

DALTON MUNIZ SANTOS

RELAÇÃO ENTRE ESPLENECTOMIA E REPRODUÇÃO
EM CAMUNDONGOS

TESE DE MESTRADO

Programa de Pós Graduação em Medicina Molecular

Faculdade de Medicina.

Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte- Minas Gerais - Brasil.

2013

DALTON MUNIZ SANTOS

**RELAÇÃO ENTRE ESPLENECTOMIA E REPRODUÇÃO
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

**Linha de Pesquisa:
Cirurgias conservadoras do baço**

**ORIENTADOR:
Prof. Dr. Andy Petroianu**

Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil
2013

S237r

Santos, Dalton Muniz.

Relação entre esplenectomia e reprodução em camundongos
[manuscrito] / Dalton Muniz Santos. – Belo Horizonte, 2013.
xiii, 29f. : il. color.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Andy Petroianu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Molecular.

Área de concentração: Medicina Molecular.

1. Esplenectomia - Teses. 2. Reprodução - Teses. 3. Sistema
endócrino - Doenças - Função gonadal - Teses. 4. Camundongo como
animal de laboratório - Teses. 5. Rato como animal de laboratório -
Teses. I. Petroianu, Andy. II. Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.411:57.017.4

RELAÇÃO ENTRE ESPLENECTOMIA E REPRODUÇÃO EM
CAMUNDONGOS

DALTON MUNIZ SANTOS

Nível: Mestrado

Data da defesa: 22/02/2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Comissão Examinadora formada pelos Professores:

Prof. Dr. Andy Petroianu - Orientador

Prof. Dr. Marcos Pitombo Ettini - UERJ

Prof. Dr. Fernando Marcos Reis - UFMG

Prof. Dr. Sávio Lana Siqueira – UFOP

Prof. Dr. Reginaldo Figueiredo - UFMG

Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG

Auxílio Financeiro:

CNPq : Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG : Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

AUTORIDADES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Pró - Reitor de Pós Graduação:

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró – Reitor de Pesquisa:

Prof. Dr. Renato Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

Coordenador do Centro de Pós Graduação:

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe: Prof. Dr. Marcello Eller Miranda

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Coordenador: Prof. Dr Luiz Armando Cunha de Marco

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Profa. Dra Carolina Cavaliéri Gomes

Prof. Dr Marco Aurélio Romano Silva

Profa. Dra Maria Marta Sarquis Soares

Vitor Bortolo de Rezende – Representante Discente

À minha esposa, Ana Paula “Lindona”, pelo apoio e motivação

AGRADECIMENTOS

A todos os que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho, e contribuíram para a minha formação profissional, meu respeito e gratidão.

Particularmente:

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo Alberti, pelo valoroso auxílio nos cálculos estatísticos.

Aos amigos Giseli Araújo Pereira, Mariana Moura Quintão Silva e Henrique Xavier de Miranda Capanema pelo apoio e cooperação.

Aos colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG.

Ao Prof. Todd Marshall pela versão em inglês do resumo.

HOMENAGENS

Aos meus pais , Santos e Providência, por toda uma dedicação e exemplo de vida.

Às minhas filhas, Maria Paula, Mariana e Isabela, por alegrarem a minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%.....	Percentual
µg.....	Micrograma
ANOVA.....	Teste de Análise de Variância
cm.....	Centímetro
dl.....	Decilitro
et al.....	et alteri / e outros
FSH.....	Hormônio Folículo Estimulante
g.....	Gramma
HCG.....	Hormônio Gonadotrofina Coriônica
IgM.....	Imunoglobulina M
kg.....	Quilograma
LH.....	Hormônio Luteinizante
mg.....	Miligrama
ml.....	Mililitro
ng.....	Nanograma
p.....	Nível de Significância
PVPI.....	Polivinilpirrolidona
UFMG.....	Universidade Federal de Minas Gerais

ÍNDICE GERAL

TÓPICO	PÁGINA
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
4. OBJETIVO.....	9
5. RELEVÂNCIA.....	9
6. MÉTODO.....	10
6.1 Ética.....	10
6.2 Animais utilizados e cuidados gerais.....	10
6.2.1 Distribuição dos animais.....	11
6.2.2 Perioperatório, Anestesia e Operação.....	11
6.2.3 Pós-operatório.....	16
6.3 Parâmetros avaliados.....	16
6.4 Coleta de sangue e análise hormonal.....	17
6.5 Morte dos animais.....	17
6.6 Avaliação estatística.....	18
7. RESULTADOS.....	19
7.1 Adaptação dos animais.....	19
7.2 Ato cirúrgico e evolução pós operatória imediata.....	19
7.3 Alteração do padrão reprodutivo.....	19
7.4 Número de filhotes obtidos na terceira gestação.....	20
7.5 Período em dias entre a segunda e terceira gestação.....	22
7.6 Análise hormonal.....	23

8. DISCUSSÃO.....	24
9. CONCLUSÃO.....	26
10. REFERÊNCIAS.....	29
11. APÊNDICE.....	30
12. ANEXOS.....	31

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA	PÁGINA
TABELA 1: Principais funções esplênicas.....	4
TABELA 2: Presença de gravidez observada no terceiro cruzamento.....	20
TABELA 3: Número de filhotes de camundongo obtidos na terceira gestação.....	21
TABELA 4: Análise do tempo (dias) entre a segunda e a terceira reprodução em cada grupo.....	22
TABELA 5: Valores séricos da testosterona (ng/dl) em ratos dos grupos controle esplenectomizados.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1: Fixação do camundongo a mesa operatória.....	13
FIGURA 2 : Ato operatório - esplenectomia.....	14
FIGURA 3: Casal de camundongos e reprodução.....	15

