

Qualidade embrionária de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geléia real

Embryo quality of mice ("Mus musculus") fed royal jelly

BARBOSA, Larissa Pires^{1*}; RODRIGUES, Marcos Vinícius²; BALARINI, Maytê Koch²;
NEVES, Mariana Machado³; MELO, Bruno Edésio dos Santos⁴; MORAIS, Danielle Barbosa⁴

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

²Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Veterinária, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Endereço para correspondência: lpires73@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivou-se verificar a influência da geléia real, associada ao tratamento de indução de crescimento folicular, no número e na qualidade de embriões de camundongos (*Mus musculus*). Foram utilizadas 60 fêmeas da linhagem Suíço albino com idade entre oito e dez semanas, distribuídas em três tratamentos: o primeiro, composto por animais que receberam 0,2 mL de solução fisiológica, via intraperitoneal (grupo controle, n=20); o segundo e terceiro, compostos de fêmeas que receberam 0,5 e 1 mg de geléia real diluídos em 0,2 mL de solução fisiológica via intraperitoneal (n=20), respectivamente. Foi administrada geléia real por um período de 15 dias, segundo o processo de indução do crescimento folicular. As coletas dos embriões ocorreram 68 horas após a cobertura, utilizando-se o método da lavagem uterina. Não houve diferença no número de fêmeas que responderam ao tratamento superovulatório, no número total de estruturas recuperadas, no número de estruturas viáveis e não-viáveis e na qualidade morfológica dos embriões viáveis ($P > 0,05$). Desta forma, nas doses utilizadas a geléia real não melhora o número e a qualidade dos embriões recuperados de fêmeas de camundongos superovuladas.

Palavras-chave: embriões, superovulação, via intraperitoneal

SUMMARY

The study was carried out to verify the effect of feeding royal jelly associated to follicle growth induction on number and quality of mice (*Mus musculus*) embryos. Sixty Swiss females ageing from eight to ten weeks were distributed into three treatments: the first one, composed by animals fed 0.2 mL of physiological solution intraperitoneal (control group, n=20); the second and third ones, composed by females fed 0.5 and 1.0 mg of royal jelly diluted in 0.2 mL of physiological solution (n=20), respectively. Royal jelly was administered during 15 days, followed by the follicular growth induction process. Embryos were collected 68 hours after mating, by uterine flushing. No treatment effects on the number of females that answered to superovulatory process, the number of total recovery structures, the number of viable and non viable structures and the morphological quality of viable embryos ($P > 0.05$) were observed. Therefore, royal jelly doses used were not efficient to increase the number of embryos and to improve the quality recovery from superovulated mice.

Keywords: embryos, intraperitoneal, superovulation

INTRODUÇÃO

As inúmeras atividades terapêuticas dos produtos da colméia – mel, pólen, geléia real, cera, cepitoxina e própolis – são responsáveis pela grande popularidade desses produtos em países da Europa Oriental e da Ásia (Japão, China e Coréia do Sul) (PUTTKAMMER, 1994). A geléia real consiste de uma secreção leitosa e fluida, produzida pelas glândulas faríngeas das abelhas de 5 a 10 dias de idade, e tem a função primordial de alimentar a rainha, produzindo um indivíduo anatômica e fisiologicamente diferente das operárias, com desenvolvimento da capacidade reprodutiva (KOHNO et al., 2004).

É na abelha rainha que se imprime o grande valor nutricional da geléia real, pois desde a fase larvária até a fase adulta é alimentada com geléia real, o que possibilita a produção em um único dia de até 3.000 ovos, equivalendo a 6 vezes o seu peso corporal. Por isso, essa secreção leitosa tem sido usada, entre outras finalidades, para melhorar a fertilidade em humanos e animais (CSUKA et al., 1978).

Alguns experimentos têm demonstrado o aumento da libido em homens e o melhoramento de alguns parâmetros reprodutivos em ovelhas e coelhos (KHATTAB et al., 1988; HUSEIN et al., 1999). Estudos realizados por Husein & Kridli (2002) mostraram que parâmetros reprodutivos como a resposta ao estro e a taxa de prenhez melhoraram em ovelhas quando se administrou geléia real associada ao tratamento com progesterona intravaginal. Em outro estudo com ovelhas, os autores utilizaram geléia real em substituição à gonadotrofina coriônica eqüina (eCG),

em protocolos de sincronização de estro, e constataram que a geléia real produziu efeitos similares àqueles promovidos pela eCG na resposta aos protocolos de sincronização, quanto à indução do estro, à taxa de prenhez e à taxa de nascimento (HUSEIN & HADDAD, 2006).

