



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MICHELLE GUIMARAES DOS SANTOS CUNHA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA CIRÚRGICA DE
EMBRIÕES: PROCEDIMENTO E VÍDEO EDUCATIVO**

**RIO DE JANEIRO
2024**

MICHELLE GUIMARAES DOS SANTOS CUNHA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA CIRÚRGICA DE
EMBRIÕES: PROCEDIMENTO E VÍDEO EDUCATIVO**

Dissertação de Mestrado Profissional de
Formação para a Pesquisa Biomédica, Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade
Federal do Rio de Janeiro

Orientador: Marcel Frajblat
Co-orientadora: Caroline dos Santos da Fonseca

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

C972i GUIMARAES DOS SANTOS CUNHA, MICHELLE
Desenvolvimento e Padronização da Transferência
Cirúrgica de Embriões: Procedimento e Vídeo
Educativo/ MICHELLE GUIMARAES DOS SANTOS CUNHA.
- Rio de Janeiro, 2024.
54 f.

Orientador: MARCEL FRAJBLAT.
Coorientador: CAROLINE DA FONSECA.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Programa de Mestrado Profissional em Formação
para a Pesquisa Biomédica, 2024.

1. REPRODUÇÃO ASSISTIDA. 2. TRANSFERENCIA
EMBRIONÁRIA. 3. BIOTECNOLOGIA. I. FRAJBLAT, MARCEL,
orient. II. DA FONSECA, CAROLINE, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

“DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA
CIRÚRGICA DE EMBRIÕES EM CAMUNDONGOS: PROCEDIMENTO E
VÍDEO EDUCATIVO”

**MICHELLE GUIMARÃES DOS SANTOS
CUNHA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO
PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 24 de outubro de 2024.

Flavia Fonseca Bloise

DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA
BIOMÉDICA)

Marcel Frajblat

DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR

Caroline dos Santos Fonseca

DRA. CAROLINE DOS SANTOS FONSECA (DOUTORA – UFRJ) – COORIENTADORA

VÍDEOCONFERÊNCIA

DRA. CLAUDIA PINTO FIGUEIREDO (DOUTORA -UFRJ)

Fernanda de Mello e Souza Gubert

DRA. FERNANDA DE MELLO E SOUZA GUBERT - (DOUTORA – UFRJ)

Mariana Boechat de Abreu

DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ)

VÍDEOCONFERÊNCIA

DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTORA – UFRJ) - REVISORA

DEDICATÓRIA

Aos preciosos animais de laboratório, cujo sacrifício e dedicação foram fundamentais para o progresso e conclusão desta tese de mestrado, dedico esta nota com profunda gratidão e respeito.

Reconheço plenamente a contribuição significativa que vocês proporcionaram para o avanço da ciência e para o aprimoramento do conhecimento humano. Cada experimento realizado, cada descoberta feita, cada insight alcançado ao longo desta jornada de pesquisa foi possível graças à sua participação valiosa.

Saibam que cada medida foi tomada para garantir seu bem-estar e conforto durante o tempo em que estiveram conosco. Seus contributos não serão esquecidos, e suas vidas não foram em vão. Espero sinceramente que, no futuro, possamos avançar ainda mais nas práticas de pesquisa, buscando sempre alternativas que minimizem o uso de animais em experimentos.

Vocês são verdadeiros heróis silenciosos, cujo legado de sacrifício e contribuição para o progresso científico não passará despercebido. Que suas vidas inspirem uma abordagem mais ética e compassiva na comunidade científica.

Com sincera gratidão,

Michelle Guimarães dos Santos Cunha

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este espaço para expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que desempenharam um papel fundamental na conclusão desta jornada acadêmica. Em primeiro lugar, desejo agradecer ao meu orientador, Marcel Frajblat, pela sua orientação excepcional e apoio inabalável, os quais foram valiosos ao longo deste processo. Sua dedicação e expertise foram essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Além disso, gostaria de estender meus sinceros agradecimentos à minha coorientadora, Caroline dos Santos da Fonseca, pela sua orientação, dedicação e contribuições que foram significativas para minha formação.

Um agradecimento especial a toda a equipe do Laboratório de Inovações em Reprodução Assistida e Laboratório de Animais Transgênicos por fornecer o ambiente propício e recursos necessários para a realização desta pesquisa.

Agradeço à minha família pelo amor incondicional, incentivo constante e apoio emocional durante toda esta jornada.

Em particular, gostaria de expressar minha gratidão ao meu esposo, Luiz Gustavo, por seu apoio inabalável, compreensão e paciência durante os momentos desafiadores. Suas palavras de encorajamento foram a força motriz por trás da minha perseverança.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu pai, Sérgio Nunes dos Santos. Embora ele não esteja mais fisicamente presente, seu amor e apoio moldaram quem sou hoje e continuam a me inspirar e motivar diariamente. Sua memória e seus ensinamentos foram fundamentais para minha jornada acadêmica e pessoal. Esta conquista é dedicada a ele, em honra à sua memória e ao impacto duradouro que teve em minha vida.

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento à minha mãe, Iara Guimarães. Seu amor, apoio e sacrifícios incondicionais foram fundamentais para minha jornada acadêmica. Sua constante presença, encorajamento e dedicação me acompanharam em cada etapa deste caminho. Esta dissertação é um reflexo de tudo o que você fez por mim, e sou eternamente grato por ter você ao meu lado.

A todos que contribuíram de diversas formas para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

CUNHA, Michelle Guimarães dos Santos. Implementação do protocolo de transferência embrionária. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2024.

A reprodução assistida se tornou uma área essencial na pesquisa biomédica com animais, devido ao aumento do número de linhagens e a necessidade de preservar a diversidade genética. Dentre as técnicas empregadas, destacam-se a criopreservação de gametas e embriões, fertilização *in vitro*, produção de novos modelos, importação e limpeza sanitária de linhagens. A transferência cirúrgica de embriões (TCE) desempenha papel crucial em todos esses procedimentos, demandando treinamento e habilidade pessoal para assegurar o sucesso. O objetivo dessa pesquisa foi elaborar um protocolo operacional padrão de TCE no Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA) da UFRJ. Foram usados camundongos da linhagem Swiss, nos quais foram testados dois tipos de acessos para realização da transferência: 1) o grupo INFUD representa as fêmeas cujo acesso foi pela região do infundíbulo da tuba uterina, e 2) o grupo AMP, pela região da ampola. Foram realizadas 30 transferências para cada grupo e foram analisadas as taxas de gestações e nascimentos. Foram utilizadas 29 fêmeas para transferência de embriões, sendo 15 no grupo AMPOL e 14 no grupo INFUND. Todas as transferências para a ampola resultaram em nascimento, enquanto o grupo INFUND apresentou 11 nascimentos (100% e 79,0% de taxa de nascimento entre AMPOL e INFUND, respectivamente, $P < 0,05$). No total, foram transferidos 445 embriões para o grupo AMPOL e 407 para o grupo INFUND, com médias de 29,7 e 29,1 embriões por fêmea, respectivamente. Observou-se uma média de filhotes nascidos maior no grupo AMPOL em comparação com o INFUND (29,1 e 20,0, respectivamente, $P < 0,05$). Considerando o número de embriões transferidos, a média de filhotes nascidos por número de fêmeas mostrou-se mais realista para avaliar o sucesso do procedimento.

Palavras-chave: reprodução assistida, transferência cirúrgica de embriões, fertilização *in vitro*, modelos animais, taxa de gestação, taxa de nascimento, infundíbulo, ampola.

ABSTRACT

CUNHA, Michelle Guimarães dos Santos. Implementação do protocolo de transferencia embrionária. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2024.

Assisted reproduction has become an essential area in the use of animals in biomedical research due to the increased use of various lineages and the need to preserve genetic diversity. Among the techniques employed, the cryopreservation of gametes and embryos, in vitro fertilization, production of new models, importation and sanitary cleaning of lineages stand out. The surgical transfer of embryos (TCE) plays a crucial role in all these procedures, demanding extensive training and personal skill to ensure success. The objective of this project is to develop a TCE protocol at the Laboratory of Innovation in Assisted Reproduction (LIRA) at UFRJ. Two type of aceisses will be compared: INFUD group, through the region of infundibulum of the uterine tube, and AMP group, through the region of ampulla. Thirty transfers will be performed for each group, analyzing pregnancy and birth rates. For this study, 29 females were used for embryo transfer, with 15 in the AMPOL group and 14 in the INFUND group. All 15 transfers to the ampulla resulted in births, while 11 births occurred in the INFUND group (100% and 79.0% birth rates between AMPOL and INFUND, respectively, $P < 0.05$). In total, 445 embryos were transferred to the AMPOL group and 407 to the INFUND group, with averages of 29.7 and 25.4 embryos per female, respectively. A higher average of pups born was observed in the AMPOL group compared to the INFUND group (29,1 and 20.0, respectively, $P < 0.05$). However, considering the number of embryos transferred, the average number of pups born per females proved to be a more realistic measure of the success of the procedure.

Keywords: assisted reproduction, surgical embryo transfer, in vitro fertilization, animal models, pregnancy rate, birth rate, infundibulum, ampulla.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Importância da pesquisa biomédica e do uso de animais.....	15
2.2. Importância do camundongo na pesquisa biomédica	16
2.3. Reprodução assistida e sua participação na pesquisa biomédica	17
2.4. Anatomia do trato reprodutivo feminino	20
2.5. Fisiologia do ciclo estral do camundongo	22
2.6. Controle do ciclo estral em camundongos	25
2.7. Importância da Transferência de Embriões	26
2.8. Fatores que podem afetar o resultado da transferência de embriões	28
.....	
2.8.1. Acesso pelo infundíbulo ou pela ampola	28
2.8.2. Qualidade dos embriões	28
2.8.3. Estágio embrionário	28
2.8.4. Linhagem.....	29
2.8.5. Momento e Local da Transferência (Tuba uterina ou útero).....	29
2.8.6. Sincronização entre embrião e estágio uterino	30
2.8.7. Utilização de fêmeas pseudogestantes e machos vasectomizado	30
2.8.8. Número de embriões transferidos	30
2.8.9. Manipulação dos Embriões transferidos.....	30
2.8.10. Transferência para um ou para os dois cornos uterinos.....	31
2.8.11. Anestésicos e analgésicos	31
2.8.12. Velocidade do Procedimento	32
2.8.13. Habilidades Técnica	32
2.9. Local de Transferência dos Embriões	33
2.9.1. Transferência para o corno uterino	33

2.9.2. Transferência para a tuba uterina	33	
2.9.3. Locais de Transferência na tuba uterina	34	
3. PROBLEMA	36	
4. OBJETIVO	36	
4.1. Objetivo Geral	36	
4.2. Objetivos Específicos	36	
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36	
5.1. Animais.....	37	
5.2. Grupos Experimentais	37	
5.3. Fêmeas produtoras de embriões	37	
5.4. Machos Reprodutores Íntegros.....	38	
5.5. Machos Vasectomizados	39	
5.6. Produção das Fêmeas Receptoras e Transferência dos Embriões	40	
5.7. Transferência pelo Infundíbulo	41	
5.8. Transferência pela Ampola.....	42	
5.9. CÁLCULO AMOSTRAL, COMPARAÇÕES E ANÁLISE ESTATÍSTICA		43
6. RESULTADOS	46	
6.1 Procedimento Operacional Padrão – POP	46	
6.2. Produção do vídeo educativo.....	47	
7. PRODUTO.....	47	
8. DISCUSSÃO	48	
9. CONCLUSÃO	55	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56	

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Anatomia do aparelho reprodutor feminino de camundongos.	21
Figura 02: O ciclo reprodutivo do camundongo	23
Figura 03: Ilustração com as regiões da tuba uterina nas quais a transferência cirúrgica pode ser realizada.....	33
Figura 04: Ilustração da sequência da pipeta de transferência.....	40
Figura 05: Ilustração com as regiões anatômicas no camundongo.	41
Figura 06: Transferência com acesso pela ampola	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características biológicas, fisiológicas e reprodutivas dos camundongos.....	15
Tabela 02. Fatores que podem afetar os resultados da técnica de transferência cirúrgica de embriões em camundongos.....	24
Tabela 03. Variáveis que podem afetar os resultados de uma transferência de embriões e condições destas variáveis no presente projeto	31
Tabela 04. Resultados da transferência de embriões para a região do infundíbulo ou para a região da ampola da tuba uterina	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CrioP – grupo experimental de embriões que foram criopreservados

eCG – do inglês, “*equine chorionic gonadotrofin*”, Gonadotrofina coriônica equina

FIV – Fertilização *in vitro*

hCG – do inglês, “*human chorionic gonadotrofin*”, Gonadotrofina coriônica humana

HEPES - ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico, tampão existente no meio de HTF, para coleta dos embriões

HTF – do inglês, “*human tubarian fluid*” fluido tubário humano, meio utilizado para coleta de embriões de camundongos.

LIRA – Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

TE – Transferência embrionária

TCE – Transferência cirúrgica embrionária

INFUND – Infundíbulo da tuba uterina

AMPOL – Ampola da tuba uterina

UI – Unidades internacionais

IP - Intraperitoneal

1. INTRODUÇÃO

O uso de animais em pesquisa, apesar de controverso, é indispensável para o entendimento da fisiopatologia das doenças e para o desenvolvimento de novos tratamentos, pois permite simular de forma mais realista a complexidade dos organismos vivos. Os camundongos, em particular, são os modelos experimentais mais utilizados devido à sua homologia genética com os humanos, facilidade de manejo, rápido ciclo de vida e custo relativamente baixo.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) possui uma longa tradição no uso de camundongos para pesquisa biomédica, abrigando o Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) e o Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA). Nesse contexto, a reprodução assistida é uma área essencial, pois através de suas técnicas é possível a produção e manutenção de diversas linhagens de camundongos.

Técnicas como a transferência cirúrgica de embriões (TCE) são essenciais para a preservação da diversidade genética e para o sucesso dos experimentos. Outra importante contribuição da técnica é por ela possibilitar a criação de animais transgênicos, facilitando estudos sobre a função de genes específicos, a investigação de doenças genéticas e o desenvolvimento de terapias inovadoras.