1. RESUMO

INTRODUÇÃO: O baço é um importante órgão, com função na depuração sanguínea, hematopoese, metabolismo e resposta imune a diversos antígenos, além de armazenar e controlar a liberação de metais, aminoácidos e elementos de defesa do organismo. Esse órgão pode estar envolvido em diversas doenças, além de ser frequentemente lesado nos traumas abdominais, cujo tratamento na maioria das vezes é a esplenectomia. Para evitar as graves repercussões da asplenia, o baço tem sido preservado por meio de operações conservadoras ou implantes de tecido esplênico autógeno. Entre os efeitos adversos da esplenectomia, sugere-se inatividade sexual, entretanto, ainda não há estudo que evidencie relação entre baço e atividade sexual.. **OBJETIVO:** Verificar a influência da esplenectomia na reprodução em camundongos. **MÉTODO:** Foram utilizados 25 casais de camundongos, distribuídos em cinco grupos: Grupo 1: controle sem cirurgia. Grupo 2: controle submetidos a laparotomia e laparorráfia. Grupo 3: esplenectomia em machos. Grupo 4: esplenectomia em fêmeas. Grupo 5: esplenectomia em machos e fêmeas. Vinte ratos Holtzman machos foram distribuídos em dois grupos: Grupo 6: controle sem cirurgia e Grupo 7: esplenectomia. Os camundongos foram estudados quanto ao número de gestações e número de filhotes por gestação. Nos dois grupos de ratos, dosou-se a testosterona. Observou-se nos camundongos reprodução após as intervenções cirúrgicas, número de filhotes em cada grupo e período entre as gestações. **RESULTADOS:** Encontrou-se redução do número de gestações e do número de filhotes nos camundongos esplenectomizados acasalados com fêmeas normais. Nos ratos, houve aumento da testosterona após esplenectomia. **CONCLUSÃO:** Há redução do número de gestações e da prole em casais de camundongos machos esplenectomizados com fêmeas normais. A esplenectomia associa-se ao aumento da testosterona sérica em ratos.

Unitermos: Esplenectomia, Reprodução, Função gonadal, Camundongo, Rato.

2. ABSTRACT

INTRODUCTION: The spleen is an important organ which plays a role in blood clearance, haematopoiesis, metabolism, and immune responses to different antigens, in addition to storing and controlling the release of metals, aminoacids and the organism defence elements. This organ may be involved in a wide range of disturbances, and is frequently injured in abdominal traumas, which is most commonly treated by splenectomy. To avoid the severe repercussions of asplenia, the spleen has been preserved by means of conservative procedures, including partial or subtotal splenectomies, or autogenous splenic tissue implants. Some accounts point to sexual inactivity as being among the adverse effects of splenectomy; however, no study to date has been able to produce evidence which reflects the relationship between the spleen and sexual activity. **OBJECTIVE:** To verify the effect of splenectomy on reproduction. **METHOD:** The present study analysed 25 pairs of mice, divided into five groups: Group 1: control without surgery; Group 2: control of those subjected to laparotomy and laparorrhaphy; Group 3: splenectomy in male mice; Group 4: splenectomy in female mice; Group 5: splenectomy in male and female mice. In addition, 20 Holtzman rats were divided into two groups: Group 6: control without surgery and Group 7: splenectomy. The mice were studied according to both the number of pregnancies and the number of pups per pregnancy. In the two rat groups, the testosterone levels were dosed. In the mouse groups, reproduction after surgical interventions, the number of pups in each group and the time between pregnancies were assessed. **RESULTS:** A reduction in the number of pregnancies, as well as in the number of pups, could be observed in splenectomised male mice that had been coupled with normal female mice. In the rats groups, an increase in testosterone could be identified after splenectomy. **CONCLUSION:** A reduction in the number of pregnancies and in the number of pups could be observed in splenectomised males that had been coupled with normal female mice. Splenectomy is associated with an increase in serum testosterone levels in rats.

Keywords: Splenectomy, Reproduction, Gonadal function, Mouse, Rat.

3- Introdução:

O baço é um órgão parenquimatoso com funções importantes no sistema imunitário, sobressaindo a remoção de antígenos da circulação sanguínea. Ele contém cerca de 25% da população de macrófagos teciduais, 25% do total de linfócitos T e 15% dos linfócitos B do organismo. Em sua polpa branca, ocorre a formação de linfócitos, monócitos e opsoninas, como imunoglobulinas, fatores de complemento, além de tuftsina e properdina. O baço compõe 30% do sistema mononuclear fagocitário.^{1,2}

A rica rede de macrófagos forma cordões em torno dos capilares sinusoides, que retiram partículas estranhas e células anômalas do sangue. Esse papel torna-se ainda mais importante ao considerar-se que tais macrófagos fagocitam sem a necessidade de opsonização, sendo assim prioritários na defesa do organismo em condições sépticas agudas.²

Outra característica do baço é a produção de imunoglobulinas com destaque para IgM, em sua polpa branca. Esse órgão sintetiza fatores do complemento e outras opsoninas, como a tuftsina e a properdina. A maturação ou recirculação, que constitui a ativação dos elementos do sistema imunitário, também ocorre dentro do baço.²

Além de pertencer ao sistema de defesa do organismo, o tecido esplênico armazena células e elementos sanguíneos. Ele também controla a quantidade desses elementos na circulação. Em caso de necessidade, ocorre sua liberação imediata, para compensar parcialmente as deficiências orgânicas.² A Tabela 1 mostra parte das principais funções do baço.²

O tratamento para a maioria das doenças que acometem o baço é a esplenectomia, porém o tratamento conservador de tecido esplênico tem sido progressivamente mais utilizado.