Segundo Whittinghan (1971), inúmeras pesquisas relacionadas à biologia da reprodução têm utilizado o camundongo como modelo experimental, a fim de elucidar inúmeros eventos ligados à fisiologia reprodutiva, visando aplicação posterior em outras espécies. Estes estudos servem de base para pesquisas realizadas com zigotos de espécies domésticas de interesse econômico, além de contribuírem para a solução de problemas de infertilidade na espécie humana. Desta forma, objetivou-se verificar a influência da geléia real, associada ao tratamento de indução de crescimento folicular, no número e na qualidade de embriões de camundongos (*Mus musculus*).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UnilesteMG), na cidade de Coronel Fabriciano – MG. Foram utilizadas 60 fêmeas de camundongos (*M. musculus* - suíços albinos), com idade entre oito e dez semanas e peso médio entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério do Curso de Ciências Biológicas do UnilesteMG. Esses animais foram mantidos nesse biotério, sob temperatura ambiente e fotoperíodo de 14 horas diárias de luz, e receberam água e ração comercial específica para camundongos *ad libitum*.

As fêmeas foram distribuídas, aleatoriamente, em três tratamentos: o primeiro, composto por fêmeas superovuladas que receberam 0,2 mL de solução fisiológica, diariamente, via intraperitonal (grupo controle, n=20); o segundo e terceiro, compostos por fêmeas superovuladas que receberam, respectivamente, 0,5 mg e 1,0 mg de geléia real diluídos em 0,2 mL de solução fisiológica, diariamente, via intraperitonal (n=20).

Para indução do crescimento folicular, utilizou-se gonadotropina coriônica equina (eCG) e gonadotropina coriônica humana (hCG). Cada hormônio foi diluído em água destilada de forma a se obter concentração final de 10 unidades internacionais (UI) por 0,1 mL de solução final. O tratamento indutório iniciou-se com aplicação de 10 UI de eCG por animal e a segunda inoculação, 48 horas após a primeira, correspondente a 10 UI de hCG por animal. Todas as inoculações foram feitas intraperitonealmente e o acasalamento foi realizado no momento da aplicação do hCG, na proporção de duas fêmeas para um macho.

A geléia real *in natura*, produzida no Vale do Aço em Minas Gerais, foi administrada, diariamente, via intraperitoneal, diluída em água destilada, nas doses de 0,5 e 1,0 mg para o segundo e terceiro tratamentos, por animal, durante os 15 dias que precederam o tratamento indutório. Aos animais do tratamento controle foi administrado 0,2 mL de solução fisiológica; todos os animais do experimento foram submetidos ao mesmo estresse de manipulação, contenção e administração de medicamentos.

Os animais foram sacrificados, 68 horas após a cópula, por deslocamento cervical, conforme procedimentos aceitos para sacrifício de animais, definido pela Resolução N°714 de 20/06/2002 do CFMV (2003). A pele foi incisada na região do abdômen e afastada com auxílio das mãos, efetuando-se em seguida a abertura do peritônio. Após a incisão, os intestinos e o tecido adiposo que envolve os órgãos genitais foram removidos com o auxílio de uma pinça, com posterior retirada do útero, das tubas uterinas e dos ovários. Uma incisão foi efetuada cranialmente ao nível de inserção da tuba uterina e outra, caudalmente, ao nível imediatamente anterior a cérvix, completando a salpingo-histerectomia. Os dois cornos uterinos foram, então, separados por meio de incisão longitudinal no corpo do útero e transferidos, posteriormente, para placas de Petri. Os cornos uterinos foram lavados com solução fisiológica. Após este procedimento, os embriões foram identificados e classificados com o auxílio de um estereomicroscópio (10X a 40X), quanto ao estágio de desenvolvimento e ao aspecto morfológico, segundo o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW et al., 1998).

As variáveis analisadas foram: número de fêmeas que responderam ao processo de superovulação, número de estruturas recuperadas por fêmea, número de estruturas viáveis e não-viáveis e qualidade morfológica dos embriões viáveis.