Este trabalho teve como objetivo implementar e avaliar um protocolo de TCE, comparando dois acessos distintos para a transferência embrionária: pela região do infundíbulo e pela ampola da tuba uterina. A análise das taxas de gestações e nascimentos permitirá determinar a eficiência dos métodos propostos, contribuindo para o aprimoramento das práticas de reprodução assistida animal na pesquisa biomédica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância da pesquisa biomédica e do uso de animais

A pesquisa biomédica tem um papel fundamental na descoberta de novos tratamentos e terapias para doenças humanas, melhorando a saúde e a qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. Neste contexto, o uso de animais em pesquisa é uma importante ferramenta para ampliar os conhecimentos, e compreender melhor a fisiopatologia das doenças humanas e animais, e apesar de controverso, o uso de modelos animais ainda se mostra necessário devido a possibilidade de simulação de um organismo semelhante ao humano. (PRESGRAVE et al., 2010; HUIJBERS et al., 2015).

Seres humanos, camundongos e outros mamíferos compartilham um ancestral comum há aproximadamente 80 milhões de anos (BATZOGLOU et al., 2000). Por isso, há grande homologia genética entre humanos e camundongos. O trabalho de Batzoglou (2000) mostra que, de um total de 4.000 genes analisados, menos de 10 foram encontrados em uma espécie, mas não na outra, Portanto, é natural que os genomas de todos os mamíferos sejam comparativamente semelhantes (PEREIRA, 2008).

Dentre as diversas espécies de animais usados para estudos, como os primatas não humanos e porcos, os roedores, principalmente os camundongos, têm sido os modelos experimentais mais utilizados e bem estabelecidos. O tamanho reduzido, o ciclo de vida curto, grande facilidade de obtenção, a facilidade de produção e micromanipulação de embriões desta espécie facilitam o desenvolvimento de projetos interessados na função dos genes (PESQUERO, 2002).

Em posse dessa informação, o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na UFRJ, por meio de um projeto nos anos 90, construiu o Laboratório de Animais Transgênicos (LAT), para abrigar os animais geneticamente modificados utilizados na universidade. Porém, a crescente demanda por estes tipos de animais, inspirou a criação do Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA), cujo objetivo é apoiar a pesquisa biomédica com animais por meio de biotecnologias da reprodução assistida em animais de laboratório.

2.2. Importância do camundongo na pesquisa biomédica

O camundongo pertence à Classe: Mammalia, Ordem: Rodentia, Família: Muridae, Gênero: *Mus*, Espécie: *Mus musculus* (LINNEAUS, 1758), e apresentam como características principais: o corpo fusiforme, a cauda que pode ser mais comprida do que o corpo, coloração natural marrom escura no dorso, com um ventre mais claro e cinzento, não possuem glândulas sudoríparas e patas anteriores e posteriores possuem cinco dedos (ANDRADE, 2002).

Atualmente os camundongos são os animais mais utilizados e compreendidos pelos cientistas em testes laboratoriais, ensino e pesquisa biomédica, devido ao seu baixo custo e fácil manipulação. Devido ao seu vasto uso seu genoma é bem conhecido, oferecendo a variação genética mais bem definida entre os animais disponíveis, com extensa literatura, o que explica o seu amplo uso na pesquisa genética, incluindo a identificação de genes responsáveis por doenças específicas, a compreensão da expressão gênica e a manipulação genética para produção de animais transgênicos (HOURMAT et al., 2021; BROWN, 2022).

Além disso, essa espécie é altamente fértil, possui tamanho reduzido e um ciclo de vida breve, o que permite avaliar o objeto de estudo ao longo de várias gerações em um período relativamente curto. Além disso, a utilização de modelos murinos para xenotransplantes—uma técnica que envolve a inserção de tecidos ou células humanas em camundongos—proporciona uma avaliação rápida e relativamente simples do potencial de formação de tumores de certos materiais biológicos ou dos efeitos antitumorais de novas drogas. Isso torna a técnica essencial para pesquisas na área de oncologia (ANDRADE, PINTO E OLIVEIRA, 2002). A Tabela 01 destaca algumas das características fisiológicas dos camundongos.

Tabela 01. Características biológicas, fisiológicas e reprodutivas dos camundongos (adaptado de Neves, Mancini Filho e Menezes, 2013)

Parâmetro	Valor
Peso ao Nascer	1-2g
Peso ao Desmame	10-15g
Peso Adulto (Macho)	25-50g
Peso Adulto (Fêmea)	25-45g
Idade Adulta Jovem	6 Semanas
Início da Idade Reprodutiva	6-8 Semanas
Final da Idade Reprodutiva	8-10 Meses
Ciclo Estral	4-5 Dias
Duração do Estro	10-20 Horas
Mecanismo de Ovulação	Espontânea
Período de Gestação	19-21 Dias
Idade do Desmame	19-21 Dias

2.3. Reprodução assistida e sua participação na pesquisa biomédica

O uso de técnicas de reprodução assistida se tornou uma área essencial nas instituições de pesquisa devido o grande número de linhagens de camundongos disponíveis para a pesquisa, haja vista que, em muitos casos, os processos de produção dessas linhagens requerem a manipulação de embriões (WOHLRES-VIANA et al., 2006).

A reprodução assistida reúne diversas técnicas que possibilitam a manipulação de gametas com finalidade de: a criopreservação, formação de embriões, transferência embrionária e produção de camundongos transgênicos. O uso dessa ferramenta auxilia na investigação de diferentes condições humanas através de modelos animais (BARUSELLI et al., 2020).

De acordo com MOCHIDA (2020), as tecnologias de reprodução assistida têm sido desenvolvidas em espécies de animais de pequeno porte para sua eficiente preservação e a produção de linhagens geneticamente modificadas. São exemplos de técnicas utilizadas em reprodução assistida em camundongos:

- **Criopreservação de espermatozoides:** Estratégia mais rápida e eficiente para preservar e assegurar linhagens geneticamente modificadas (DAVISSON e TAFT, 2006). Com apenas dois machos é possível congelar um grande número de amostras que podem ser mantidas por tempo indefinido em nitrogênio líquido (DAVISSON e TAFT, 2006). No processo de recuperação das amostras congeladas, a fertilização *in vitro* seguida da transferência cirúrgica dos embriões são técnicas necessárias.
- **Criopreservação de embriões:** Técnica mais tradicional para preservação de linhagens, tanto linhagens transgênicas quanto as selvagens isogênicas ou heterogênicas. Porém, são necessários cerca de 150-200 embriões para cada linhagem, o que exige um bom número de fêmeas receptoras (DAVISSON e TAFT, 2006). Apesar da criopreservação de espermatozoides basicamente substituir os embriões para linhagens transgênicas com uma única alteração em seu genoma a demanda por embriões continua alta em centros de biotecnologia com grandes números de linhagens e mutações duplas ou triplas. Após a recuperação dos embriões, a técnica de transferência cirúrgica para a receptora será necessária para o nascimento dos animais.
- **Fertilização *in Vitro* (FIV):** Esta técnica é necessária para recuperar as linhagens que tiveram espermatozoides criopreservados. Óvulos de fêmeas selvagens, com o mesmo fundo genético, serão fertilizados com os espermatozoides criopreservados (PAIM, 2015). Os embriões resultantes da FIV serão transferidos cirurgicamente para as fêmeas receptoras (pseudoprenhes), para a obtenção de filhotes com a genética desejada.
- **Produção de animais geneticamente modificados:** Há um projeto internacional de produção de camundongos mutantes que já gastou \$350 milhões e conseguiu alterar cerca de 25% do genoma do camundongo (COHEN, 2016). A tecnologia do CRISPR causou um avanço significativo neste projeto, através de alteração genética pontual, com metodologia mais simples e barata do que as tradicionais TALENs e Zinc Fingers (RAEHUM, 2022). Não há dúvidas que a velocidade e a redução de custos com o CRISPR tornaram o progresso deste projeto mais acelerado. Porém, ainda é necessária a

produção e micromanipulação de embriões, com sua posterior transferência cirúrgica para fêmeas receptoras (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

- **Importação de linhagens:** Importar embriões ou espermatozoides criopreservados é bem menos complexo que animais vivos, inclusive em termos de burocracia. A não importação de animais vivos e a preferência pela importação de embriões e espermatozoides de camundongo podem ter diversos benefícios, entre eles:

A redução de custos e a diminuição do uso e sofrimento de animais são benefícios significativos ao optar pela importação de embriões ou espermatozoides criopreservados em vez de animais vivos. Esse método elimina despesas associadas ao transporte especializado e à manutenção de condições ideais para os animais durante o deslocamento, além de simplificar os procedimentos alfandegários. Do ponto de vista ético, evita o estresse, o desconforto e os riscos à saúde que os animais podem sofrer durante o transporte, promovendo práticas mais humanitárias e alinhadas às diretrizes de bem-estar animal, enquanto mantém a viabilidade genética necessária para os experimentos.

- **Redução do risco de doenças:** De acordo com TYSON (2012), a importação de camundongos pode apresentar desafios e riscos para a biossegurança e a integridade genética das colônias do biotério de destino. A importação de animais vivos pode aumentar o risco de introdução de doenças ou patógenos indesejados em uma instituição ou país. A importação de embriões e gametas reduzem esse risco, já que eles normalmente não carregam esses patógenos.
- **Redução do sofrimento animal:** As técnicas de reprodução assistida possibilitam a redução e o sofrimento no uso de animais. Pois permitem diminuir a quantidade de reprodutores para a produção e manutenção de linhagens, conseqüentemente, reduz a quantidade de manipulação e os possíveis estresses nos animais.
- **Melhor controle genético:** A manipulação de embriões e gametas permitem um melhor controle genético, já que é possível escolher os doadores com base em suas características genéticas e comportamentais. Isso pode melhorar a qualidade da pesquisa e aumentar a reprodutibilidade dos resultados.

- **Custos reduzidos:** A manutenção e importação de animais vivos representa altos valores, devido ao transporte e cuidados exigidos pela legislação e para garantir o bem-estar, fora o risco de perdas animais. Com isso, a manipulação de embriões e gametas torna-se mais econômica, pois elimina o cuidado e as burocracias exigidas quando envolvem animais vivos.
- **Limpeza sanitária de linhagens:** Melhor estratégia para eliminar patógenos de uma colônia. Boa parte dos patógenos são transmitidos por exposição ao sangue materno durante o parto. Dessa forma, a transferência de embriões para receptoras livres de patógenos e a cesárea asséptica garantem que os filhotes de fêmeas contaminadas nascerão livres dos patógenos. (MULLEN; CRITSER, 2007; AMORIM et al., 2011a).

Todas as tecnologias descritas acima têm em comum a necessidade da transferência de embriões para a sua conclusão, salientando o quanto a transferência de embriões se torna um ponto crítico em todos os laboratórios de reprodução assistida de animais de laboratório e por esta razão se tornou o foco deste trabalho.

Estas tecnologias são fundamentais dentro de um contexto no qual camundongos continuarão a ser utilizados como ferramentas na pesquisa biomédica. O número de linhagens de camundongo disponíveis para pesquisa biomédica está próximo a 20 mil e potencialmente pode chegar a 50 mil levando em consideração animais *knockout* (com uma ou duas ou mais mutações), *knockin*, transgênicos e knockouts em diferentes fundos genéticos (FAHEY et al., 2013). Nesta realidade, a produção e gerenciamento de novas colônias passam a ser um desafio e a reprodução assistida torna-se uma área essencial na pesquisa biomédica.

2.4. Anatomia do trato reprodutivo feminino

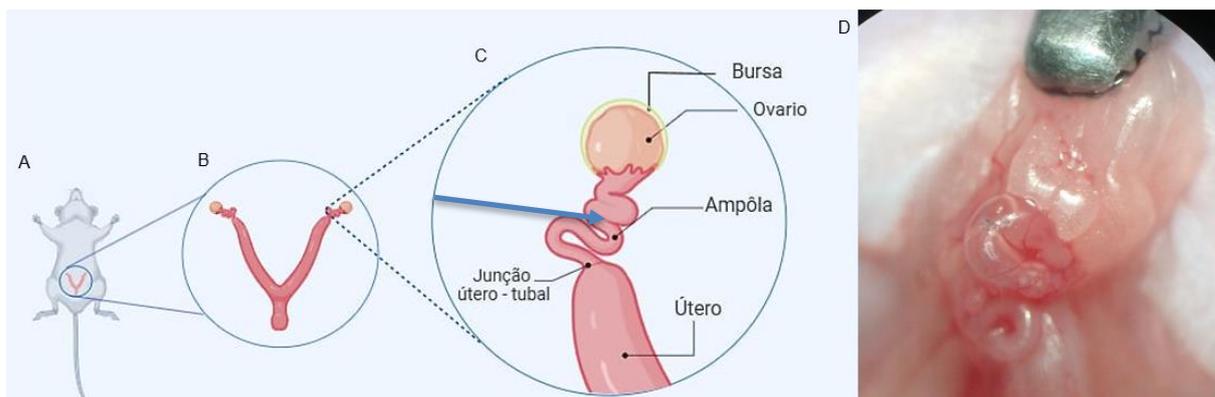
O sistema reprodutor feminino é essencial para a perpetuação da espécie em mamíferos, desempenhando um papel central na reprodução e na continuidade genética. O estudo detalhado da anatomia e fisiologia do sistema reprodutor é fundamental para compreender os mecanismos subjacentes à fertilidade, desenvolvimento embrionário e saúde reprodutiva. Nesse contexto, os camundongos (*Mus musculus*) têm se destacado como modelos experimentais valiosos para

investigar uma ampla gama de questões relacionadas à biologia reprodutiva, devido à sua fácil manipulação genética, reprodução rápida e baixo custo de manutenção (RENDI et al., 2012).