Tabela1: Principais Funções Esplênicas.²

FUNÇÕES GERAIS	FUNÇÕES ESPECÍFICAS
HEMATOLÓGICA E IMUNITÁRIA	HEMATOPOESE MATURAÇÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS ATIVAR IMUNOGLOBULINAS RECIRCULAR LINFÓCITOS T e B
PRODUTORA	LEUCÓCITOS PEPTÍDEOS OPSONINAS -imunoglobulinas -tuftsina -properdina -fatores do complemento
ARMAZENADORA	LEUCÓCITOS PLAQUETAS TODOS OS METAIS
DEPURADORA	PARASITAS AGENTES INFECCIOSOS SUBSTÂNCIAS ANTIGÊNICAS CÉLULAS ANÔMALAS CORPÚSCULOS ESTRANHOS
PRECURSORA E DE SÍNTESE	FUNÇÕES DO HEPATÓCITO
METABOLISMO	LIPÍDICO COLESTEROL BILIRRUBINAS AMINOÁCIDOS
RELAÇÃO DE CONTROLE	MEDULA ÓSSEA SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITÁRIO SISTEMA ENDÓCRINO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO ATIVIDADE SEXUAL

As complicações cirúrgicas da esplenectomia, estão associadas à

técnica operatória, à via de acesso e principalmente ao estado asplênico. Essas adversidades podem surgir em decorrência de manipulação incorreta do órgão, de estruturas próximas do baço e contaminação. Trombose das veias esplênica, porta e mesentéricas pode evoluir desde assintomática até com necrose intestinal. A sepse fulminante pós-esplenectomia, é característica do estado imunodeprimido do estado asplênico, e pode levar à morte até em poucas horas.²⁵⁻²⁶

A reprodução humana é controlada pela ação de diversos hormônios sexuais. No homem, o principal é a testosterona, produzida no interior dos testículos nas células de Leydig. O hormônio hipofisário folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) estimulam no homem, a produção de testosterona pelas células de Leydig e promovem a maturação dos espermatozoides³

Os principais hormônios sexuais femininos são o estrogênio e a progesterona. O estrogênio é produzido pelos folículos ovarianos e é responsável pelos caracteres sexuais secundários femininos e pelo controle do ciclo menstrual. A progesterona é produzida pelo corpo lúteo, formado a partir do folículo maduro, e atua na segunda fase do ciclo menstrual. O FSH e o LH participam das diversas etapas do ciclo menstrual e da gravidez.³

O retardo do desenvolvimento somático e sexual decorrente de esplenomegalia por etiologias diversas, também descrito como nanismo esplênico, é completamente revertido por esplenectomia total ou subtotal.² As causas desse distúrbio sexual ainda não foram esclarecidas, tendo em vista

não terem sido encontradas afecções nutricionais, ambientais ou hormonais. Acredita-se que haja um fator esplênico associado a esse hipodesenvolvimento.²⁴

Capacidade reprodutiva, fecundação e fertilidade, são inter-relacionadas e suas características confundem-se.³ Entende-se por capacidade reprodutiva a fecundidade de um indivíduo e fertilidade indica a prevalência de procriação. Por outro lado, esterilidade é a incapacidade de reprodução. enquanto infertilidade é a incapacidade de um casal obter a gravidez por um período superior ao de duas gestações, tendo conjunção carnal pelo menos duas vezes por semana.³

No Brasil, cerca de 10% dos casais apresentam infertilidade.³ Fatores masculinos provocam 40% desses distúrbios e estão relacionados a alterações na espermatogênese.⁴ Fatores femininos são responsáveis por outros 40% e a combinação de ambos os fatores perfazem os 20% restantes.⁴ Entre as afecções relacionadas ao sexo feminino, destacam-se distúrbios da ovulação, obstruções tubárias e alterações uterinas. Doenças adquiridas ao longo do tempo, doenças sexualmente transmissíveis, neoplasias, traumatismos e endometrioses são algumas das causas de um casal infértil.^{3,7}

Há na literatura cinco artigos que relacionaram o baço com função gonadal. Durante a Batalha de Dettingen, na Inglaterra, em 1743, um soldado sofreu trauma abdominal com exteriorização do baço lesado através da ferida abdominal. No dia seguinte, percebeu-se que o baço exteriorizado necrosara durante a noite fria e foi retirado cirurgicamente. O soldado recuperou-se bem da operação, mas ficou insatisfeito por ter perdido o interesse por mulheres.

Shulz e Czermak, no século XIX, também observaram redução da fertilidade em animais esplenectomizados. Esses fatos levantaram a possibilidade de a esplenectomia interferir na atividade sexual.¹

Saito et al (1988), verificaram que a esplenectomia causava atraso na ovulação de ratas, sendo normalizada após a injeção de esplenócitos. Segundo esses autores, o baço modula funções ovarianas. A queda da prolactina na fase final de pseudogravidez em ratas esplenectomizadas sugere que os esplenócitos estão envolvidos no mecanismo de luteólise.⁸

Oakley et al (2010), estudaram a dinâmica da ovulação com base na teoria de Espey, de que a ovulação é um processo inflamatório agudo em resposta à estimulação da gonadotrofina.^{9,12} Os leucócitos são os principais mediadores de resposta inflamatória, circulando no sangue, sendo atraídos por moléculas conectivas em tecidos inflamados, atravessando a parede dos vasos sanguíneos e infiltrando nos tecidos intersticiais. As citocinas seriam liberadas pelo tecido inflamado, promovendo o aumento da conjugação nas células endoteliais, promovendo a regulação de receptores leucocitários e aumentando a migração dos leucócitos para os tecidos alvo.⁹ Uma vez recrutados pela inflamação, os leucócitos liberariam mediadores, que aceleraram o recrutamento e a função dos leucócitos, que sintetisariam proteases associadas à resposta imunitária no período pré-ovulatório.⁹

Esses pesquisadores quantificaram, por citometria de fluxo, leucócitos infiltrados no ovário durante o ciclo estral, e no período ovulatório induzido por gonadotrofina coriônica (HCG), em ratas. Eles concluíram que a ovulação decorre de reações inflamatórias mediadas por leucócitos, que promovem a ruptura do folículo, com expulsão do óvulo. Parece haver relação inversa

entre o número de leucócitos no ovário e no baço. Constatou-se redução do número de leucócitos infiltrados nos ovários de ratas esplenectomizadas, indicando que o baço libera leucócitos no período periovulatório.^{9,11-12}

Hedin (2010), avaliou vários fatores que influenciam na ovulação, como o impacto da obesidade e do diabetes melito, estabelecendo a relação entre metabolismo e reprodução. Esse autor destacou a importância do sistema imune com o sucesso da reprodução, por estar em acordo com os estudos de Oakley.^{8-12,19-24}

4- Objetivo

Verificar a influência da esplenectomia na reprodução em camundongos.