Foi analisada a distribuição dos dados por intermédio do teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados não apresentaram distribuição normal ($P < 0,05$). Apenas os animais que apresentaram acima de oito estruturas

recuperadas foram considerados positivos à resposta superovulatória (Tabela 1). Não houve diferença entre as respostas dos animais nos três tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 1. Resposta ao tratamento superovulatório de camundongos (*Mus musculus*) que receberam geléia real via intraperitoneal

| Tratamento | Sem geléia real | 0,5 mg de geléia real | 1,0 mg de geléia real | Total |
|------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| RT | 12 (60%) | 13 (65%) | 11 (55%) | 36 (60%) |
| NRT | 08 (40%) | 07 (35%) | 09 (45%) | 24 (40%) |
| Total | 20 | 20 | 20 | 60 |

RT = animais que responderam à superovulação e NRT = animais que não responderam à superovulação. Não houve diferença entre as respostas dos animais entre os tratamentos, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

A geléia real não interferiu no número de animais que responderam ao processo de superovulação. A superovulação observada neste experimento foi inferior aos resultados descritos por Pozzer et al. (1987) e similar ao encontrado por Maffili et al. (2001), de 66,6% de fêmeas que responderam ao tratamento superovulatório, em animais sem administração de geléia real. A ausência de resposta ao tratamento superovulatório pode ser atribuída à linhagem dos animais utilizados, ao estresse ambiental a que os animais são submetidos, a ovulações tardias, entre outros fatores.

A complexa composição da geléia real, incluindo vitaminas, minerais, fatores de crescimento e hormônios esteróides podem ter influenciado a associação com os hormônios tradicionalmente utilizados no processo superovulatório, o número de folículos ovulatórios e, conseqüentemente, o número de embriões produzidos. A ausência de observação de efeito da geléia

real pode ser justificada pelas doses utilizadas, possivelmente insuficientes para causar o efeito esperado. As dosagens a serem utilizadas ainda não são padronizadas e definidas para as diversas espécies animais, para avaliar seus efeitos nos processos reprodutivos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as médias do número total de estruturas recuperadas, de estruturas viáveis e não viáveis por tratamento (Tabela 2).

Houve alta correlação entre o número total de estruturas recuperadas e o número de embriões viáveis (Figura 1).

O número médio de embriões por fêmea foi superior aos encontrados por Wohlres-Viana et al. (2006), de 7,83 estruturas recuperadas por animal e de 5,83 embriões viáveis, e por Maffili et al. (2001), de 5,60 embriões viáveis em fêmeas superovuladas, em ambos os casos com o mesmo protocolo utilizado neste estudo, sem utilização de geléia real.

Tabela 2. Número de estruturas recuperadas, viáveis e não-viáveis (erro padrão) em camundongos (*Mus musculus*) submetidos à suplementação com geléia real via intraperitoneal que responderam ao tratamento superovulatório

| Tratamento | Nº de estruturas recuperadas | Nº de estruturas viáveis | Nº de estruturas não-viáveis |
|------------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Sem geléia real (n=16) | 24,12 ± 12,12 | 15,65 ± 9,08 | 8,47 ± 4,37 |
| 0,5 mg de geléia real (n=17) | 29,61 ± 21,86 | 20,23 ± 15,09 | 9,38 ± 7,32 |
| 1,0 mg de geléia real (n=16) | 23,11 ± 7,07 | 17,88 ± 7,76 | 5,23 ± 2,43 |

Não houve diferença no número de estruturas recuperadas entre os tratamentos, pelo teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