O sistema reprodutor das fêmeas de camundongo é complexo e compartilha muitas semelhanças com o das fêmeas de outros mamíferos, incluindo humanos (WASSON, 2017). Ele é composto por vários órgãos interconectados que desempenham papéis específicos na reprodução. Os camundongos têm dois ovários, que são responsáveis pela produção dos óvulos ou ovócitos, além da produção de hormônios, como estrogênio e progesterona, que são essenciais para o ciclo reprodutivo e a manutenção da prenhez (RENDI et al., 2012) (Figura 01). Os ovários são recobertos pela bursa ovariana, também conhecida como bursa de Fabrício que desempenha um papel importante no sistema reprodutivo desses animais. Ela é composta por tecido conjuntivo e é revestida por uma membrana epitelial, sua forma pode variar, mas geralmente é oval ou arredondada, e sua aparência pode ser translúcida ou levemente esbranquiçada (Figura 01 C). Embora a bursa ovariana seja uma estrutura importante no sistema reprodutivo das fêmeas de camundongos, sua função específica ainda não é totalmente compreendida. No entanto, sabe-se que ela está envolvida na regulação do desenvolvimento e da função dos ovários, bem como na manutenção da integridade do sistema reprodutivo como um todo (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

Figura 01: Anatomia do aparelho reprodutor feminino de camundongos. (A) Esquema de camundongo em decúbito dorsal, mostrando a localização anatômica do útero e dos ovários. (B) Esquema do aparelho reprodutor feminino. (C) Esquema ampliado de B, mostrando e identificando todas as estruturas. (D) Foto real com foco principal na tuba ovariana, seta azul indicando a ampola.

Colocar autores das fotos



As tubas uterinas conectam os ovários ao útero e são os locais onde geralmente ocorre a fertilização do óvulo pelo espermatozoide. Anatomicamente, a tuba uterina dos camundongos é composta por três partes principais: a infundíbulo, a ampola e o istmo ou junção útero-tubal (Figura 01 C). O infundíbulo é a porção mais distal da tuba, caracterizada por uma estrutura chamada fimbria, que ajuda a capturar o óvulo após a ovulação (EDSON et al., 2009). A ampola é a porção intermediária e é onde a fertilização geralmente ocorre. O istmo é a porção mais próxima do útero e se conecta diretamente a ele (Figura 01 C). É importante ressaltar que a tuba uterina não atua apenas transportando o óvulo, mas também fornecendo um ambiente propício para a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. As células secretoras presentes na mucosa da tuba uterina produzem fluidos que ajudam a nutrir e proteger os espermatozoides e o embrião em desenvolvimento (RENDI et al., 2012).

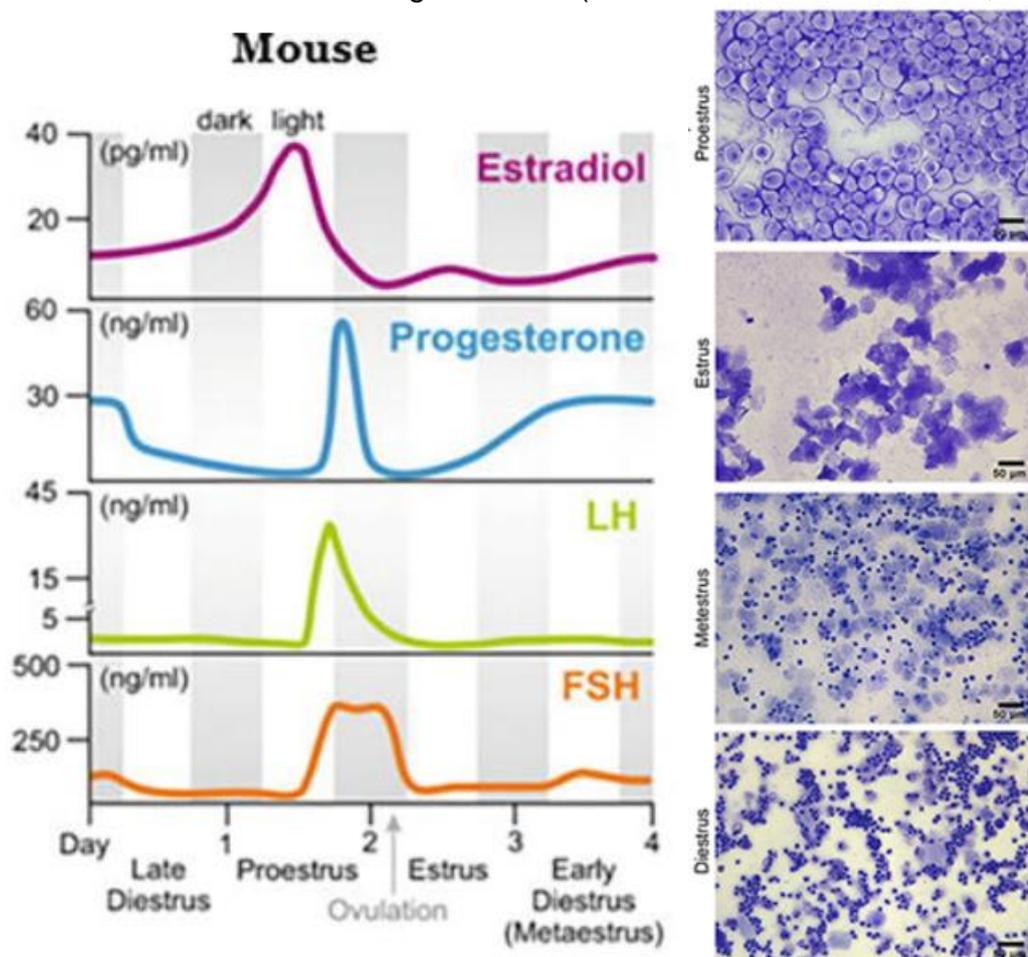
O útero dos camundongos, assim como em outros mamíferos, é o órgão onde o embrião se implanta e se desenvolve durante a gestação. No entanto, em camundongos, o útero tem uma estrutura um pouco diferente de outros mamíferos. O útero dos camundongos é composto por dois cornos uterinos alongados e estreitos, que se fundem em um corpo uterino curto (NELSON et al., 2012; GONZALEZ, 2016) (Figura 01 A, B). Essa estrutura em forma de "Y" é uma adaptação importante para acomodar múltiplos embriões durante a gestação. Cada corno uterino é revestido internamente por uma mucosa conhecida como endométrio, que é ricamente vascularizada e secretora, fornecendo o ambiente necessário para o desenvolvimento do embrião (RENDI et al., 2012).

Durante a gestação, o útero dos camundongos passa por mudanças morfológicas e funcionais significativas para sustentar o crescimento e o desenvolvimento dos fetos. Isso inclui o aumento do suprimento sanguíneo para o útero, a formação da placenta e o desenvolvimento das estruturas que apoiam os fetos em crescimento. Esses detalhes anatômicos e fisiológicos da tuba uterina e do útero dos camundongos são fundamentais para compreender sua função no ciclo reprodutivo e na gestação desses animais, bem como para utilizá-los como modelos experimentais em pesquisas biomédicas relacionadas à reprodução e ao desenvolvimento embrionário (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

2.5. Fisiologia do ciclo estral do camundongo

O ciclo estral em camundongos refere-se às mudanças cíclicas que ocorrem no sistema reprodutivo feminino durante um determinado período de tempo e é intimamente relacionado ao fotoperíodo e ao ciclo de luz. A exposição à luz desempenha um papel crucial na regulação do ciclo estral, influenciando a produção e liberação de hormônios responsáveis pelas diferentes fases do ciclo. Este ciclo é dividido em várias fases distintas onde cada uma é caracterizada por mudanças hormonais e fisiológicas que preparam o organismo para a fertilização e gestação. O ciclo pode ser dividido em cinco fases: pró-estro, estro, metaestro, diestro e anestro (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017) (Figura 02).

Figura 02. Ciclo reprodutivo do camundongo de 4 a 6 dias ilustrando no lado esquerdo os níveis hormonais durante as fases do estro e no lado direito as células vaginais características de cada estágio do ciclo (Fonte: DONNER E LOWRY, 2013)



Neste diagrama (Figura 02), são mostradas as flutuações médias de estradiol, progesterona, LH e FSH (MAEDA et al., 2000). A citologia do esfregaço vaginal reflete

os eventos endócrinos subjacentes, e pode ser usada para identificar a fase do estro. Três tipos principais de células são detectados em amostras de esfregaço vaginal: (A) células epiteliais nucleadas, (B) células epiteliais escamosas cornificadas e (C) leucócitos. A proporção desses tipos de células presentes no esfregaço pode ser usada para identificar camundongos em (D) proestro, (E) estro, (F) metestro ou (G) diestro, conforme descrito em resultados representativos. As setas pretas em E, F e G apontam para células epiteliais escamosas cornificadas representativas. As setas pretas em C, F e G apontam para leucócitos representativos. As setas brancas em D e G destacam células epiteliais nucleadas representativas (MCLEAN *et al.*, 2012)

O proestro é a fase inicial do ciclo estral, caracterizada por um aumento nos níveis de estrogênio. Durante esta fase o folículo ovariano começa a desenvolver e a produzir estradiol, que estimula a proliferação do revestimento uterino (endométrio) e provoca mudanças no trato reprodutivo, preparando-o para a ovulação (BANKS, 1992, p. 626). Os sinais comportamentais de receptividade ao macho ainda não são evidentes nesta fase.

Em seguida é iniciado o estro que é a fase em que ocorre a ovulação. O estro é caracterizado por um pico nos níveis de estrogênio, que desencadeia a liberação do óvulo maduro do folículo ovariano. Durante esta fase, as fêmeas estão receptivas ao acasalamento e exibem comportamentos específicos para atrair os machos (cio), como a posição de lordose (curvatura da coluna vertebral). A duração do estro é relativamente curta, geralmente durando cerca de 12 a 24 horas (Richard *et al.*, 2016).

O metaestro é iniciado após a ovulação. O folículo ovariano se transforma em corpo lúteo, que secreta progesterona. O metaestro é caracterizado por um declínio nos níveis de estrogênio e um aumento na progesterona. Durante esta fase, o útero prepara-se para uma possível gravidez, e o endométrio se torna mais espesso em preparação para a implantação do embrião (MCLEAN *et al.*, 2012)

Após esta fase, inicia-se o diestro, fase responsável pela manutenção da gravidez ou do corpo lúteo em camundongos não gestantes. Durante esta fase, os níveis de progesterona permanecem elevados, mantendo o endométrio espesso e secretor (MCLEAN *et al.*, 2012. Se a fertilização não ocorrer, o corpo lúteo regredirá no final do diestro, levando a uma queda nos níveis de progesterona e ao início de um novo ciclo estral .

Por fim o anestro é uma fase de repouso reprodutivo em que os ciclos estrais

não ocorrem. Esta fase pode ser influenciada por vários fatores, incluindo fotoperíodo, nutrição e fatores sociais. Durante o anestro, os ovários ficam inativos e os níveis hormonais são baixos. O ciclo estral em camundongos é um processo dinâmico e altamente regulado que desempenha um papel crucial na reprodução e na manutenção da espécie (MCLEAN *et al.*, 2012).

O entendimento detalhado das diferentes fases do ciclo estral e das mudanças hormonais associadas é fundamental para a reprodução assistida em camundongos. A manipulação desse ciclo é realizada para a produção dos embriões e para produção de um ambiente uterino propício para o recebimento de embriões na transferência embrionária (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

2.6. Controle do ciclo estral em camundongos

O ciclo estral dos camundongos pode ser manipulado controlando o fotoperíodo, ou seja, a duração da exposição à luz (EDSON *et al.*, 2009). A variação no fotoperíodo afeta o eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano, que regula o ciclo estral. Dias curtos (fotoperíodo reduzido) podem induzir o anestro, interrompendo o ciclo reprodutivo, o que é útil em estudos que requerem sincronização ou pausa da atividade reprodutiva. Por outro lado, dias longos (fotoperíodo aumentado) estimulam a atividade reprodutiva e a sincronização dos ciclos, favorecendo experimentos que demandam animais em fases específicas, como pesquisas sobre terapias hormonais.

Além da manipulação do fotoperíodo, os hormônios exógenos podem ser administrados para controlar o ciclo estral dos camundongos. Por exemplo, a administração de hormônios gonadotrópicos, como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), pode induzir a ovulação em camundongos em qualquer fase do ciclo estral. Dependendo da dose administrada é possível hiperestimular o crescimento folicular para obter a ovulação de um número muito maior de óvulos que o normal e conseqüentemente muito mais embriões. Isso é particularmente útil em estudos que requerem a produção de embriões em estágios específicos de desenvolvimento ou a indução da ovulação em animais com ciclos estrais irregulares (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

O ciclo estral dos camundongos também pode ser influenciado por efeitos específicos, como o efeito "Whitten", onde a introdução de um macho reprodutivo em um grupo de fêmeas pode sincronizar seus ciclos estrais (ANDRADE, 2002). Outros

efeitos incluem o "Lee-Boot", onde a ausência de machos reprodutivos pode levar a uma interrupção temporária ou irregular do ciclo estral, e o "Bruce", que se refere à supressão do ciclo estral em fêmeas expostas a machos castrados ou a odores provenientes de machos (BATZOGLOU et al., 2000). Esses efeitos podem ser utilizados para manipular o ciclo estral dos camundongos e controlar a atividade reprodutiva em experimentos biomédicos, sendo fundamentais para a realização de estudos que dependem da manipulação precisa do ciclo estral e da sincronização dos ciclos estrais de grupos de animais (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

2.7. Importância da Transferência de Embriões

A transferência cirúrgica de embriões desempenha um papel essencial na pesquisa biomédica envolvendo camundongos. Independentemente do procedimento, seja criopreservação de embriões ou gametas, fertilização *in vitro*, produção de animais geneticamente modificados ou limpeza de linhagens, essa técnica é fundamental para o sucesso de todas as abordagens de reprodução assistida nessa espécie (Leah; Roberts; Franasiak, 2023)..

A transferência embrionária é fundamental para assegurar o sucesso reprodutivo dos protocolos. Após a manipulação dos embriões em laboratório, o objetivo final é sempre alcançar o nascimento de filhotes saudáveis (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017). A transferência de embriões constitui a etapa final, em que os embriões são cuidadosamente implantados no útero da fêmea receptora, com a expectativa de que se desenvolvam e resultem em nascimentos bem-sucedidos (Chen, 2022).

Este procedimento cirúrgico é complexo e requer treinamento e habilidade, já que as estruturas manipuladas não são visíveis a olho nu, sendo, portanto, realizado com auxílio de uma lupa. A habilidade do técnico que realiza o procedimento é um fator que pode influenciar as taxas de sucesso (JOHNSON et al., 1996).