5 - Relevância

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa relacionada à esplenectomia e sua influência em diversos aspectos funcionais do organismo.

Os conhecimentos desta investigação poderão trazer subsídios na compreensão funcional do baço e seu papel em aspectos relacionados à reprodução em ambos os sexos.

6 – Método

6.1 Ética

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988). O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Câmara do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da UFMG, Protocolo nº 095/11. (Apêndice 1)

6.2 Animais Utilizados e Cuidados Gerais

Foram utilizados 50 camundongos albinos (*Mus musculus*) da raça BALB/c adultos, 25 machos e 25 fêmeas, com peso de aproximadamente 30 g, e 20 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da raça Holtzman, adultos, com peso de aproximadamente 350 g. Todos os animais foram procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Os camundongos foram guardados no Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, em gaiolas com dois animais, um macho e uma fêmea. Os ratos foram alocados em gaiolas apropriadas com cinco animais cada. Todos os animais foram mantidos em condições de temperatura ambiente, com luminosidade natural, receberam ração LABINA da PURINA e água à vontade, tendo sido acompanhados diariamente. As gaiolas foram limpas e a maravalha trocada diariamente.

6.2.1 Distribuição dos Animais

Os 50 camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos:

(n =10):

Grupo 1 – controle, sem operação;

Grupo 2 – laparotomia e laparorrafia, sem manipulação do baço;

Grupo 3 – esplenectomia total somente nos machos;

Grupo 4 – esplenectomia total somente nas fêmeas;

Grupo 5 – esplenectomia total em machos e fêmeas;

Os ratos, todos machos, foram distribuídos em quatro gaiolas contendo cinco animais cada.

Grupo 6 – esplenectomia total;

Grupo 7 – grupo controle sem operação;

6.2.2 Perioperatório, Anestesia e Operação

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG, obedecendo às normas técnicas de assepsia e antissepsia.¹⁷⁻¹⁸

Os procedimentos operatórios foram conduzidos sob anestesia geral com pentabarbúrico (Tiopental® , Cristália , Itapira, SP), na dose de 3,5 mg/animal (90 mg /kg) e citrato de fentanila (Fentanil®, Janssen-Cilag (São Paulo, SP) 2,5 µg/animal (60 µg / kg), ambos por via intraperitoneal. Durante todo o período da anestesia, foram observadas as frequências cardíaca e respiratória e ausência de movimentação voluntária.

Os camundongos e os ratos foram fixados em decúbito dorsal, com esparadrapo, sobre uma prancha cirúrgica. Após tricotomia de todo o abdome do animal, a antissepsia da parede abdominal foi feita com solução de polivinilpirrolidona (PVPI[®]) degermante e solução alcoólica de iodo a 2%. Foram utilizados campos de tecido para proteger a área a ser operada.

Em todos os grupos, exceto grupos 1 e 7 (controles), realizou-se laparotomia mediana com dois centímetros de comprimento nos camundongos e três centímetros de comprimento nos ratos. Nos animais dos grupos 3, 4, 5 e 6, identificou-se o baço, ligaram-se, com fio de seda 5-0 (Sutupak, Ethicon – Johnson&Johnson), e seccionaram-se os vasos esplênicos, para a retirada desse órgão.

No Grupo 2, o procedimento cirúrgico limitou-se a laparotomia e laparorrafia, nas mesmas condições dos grupos 3, 4 e 5, mas sem remoção do baço. A cavidade abdominal dos camundongos e dos ratos submetidos ao procedimento cirúrgico foi fechada em dois planos, com sutura contínua utilizando fio de náilon 4-0 (Sutupak, Ethicon – Johnson&Johnson).