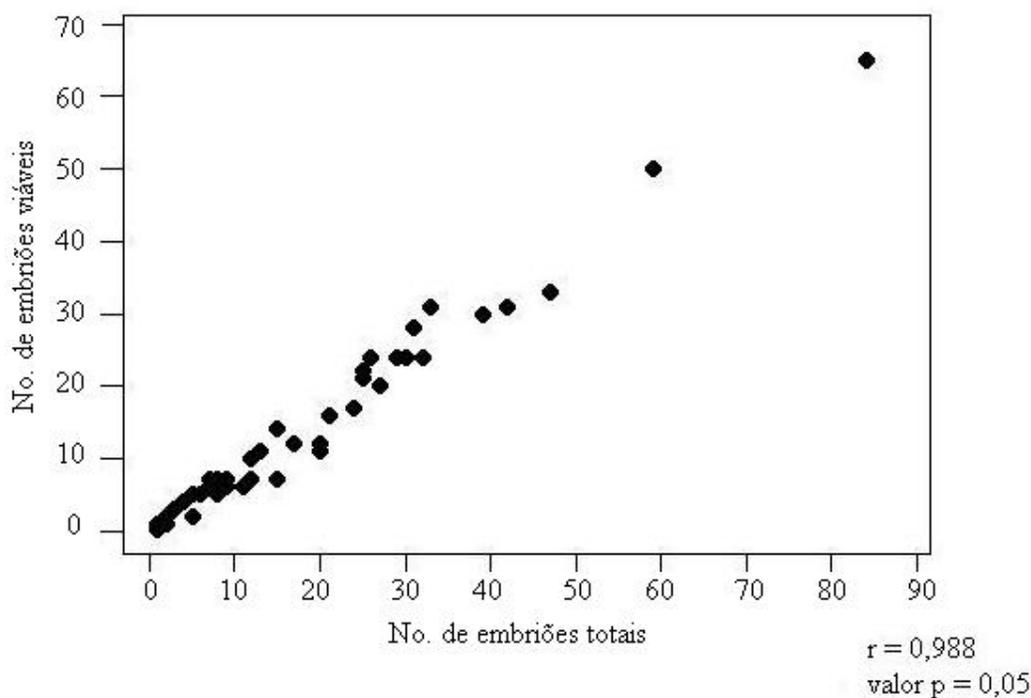


Figura 1. Correlação entre o número de embriões viáveis e o número de embriões totais coletados de camundongos superovulados sob suplementação com geléia real via intraperitoneal

Os embriões viáveis foram classificados morfológicamente como grau I, II e III, segundo Stringfellow et al. (1998) (Tabela 3). Não houve diferença

significativa na qualidade morfológica dos embriões observados nos três tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 3. Classificação morfológica de embriões viáveis de camundongos (*Mus musculus*) superovulados e submetidas à suplementação com diferentes doses de geléia real via intraperitoneal

| Qualidade morfológica | Sem geléia real | 0,5 mg de geléia real | 1,0 mg de geléia real |
|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| Grau I | 9,25 ± 6,18 | 10,69 ± 9,19 | 10,22 ± 7,66 |
| Grau II | 2,75 ± 1,90 | 3,92 ± 5,09 | 2,77 ± 2,22 |
| Grau III | 3,62 ± 2,77 | 5,61 ± 3,98 | 4,88 ± 4,04 |

Não houve diferença de qualidade morfológica entre os tratamentos, pelo teste Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

A administração diária de 0,5 e 1,0 mg de geléia real aplicada via intraperitoneal não melhora a quantidade e a qualidade embrionária de camundongos (*Mus musculus*) superovulados, sugerindo-se avaliações com outras doses e vias de aplicação.

REFERÊNCIAS

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA - CFMV, 2003.

Disponível em:

<<http://www.cfmv.org.br>>. Acesso em: 17 jun. 2008.

CSUKA, J.; BAUMGARTNER, J.; DUBAY, J. The effect of Royal jelly on some reproductive characters of Japanese quail. **Zivocisna Vyroba**, v.23, n.5, p.395-400, 1978. [Links].

HUSEIN, M.Q.; HADDAD, S.G. A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.24-33, 2006. [Links].

HUSEIN, M.Q.; KRIDL, R.T. Reproductive responses following Royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesterone-treated Awassi ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p.45-53. 2002. [Links].

HUSEIN, M.Q.; KRIDL, R.T.; HUMPHREY, W.D. Effect of Royal jelly on estrus synchronization and pregnancy rate of ewes using fluorogestone acetate sponges. **Journal Animal Science**, v.77, p.431, 1999. [Links].

KHATTAB, M.M.; RADWAN, A.A.; AFIFI, E.A. Physiological effect of Royal jelly on female reproductive capacity in rabbits. In: INTERNATIONAL CONFERENCE APICULTURE IN TROPICAL CLIMATE, 4., 1988, Cairo. **Proceedings...Egypt, 1988**. [Links].

KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O.; ARAI, N.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.68, p.138-145, 2004. [Links].

MAFFILI, V.V.; TORRES, C.A.A.; BORGES, A.M.; AMORIN, L.S. Efeito da somatotropina bovina na resposta superovulatório e taxa de clivagem de zigotos de camundongos (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.377-379, 2001. [[Links](#)].

POZZER, M.A.; MATTOS, A.L.G.; FERRARRI, A.N. Efeito da superovulação em *Mus musculus* com HMG. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 11, p. 143-147, 1987. [[Links](#)].

PUTTKAMMER, E. **Gelêia real**: métodos e técnicas de produção, coleta e armazenamento. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 30p. [[Links](#)].

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. USA: IETS. 1998. p.103-116. [[Links](#)].

WHITTINGHAN, D.G. Culture of mouse ova. **Journal Reproduction Fertility**, v.14, p.7-21, 1971. [[Links](#)].

WOHLRES-VIANA, S.; PINTO, I.S.B.; VIANA, J.H.M. Avaliação da recuperação e morfologia em embriões de camundongos (*Mus musculus*) da linhagem suíço produzidos com diferentes protocolos superovulatórios. In: SEMANA DE BIOLOGIA, 2006. Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2006. p.120-122. [[Links](#)].

Data de recebimento: 26/06/2008

Data de aprovação: 23/01/2009