A transferência cirúrgica dos embriões em camundongos pode ser realizada tanto no útero como na tuba uterina. Apesar da transferência para o útero ser uma técnica relativamente mais simples, ela requer que os embriões sejam cultivados por mais tempo e aumenta sua exposição a riscos e perdas (MOBRAATEN, 1986).

É importante ressaltar a existência de uma técnica não cirúrgica para transferência de embriões em camundongos (STONE, 2020). Nesta técnica um cateter é inserido pela vagina após a contenção da fêmea. O cateter deve atravessar a cérvix para que os embriões sejam depositados no corpo do útero. É uma técnica chamada de transcervical, porém não há como assegurar que o cateter passou pela cérvix. Devido a transferência ocorrer no útero, os embriões devem estar em um estágio mais avançado de desenvolvimento embrionário (mórula – blastocisto) para este procedimento (Dantas et al., 2024). Salienta-se que, mesmo sendo técnica que não expõe os animais a uma cirurgia invasiva e os resultados serem satisfatórios, a vasta maioria dos laboratórios ainda utilizam a transferência cirúrgica. É possível dizer que futuramente o refinamento da técnica para um procedimento não cirúrgico deve se tornar uma tendência devido a questões de bem-estar animal.

A técnica de transferência cirúrgica de embriões exige um considerável treinamento pois além das habilidades técnicas, diversos outros fatores podem afetar os resultados da transferência e nascimento de filhotes vivos (JOHNSON et al., 1996). Entender e controlar todos esses fatores é fundamental para otimizar os resultados e o sucesso da transferência de embriões. No presente estudo, a forma de acesso ao interior da tuba uterina foi testada de duas formas: pelo infundíbulo ou por uma incisão na ampola.

Além do local específico para transferência na tuba uterina, conforme demonstra a tabela 02, diversos outros fatores podem afetar os resultados de uma transferência de embriões. Estes fatores devem ser testados quando possível para determinar o melhor protocolo para um determinado laboratório. No presente estudo, dois diferentes acessos na tuba uterina foram testados.

Tabela 02. Fatores que podem afetar os resultados da técnica de transferência cirúrgica de embriões em camundongos.

Fatores que podem afetar os resultados da transferência de embriões

- Acesso pelo infundíbulo ou pela ampola
 - Qualidade dos embriões
 - Estágio embrionário
 - Linhagem
-

-
- Momento e Local da transferência (tuba uterina ou útero)
 - Sincronização entre embrião e estágio uterino
 - Número de embriões transferidos
 - Utilização de fêmeas pseudogestantes e machos vasectomizados
 - Manipulação dos embriões transferidos
 - Transferência para um ou para os dois cornos uterinos
 - Anestésicos e analgésicos
 - Velocidade do procedimento
 - Habilidade técnica
-

2.8. Fatores que podem afetar o resultado da transferência de embriões

2.8.1. Acesso pelo infundíbulo ou pela ampola

O local de acesso aos embriões tem um impacto direto no sucesso da técnica, especialmente quando combinado com o entendimento da fase de desenvolvimento embrionário. A utilização do infundíbulo e da ampola como pontos de acesso tem se mostrado promissora, especialmente para a transferência de embriões em estágios iniciais, como uma ou duas células. A colocação desses embriões em um estágio tão precoce no ambiente natural de desenvolvimento pode aumentar as taxas de prenhez (ALI *et al.*, 2013). O presente trabalho teve como objetivo identificar qual dessas duas abordagens, infundíbulo ou ampola, é mais eficaz para o acesso e a transferência dos embriões no Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA).

2.8.2. Qualidade dos embriões

Embriões de qualidade são fundamentais para o sucesso da transferência de embriões. Durante a coleta, muitas estruturas são obtidas, entre elas oócitos não fertilizados, embriões de uma célula, embriões de duas células e embriões ou oócitos degenerados. A qualidade dos embriões e oócitos, que serão manipulados, devem ser de acordo com critérios de seleção morfológica (STONE *et al.*, 2023). Procedimentos como o descongelamento após criopreservação, também podem causar alterações morfológicas que podem afetar os resultados da transferência. Portanto, no momento da transferência, somente embriões íntegros, sem fragmentação e no estágio correto de desenvolvimento serão transferido(AUER *et al.*, 2023).

2.8.3. Estágio embrionário

A transferência de embriões em camundongos pode ser realizada em diferentes estágios embrionários, adaptando-se aos objetivos específicos de cada projeto. Essa flexibilidade permite sua aplicação em diversos contextos da pesquisa biomédica, como criopreservação, fertilização *in vitro*, rederivação de linhagens, importação de linhagens e produção de novos modelos. Dependendo do estágio embrionário e das metas do projeto, diferentes técnicas de transferência podem ser escolhidas. Por exemplo, a transferência cirúrgica é comumente utilizada para embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, enquanto a transferência não cirúrgica pode ser mais adequada para embriões em estágios mais avançados, como mórulas e blastocistos (AUER et al., 2023).

2.8.4. Linhagem

Técnicas de criopreservação são essenciais para preservar a estabilidade genética de linhagens isogênicas e geneticamente modificadas de camundongos utilizadas em pesquisas biomédicas (TRAPPHOFF; DIETERLE, 2023). Cada linhagem possui um fundo genético distinto, que pode influenciar significativamente a resposta à estimulação ovariana, a qualidade dos embriões produzidos e, conseqüentemente, os resultados das transferências embrionárias (TRAPPHOFF; DIETERLE, 2023). É importante reconhecer essas diferenças genéticas entre as linhagens de camundongos, conforme descrito na literatura, pois elas podem impactar diretamente os resultados experimentais. Por exemplo, algumas linhagens podem ser mais sensíveis à estimulação ovariana, resultando em uma produção de embriões que difere de outras linhagens. Além disso, a qualidade dos embriões pode variar entre linhagens, afetando as taxas de sucesso das transferências embrionárias e, por extensão, os resultados dos experimentos (LAPCHIK, MATTARAIA & KO, 2017).

2.8.5. Momento e Local da transferência (tuba uterina ou útero)

A transferência de embriões de camundongo pode ocorrer tanto na tuba uterina quanto no útero. A escolha do local de transferência depende de diversos fatores. Um desses fatores é o estágio embrionário, pois embriões em diferentes estágios de desenvolvimento podem se beneficiar de diferentes ambientes uterinos. Embriões mais precoces podem ser transferidos para a tuba uterina, onde encontram um ambiente favorável para a nidificação inicial, enquanto embriões mais avançados

podem ser transferidos diretamente para o útero (AUER et al., 2023). Além disso, o objetivo da pesquisa desempenha um papel fundamental na escolha do local de transferência. O treinamento e a habilidade do cirurgião também são determinantes na escolha do método de transferência e podem influenciar diretamente o resultado do procedimento. No caso da transferência para o útero, a escolha entre métodos cirúrgicos e não cirúrgicos também deve ser considerada. Este ponto será melhor discutido abaixo.

2.8.6. Sincronização entre embrião e estágio uterino

A sincronia entre o estágio embrionário e o dia e local da transferência é de extrema importância. A capacidade de reproduzir de forma precisa os eventos naturais do ciclo reprodutivo é fundamental para garantir o sucesso dos experimentos e a validade dos resultados obtidos. Isso significa que o embrião deve estar em sincronia com o local da transferência de acordo com sua posição durante o processo natural de desenvolvimento. Qualquer descompasso nessa sincronia pode afetar negativamente a viabilidade e o sucesso da gestação, bem como distorcer as conclusões do estudo (LORETI et al., 2024)

2.8.7. Utilização de fêmeas pseudogestantes e machos vasectomizados

As fêmeas pseudogestantes desempenham um papel muito importante no protocolo de transferência de embriões em camundongos. Esses animais são essenciais porque proporcionam uma condição semelhante à gestação sem a presença de embriões. Esse estado é induzido pelo acasalamento com machos vasectomizados, o que leva à ativação de processos hormonais e comportamentais associados à gestação. A simulação dessa condição é fundamental para preparar o útero e o ambiente uterino para receber os embriões transferidos cirurgicamente (STONE et al., 2023). A transferência de embriões para fêmeas pseudogestantes oferece a vantagem de minimizar o risco de rejeição ou absorção dos embriões pelo organismo da fêmea receptora, aumentando assim a taxa de sobrevivência e sucesso da gestação (STONE et al., 2023). É importante estar atento ao manejo destas fêmeas bem como dos machos vasectomizados, pois qualquer descuido com esses animais pode afetar os resultados da transferência.

2.8.8. Número de embriões transferidos

A relação entre o número de embriões transferidos e o sucesso da transferência de embriões em camundongos deve ser avaliado. Geralmente, a transferência de um maior número de embriões aumenta as chances de sucesso na obtenção de gestações e nascimentos (AUER et al., 2023; CHEN et al. 2023)

2.8.9. Manipulação dos embriões transferidos

Todos os tipos de manipulação podem de alguma forma afetar os embriões e influenciar nos resultados da transferência (ROBERTS; FRANASIAK, 2023) Desta forma é importante sempre ter as técnicas de manipulação refinadas e os embriões avaliados antes da transferência. Mesmo embriões com boa morfologia podem estar metabolicamente afetados pelos procedimentos experimentais, portanto este é um fator que deve ser sempre apreciado durante a avaliação do sucesso da transferência de embriões (MAGGIULLI et al., 2022). Além disso, foi demonstrado que o uso de métodos e estratégias de culturas específicas melhoram as taxas de blastulação e de nascidos vivos por transferência de embrião, confirmando o impacto das técnicas de manipulação no sucesso geral dos procedimentos de reprodução assistida (MAGGIULLI et al., 2022).

2.8.10. Transferência para um ou para os dois cornos uterinos

Não há um consenso na literatura sobre a escolha de um ou dois cornos para a transferência dos embriões, cada laboratório ou cirurgião define o seu protocolo (TEKLU; SIUM; GODIE, 2024). Alguns fatores podem influenciar a decisão como número de embriões disponíveis para transferência e número de receptoras pseudogestantes. Transferir um número maior de embriões para os dois cornos de uma fêmea pode aumentar as chances de gestação. Da mesma forma que ao transferir um número menor de embriões para um corno uterino de duas fêmeas, pode eliminar o fator fêmea descrito acima e também aumentar as taxas de sucesso (LIN et al., 2024). Portanto, esse é um ponto que necessita de mais resultados experimentais para que se tenha um posicionamento definido baseado em dados científicos.

2.8.11. Anestésicos e analgésicos

A administração de anestésicos e analgésicos durante a transferência cirúrgica de embriões em camundongos pode ter um impacto nos resultados do procedimento. A escolha do anestésico e a sua dose podem influenciar a resposta fisiológica da fêmea receptora durante a cirurgia (SCHWARTZ; PACHARINSAK, 2024; NARVER, 2024). Anestésicos inadequados ou em doses excessivas podem afetar a pressão sanguínea, a frequência cardíaca e a respiração, potencialmente comprometendo o fluxo sanguíneo uterino e a oxigenação dos tecidos, o que pode prejudicar a viabilidade dos embriões transferidos. Além disso, a dor causada pela cirurgia pode desencadear uma resposta de estresse no organismo da fêmea receptora, liberando hormônios do estresse que podem afetar negativamente o ambiente uterino e a receptividade endometrial aos embriões (THERE, 2024). O uso de analgésicos adequados pode ajudar a minimizar essa resposta de estresse, proporcionando conforto e alívio da dor durante o procedimento e no pós-operatório (ANDRADE, 2002).

2.8.12. Velocidade do procedimento

A velocidade de realização da transferência cirúrgica de embriões deve ser considerada no contexto da melhora dos resultados e sucesso da técnica. Apesar da ausência de estudos específicos, podemos sugerir que uma transferência mais rápida pode ter vantagens significativas, uma vez que os embriões ficam menos expostos ao procedimento e são mais rapidamente colocados em seu ambiente natural no útero da fêmea receptora. Isso reduz a exposição da fêmea ao procedimento cirúrgico, minimizando o tempo de manipulação e potencialmente diminuindo o estresse associado à intervenção. Portanto, a velocidade pode ser um fator determinante para o resultado final da transferência de embriões. No entanto, vale ressaltar que a rapidez não deve comprometer a segurança e a precisão do procedimento. A realização da transferência cirúrgica deve seguir rigorosamente o protocolo estabelecido, garantindo que todos os passos sejam executados de maneira adequada e que os embriões sejam depositados no local correto no útero da fêmea receptora (HSUEH et al., 2023); Portanto, a velocidade ideal é aquela que permite uma transferência eficiente, mas que ainda seja realizada com segurança e seguindo os padrões estabelecidos (Kuroshima et al., 2024).

2.8.13. Habilidades técnica

A realização da transferência de embriões em camundongos é uma técnica cirúrgica que demanda habilidades específicas e treinamento apropriado para assegurar o êxito do procedimento. O treinamento inclui a aquisição de habilidades em microcirurgia necessárias para a execução precisa e segura da transferência, bem como o manejo correto dos equipamentos e materiais envolvidos. É essencial que o cirurgião possua conhecimento em anestesia e analgesia, além de habilidades em manuseio e posicionamento dos animais, garantindo a realização segura e eficiente da cirurgia. Além disso, o entendimento profundo da anatomia e fisiologia dos camundongos é crucial para minimizar o trauma cirúrgico e otimizar a sobrevivência dos animais.

A competência do cirurgião não se restringe apenas à execução do procedimento cirúrgico, mas também abrange os cuidados pré e pós-operatórios, incluindo o monitoramento constante dos animais e a pronta intervenção em caso de complicações (DAVIS, 1981; CHIN; WANG, 2001; ZHANG et al., 2009; SARVARI et al., 2013; CUI et al., 2014).

2.9. Local de transferência dos embriões

Uma das primeiras decisões em um programa que necessita da transferência de embriões é o local para a transferência, o que será apresentado a seguir.