Figura 1: Fixação do camundongo à mesa operatória

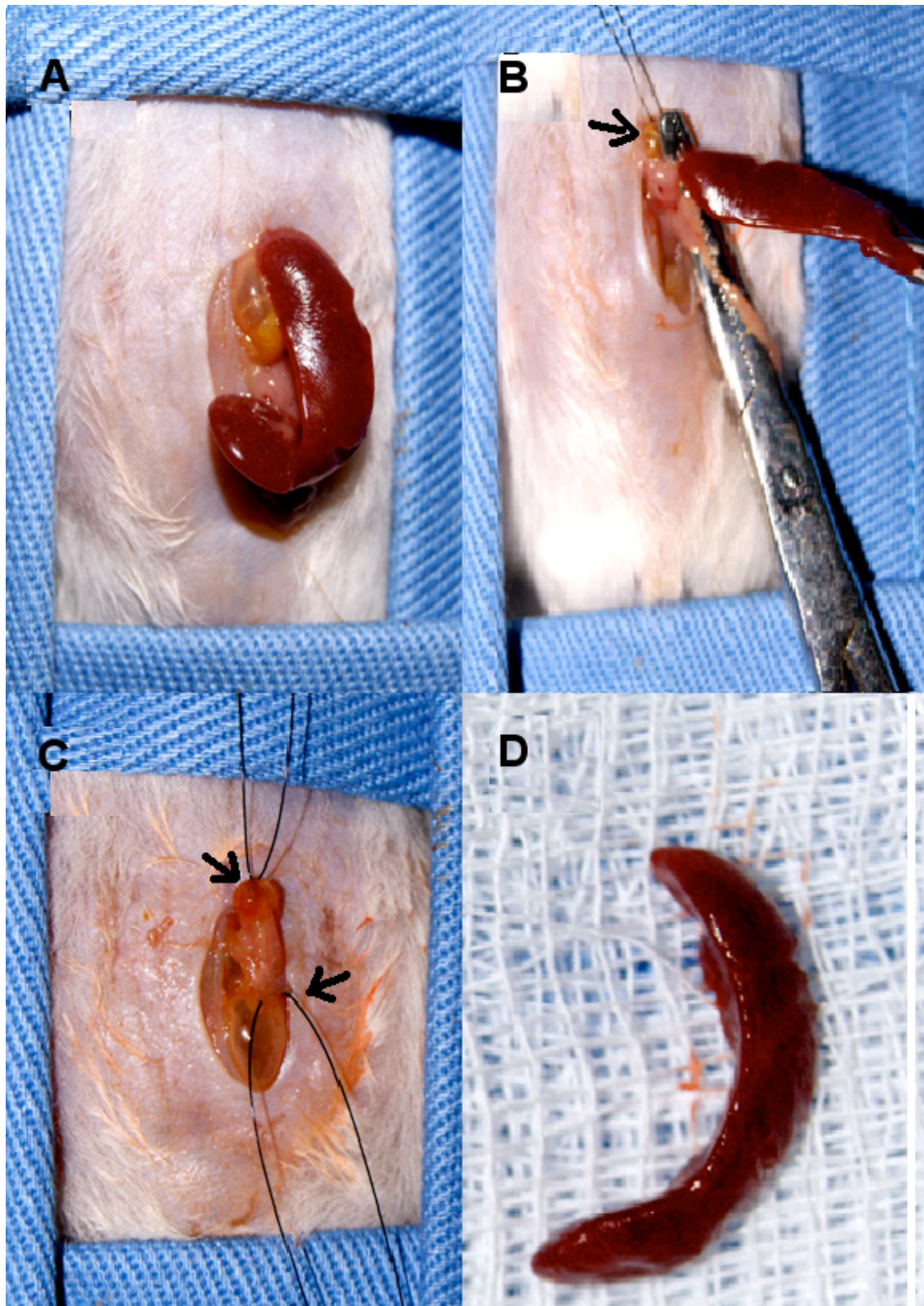


Figura 2: Ato operatório para esplenectomia

A – Exposição do baço. B – Ligadura dos vasos esplênicos (seta) para a retirada do órgão. C – Ligaduras dos vasos esplênicos (setas) após a retirada do baço. D – Baço retirado.

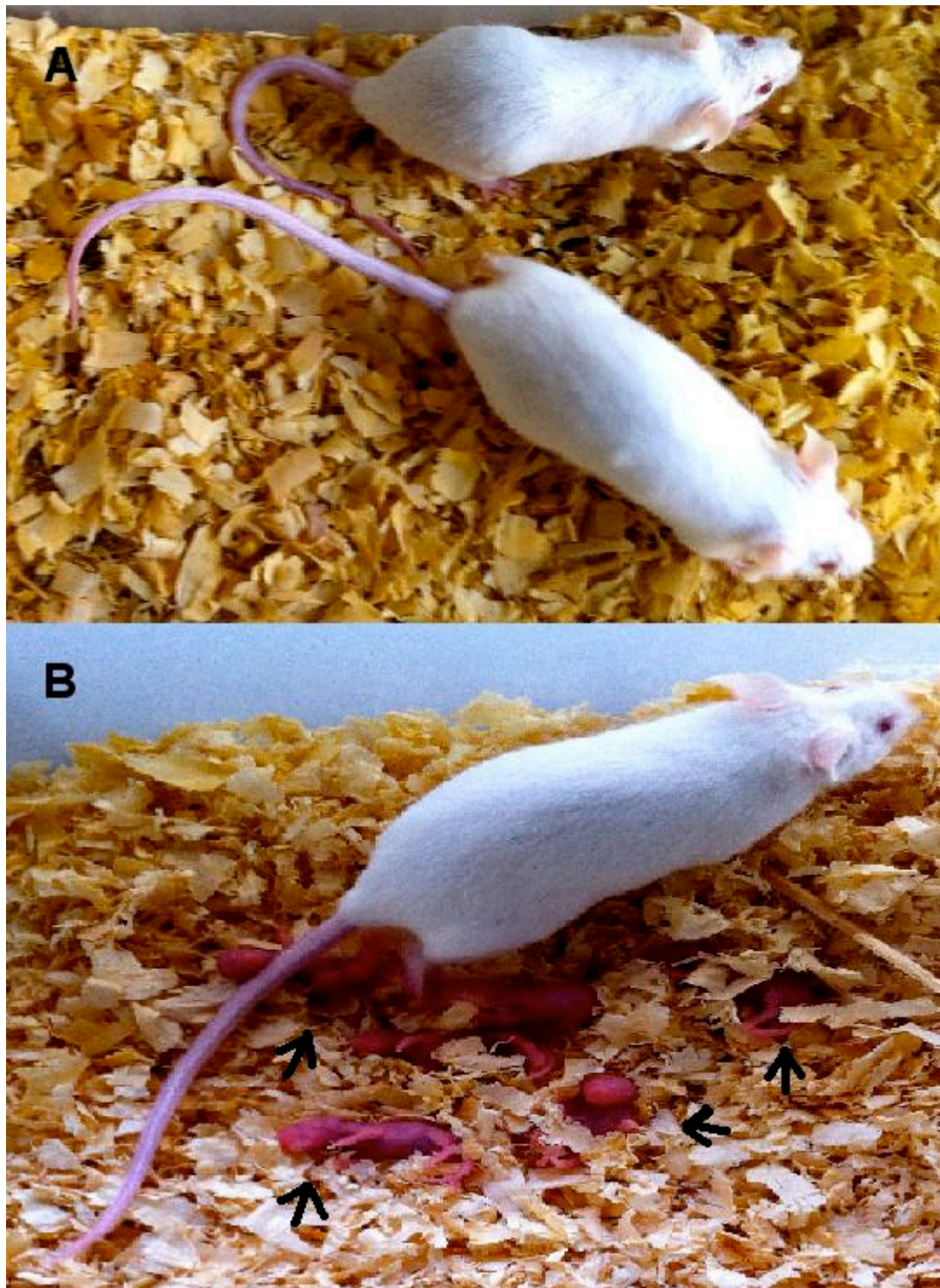


Figura 3: Camundongos dentro da gaiola

A – Casal de camundongos

B – Fêmea e filhotes (setas)

