camundongos NOD produzidos no ICTB/FIOCRUZ**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências de Animais de Laboratório) – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

FRAJBLAT, Marcel; AMARAL, Vera Lucia Langaro. Biotécnicas reprodutivas na produção de animais geneticamente modificados para pesquisa biomédica. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.103-104, jan./mar., 2017. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p103-04%20\(RB672\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p103-04%20(RB672).pdf)

HANAFUSA, Toshiaki *et al.* The NOD mouse. **Diabetes research and clinical practice**, v. 24, p. S307-S311, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0168-8227(94)90267-4)

HAZZARD, Karen C.; WATKINS-CHOW, Dawn E.; GARRETT, Lisa J. Method of euthanasia influences the oocyte fertilization rate with fresh mouse sperm. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 641-646, novembro, 2014. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2014/00000053/00000006/art0002#>

KIRSTEN, Vanessa Ramos. **Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciência da Saúde) – Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

KIRSTEN, Vanessa R.; SESTERHEIM, Patrícia; SAITOVITCH, David. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 1, p. 3-10, março, 2010. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/159>

KO, Gui Mi; DE LUCA, Rosália Regina; OLIVEIRA, Gabriel Melo. Camundongo de Laboratório. *In*: LAPCHIK, Valdevez Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 169-199.

KUMAGAI, Katsuyoshi *et al.* Generation of transgenic mice on an NOD/SCID background using the conventional microinjection technique. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 4, p. 682-688, abril, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087106>

GLENISTER, Peter H.; THORNTON, Claire E. Cryoconservation—archiving for the future. **Mammalian genome**, v. 11, n. 7, p. 565-571, julho, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003350010108>

LAMBERT, R. Breeding strategies for maintaining colonies of laboratory mice: A Jackson Laboratory resource manual. **Jackson Laboratories**, v. 10, 2007. Disponível em: www.jax.org/jaxmice

LEITER, Edward H. The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. **ILAR Journal**, v. 35, n. 1, p. 4-14, janeiro, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar.35.1.4>

LEITER, Edward H. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. **Current protocols in immunology**, v. 24, n. 1, p. 15.9. 1-15.9. 23, maio, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1509s24>

LIN, Yi *et al.* Prevention of embryo loss in non-obese diabetic mice using adoptive ITGA2+ ISG20+ natural killer-cell transfer. **Reproduction**, v. 137, n. 6, p. 943, 2009. Disponível em: www.reproduction-online.org

LUO, Charlie *et al.* Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 471-478, julho, 2011. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2011/00000050/00000004/art00006#expand/collapse>

MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; LAPCHIK, Valderez Bastos Valero; KO, Gui Mi. Métodos para Produção de Ratos e Camundongos de Laboratório. *In*: LAPCHIK,

Valderez Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 141-153.

MOLEY, K. H. *et al.* Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. **Reproduction**, v. 93, n. 2, p. 325-332, novembro, 1991. Disponível em: https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/93/2/jrf_93_2_009.xml

MORAES, Oscar Albuquerque de *et al.* **Avaliação da modulação autonômica cardiovascular de camundongos diabéticos não obesos**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Medicina da Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2013.

MOREIRA, Virgínia Barreto. **Eficiência reprodutiva de camundongos endogâmicos BALB/c em diferentes idades de acasalamento, com ou sem enriquecimento ambiental**. 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MOREIRA, Virgínia Barreto. **Eficiência reprodutiva e comportamento parental de camundongos isogênicos e heterogênicos produzidos em ambiente modificado**. 2015. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

MULLEN, Yoko. Development of the nonobese diabetic mouse and contribution of animal models for understanding type 1 diabetes. **Pancreas**, v. 46, n. 4, p. 455, abril, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359790/>

PRICHETT-CORNING, Kathleen R. *et al.* **Guidebook on mouse and rat colony management**. Charles River Laboratories. 2015.

RANGEL, Humberto de Araújo. A Evolução da Ciência de Animais de Laboratório no Brasil. *In*: LAPCHIK, Valderez Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura;

KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 3-9.

REED, James C.; HEROLD, Kevan C. Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 5, p. 308-314, janeiro, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2014.236>.

ROUSTAN, Audrey; PERRIN, Jeanne; COURBIERE, Blandine. Reply: Mouse euthanasia by isoflurane inhalation: a controversial method for the animal welfare and a negative impact on oocyte quality. **Laboratory Animals**, v.46, n.4, p. 360–360, outubro, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/la.2012.012130>.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: **Universities Federation for Animal Welfare (UFAW)**, 1992. Special Edition. Disponível em: http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.html.

SALGADO, Andréia Ruis; PASSOS, Luiz Augusto Corrêa. A Criopreservação e a Fertilização *in vitro*. In: LAPCHIK, Valderéz Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 465-486.

SANCHES, Juliane Cristina Trevisan. **Efeitos da duração do diabetes mellitus tipo I sobre a placenta e o desenvolvimento fetal em modelo de camundongos**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SANTAGOSTINO, Sara F. *et al.* Pathology of aging in NOD scid gamma female mice. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 5, p. 855-869, março, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300985817698210>.

SANTOS, Anne Carolline Veríssimo dos *et al.* **Alterações placentárias decorrentes do diabetes tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD)**. 2016.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2016.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Criação e manejo de camundongos. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 115-118.

SANTOS, Belmira Ferreira dos. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Genético. *In*: ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 65-70.

SARAIVA, M. V. A. *et al.* Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 206-221, out./dez., 2010. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n4/p206-221.pdf>.

SIMMONS, J.G. **Médicos e descobridores – vidas que criaram a Medicina de hoje**. São Paulo: Record, 2004.

SORAES, M.B.P. *et al.* Dissociation between Inflammation and Tissue Parasitism. **The American Journal of Pathology**. v.159 n.2, p. 703-709, agosto, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61741-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61741-5)

SOBRINHO, C. M. F. *et al.* Influência de diferentes tipos de dieta sobre a obtenção de embriões coletados de camundongos fêmeas (*Mus musculus*) superovuladas. **R. bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.2, p. 284-288, abr./jun. 2015. Disponível em: [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag284-288%20\(RB576\).pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag284-288%20(RB576).pdf)

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, março, 2001. Disponível em: <https://www.biomed.cas.cz/physiolres/2001/issue6/pdf/szkudelski.pdf>.

TATEWAKI, Reiko *et al.* Chromosome analysis in preimplantation stage embryos of non-obese diabetic (NOD) mice. **Congenital Anomalies**, v. 29, n. 1, p. 7-13, março, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.1989.tb00731.x>

TEIXEIRA, Maria Araújo. Impacto dos Fatores Ambientais. *In*: LAPCHIK, Valderez Bastos Valero; MATTARAIA, Vania Gomes de Moura; KO, Gui Mi. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017. p. 89-100.

WURI, Liga; AGCA, Cansu; AGCA, Yuksel. Euthanasia via CO2 inhalation causes premature cortical granule exocytosis in mouse oocytes and influences in vitro fertilization and embryo development. **Molecular reproduction and development**, v. 86, n. 7, p. 825-834, maio, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.23167>