2.9.1. Transferência para o corno uterino

Devido ao tamanho dos cornos uterinos, esta técnica pode ser utilizada sem a necessidade do uso de uma lupa para visualização das estruturas anatômicas. Devido a necessidade da sincronia entre estágio embrionário e dia da transferência, os embriões necessitam ser cultivados até o dia 3-4 para que a transferência seja no útero. Porém, o estágio embrionário de duas células é o mais comumente utilizado nos procedimentos de reprodução assistida em camundongos (QUINN et al., 1985). Neste estágio na reprodução natural, os embriões de duas células estão presentes na tuba uterina e a transferência para esta região é indicada. Como mencionado anteriormente, já está disponível uma técnica para transferência cervical não cirúrgica de embriões para o útero. Nesse caso os embriões devem ser cultivados até o estágio de mórula ou blastocisto. Os resultados desta técnica têm sido compatíveis com os

métodos cirúrgicos, mas ainda não houve sua aderência pela comunidade científica (MICHAEL et al., 2009).

2.9.2. Transferência para a tuba uterina

Esta é a técnica mais comumente utilizada. Os embriões em seu estágio inicial são transferidos logo após sua manipulação não sendo necessário o cultivo até estágios posteriores. Por exemplo, no caso da criopreservação de embriões, estes são coletados e criopreservados no estágio de duas células. Uma vez aquecidos são imediatamente transferidos para a tuba uterina (MOBRAATEN, 1986).

No caso do congelamento de espermatozoides e a necessidade da fertilização *in vitro*, o estágio de duas células também é a escolha para transferência (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2014). Neste caso, os óvulos são fertilizados *in vitro* e assim que chegam ao estágio de duas células, são congelados ou transferidos para tuba uterina imediatamente para fêmeas receptoras (NAKAGATA, 2011).

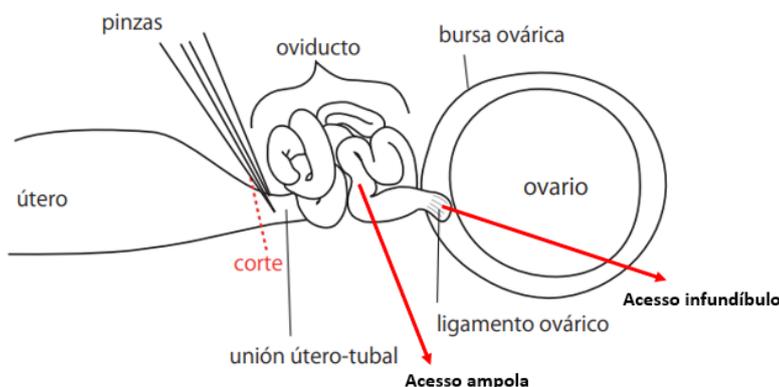
2.9.3. Locais de transferência na tuba uterina

Dois locais comuns para a transferência de embriões na tuba uterina são o infundíbulo e a ampola (figura 01). O infundíbulo, localizado próximo ao ovário, é frequentemente usado em reprodução assistida animal. Suas fímbrias, que ajudam na captura dos óvulos durante a ovulação, também facilitam a introdução de embriões, pois a região já possui uma abertura natural. Durante a cirurgia de transferência, a agulha com os embriões é inserida nessa região. Contudo, é necessário romper a bursa ovariana, um tecido que cobre o ovário e possui vasos sanguíneos, o que pode causar sangramento.

Nakagata et al. (2010) e seu grupo no Japão desenvolveram uma técnica alternativa na qual a transferência dos embriões é diretamente na ampola da tuba uterina. Nesta técnica a porção da tuba é facilmente visualizada na lupa e não há necessidade de romper a bursa ovariana. Porém, é necessário realizar uma incisão na ampola, por onde a pipeta de transferência com os embriões será inserida. Essa incisão é realizada com uma agulha 32G e a visualização dessa abertura é delicada, principalmente quando o cirurgião realiza o procedimento sozinho, o que pode prejudicar a técnica e seu resultado final (LARSON, 2020).

Figura 03. Ilustração com as regiões da tuba uterina nas quais a transferência cirúrgica pode ser realizada. O acesso pelo infundíbulo é o mais utilizado. O acesso pela ampola tem sido também bastante utilizado no qual é necessário a realização de

uma incisão na região indicada pela seta para a entrada da pipeta de transferência com os embriões (Adaptação Nakagata, Manual técnico 3ªedição).



Fonte:Nakagata,2015

Como mencionado anteriormente, uma série de fatores pode afetar os resultados da transferência de embriões. No presente estudo, a técnica e localização da transferência na tuba uterina será o ponto a ser testado. Futuramente, as outras variáveis devem ser testadas com o objetivo de refinar a técnica.

Tabela 03. Variáveis que podem afetar os resultados de uma transferência de embriões e condições destas variáveis no presente projeto.

Variáveis que podem afetar o resultado da transferência de embriões	Condições no presente projeto
➤ Acesso pelo infundíbulo ou pela ampola	➤ Ambos os métodos foram avaliados neste projeto.
➤ Qualidade dos embriões	➤ Somente embriões de duas células, de boa qualidade e sem fragmentação.
➤ Estágio embrionário	➤ Embriões de duas células, obtidos no segundo dia pós-coito.
➤ Linhagem	➤ Obtenção de embriões do cruzamento híbrido B6CF1 e receptoras Swiss-webster.
➤ Momento da transferência na receptora	➤ Após a observação do tampão vaginal, na manhã seguinte à cópula com o macho vasectomizados.
➤ Local da transferência (tuba uterina ou útero)	➤ Tuba uterina

➤ Sincronização entre embrião e estágio uterino	➤ Embrião no estágio de 2 células, no segundo dia pós-coito, já o útero, fica ideal no dia da observação do tampão.
➤ Número de embriões transferidos	➤ Quinze embriões por tuba uterina
➤ Manipulação dos embriões transferidos	➤ Embriões frescos, recém coletados das fêmeas doadoras.
➤ Transferência para um ou para os dois cornos uterinos	➤ Para os dois cornos uterinos
➤ Anestésicos e analgésicos	➤ Meloxicam 0,2%, 5mg/kg por até 5 dias se necessário

3. PROBLEMA

A reprodução assistida em camundongos é uma área essencial na pesquisa biomédica e praticamente todas as técnicas nessa área requerem a transferência de embriões em sua etapa final. Entretanto, devido à complexidade de sua realização e necessidade de um treinamento longo e com muitas repetições, o sucesso desta técnica tem sido historicamente muito baixo quando realizado no Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA) da UFRJ.

Esse desafio motivou o desenvolvimento deste estudo no LIRA, com o objetivo de aprimorar os resultados e estabelecer um protocolo eficaz para a transferência cirúrgica de embriões. Para isso, o trabalho focou na elaboração e implementação de um protocolo de transferência embrionária, testando duas técnicas de acesso dos embriões através da tuba uterina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Definir o protocolo operacional padrão para a transferência cirúrgica de embriões de camundongo no Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA).

4.2. Objetivos específicos

- Comparar o resultado das técnicas de transferência de embriões com a técnica de acesso pelo infundíbulo da tuba uterina e de acesso pela ampola da tuba uterina.
- Elaborar um vídeo ilustrativo dessa técnica como auxílio ao POP.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento da pesquisa foi realizado no Laboratório de Inovação em Reprodução Assistida (LIRA) localizado no Polo de Biotecnologia da UFRJ. O LIRA divide seu espaço com o Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) da Decania do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. O LIRA foi criado com apoio da FAPERJ e tem como objetivo prestar serviços à pesquisa biomédica da instituição por meio das técnicas de reprodução assistida.

5.1. Animais

O biotério no qual os animais utilizados foram criados é do tipo convencional. Os animais são criados dentro de caixas micro isoladoras (31cm comprimento x 20cm de largura x 13cm de altura) contendo: tampa com filtro, grade, cama e mamadeira. Os animais foram trocados de gaiola a cada 15 dias e a cama era composta de flocos e pinus. Água e ração (Nuvilab comum, Quimtia) foram fornecidos a vontade. A temperatura da sala foi mantida a 22°C com 50± 5 % de umidade. O ciclo claro escuro foi de 12/12 horas. O projeto foi aprovado pela CEUA com protocolo 177/21.

Diversas categorias de animais foram utilizadas e estão descritas abaixo:

- **Fêmeas doadoras de embriões** – animais acasaladas com machos reprodutores para a produção de embriões.
- **Fêmeas receptoras de embriões** – animais com indução de pseudoprenhez para receber os embriões através de transferência por meio das duas técnicas testadas.
- **Machos íntegros** – animais reprodutores usados com as fêmeas doadoras para a fertilização e produção dos embriões.
- **Machos vasectomizados** – animais utilizados com as fêmeas

receptoras para a cópula sem fertilização e indução da pseudoprenhez com a preparação do útero para a transferência.

5.2. Grupos experimentais

A transferência dos embriões foi realizada em duas regiões distintas da tuba uterina.

Dessa forma, dois grupos experimentais foram criados:

- Grupo **INFUND**: fêmeas que receberam a transferência do embrião pela região do infundíbulo da tuba uterina;
- Grupo **AMPOL**: fêmeas que receberam a transferência pela região da ampola da tuba uterina.

5.3. Fêmeas produtoras de embriões

Fêmeas de camundongos híbridos B6CF1 com idade entre 4 a 12 semanas foram expostas a um protocolo de estimulação ovariana por meio de uma injeção intraperitoneal de 5 unidades internacionais (UI) de eCG (gonadotrofina coriônica equina, Novormon). Após 46-48h, estas fêmeas receberam 5 U.I de hCG (gonadotrofina coriônica humana, Vetecor) para indução da ovulação. Após a injeção de hCG, as fêmeas foram colocadas com machos íntegros de fertilidade comprovada, na proporção de um macho para uma fêmea. Na manhã do dia seguinte, foi observada a presença do tampão vaginal indicativo de cópula. Trinta e seis horas após a injeção de hCG as fêmeas foram eutanasiadas em câmara com CO₂.

Após a eutanásia, as fêmeas foram posicionadas em decúbito ventral, seguida pela assepsia do abdômen com álcool 70%. A cavidade abdominal foi aberta para a remoção das tubas uterinas por laparotomia. Em seguida, as tubas foram colocadas em placas de Petri, e os embriões foram removidos das tubas através de uma lavagem contínua com meio GV-HEPES (Ingamed).

Uma seringa de 1 ml com o meio e uma agulha de 32G com ponta romba foram usadas para acessar o infundíbulo e injetar o meio na tuba uterina sob pressão contínua. Os embriões foram expelidos pela ponta oposta da tuba uterina. Os embriões coletados foram lavados em gotas de meio GV-HEPES e mantidos em estufa a 37°C até a finalização da coleta de todas as fêmeas separadas no dia.

Uma vez finalizada as coletas, os embriões foram selecionados e agrupados em gotas. Somente embriões com duas células bem definidas sem fragmentação celular e ocupando 80% do espaço dentro da zona pelúcida foram selecionados. Estes embriões foram colocados em gotas de 100ul e permaneceram nelas até o momento da transferência cirurgica.

5.4. Machos reprodutores íntegros – para fertilização

Um grupo de 10 machos híbridos B6CF1 em idade reprodutiva foi usado como reprodutores neste projeto. Eles ficaram em caixas individuais e receberam as fêmeas estimuladas para que a realização da cópula, fertilização e produção dos embriões. Cada macho recebeu em sua caixa uma fêmea estimulada por vez. Esses machos receberam as fêmeas com intervalo de pelo menos dois dias.

5.5. Machos vasectomizados – para indução da pseudoprenhez

Machos vasectomizados foram necessários para induzir a pseudoprenhez e a presença de um ambiente uterino receptivo aos embriões transferidos. Um total de 10 machos da linhagem Swiss foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e em seguida, ainda no pré-cirúrgico, foi aplicado por via subcutânea Meloxicam 0,2% (5mg/kg) para analgesia. Após a perda de reflexos e ausência de dor por meio de estímulos físicos nas patas posteriores, com auxílio de uma pinça, colocou-se uma gota de soro fisiológico (NaCl 0,9%) em cada olho, para evitar ressecamento. Este procedimento foi repetido enquanto o animal esteve anestesiado.

Em seguida, foi realizada a tricotomia e assepsia na parte inferior do **abdome**. Após a tricotomia, foi realizada uma incisão na linha média, iniciando na altura da linha do joelho em sentido crânio-caudal, com aproximadamente 1 cm de extensão. O peritônio foi aberto, permitindo a exteriorização dos testículos, epidídimo e parte do vaso deferente. Com uma pinça foi levantado o vaso deferente, permitindo a introdução de outras duas pinças por baixo para apoiar e isolar o vaso deferente de outros tecidos. Depois, o vaso deferente foi contido com uma das pinças e cauterizado em dois pontos usando uma pinça

aquecida, cortando a porção do vaso deferente que ficou entre as cauterizações.

Em seguida retorna-se o testículo para dentro da cavidade e exterioriza-se o testículo contra-lateral e repete-se o procedimento. Após esses procedimentos, o peritônio foi suturado e em seguida a pele com nylon 6-0. Durante e após a cirurgia, os animais foram mantidos em placa térmica a 37°C e monitorados até a completa recuperação anestésica. Foi realizada a observação do comportamento, postura, possíveis vocalizações, para verificar a necessidade de mais alguma intervenção analgésica imediata. Quando o animal acorda bem, sem manifestar desconforto, o analgésico foi repetido a cada 24 horas (meloxicam 0,2%, 5mg/kg) por mais dois dias, e caso necessário, por mais cinco dias.