6.2.3 Pós – operatório

Os animais foram acompanhados até sua recuperação da anestesia. Cada animal foi examinado diariamente, em busca de complicações ou mudanças de comportamento.

6.3 Parâmetros Avaliados

Registraram-se o tempo de reprodução e o número de filhotes de cada casal. Foram considerados somente casais que haviam reproduzido, tendo sido excluídos os animais que não reproduziram na primeira parte desta pesquisa. Eles foram substituídos por outros camundongos com as mesmas características.

No Grupo 1, o tempo de estudo foi o período correspondente a duas gestações (42 dias). Já nos demais grupos (2, 3, 4 e 5) o tempo foi de 66 dias após a operação, correspondendo a três gestações (21 dias por gestação).

Não se avaliou a segunda reprodução, já que a fertilização poderia ter ocorrido antes do procedimento cirúrgico. Portanto foram considerados os dados obtidos em decorrência das primeira e terceira gestações. Os casais que não obtiveram a terceira reprodução dentro dos dois meses pós-operatórios foram considerados não reprodutivos, apesar de terem sido previamente férteis.

6.4 Coleta de sangue e análise hormonal.

Após a terceira reprodução, obtida em torno dos 60 dias depois da esplenectomia, os camundongos foram submetidos a novo procedimento anestésico e laparotomia mediana. Coletaram-se aproximadamente 2 ml de sangue da veia cava caudal.

Nos camundongos machos tentou-se verificar os valores séricos de testosterona, estrogênio, FSH, LH, enquanto nos camundongos fêmeas tentou-se avaliar os valores séricos de estrogênio, progesterona, FSH, LH, prolactina e testosterona, dosados sob a técnica de quimioluminescência.

Entretanto, em decorrência da reduzida quantidade de sangue obtida na coleta pela veia cava caudal, não se conseguiu realizar esse estudo. Com vista a verificar se é possível a dosagem de hormônios em ratos, incluíram-se mais dois grupos de ratos machos nesta pesquisa. Desses animais foram coletados 5 ml de sangue da veia cava caudal, para verificação dos níveis séricos de testosterona.

6.5 Morte dos animais

Após a terceira reprodução dos camundongos e a coleta do sangue em ratos a morte dos animais foi induzida por dose letal inalatória de éter após anestesia geral com pentabarbúrico e citrato de fentanila, nas mesmas doses descritas para a anestesia da esplenectomia.

6.6 Avaliação estatística

O número de animais utilizados em cada grupo foi definido com base em trabalhos pregressos desta linha de pesquisa, bem como em artigos da literatura. A distribuição aleatória dos animais em grupos teve como objetivo a homogeneização da amostra.

Os testes estatísticos foram realizados com o *software* Prism® versão 3.0. Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média.

Para comparar o índice de fertilidade entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fisher. Os resultados obtidos do padrão reprodutivo foram analisados pelo teste de Fisher, usado para amostras pequenas e permite calcular a probabilidade de associação das características independentes.

Para a comparação dos números de filhotes, tempo de reprodução e dosagens hormonais utilizou-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, para verificar a normalidade dos dados, seguido pelo teste de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey.

Todos os resultados foram considerados significativos quando as diferenças foram correspondentes a uma probabilidade superior a 95%, ($p < 0,05$).

7- Resultados

7.1 Estado geral dos animais

No período de adaptação, compreendido entre o primeiro e o décimo quinto dias, os camundongos e os ratos aparentaram saúde e estavam adaptados ao ambiente do biotério.

7.2 Ato cirúrgico e evolução pós-operatória imediata

Em todos os animais, o ato cirúrgico transcorreu sem anormalidades. À laparotomia, não foram vistas alterações morfológicas ou patológicas. Todos os animais recuperaram-se espontaneamente da operação.

7.3 Alteração do padrão reprodutivo

Observou-se que três dos cinco casais do grupo de machos esplenectomizados não reproduziram, $p = 0,038$, indicando influência no padrão reprodutivo, conforme descrito na Tabela 2.

Os resultados encontrados na análise do padrão reprodutivo, indicaram que três casais previamente reprodutores, mesmo com todas as condições favoráveis mantidas, como ração e água à vontade, conforto térmico, luminosidade adequada, interromperam o processo reprodutivo, após a esplenectomia nos machos. Entretanto essa mudança não ocorreu quando ambos os camundongos do casal foram esplenectomizados.

Tabela 2- Presença de gravidez observada no terceiro cruzamento.

Grupos	GRAVIDEZ		Valor – p *
	SIM	NÃO	
Sem operação	5	0	
Laparotomia	5	0	1,0
Machos esplenectomizados	2	3	0,038
Fêmeas esplenectomizadas	5	0	1,0
Machos e fêmeas esplenectomizadas	5	0	1,0

*Todos os grupos foram comparados com o grupo controle

7.4 Número de filhotes obtidos na terceira gestação

Apesar de não haver diferença nos cálculos estatísticos, em decorrência do reduzido número de animais, percebe-se nítida redução do número de filhotes dos cruzamentos com machos esplenectomizados (Tabela 3). Por outro lado, não houve alteração no número de filhotes quando ambos os camundongos do casal foram esplenectomizados.