5.6. Produção das fêmeas receptoras e transferência dos embriões

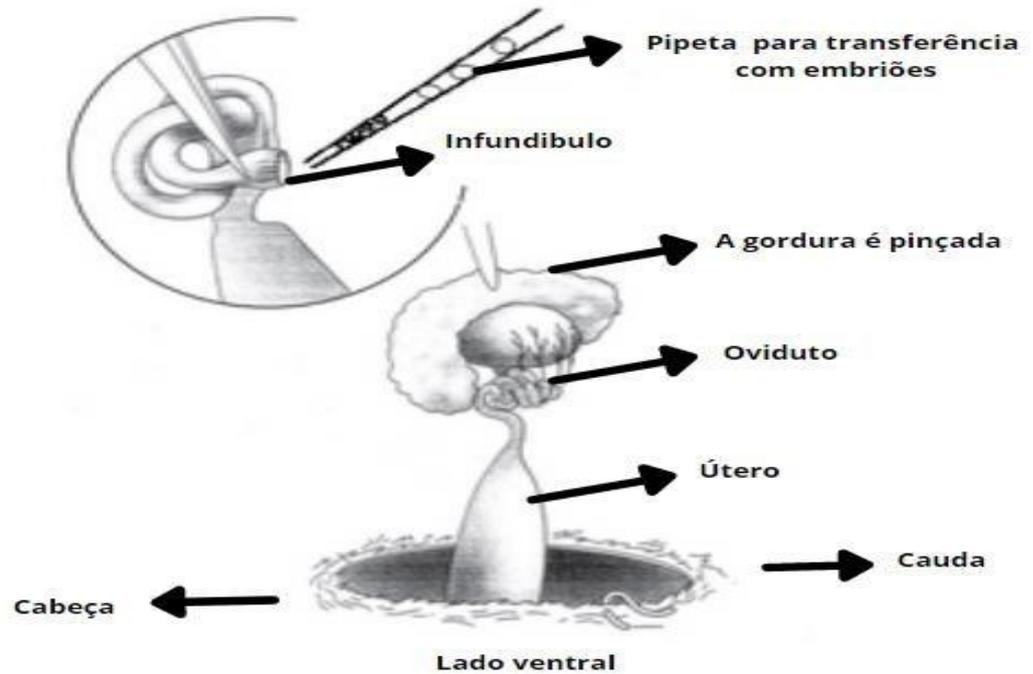
Para a transferência de embriões é necessária a utilização de fêmeas pseudoprenhes. Estas são fêmeas acasaladas com machos vasectomizados e devido a cópula iniciaram a fase luteal do ciclo (BRONSON; DAGG; SNELL, 1966). Um grupo de 50 fêmeas da linhagem swiss em idade reprodutiva foram utilizadas neste grupo. A cada rotina, um grupo de 5 fêmeas foram acasaladas com machos vasectomizados um dia após o acasalamento das fêmeas doadoras de embrião. No dia da transferência de embriões, as fêmeas receptoras que apresentaram o tampão vaginal foram separadas para a cirurgia.

No laboratório, grupos de 30 embriões de duas células foram selecionados para a transferência. Estes embriões foram mantidos em uma gota de meio GV-HEPES até o momento da cirurgia quando foram colocados nas pipetas de transferência.

Para a cirurgia, as fêmeas foram anestesiadas por via intraperitoneal com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Ainda no período pré-cirúrgico, foi administrado meloxicam 0,2% (5 mg/kg) por via subcutânea para analgesia. Após a verificação da perda de reflexos e ausência de dor, foi aplicada uma gota de soro fisiológico (NaCl 0,9%) em cada olho para evitar o

ovariana para acessar o infundíbulo, permitindo a introdução do capilar de vidro estirado contendo os embriões e seu depósito no interior na tuba uterina em direção à ampola (Figura 05).

Figura 05. Ilustração com as regiões anatômicas no camundongo. No acesso pelo infundíbulo, o ovário é suspenso pela gordura associada, a Bursa ovariana seccionada para a visualização, acesso e transferência dos embriões (Naomi Nakagata)

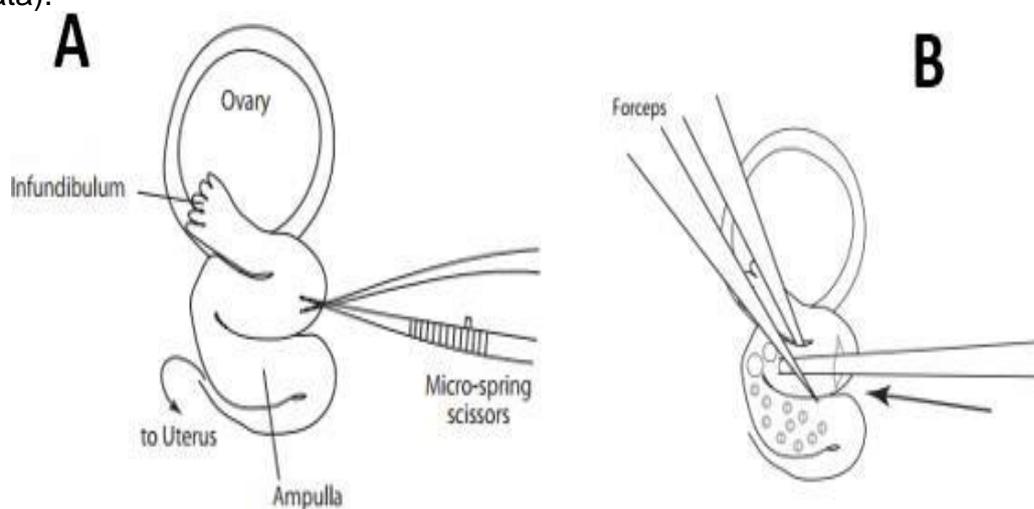


Fonte: Nakagata, 2015

5.8. Transferência pela ampola:

Nesta técnica o ovário e sua bursa serão mantidas integras. A região da ampola é identificada e um orifício é realizado com uma agulha 32G. Em seguida o capilar de vidro estirado contendo os embriões é inserido por este orifício e os embriões depositados dentro da tuba uterina (Figura 06).

Figura 06. Transferência com acesso pela ampola. Na ilustração A é indicado o momento da realização da incisão na ampola. Na ilustração B os embriões são inseridos com uma pipeta pelo orifício gerado na ampola (Naomi Nakagata).



Fonte: Nakagata, 2015

Após a transferência nos dois métodos, as estruturas exteriorizadas serão devolvidas para dentro da cavidade, e o peritônio será suturado com fio de nylon 6-0, confirmando que não há espaço para futuras hérnias. A pele será suturada com fio nylon 6-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em placa térmica a 37°C e monitorados até a completa recuperação anestésica. Foram observados sinais de comportamento alterado, como postura arqueada, pelo eriçado e vocalizações, para verificar a necessidade de alguma intervenção analgésica imediata. Caso o animal retornasse bem do plano anestésico e da cirurgia, sem manifestar desconforto, o analgésico foi repetido a cada 24 horas (meloxicam 0,2%, 5 mg/kg) por mais dois dias, ou, se necessário, até cinco dias.

5.9. CÁLCULO AMOSTRAL, COMPARAÇÕES E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar o número de animais necessários em cada grupo experimental, foi realizado um cálculo amostral baseado nos parâmetros estatísticos usuais para estudos comparativos. O estudo foi desenhado para comparar a eficiência de duas técnicas de transferência de embriões em camundongos, sendo que cada técnica foi aplicada a um grupo de fêmeas.

Primeiramente, foi definido um tamanho de efeito com base em dados preliminares disponíveis na literatura, que sugeriram uma diferença mínima relevante de 20% nas taxas de implantação embrionária entre as duas técnicas. O poder estatístico foi fixado em 80% ($\beta = 0,20$), o que indica que o estudo teria 80% de chance de detectar uma diferença significativa entre os grupos, caso essa diferença de fato exista. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$), o que corresponde a uma probabilidade de 5% de cometer um erro do tipo I, ou seja, rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira.

Além disso, foi utilizada uma estimativa de variabilidade intra-grupo com base em estudos anteriores de transferência de embriões, o que permitiu calcular o desvio padrão das taxas de sucesso. Como se tratava de uma comparação entre dois grupos independentes, foi aplicado um teste t de Student para amostras independentes.

Com base nesses parâmetros e utilizando o software G*Power, foi determinado que o número mínimo de fêmeas necessário por grupo seria de 15, totalizando 30 animais para o experimento. Esse tamanho amostral permite a detecção de diferenças estatisticamente significativas entre as duas técnicas de transferência de embriões, mantendo os critérios de significância e poder estatístico definidos para o estudo.

As seguintes comparações entre os grupos foram realizadas:

- **Taxa de nascimento/transferência** – número de nascimentos obtidos dividido pelo número de transferências realizadas.
- **Média de filhotes/parto** – número médio de filhotes observados em cada parto.
- **Média de embriões transferidos por fêmea** – número médio de embriões transferidos para cada fêmea receptora.
- **Proporção de filhotes por total de embriões transferidos** – total de filhotes nascidos dividido por total de embriões transferidos.

As proporções de fêmeas prenhes e não prenhes entre os dois grupos experimentais foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado não paramétrico. Este teste foi empregado para comparar as proporções e

identificar possíveis discrepâncias entre as frequências observadas e aquelas esperadas para o evento de prenhez. As médias de filhotes por parto, embriões transferidos por fêmea receptora e filhotes por nascimento foram comparadas entre os grupos por meio do teste *t* de *Student*. Resultados com valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Procedimento Operacional Padrão - POP

Os resultados do presente estudo permitiram o estabelecimento de um Procedimento Operacional Padrão (POP) para a transferência de embriões no LIRA. O POP está anexado a esta tese e apresenta, em maior detalhamento, os procedimentos descritos ao longo do trabalho. Ele foi elaborado com base nos resultados obtidos, conforme descrito a seguir.

Este estudo utilizou 29 fêmeas para transferência de embriões, sendo 15 no grupo AMPOL e 14 no grupo INFUND (Tabela 04). Todas as fêmeas do grupo AMPOL (15) resultaram em gestação com nascimento, enquanto, no grupo INFUND ocorreram 11 gestações com nascimentos (100,0% e 79,0 % para taxa de nascimento por transferência entre AMPOL e INFUND, respectivamente, $P < 0,05$).

Foram transferidos um total de 445 embriões divididos entre as 15 fêmeas receptoras do grupo AMPOL e 407 embriões divididos entre as fêmeas receptoras do grupo INFUND o que corresponde a uma média de 29,7 e 29,1 embriões transferidos por fêmea, respectivamente, para cada grupo. Desta forma não houve diferença no número médio de embriões transferidos por fêmea entre os grupos.

A proporção de filhotes nascidos foi maior no grupo AMPOL comparado ao grupo INFUND (32,4 e 20,0 para AMPOL e INFUND, respectivamente, $P < 0,05$). O número total de filhotes nascidos foi também maior no grupo AMPOL, porém como mais embriões foram transferidos para este grupo, a média de filhotes nascidos por número de embriões transferidos é o valor mais realístico do sucesso do procedimento.

Tabela 04. Resultados da transferência de embriões para a região do infundíbulo ou para a região da ampola da tuba uterina.

	AMPOL	INFUND
Número de receptoras utilizadas	15	14
Total de partos observados	15	11
Total de embriões transferidos	445	407
Total de filhotes nascidos	144	81
Taxa de nascimento/transferência (%)	100%*	79%
Média de embriões transferidos por fêmea	29,7	29,1
Média de filhotes/parto	9,6*	5,7

Proporção de filhotes nascidos/total de embriões transferidos %	32,3*	20,0
---	-------	------

*Significa estatisticamente diferente com $P < 0,05$ na comparação do grupo AMPOL com o grupo INFUND.

Desta forma, a técnica utilizada no grupo AMPOL foi a que orientou a elaboração do POP de transferência de embriões para o LIRA.

6.2. Produção do vídeo educativo

Filmagens foram realizadas com as técnicas realizadas nestes estudo e um vídeo educativo foi produzido. O vídeo está disponível no canal do Youtube do LIRA.

7. PRODUTO

Como produto deste projeto foram produzidos:

- Formulário do Procedimento Operacional Padrão (POP) para a técnica e transferência cirúrgica de embriões pela ampola da tuba uterina;
- Vídeo ilustrativo e educativo com detalhes da técnica descrita no POP.

Durante a elaboração deste projeto, a produção de novos modelos animais não era um dos objetivos principais, embora a transferência de embriões fosse uma etapa essencial e uma das dificuldades enfrentadas no LIRA. No entanto, ao final deste projeto, a técnica de transferência de embriões, proposta como POP para o laboratório, foi utilizada com sucesso na produção dos dois primeiros animais geneticamente modificados do Rio de Janeiro (FAPERJ, 2024).

Esses dois modelos animais geneticamente modificados foram desenvolvidos graças à técnica de transferência de embriões descrita e validada no presente estudo, sendo fundamentais para pesquisas específicas:

- **Camundongo mutante para o gene P2ry12:** Este gene é responsável pela migração da micróglia, envolvida no início do processo inflamatório no sistema nervoso. O modelo é essencial para estudos sobre a inflamação neural.
- **Camundongo mutante para o gene Lysmd3:** Este gene codifica uma proteína envolvida na resposta inflamatória à quitina e tem papel importante na

inflamação pulmonar. O modelo será utilizado para o desenvolvimento de tratamentos de doenças inflamatórias pulmonares, como fibrose pulmonar e asma alérgica.

A técnica de transferência de embriões validada no estudo foi fundamental para garantir a eficiência na criação desses modelos genéticos.

8. DISCUSSÃO

No contexto da pesquisa biomédica, a questão do gerenciamento de linhagens de camundongos geneticamente modificados emerge como um ponto essencial. Com o crescimento exponencial dessas linhagens e o constante fluxo de animais entre diferentes instituições de pesquisa, surge a necessidade de considerar alternativas eficazes e éticas para sua manutenção. Nesse sentido, o uso da reprodução assistida associada com as técnicas de criopreservação de gametas e embriões representa não apenas uma solução viável, mas também mais segura e econômica.

Ao examinar a questão, torna-se evidente que a utilização de embriões oferece uma série de vantagens significativas em comparação com métodos convencionais de manutenção de linhagens. A preservação do status sanitário das linhagens surge como um ponto importante. Ao evitar a necessidade de transporte de animais vivos entre instituições, o uso de embriões reduz consideravelmente o risco de contaminação e a propagação de patógenos (CRABBE et al. 1993, RALL et al. 2000). Além disso, a adoção dessa abordagem pode promover o bem-estar dos animais, eliminando a necessidade de mantê-los em condições de confinamento durante o transporte. Ainda cabe ressaltar, que a capacidade de manter embriões criopreservados indefinidamente representa uma vantagem adicional e oferece uma solução prática e sustentável para o gerenciamento de linhagens em longo prazo.

A transferência de embriões desempenha um papel central nos procedimentos de reprodução assistida em laboratórios que lidam com animais experimentais. Como mencionado anteriormente, esta técnica é fundamental para reintroduzir os embriões que foram manipulados independentes do objetivo dessa manipulação e trazer de volta os animais desejados. No âmbito deste estudo, duas técnicas de transferência por meio da tuba uterina foram comparadas: uma envolvendo uma incisão na ampola e outra pela abertura do infundíbulo. Os resultados revelam taxas de sucesso

satisfatórias em ambas as abordagens, porém uma melhor eficácia foi observada nas transferências realizadas através da incisão na ampola. Portanto, essa abordagem foi escolhida como a preferencial para as transferências de embriões no Laboratório de Reprodução Assistida (LIRA), mesmo com a viabilidade de outras vias e técnicas serem comprovadas.

Apesar da ausência na literatura revisada de estudos semelhantes ao presente trabalho, foi possível identificar uma quantidade significativa de pesquisas relacionadas à transferência de embriões. Como previamente mencionado, vários fatores podem impactar os resultados dessa técnica. Nesta discussão, serão abordados alguns desses estudos, contextualizando-os em relação aos resultados do estudo atual e considerando sua potencial aplicação no LIRA.

A promoção do bem-estar animal é uma questão importante na experimentação animal e uma prioridade contínua no Laboratório de Reprodução Assistida (LIRA), tanto durante os procedimentos cirúrgicos quanto no período pós-operatório. Neste estudo, utilizou-se a combinação padrão de anestésicos, ketamina e xilazina, durante a cirurgia, complementada pelo analgésico meloxicam no pós-operatório, seguindo a prática utilizada no laboratório. A investigação dos efeitos desses medicamentos e medicamentos analgésicos na reprodução foi conduzida em um estudo de THAETE et al. (2013). Os resultados indicaram uma redução significativa no crescimento fetal com o meloxicam apenas quando administrado por dois dias consecutivos, sem impacto relevante no crescimento placentário durante os dias de gestação avaliados. Por outro lado, a utilização da ketamina/xilazina resultou em uma diminuição notável no crescimento fetal em diferentes estágios da gestação. No presente estudo, não se observou efeito desses medicamentos nos resultados e a alta taxa de sucesso no grupo AMPOL sugere que não houve interferência no desenvolvimento embrionário. No entanto, é essencial permanecer vigilante quanto a esse possível efeito, caso as taxas de sucesso diminuam em algum momento. Importante também ressaltar que o LIRA está em processo de substituição do protocolo anestésico atual com ketamina e xilazina e em breve passará a usar o isoflurano como método padrão.

Os camundongos possuem dois cornos uterinos e duas tubas uterinas, o que permite a realização da transferência de embriões em uma ou em ambas as tubas ou cornos. Contudo, a literatura carece de consenso quanto à realização da transferência bilateral ou unilateral. Um estudo realizado por AUER et al. (2023) investigou 223 transferências de embriões, sendo 56 unilaterais à esquerda, 56 unilaterais à direita e

111 bilaterais, com 10 a 14 embriões de duas células cada. Os resultados revelaram que as transferências bilaterais apresentaram taxas mais elevadas de gestação e nascimento em comparação com as unilaterais do lado esquerdo. Surpreendentemente, as transferências unilaterais do lado direito demonstraram taxas de gestação comparáveis às bilaterais, sem diferença na sobrevivência embrionária.

No presente estudo, optou-se por realizar as transferências bilateralmente. Importante lembrar que a mudança de bilateral para unilateral demanda um maior número de receptoras utilizadas, podemos considerar que o dobro de fêmeas será utilizado com essa mudança. Se por um lado essa mudança pode representar uma estratégia interessante a ser explorada no futuro pois com um maior número de receptoras disponíveis e menos embriões transferidos por receptora, é possível reduzir um potencial efeito materno nas taxas de gestação e nascimento. Por outro lado, se levarmos em consideração o número de animais utilizados, haverá um aumento, que pode ser questionado em função dos 3Rs da experimentação animal. É relevante notar que as transferências para o lado direito apresentaram resultados semelhantes à abordagem bilateral, o que pode ser explicado pelo fato que a maioria dos técnicos que realizam a cirurgia são possivelmente destros.

Em outra pesquisa foi demonstrada que a transferência bilateral resultou em taxas superiores de gestação e no nascimento de ninhadas maiores (LAMAS et al., 2020). Esse achado fortalece o protocolo adotado neste estudo, que optou pela transferência bilateral. No presente trabalho, a transferência bilateral é conduzida por meio de duas incisões, uma em cada lado. Para minimizar a invasividade do procedimento, uma possibilidade a ser considerada futuramente é a realização da transferência por meio de uma única incisão central no dorso do animal. A avaliação dos resultados com esse método de incisão única poderá potencialmente conduzir a uma revisão do protocolo, representando um refinamento significativo no procedimento.

Uma análise retrospectiva das transferências de embriões em camundongos revelou que ampolas inchadas em camundongos B6C3F1 foram associadas a taxas mais altas de gestação (GOUGOULA et al. 2023). Esta observação foi também realizada durante o treinamento e condução do presente projeto mas não foi categorizado para poder ser analisado. A ampola inchada tem sido utilizada como um prognóstico para o sucesso da transferência. Estes resultados destacam a importância de considerar fatores morfológicos e genéticos

na transferência de embriões, visando melhorar o sucesso reprodutivo e reduzir o uso de animais.

A busca pela inovação é fundamental em laboratórios que empregam tecnologias avançadas, e no contexto da transferência de embriões, técnicas e protocolos devem ser continuamente aprimorados. O estudo a seguir empregou uma agulha montada manualmente e uma pinça fina auto-fechante, fornecendo estabilidade e precisão para uma inserção eficaz e rápida dos embriões (SARVARI ET AL. 2013). As taxas de sucesso obtidas foram satisfatórias, evidenciando a importância de constante refinamento das técnicas empregadas. Esse refinamento pode abranger tanto aspectos da própria técnica quanto do procedimento no animal. No contexto do LIRA, caso as boas taxas obtidas neste estudo sejam mantidas, em futuras práticas e pesquisas, o aprimoramento deve se concentrar em melhorar o bem-estar dos animais durante o procedimento seguindo a linha dos 3Rs.

Outra abordagem envolveu o uso de uma microbomba manual para realizar a transferência de embriões através de uma incisão na tuba uterina (SARVARI et al. 2013), comparando suas taxas com a técnica tradicional. Os resultados revelaram uma taxa significativamente mais elevada de nascimentos vivos na nova abordagem (42,4% versus 21,7% na técnica convencional). Essa inovação demonstrou melhorias nas taxas de nascidos vivos em comparação com a técnica tradicional.

A busca por novas técnicas cirúrgicas e de transferência de embriões para a tuba é essencial. No entanto, como destacado anteriormente, é igualmente importante desenvolver técnicas que priorizem o bem-estar animal. Nesse sentido, abordagens que dispensam a cirurgia e realizam a transferência dos embriões através da passagem pela cérvix usando um cateter, depositando-os diretamente no corpo do útero, parecem ser promissoras.

Para minimizar o potencial de complicações cirúrgicas, reduzir a necessidade de anestesia e analgesia, simplificar os procedimentos de transferência de embriões e o longo treinamento necessário para a prática, foram desenvolvidos dispositivos e métodos para permitir a transferência de embriões não cirúrgica (NSET). O primeiro dispositivo para NSET foi desenvolvido em camundongos (GREEN ET AL 2009) e apresentou resultados promissores. Um outro estudo utilizou o NSET para testar o efeito das condições de cultura no

desenvolvimento pós-implantação de zigotos de camundongos cultivados até o estágio de blastocisto (CHOI et al. 2019). As taxas de aproximadamente 50% de gestação foram boas o suficiente para avaliar as condições de cultivo testadas. A transferência por meio do NSET, também foi utilizada para avaliar os efeitos tóxicos de vários compostos utilizados no meio de cultivo e sua associação no desenvolvimento embrionário pós-implantação e na gestação em camundongos (PRASAD et al. 2015 E HUANG et al. 2017).

Embora a transferência não cirúrgica represente um avanço significativo no refinamento do bem-estar animal, a técnica cirúrgica ainda é amplamente preferida pela comunidade científica (AUER et al., 2023).

As possíveis razões para a preferência pela técnica cirúrgica são diversas. Primeiramente, a precisão é um ponto crucial. As técnicas cirúrgicas permitem um posicionamento preciso dos embriões na tuba uterina ou no útero, o que pode ser fundamental para o sucesso do procedimento. Além disso, a flexibilidade é outro aspecto importante. Esses métodos permitem a transferência em vários estágios de desenvolvimento, desde embriões de uma célula até blastocistos, oferecendo uma gama de opções aos pesquisadores.

A transferência cirúrgica de embriões também se destaca pela presença de protocolos estabelecidos. Essa técnica tem sido amplamente utilizada e documentada na literatura científica, sendo reconhecida como uma abordagem estabelecida e confiável dentro da comunidade científica. Por outro lado, a transferência não cirúrgica, realizada para o útero, exige que os embriões estejam no estágio de blastocisto, o que pode limitar sua aplicabilidade em certos casos. É importante considerar também a questão da familiaridade e tradição. As técnicas cirúrgicas têm sido utilizadas há muitos anos na pesquisa com camundongos, e os laboratórios podem preferir continuar utilizando esses métodos devido à sua longa história de sucesso e à familiaridade dos pesquisadores com eles. Essa resistência à mudança pode ser um fator significativo na escolha da técnica de transferência de embriões em experimentos biomédicos.

Os questionamentos em relação ao uso de animais e a preocupação com o bem-estar podem forçar que as técnicas não cirúrgicas sejam realizadas com mais frequência. Isso exigirá uma mudança de protocolos nos laboratórios que precisarão cultivar seus embriões até o estágio de blastocisto antes da transferência. As justificativas acima para o uso da técnica cirúrgica podem não se

sustentar com a pressão constante para que o bem-estar animal seja colocado como prioridade no uso de animais em pesquisas. O LIRA vai continuar investindo no refinamento da técnica cirúrgica, mas dedicará esforço também no domínio da técnica não cirúrgica.

A rederivação cesariana é uma técnica na qual fetos são removidos do útero de fêmeas positivas para patógenos murinos um dia antes do parto previsto, são reanimados e colocados com fêmeas que estão em um biotério livre de patógenos (GLAGE et al. 2007). Um refinamento técnico desse procedimento é a utilização da transferência embrionária (SUZUKI et al. 1996). Os embriões são removidos no estágio de duas células até blastocisto e transferidos para fêmeas receptoras localizadas em biotérios livres de patógenos. A transferência pode ser por meio cirúrgico, se forem usados embriões de duas células ou não cirúrgicos se forem usados blastocistos. Esta técnica foi testada no estudo de ANTIORIO et al. (2016) e resultou na limpeza de 13 linhagens a partir de embriões obtidos de fêmeas doadoras superovuladas e transferidos para fêmeas receptoras sob estritas condições assépticas.

A técnica cirúrgica de transferência embrionária com o acesso pela ampola se destacou como melhor ferramenta para obtenção da maior taxa de prenhez e nascidos. O LIRA pretende oferecer essa técnica para linhagens presentes na UFRJ que necessitam dessa limpeza sanitária. Apesar das excelentes taxas de transferência cirúrgica, entendemos que é possível coletar os embriões no estágio blastocisto e testar a técnica não cirúrgica, atendendo desta forma as mudanças de conceito em relação ao bem-estar animal.

Outros fatores podem afetar conjuntamente o resultado de uma transferência sendo ela cirúrgica ou não. A citologia vaginal é uma interessante forma de avaliação do estado uterino das fêmeas receptoras antes da transferência de embriões, oferecendo uma alternativa não invasiva, rápida e eficaz. Em camundongos, a taxa de implantação durante o diestro foi significativamente alta (96%), destacando a importância dessa fase, caracterizada por níveis elevados de progesterona e receptividade uterina. Esses achados sublinham a relevância da citologia vaginal na maximização do sucesso das transferências de embriões, evitando procedimentos invasivos desnecessários (GLAGE et al. 2007). O acompanhamento do ciclo estral das receptoras pode ser uma boa estratégia para melhorar as taxas de gestação, mas não é algo

normalmente realizado nos laboratórios. Porém em caso de taxas baixas, esse acompanhamento permanece como uma técnica com potencial de melhorar os resultados.

A presente discussão apresentou diversos fatores que podem afetar os resultados de uma transferência embrionária cirúrgica bem como as opções disponíveis para transferências não cirúrgicas. Os excelentes resultados obtidos nesse trabalho resultaram na definição do protocolo pela ampola como padrão para o LIRA. O procedimento operacional padrão foi produzido conjuntamente com um vídeo ilustrativo da técnica que será submetido para uma revista de trabalhos visuais. Em razão dos excelentes resultados com a técnica cirúrgica aqui proposta, esta continuará a ser utilizada no LIRA em seus projetos de criopreservação e produção de novos modelos. Apesar de necessitar de cultivo embrionário prolongado e embriões em estágio mais avançado o LIRA vai investir esforço para que a técnica não cirúrgica seja também dominada no laboratório.

9. CONCLUSÃO

- A técnica cirúrgica de transferência de embriões de camundongo pela ampola da tuba uterina resultou em uma maior taxa de sucesso de gestação.
- Esta técnica foi utilizada para a produção do protocolo operacional padrão do LIRA.
- Foi elaborado um vídeo para juntamente com o POP, auxiliar o aprendizado e realização da técnica.

REFERÊNCIAS

ALI, Sarvari; MOHAMMAD, Mehdi; NADERI, Mohammad Reza; SADEGHI, Mohammad Mehdi; AKHONDI, Mohammad Mehdi. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 23-29, 2013.

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541- 015-6.

ANTIORIO, A. T. F. B. Rederivação de linhagens de camundongos por transferência embrionária para obtenção de colônias livres de patógenos específicos (SPF). 2016. 53 f

Auer, R, B Haslhofer, S Kitzler, P Saggese e F Victor (2023), “ The Technology of Decentralized Finance (DeFi) ”, documento de discussão de imprensa do CEPR nº 18038.

AUER, K. E. et al.. Comparison of unilateral and bilateral embryo transfer in mice. *Laboratory Animals*, 2023. doi: 10.1177/00236772221149844.

BANKS, W. J. *Histologia Veterinária Aplicada*. Manole, 2. ed., 1992, p. 626.

BARUSELLI PS, FERREIRA RM, VIEIRA LM, SOUZA AH, BÓ GA, RODRIGUES

CA. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*. 2020; 155: 1-11.

BATZOGLOU, S., PACHTER, L., MESIROV, J. P., BERGER, B., & LANDER, E. S. Human and Mouse Gene Structure: Comparative Analysis and Application to Exon Prediction. *Genome Research*, 10(7), p. 950–958, 2000.

BERMEJO-ALVAREZ P, PARK KE, TELUGU BP. Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model. *J Vis Exp*. Fev/2014

BRONSON, F. H.; DAGG, C. P.; SNELL, G. D. *Biology of the laboratory mouse*. 2nd. ed. New York: Dover Publications, New York, 1966. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml>>. acesso em 20\06\20

BROWN, Richard E. Genetically modified mice for research on human diseases: A triumph for Biotechnology or a work in progress?. *The EuroBiotech Journal*, v. 6, n. 2, p. 61-88, 2022. Disponível em: <[10.2478/ebtj-2022-0008](https://doi.org/10.2478/ebtj-2022-0008)>.

CHEN, P. et al. Number of embryos transferred could possibly be associated with angular pregnancy in in vitro fertilization-embryo transfer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2023. doi: 10.1002/ijgo.15294.

CHEN, Xiaojun. Transferência de embriões na fertilização in vitro: fatores que afetam o resultado bem-sucedido. 2022. DOI: 10.5772/intechopen.105785.

CHIN HJ, WANG C-KL. Utero-tubal transfer of mouse embryos. *Genesis*. 2001;30(2):77-81. <http://dx.doi.org/10.1002/gene.1036>. PMID:11416867.

CHOI ES, KAWANO K, HIRAYA M, MATSUKAWA E, YAMADA M. 2019. Effects of pyruvate and dimethyl- α -ketoglutarate, either alone or in combination, on pre- and post-

implantation development of mouse zygotes cultured in vitro. *Reprod Med Biol* 18:405–410. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12288>

COHEN, J. “Any idiot can do it: Genome editor CRISPR could put mutant mice in everyone's reach”. *Science*, 2016.

CRABBE JC, SCHNEIDER U, HALL JW, MAZUR P. Invited commentary: cryopreservation as a tool for the study of selectively bred lines in rodent behavioral genetics. *Behav Genet.* 1993 Jul;23(4):307-12. doi: 10.1007/BF01067430. PMID: 8240209

CUI L, ZHANG Z, SUN F, DUAN X, WANG M, DI K, LI X. Transcervical embryo transfer in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(3):228-31. PMID:24827563.

DANTAS, Joedson; HAUSCHILDT, Jenniffer; MACHADO-NEVES, Mariana; VERGANI, Gabriel Brun; AHMADI, Bahareh; PEREIRA BATISTA, Ivan Tavares; SOUZA-FABJAN, Joanna Maria Gonçalves; OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, Pawel M.; DA FONSECA, J. F. Transcervical uterine flushing and embryo transfer in sheep: Morphophysiological basis for approaches currently used, major challenges, potential improvements, and new directions (alas, including some old ideas). *Reproductive Biology*, 2024. DOI: 10.1016/j.repbio.2024.100920.

DAVIS T. Nonsurgical transfer of mouse embryos. *Bios.* 1981;52(3):127-33.

DAVISSON, M.T.; TAFT, R.A.. Strategies for managing an ever increasing mutant mouse repository. *Brain Res*, v. 1091, p.255-257, 2006

FAHEY JR, KATOH H, MALCOLM R, PEREZ AV. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mamm Genome.* p. 89-94, Jan/2013.

GLAGE, S., DORSCH, M., HEDRICH, H. J., & BLEICH, A. (2007). Rederivation of *Helicobacter hepaticus*-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice. *Lab Anim*, 41(1), 103-110. doi: 10.1258/002367707779399437.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GOUGOULA, C.; BENTEN, W. P. M.; KAPLANIAN, A.; BENGA, L.; KNORR, I. J.; ENGELHARDT, E.; SAGER, M. Swollen ampulla as an indicator of successful pregnancy in B6C3F1 recipient mice used for assisted reproduction. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 63, n. 1, p. 89–98, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-23-000051>.

GREEN M, BASS S, SPEAR BT. 2009. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. *Biotechniques* 47:919–924. <https://doi.org/10.2144/000113257>.

HOURMAT, Hind; WINKLER, Emma S.; CHEN, Rita E.; ALAM, Fahmida; YILDIZ, Soner; CASE, James Brett; UCCELLINI, Melissa B.; HOLTZMAN, Michael J.; GARCÍA-

SASTRE, Adolfo; SCHOTSAERT, Michael; DIAMOND, Michael S. SARS-CoV-2 causes lung infection without severe disease in human ACE2 knock-in mice. *Journal of Virology*, 2021. doi: 10.1128/JVI.01511-21.

HUANG CH, CHAN WH. 2017. Rhein induces oxidative stress and apoptosis in mouse blastocysts and has immunotoxic effects during embryonic development. *Int J Mol Sci* 18:1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms18092018>.

HUIJBERS, I. J. et al. Using the GEMM-ESC strategy to study gene function in mouse models. *Nature Protocols*, v. 10, n. 11, p. 1755-1785, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.114>. Acesso em: 25 jul. 2024

L.W. JOHNSON, R.J. MOFFATT, F.F. BARTOL, C.A. PINKERT. Optimization of embryo transfer protocols for mice, *Theriogenology*, Volume 46, Issue 7, p. 1267-1276, 1996

LAMAS, SOFIA. C57BL/6J and B6129F1 Embryo Transfer: Unilateral and Bilateral Transfer, Embryo Number and Recipient Female Background Control for the Optimization of Embryo Survival and Litter Size *In Animals* (Basel). 2020 Aug; 10(8): 1424

LAPCHIK, Valderez Bastos Valero; MATTARAIA, Vânia Gomes; KO, Gui Mi. *Cuidados e manejo de animais de laboratório*. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2017

LARSON M.A. Embryo Transfer Surgery. In: Larson M. (eds) *Transgenic Mouse*. *Methods in Molecular Biology*, vol 2066. Humana, New York, NY. 2020

M., M., Lin., Y., M., Ge., S., Yang., R., Yang., R., Li. "[Rudimentary horn pregnancy: clinical analysis of 12 cases and literature review]." *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, undefined (2024). doi: 10.3760/cma.j.cn112141-20231112-00184

LEAH, M.; ROBERTS, Jason M.; FRANASIAK. Técnica de transferência de embriões. 2023. DOI: 10.1201/9781003268611-60.

LINNEAUS, C. von. (1758). *Systema naturae*, 10 ed, vol. 1. Pág. 62. Stockholm: L. Salvii, 1758. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/80764#page/71/mode/1up>> Acesso em: 30 set. 2023

LIPERIS, G.; SJÖBLOM, C. Quality Control in the IVF Laboratory. 2023. p. 86-95. doi: 10.1017/9781009030601.013.

LORETI, S. et al. Circadian serum progesterone variations on the day of frozen embryo transfer in a modified natural cycle protocol. *Human Reproduction*, 2024. doi: 10.1093/humrep/deae101.

MAGGIULLI, R. et al. P-773 Assessment of the putative impact of culture strategies, oocyte/embryo manipulations, and operators: a retrospective analysis of 3705 blastocyst culture cycles and 2604 single blastocyst transfers. *Human Reproduction*, 2022. doi: 10.1093/humrep/deac107.713.

MCLEAN AC, VALENZUELA N, FAI S, BENNETT SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging

identification. J Vis Exp. 2012 Sep 15;(67):e4389. doi: 10.3791/4389. PMID: 23007862; PMCID: PMC3490233.

MICHAEL, A.; GREEN, Brett T.; SPEAR. Non-surgical embryo transfer method and apparatus. [s.l.], 2009.

MOBRAATEN, L.E. Mouse embryo cryobanking. J Assist Reprod Genet 3, p. 28–32, 1986

MOCHIDA K. Development of assisted reproductive technologies in small animal species for their efficient preservation and production. J Reprod Dev. 2020 Aug 20;66(4):299-306. doi: 10.1262/jrd.2020-033. Epub 2020 Apr 19. PMID: 32307339; PMCID: PMC7470897.

NAKAGATA N. Cryopreservation of mouse spermatozoa and in vitro fertilization. Methods Mol Biol. 693: p. 57-73, 2011.

NAKAGATA, N. Cryopreservation of mouse spermatozoa. Mamm. Genome., 11, p. 572–576, 2000.

NARVER, H. L. Mouse and Rat Anesthesia and Analgesia. *Current Protocols*, 2024. doi: 10.1002/cpz1.995.

NELSON, S.M.; TELFER, E.E.; ANDERSON, R.A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. Human Reproduction Update, v.19, n.1, p.67-83, 2012.

NEVES, S. M. P., MANCINI FILHO, J., MENEZES, E. W. de (editores). Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. FCF-IQ/USP, São Paulo, p. 50, 2013.

OZTURK, Saffet. Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 10, p. 1021-1036, 2020.

PEREIRA, L.V. Animais transgênicos: nova fronteira do saber. Cienc. Cult, vol.60, n.2, p. 40-42, 2008.

PESQUERO, João Bosco et al. Animais transgênicos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 27, p. 52-56, 2002.

PRASAD P, MOLLA MR, CUI W, CANAKCI M, OSBORNE B, MAGER J,

PRESGRAVE, O. A. F. et al. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. *Ciênc. vet. tróp.*, v. 13, p. 106-117, 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-479426>. Acesso em: 25 jul. 2024.

QUINN, P., WARNES, G.M., KERIN, J.F. and KIRBY, C. Culture Factors Affecting the Success Rate of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Annals of the New York Academy of Sciences, 442: p. 195-204, 1985

RAEHUM, P. CRISPR/Cas9 Endonuclease-Mediated Mouse Genome Editing of One-Cell and/or Two-Cell Embryos by Electroporation, and the Use of Rad51 to Enhance Knock-In

Allele Homozygosity via Interhomolog Repair Mechanism. In: *Methods in Molecular Biology*, 2022. doi: 10.1007/978-1-0716-2990-1_10.

RENDI, M. H. et al. Female Reproductive System. In: (Ed.). *Comparative Anatomy and Histology A mouse and Human Atlas*: Elsevier, 2012. cap. 17, p.253-294.

RICHARD, R.; BEHRINGER, Marina; GERTSENSTEIN, Marina; VINTERSTEN, Kristina; NAGY, Andras; NAGY, Andras. Seleção de camundongos fêmeas no estro e verificação de plugues. *Protocolos CSH*, 2016. DOI: 10.1101/PDB.PROT092387.

ROBERTS, L. M.; FRANASIAK, J. M. Embryo Transfer Technique. In: *Reproductive Medicine*, 2023. doi: 10.1201/9781003268611-60.

SARVARI A, NADERI MM, SADEGHI MR, AKHONDI MM. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2013;5(1):62-5. PMID:23626878

SCHWARTZ, K.; PACHARINSAK, C. Mouse Anesthesia and Analgesia. *Current Protocols*, 2024. doi: 10.1002/cpz1.1006.

STONE, S. Nonsurgical Embryo Transfer Protocol for Use with the NSET™ Device [Methods in Molecular Biology] *Transgenic Mouse Volume 2066 (Methods and Protocols*, 2020. (NAKAGATA e TAKEO, 2020)

STONE, Barbara J.; SRODULSKI, Sarah. Inducing Pseudopregnancy in Female Mice Without the Need for Vasectomized Males Prior to Non-Surgical Embryo Transfer or Artificial Insemination. *Journal of Visualized Experiments*, [s. l.], (2023). DOI: 10.3791/65477.

SUNTSOVA, MV, BUZDIN, A Diferenças entre genomas humanos e de chimpanzés e suas implicações na expressão gênica, funções de proteínas e propriedades bioquímicas das duas espécies. *BMC Genomics* 21, 535 (2020).

SUZUKI H, YOROZU K, WATANABE T, NAKURA M, ADACHI J. Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer. *Exp Anim*. 1996 Jan;45(1):33-8. doi: 10.1538/expanim.45.33. PMID: 8689578.

TEKLU, H.; FESSEHAYE, A.; SIUM, Y. Non-Communicating Rudimentary Horn Pregnancy Presenting as a Second Trimester Missed Abortion: A Case Report. In: *Reproductive Health*, 2024. doi: 10.21203/rs.3.rs-4253017/v1.

THAETE LG, LEVIN SI, DUDLEY AT. Impact of anaesthetics and analgesics on fetal growth in the mouse. *Lab Anim*. 2013 Jul;47(3):175-83. doi: 10.1177/0023677213480769. PMID: 23760961; PMCID: PMC7164588.

THERE, A. W. Anesthesia and Analgesia Recommended for Painful Procedures in Small Animals. *Journal of Biomedical Research*, 2024. doi: 10.31531/edwiser.jpbm.1000103.

TRAPPHOFF, T.; DIETERLE, S. Cryopreservation of Ovarian and Testicular Tissue and the Influence on Epigenetic Pattern. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. doi: 10.3390/ijms241311061.

TYSON JA. Considerations for importing live genetically modified mice from academic laboratories. *Lab Anim (NY)*. 2012 Jun;41(6):167-70. doi: 10.1038/labani0612-167. PMID: 22614092.

WASSON K. Retrospective Analysis of Reproductive Performance of Pair-bred Compared with Trio-bred Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2017 Mar 1;56(2):190-193. PMID: 28315650; PMCID: PMC5361046.

WOHLRES-VIANA, S. et al. Avaliação da recuperação e morfologia em embriões de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem suíço produzidos com diferentes protocolos superovulatórios. In: SEMANA DE BIOL29., MOSTRA DE PRODUJuiz de Fora, MG, 2006. Anais... Juiz de Fora. 2006.

ZHANG Z, LV X, WANG Y, CHEN Y, ZHENG R, SUN H, BIAN G, XIAO Y, LI Q, YANG Q, AI J, DUAN J, TAN R, LIU Y, YANG Y, WEI Y, ZHOU Q. Success of murine embryo transfer increased by a modified transfer pipette. *J Reprod Dev*. 2009;55(1):94-7. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.20090>. PMID:19023181.