Tabela 3 :Número de filhotes de camundongos obtidos na terceira gestação de todos os grupos estudados

Casal	Número de Filhotes				
	Sem opera- ção	Laparotomia	Machos esplenectomizados	Fêmeas esplenectomizados	Machos e fêmeas esplenectomizados
1	9	4	0	9	5
2	8	6	0	9	4
3	6	8	4	7	7
4	6	10	1	5	7
5	7	8	0	2	6
Média	7	7	2	6	5
EPM	1,3	2,2	2,1	2,9	1,3

Não houve diferença $p = 0,11$

Não foi encontrada diferença na quantidade de filhotes obtidos.

7.5 Período em dias entre a segunda e a terceira gestações.

Não houve diferença no período entre a segunda e a terceira reprodução dos casais de todos os grupos de camundongos, em que foram gerados filhotes. (Tabela 4)

Tabela 4 – Análise do tempo (dias) entre a segunda e a terceira reprodução em cada grupo.

Casal	Tempo em dias				
	Sem opera- ção	Laparotomia	Machos esplenectomizados	Fêmeas esplenectomizadas	Machos e fêmeas esplenectomizados
1	17	20	—	42	22
2	28	17	—	16	20
3	20	28	27	35	21
4	19	19	22	22	24
5	27	21	—	27	21
Média	22	21	25	28	22
EPM	5	4	4	10	2

Não houve diferença já que o $p= 0,33$

7.6 Análise hormonal

Houve elevação dos valores de testosterona no grupo de ratos esplenectomizados, apesar de não ter sido considerada significativa nos parâmetros adotados nesta pesquisa.

Tabela 5- Valores séricos da testosterona (ng/dl) em ratos dos grupos controle e esplenectomizados

Animal	Valor da testosterona (ng/dl)		
	Controle	Esplenectomizados	P
1	148,3	475,8	0,0711
2	303,1	196,4	
3	258,7	302,7	
4	164,4	612,7	
5	374,0	584,8	
6	209,5	221,7	
7	16,6	736,8	
8	57,8	847,3	
9	286,3	224,1	
10	839,6	425,9	
MÉDIA	265,8	462,8	
EPM	229,8	229,4	

8. DISCUSSÃO

Optou-se por não desenvolver a pesquisa em humanos em decorrência de fatores intervenientes na libido, como excesso de trabalho, estresse, uso do álcool, tabaco, drogas, medicamentos, além de doenças vasculares, obesidade e diabetes melito, entre outras. Haveria ainda o risco de respostas inverídicas por parte dos entrevistados com dificuldades na atividade sexual.

Os camundongos BALB/c e os ratos Holtzman são de fácil manejo, período reprodutivo curto e conhecido, além de serem de pequeno porte, o que facilita o seu acondicionamento e cuidados.

Inicialmente, a pesquisa teve por objetivo a libido dos animais, porém não foram encontrados na literatura subsídios que permitissem este estudo em camundongos, a revisão bibliográfica não revelou artigo que abordasse a relação entre baço, libido e reprodução. O estado asplênico também não tem sido relacionado aos aspectos reprodutivos, hormonais ou de libido.

As operações foram realizadas de acordo com os princípios da técnica cirúrgica e anestesiológica correta, evitando a interferência de complicações pós-operatórias no trabalho proposto. As condições de higiene dentro das gaiolas foram satisfatórias, para permitir o conforto dos casais de camundongos para seu acasalamento.

A coleta de sangue em camundongos não forneceu material suficiente para que fossem realizadas as dosagens hormonais. Por esse motivo, optou-se pela inserção de dois grupos de ratos, nesta pesquisa. A princípio, houve a intenção de estudar todos os hormônios sexuais e relacionados à reprodução, contudo preferiu-se transferir essa avaliação para um novo trabalho desta linha de pesquisa. Investigou-se apenas a testosterona como

subsídio piloto de trabalho vindouro. A elevação da testosterona reforça a necessidade de compreender melhor a influência da esplenectomia na reprodução de animais machos.

Cabe ressaltar a associação negativa da esplenectomia na reprodução com machos asplênicos somente quando as fêmeas eram normais. Nos casais em que ambos os camundongos haviam sido esplenectomizados, não se registrou mudança no padrão reprodutivo.

Por um lado pressupõe-se a interferência do estado asplênico na reprodução dos machos. Por outro lado, deve-se considerar o aspecto de a fêmea não aceitar o cruzamento com macho esplenectomizado, tendo em vista que o macho laparotomizado apenas, foi bem aceito para o cruzamento. O cruzamento com macho esplenectomizado ocorre normalmente desde que a fêmea esteja em condição similar.

Com relação aos machos com baço, não se observou mudança no padrão reprodutivo, seja com fêmeas esplenectomizadas ou normais. Considerando os achados deste trabalho, torna-se necessário prosseguir na mesma linha de pesquisa, para esclarecer o papel do baço e as repercussões do estado asplênico nas funções reprodutiva, hormonal e comportamental.

Na pesquisa conduzida por Oakley et al (2010) houve indícios de interferência da esplenectomia na ovulação, porém os achados restringiram-se a alterações nas fêmeas, diferentemente deste trabalho, que não observou alteração na fertilidade feminina.

Na pesquisa atual, as alterações encontradas foram em machos esplenectomizados. Tais resultados ainda não foram publicados na literatura, e não foram encontradas explicações para a não interferência no grupo de

machos e fêmeas esplenectomizados. Esses resultados reforçam as primeiras publicações dos séculos XVIII e XIX, que apontaram para o desinteresse masculino por atividade sexual após a retirada do baço. Estudos futuros poderão trazer mais subsídios para a compreensão da função esplênica no interesse sexual, na ovulação e na espermatogênese.

9. Conclusão

Há redução do número de gestações e tendência de diminuição da prole em casais de camundongos machos esplenectomizados com fêmeas normais. A esplenectomia associa-se ao aumento da testosterona sérica em ratos.

10- Referências

- 1- Petroianu A. O Baço. Ed CLR Balieiro, São Paulo. 2003
- 2- Petroianu A. Clínica Cirúrgica do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Atheneu. 2010; 537-54.
- 3- Simões MJ, Bacarat EC, Lima GR. In: Lima GR e Bacarat EC, editores. Ginecologia Endócrina. São Paulo: Atheneu. 1995, p. 11-24.
- 4- Greenberg SH, Lipshultz LI, Wein AJ. Experience with 425 subfertile male patients. J Urol. 1978; 119:507-10.
- 5- Karagiannis A, Harsoulis F. Gonadal dysfunction in systemic diseases. Eur J Endocrinol. 2005; 152:501-13.
- 6- Matt DW, Lee J, Sarver PL, Judd HL, Lu JK. Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. Biol Reprod .1986; 34:478-87.
- 7- Working PK. Male reproductive toxicology. Environ Health Perspect. 1988; 77:37-44.
- 8- Saito S , Matsuyama S, Shiota K, Takahashi M. Involvement of splenocytes in the control of corpus luteum function in the Rat. Endocrinol.Japon. 1988; 35, 891-98.
- 9- Oakley OR, Kim HY, El-Amouri I, Lin PP, Cho J, Bani-Ahmad M, Ko C. Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*. 2010; 151:4551–59
- 10-Hedin L. Invaders from the spleen: An unexpected origin of the leukocytes participating in ovulation. Archive. 2010; 151: 4096

- 11-Zachariae F, Asboe-Hansen G, Boseila AW. Studies on the mechanism of ovulation; migration of basophil leucocytes from blood to genital organs at ovulation in the rabbit. *Acta Endocrinol.* 1958; 28:547–52.
- 12-Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. *Biol Reprod.* 1980; 22:73–106.
- 13-Petroianu A, Alberti LR, Vasconcellos LS. Allogenic and autologous ovarian orthotopic transplantation without a vascular pedicle: Morphological, endocrinological and natural pregnancy assessment. *J Obstet Gynaecol Res.* 2007; 33:24-31.
- 14-Petroianu A, Cavalcante AMT, Pereyra WJF, Santos BMR. Tensão de ruptura dos órgãos que constituem o tubo digestório com e sem o uso de corticóide em camundongos. *Rev Col Bras Cir.* 1999; 27: 69-72.
- 15-Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, editor. *Ética, Moral e Deontologia Médicas.* 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 185-190.
- 16-Petroianu A, Rocha CG, Alberti LR, DA Costa AMC. Estudo morfológico e microscópico da gastrite cáustica em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2001; 28: 404-07.
- 17-Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, editor. *Ética, Moral e Deontologia Médicas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 185-90.
- 18-Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental

purposes. *Med Sci Monit.* 2000; 6:171-80.

- 19-Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64:69–92.
- 20-Metwally M, Li TC, Ledger WL. The impact of obesity on female reproductive function. *Obes Rev.* 2007; 8:515–52.
- 21-Rachón D, Teede H. Ovarian function and obesity: interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316:172–79.
- 22-Livshits A, Seidman DS. Fertility issues in women with diabetes. *Womens Health.* 2009; 5:701–07.
- 23-Gosman GG, Katcher HI, Legro RS. Obesity and the role of gut and adipose hormones in female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:585–601.
- 24-Petroianu A, Resende V, Silva RG. Late follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy. *Int J Surg.* 2006; 4:152–8.
- 25-Sumaraju V, Smith LG, Smith SM. Infectious complications in asplenic hosts. *Infect Dis Clin North Am.* 2001; 15:551-65.
- 26-Holdsworth RJ, Irving AD, Cuschieri A. Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks. *Br J Surg*1991; 78:1031-8.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 95/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Relação entre esplenectomia e reprodução em camundongos**", que tem como responsável(is) **Andy Petroianu**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/ 06/2011**.

Este certificado expira-se em **8/ 06/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 95/2011**, related to the project entitled "**Relationship between splenectomy and reproduction in mice**", under the supervisors of **Andy Petroianu**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 8, 2011**.

This certificate expires in **June 8, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Junho de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Prof. Andy Petroianu / orientador, Prof. Marcos Pitombo Ettini, Prof. Fernando Marcos Reis, Prof. Sávio Lana Siqueira como membros titulares, aprovou a defesa Dissertação de Mestrado de **DALTON MUNIZ SANTOS**. A Dissertação foi intitulada: "RELAÇÃO ENTRE ESPLENECTOMIA E REPRODUÇÃO EM CAMUNDONGOS."; estando o mesmo apto à obtenção do título de Mestrado em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

Prof. Andy Petroianu / orientador

Prof. Marcos Pitombo Ettini

Prof. Fernando Marcos Reis

Prof. Sávio Lana Siqueira

Prof. Reginaldo Figueiredo



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE DALTON MUNIZ SANTOS, n.º de registro 2011656936. No dia **Vinte e dois de fevereiro de Dois mil e Treze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“RELAÇÃO ENTRE ESPLENECTOMIA E REPRODUÇÃO EM CAMUNDONGOS.”**; requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Andy Petroianu, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Andy Petroianu / orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Marcos Pitombo Ettini	Instituição UFRJ	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Fernando Marcos Reis	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Sávio Lana Siqueira	Instituição: UFOP	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Reginaldo Liguiredo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente o candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

Prof. Andy Petroianu / orientador _____
 Prof. Marcos Pitombo Ettini _____
 Prof. Fernando Marcos Reis _____
 Prof. Sávio Lana Siqueira _____
 Prof. Reginaldo Liguiredo _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
 Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG