

Teste de Gravidez com recurso a anfíbios para deteção da hormona gonadotrófica coriónica humana de hCG – atividade laboratorial

Pregnancy test using amphibians for detection of human chorionic gonadotropin (hCG) – lab activity

Maria Inês Pereira – Aluna do Curso de Ciências e Tecnologias (inesmp2000@gmail.com)

Rafaela Ribeiro Monteiro – Aluna do Curso de Ciências e Tecnologias (rcrmonteiro10@gmail.com)

Agrupamento de Escolas Professor António da Natividade, Mesão Frio, Portugal

Prof. Nuno Paula Santos – Docente de Biologia (nunopsantos@msn.com)

Prof. José Manuel Carvalho – Professor Bibliotecário (zmcvalho@sapo.pt)

Prof.ª Aldina Pereira – Diretora do Agrupamento (ae.mesaofrio@aepan.pt)

Agrupamento de Escolas Professor António da Natividade, Mesão Frio, Portugal

Resumo

A literacia científica e a contextualização da ciência na história serviram de base para o presente relato de prática. Tendo por base os trabalhos desenvolvidos pelo médico argentino Carlos Galli Mainini, na determinação da hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), recorrendo à utilização de anfíbios, os alunos puderam recriar um dos primeiros testes de gravidez baseados na determinação da hCG na urina. O trabalho permitiu ainda refletir sobre as implicações éticas da utilização de modelos animais em investigação científica, bem como sobre o impacto que o contexto social, económico, político de uma determinada época pode ter sobre a evolução da ciência e o impacto desta na sociedade.

Palavras-chave: *hCG, Galli Mainini, anfíbios, teste de gravidez*

Abstract

Scientific literacy and the contextualization of science in history have served as the basis for the present practice report. Based on the work of the Argentine physician Carlos Galli Mainini, concerning the determination of human chorionic gonadotrophin hormone (hCG), using male amphibians, the students were able to recreate one of the first pregnancy tests based on the identification of hCG in human female urine. This work also allowed us to reflect on the ethical implications of the use of animal models in scientific research. Moreover, to think about the impact that social, economic and political context have on a certain epoch on science development and its consequences on society.

Keywords: *hCG, Galli Mainini, amphibians, pregnancy test*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento Pedagógico

Independentemente da área curricular, na abordagem aos diferentes conteúdos programáticos, somos frequentemente confrontados com a necessidade de realizar um enquadramento histórico. Esta situação acaba por ser recorrente no caso do ensino experimental das Ciências,

dado os alunos terem dificuldade em compreender os pontos de vista dos cientistas no passado, os seus valores, crenças e atitudes, considerando-os como pessoas menos capacitadas em termos de inteligência e moral (Fontes & Silva, 2004). Aparentemente, acaba por haver uma *banalização* do conhecimento científico, aquando da abordagem em cenário de sala de aula, sendo considerado como um dado adquirido, um produto final destinado ao *consumo dos alunos*, negligenciando o modo como o contexto histórico, político, social, económico e tecnológico influenciaram /afetaram a produção desse mesmo conhecimento científico, bem como as suas repercussões para o comum dos cidadãos.

A Literacia Científica tem sido objeto de estudo sistemático nos diferentes relatórios do Programa da OCDE (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). O relatório de 2017 do programa OCDE, citando o PISA 2015 *assessment and analytical framework: Science, reading, mathematics, financial literacy and collaborative problem solving (revised edition)* para a Avaliação Internacional dos Estudantes (PISA), criado em 1997, tendo este conceito de Literacia ou Alfabetização Científica sofrido uma evolução, culminando, na definição constante do relatório de 2015:

A alfabetização científica é a capacidade de um indivíduo se envolver com questões relacionadas com a ciência e com as ideias da ciência, como um cidadão reflexivo.

Uma pessoa cientificamente alfabetizada está predisposta a envolver-se num discurso fundamentado sobre ciência e tecnologia, que exige as competências para:

- **Explicar cientificamente os fenómenos** - reconhecer, oferecer e avaliar explicações para uma variedade de fenómenos naturais e tecnológicos.
- **Avaliar e conceber o inquérito científico** - descrever e avaliar as investigações científicas e propor maneiras de abordar questões cientificamente.
- **Interpretar dados e evidências cientificamente** - analisar e avaliar dados, reivindicações e argumentos numa variedade de representações (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017, p. 22).

A publicação do Perfil do Aluno à Saída da Escolaridade Obrigatória (Despacho n.º 6478/2017, 26 de julho), materializada na publicação do recente Decreto-Lei n.º 55/2018 a 6 de julho, aponta para

“uma educação escolar em que os alunos desta geração global constroem e sedimentam uma cultura científica e artística de base humanista. Para tal, mobilizam valores e competências que lhes permitem intervir na vida e na história dos indivíduos e das sociedades, tomar decisões livres e fundamentadas sobre questões naturais, sociais e éticas, e dispor de uma capacidade de participação cívica, ativa, consciente e responsável (Perfil dos Alunos à Saída da Escolaridade Obrigatória, 2017, p. 10).”

1.2. Enquadramento Histórico e Científico

Perante o enquadramento pedagógico anteriormente realizado e considerando o desfasamento sentido entre a cultura familiar e a cultura preconizada pela escola como um dos fatores determinantes do insucesso escolar (Pereira, 2005), procurámos valorizar a contextualização histórica numa perspetiva holística de literacia científica e de evolução na produção do conhecimento científico. O relato de prática aqui partilhado constitui um dos exemplos de atividades implementadas numa aula da disciplina de Biologia de 12.º ano, tendo por base as

sugestões metodológicas do Ministério da Educação no que concerne à abordagem Ciência-Tecnologia-Sociedade (CTS) e integração de aspetos de História da Ciência (Mendes & Dorinda, 2006).

Na abordagem da unidade 1 – *Reprodução e Manipulação da Fertilidade*, a compreensão dos mecanismos de regulação hormonal torna-se essencial, embora de forma não exaustiva, para a compreensão dos diversos fenómenos do desenvolvimento embrionário e da gestação. Neste contexto, optámos por reproduzir os trabalhos práticos desenvolvidos por Galli Mainini, que culminaram nos primeiros testes de gravidez usados no século XX (Mainini, 1947), antes do desenvolvimento dos testes de gravidez baseados em reações imunológicas, desenvolvidos a partir da década de 1960.

Carlos Galli Mainini, médico endocrinologista Argentino, publica pela primeira vez, em março de 1947, os resultados obtidos, com recurso à utilização de anfíbios (sapos machos), identificando precocemente a gravidez, com base na análise de urina, obtendo resultados mais fiáveis e rápidos, comparativamente aos trabalhos de Friedman, onde era injetado, numa coelha, urina de uma mulher que se suspeitava estar grávida (Spielman, 1934). Comparativamente, no que respeita à experimentação animal, o procedimento de Friedman implicava o sacrifício e dissecação do animal para obtenção dos resultados, enquanto que no procedimento de Galli Mainini os anfíbios não eram sacrificados, podendo até, após duas semanas de repouso, voltarem a servir para novos ensaios clínicos. Tratava-se de um método mais rápido e fiável, que se baseava em respostas fisiológicas à gonadotrofina coriónica humana (hCG), como acontecia com a reação de Ascheim-Zondek e a reação de Friedman (Colaço, Pinheiro, & Monteiro, 1993).

Desde o seu aparecimento, em meados dos anos 70 do século XX, os testes de gravidez, que inicialmente necessitavam de duas horas para a obtenção de resultados, foram evoluindo, para os testes imunocromáticos que detetavam a hCG na urina da gestante (anos 80, séc. XX), culminando nos anos 90, com o desenvolvimento da geração dos "dipstick", destinados a mergulhar na amostra de urina, garantindo os fabricantes destes testes, uma eficácia entre 97 e 99% (Moraes, Cristovam, & Savaris, 2011). A hCG é uma glicoproteína sintetizada pelas células trofoblásticas e dez dias após a fecundação já está presente no plasma, exercendo uma ação idêntica à hormona lúteo-estimulina (LH) exercendo o seu efeito no corpo lúteo (corpo amarelo), permitindo a manutenção da secreção de estrogénios e progesterona durante o primeiro trimestre de gestação (Figura 1). A melhor altura para recolher a urina contendo hCG, é entre a 9.^a e 12.^a semana. A deteção desta hormona na urina da mulher confirma a nidação do embrião e, conseqüentemente, a gravidez (Colaço *et al.*, 1993; Seeley, Stephens & Tate, 1999).

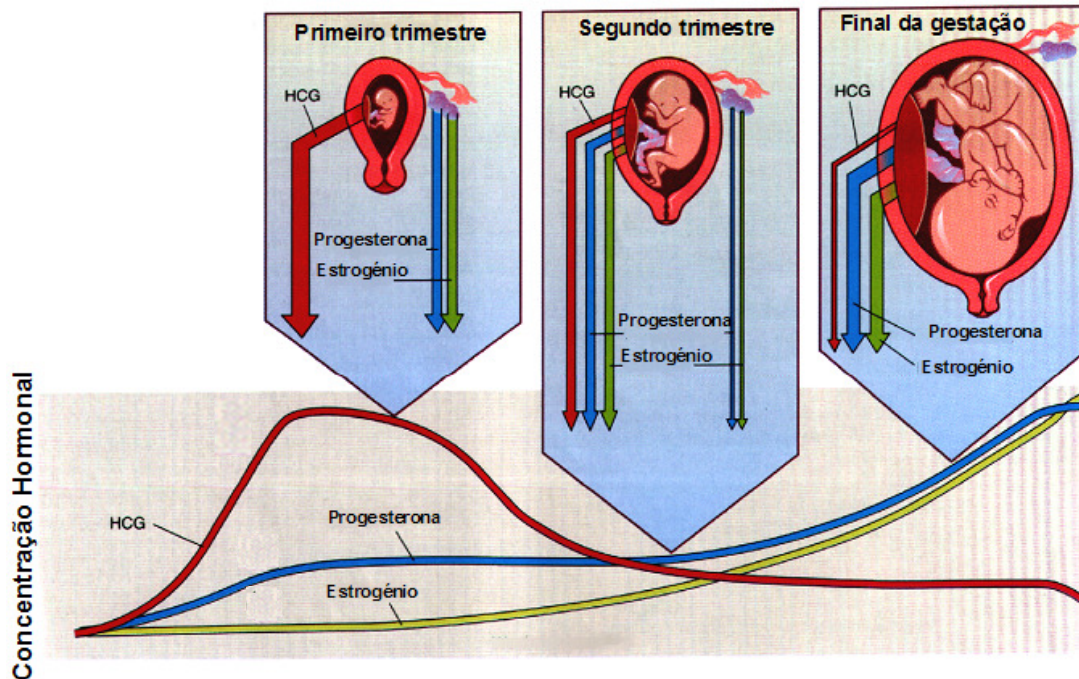


Figura 1 – Variação das concentrações das hormonas hCG, Progesterona e Estrogénio durante a gravidez (Adaptado de Seeley, Stephens & Tate, 1999 p. 544).

2. METODOLOGIA ADOTADA

O trabalho de pesquisa orientada desenvolvido pelos alunos envolveu a pesquisa e leitura de artigos sobre os trabalhos de Galli Mainini, tendo sido realizada com recurso ao motor de busca especializado na área da Medicina e Biomedicina - PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), de forma a garantir um enquadramento pedagógico e científico ao trabalho prático proposto. A título de exemplo de trabalhos consultados, referenciamos os trabalhos de Spielman, F. (1934), Mainini, C. G. (1947, 1948), Wildberger, P.B. & Miller D. F. (1948).

Posteriormente, o procedimento experimental, que oportunamente descrevemos, foi adaptado do Guia Teórico Prático de Fisiologia Animal utilizado nas aulas práticas na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - UTAD (Colaço *et al.*, 1993).

3. OBJETIVOS

Os principais objetivos foram:

- Compreender os fundamentos do teste de Galli Mainini;
- Analisar os resultados obtidos na atividade prática;
- Identificar a amostra de urina pertencente a uma mulher gestante;
- Compreender a importância do teste de Galli Mainini numa perspetiva Ciência, Tecnologia e Sociedade.

4. ATIVIDADE EXPERIMENTAL

4.1 - Material

Para a realização do teste biológico de Galli Mainini, foram utilizados os seguintes materiais/reagentes/animais:

- 2 Rãs machos (adquiridos numa loja de animais)
- 5 Lâminas e 5 lamelas
- 5 Tubos de microhematócrito
- 2 Microscópios Óticos Compostos
- 5 Seringas de 5 ml e agulhas
- 2 Gobelés de 500 ml
- 1 Amostra de urina de mulher não gestante
- 1 Amostra de urina de mulher gestante (preferencialmente entre as 9 e as 12 semanas)

Observação: As quantidades são meramente exemplificativas no que diz respeito ao material de laboratório, pois com o decorrer da experiência pode ser necessário usar mais lâminas e lamelas, por exemplo.

4.2 - Procedimento experimental

O procedimento seguiu as seguintes etapas:

1. Selecionar dois machos. Os machos são reconhecidos pela sua menor corpulência e pela presença de um calo na face ventral do “dedo polegar” dos membros anteriores (Figura 2).



Figura 2 – Distinção entre os sexos nas rãs: A – Rã fêmea; B – Rã macho (Adaptado de Colaço *et al.*, 1993)

2. Recolher a urina de cada um dos machos, fletindo os membros posteriores contra o abdômen a fim de forçar a urina a abandonar a bexiga e deslocar-se para a cloaca. A urina deve ser recolhida da cloaca com um tubo de microhematócrito, introduzindo-o suavemente através do orifício cloacal (Figura 3).

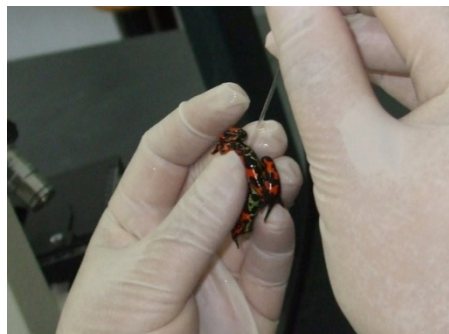


Figura 3 – Recolha prévia de urina com o objetivo de certificar a inexistência de espermatozoides no animal em estudo.

3. Depositar uma gota de urina recolhida sobre uma lâmina e cobrir com lamela.

4. Observar ao microscópio com a objetiva de 10x e de 40x com o intuito de averiguar a presença ou ausência de espermatozoides. Estes apresentam uma cabeça esverdeada e um flagelo fino. Se for detetada a presença de espermatozoides na cloaca, significa que o macho está excitado pelo que deve ser rejeitado. Apenas são usados os machos onde não foi detetada a presença dos espermatozoides.

5. Identificar dois gobelés com as letras A e B. Injetar cerca de 3 ml da amostra de urina A num dos machos e posteriormente depositar no gobelé A. Proceder de forma análoga, injetando a amostra de urina B num outro macho e depositá-lo no gobelé B.

A injeção de urina deve ser realizada da seguinte maneira:

- Segurar firmemente a rã.

- Introduzir a agulha subcutaneamente na face dorsal da coxa de forma que o líquido seja depositado junto dos sacos linfáticos dorsais (Figura 4).



Figura 4 – A – Local de administração da urina (junto aos sacos linfáticos dorsais) (adaptado de Colaço *et al.*, 1993); B – procedimento; C – urina analisada.

Observar o estado de saúde do animal após a injeção (Figura 5).



Figura 5 – Observação dos dois animais após a administração das amostras de urina; início do período de repouso.

- Uma vez injetados, os machos devem ser deixados em repouso durante cerca de 30 – a 40 minutos. Findo esse tempo, deve retirar e observar amostras de urina ao microscópio, com intervalos regulares de 15 minutos, repetindo o procedimento descrito anteriormente.

5. RESULTADOS

A recriação dos trabalhos de Galli Mainini envolvendo anfíbios permitiu observar que da injeção das amostras de urina em estudo (amostras A e B) obtiveram-se resultados distintos nas rãs às quais foram administradas, respetivamente, as amostras de urina humana identificadas por A e B. No animal onde foi administrada a amostra A, observou-se a libertação de espermatozoides (Figura 6), não tendo sido verificado o mesmo no animal ao qual administrámos a amostra de urina B; desta forma, foi possível inferir a existência da hCG na urina e concluir sobre a identificação da mulher gestante.

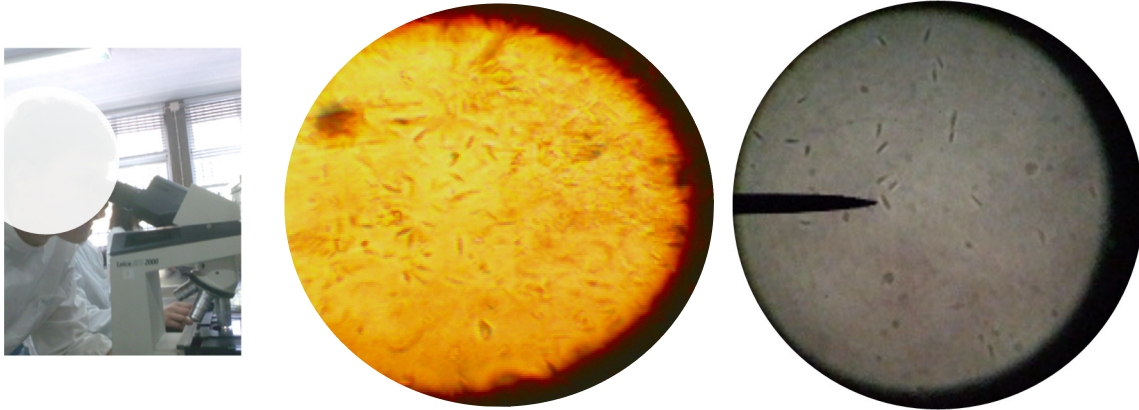


Figura 6 – Resultados obtidos no animal ao qual foi administrada urina de gestante (campos de visão distintos - ampliação total de 400x).

Após análise dos resultados obtidos, os alunos foram confrontados com as seguintes questões:

1. Explicar por que razão são rejeitadas as rãs que antes de injeção de urina humana apresentavam espermatozoides na sua urina.
2. Identificar qual das amostras de urina (A) ou (B) corresponde à da mulher gestante? Fundamenta a tua opinião.
3. Fundamentar a seguinte afirmação: “O teste de Galli Mainini é um teste biológico”.
4. Discutir sobre as implicações éticas da utilização de modelos animais em Ciência.
5. Refletir sobre as implicações do contexto histórico na produção científica.

Relativamente às questões e reflexões propostas, podemos destacar, a título de exemplo, algumas observações:

1. “(...) as rãs estavam assustadas ou estimuladas com a manipulação e os resultados eram falsos.”; (...) não tínhamos certeza se a urina a injetar era de uma grávida, pois a rã já tinha espermatozoides.”; (...) se não rejeitássemos essas rãs macho, teríamos falsos positivos no teste de gravidez.”
2. “A mulher grávida foi a que deu a amostra A, pois foi a única amostra de urina que levou à libertação dos espermatozoides na rã macho.”; “(...) a urina da amostra B não causou libertação de espermatozoides.”
3. “(...) é um teste biológico pois envolve animais.”; “(...) trata-se de um teste que depende de uma reação de um ser vivo ao estímulo.”; “(...) a hormona hCG provocou uma resposta fisiológica no ser vivo.”
4. “(...) o uso de animais permitiu avanços no conhecimento.”; “(...) que alternativas podem ser usadas à experimentação animal.”; “(...) o médico Carlos Gailli Mainini preocupou-se com o bem-estar animal, pois o método que desenvolveu não implicava o sacrifício dos animais.”. “(...) o progresso tem que ser feito à custa dos animais?”.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente trabalho prático permitiu não só a reprodução das condições e respetivas limitações aos testes em anfíbios proposto por Carlos Galli Minini, como permitiu gerar a discussão sobre o impacto social desta técnica *inovadora* (à época), facilitando a deteção precoce da gravidez e com um maior grau de fiabilidade.

A testagem prévia às urinas das rãs macho, antes da administração das amostras de urina A e B das supostas gestantes humanas, garantiu a fiabilidade do teste, pois poderiam existir outros fatores que condicionassem a libertação de espermatozoides, inviabilizando os resultados obtidos.

Da análise às duas amostras de urina obtiveram-se resultados distintos; – na amostra de urina A houve uma resposta biológica por parte da rã à presença da hCG, com conseqüente libertação de espermatozoides, enquanto que na amostra de urina B não houve qualquer tipo de reação. Assim sendo, foi possível identificar a amostra A como pertencente à Mulher gestante.

Como nota final, destaca-se a importância da valorização da contextualização histórica do conhecimento e tecnologia disponível na produção de conhecimento científico, demonstrando claramente que as capacidades de observação e de questionamento que terão levado os investigadores da época ao desenvolvimento dos modelos experimentais abordados, permitindo aos alunos conhecer as dificuldades inerentes à produção de conhecimento científico, numa sociedade distinta da atual, reforçando a valorização do conhecimento atualmente abordado nas aulas. De salientar que foram igualmente discutidos aspetos inerentes à experimentação animal e suas implicações éticas que, naturalmente, não podem ser ignoradas, tendo sido realizada uma súmula dos chamados princípios dos 3R's (Replacement, Reduction and Refinement) - Substituição, Redução e Refinamento (Russel & Burch 1992), reforçado pelo facto de muitas espécies se encontrarem atualmente protegidas.

Agradecimentos

Agradecimento aos alunos da turma do 12.ºA do Curso de Ciências e Tecnologias do AEPAN, que tornaram possível a realização deste artigo:

António Monteiro, Bárbara Fernandes, Bruna Benedito, Bruna Fonseca, Diana Trindade, Diana Pinto, Diogo Soares, Ivo Monteiro, Jorge Nunes, Lúcia Carreira, Maria Inês Pereira, Marta Coutinho, Paulo Morais, Rafaela Monteiro, Rita Monteiro, Rúben Teixeira, Rute Pinto, Fernando Marques e José Rafael Pinto.

Os autores agradecem as sugestões da Docente de Inglês, Dália Portela, para a elaboração do *abstract*.

Referências

- Colaço, A., Pinheiro, V. & Monteiro, D. (1993). *Guia Teórico-Prático de Fisiologia Animal*. Vila Real: UTAD.
- Fontes, A., & Silva, I. (2004). *Uma nova forma de aprender Ciências - A Educação em Ciência/Tecnologia/Sociedade (CTS)*. Porto: ASA Editores.
- Mainini, C. G. (1947). Pregnancy teste using the male toad. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 7(9), 653–658.
- Mainini, C. G. (1948). Pregnancy test with male batrachia, *Endocrinology*, Volume 43, Issue 5, 349–350. <https://doi.org/10.1210/endo-43-5-349>
- Mendes, A. & Dorinda, R. (2006). *Programa de Biologia 12.º Ano*. Lisboa: Direção-Geral de Inovação e de



Desenvolvimento Curricular - Ministério da Educação.

Moraes, G., Cristovam, R. & Savaris, R. (2011). Análise comparativa da acurácia in vitro de testes de detecção de hCG urinário. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 57(5), 516–522. <http://doi.org/10.1590/S0104-42302011000500008>

Organisation for Economic Co-operation and Development (2017). *PISA 2015 assessment and analytical framework: Science, reading, mathematics, financial literacy and collaborative problem solving (revised edition)*. <http://doi.org/10.1787/9789264281820-en>

Pereira, A. de F. M. (2005). *Insucesso e abandono escolar no concelho de Mesão-Frio*. Universidade Portucalense - Infante D. Henrique, Porto.

Russel, W. M. S. & Burch, R. L. (1992). *The principles of Human Experimental Technique*. http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P. (1999). *Essentials of Anatomy and Physiology* (3rd ed.). New York: WCB-McGraw-Hill.

Spielman, F. (1934). The Friedman pregnancy test. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 27(3), 448–450. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(34\)90643-8](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(34)90643-8)

Wildberger, P. B. & Miller, D. F. (1948). The Male Frog, *Rana pipiens*, as a New Test Animal for Early Pregnancy. *Science* Vol. 107, Issue 2773, pp. 198. <http://science.sciencemag.org/content/107/2773/198.1>

Legislação citada:

Despacho n.º 6478/2017, 26 de julho – Perfil do Aluno à Saída da Escolaridade Obrigatória

Decreto-Lei n.º 55/2018, 6 de julho – estabelece o currículo dos ensinos básico e secundário, os princípios orientadores da sua conceção, operacionalização e avaliação das aprendizagens, de modo a garantir que todos os alunos adquiram os conhecimentos e desenvolvam as capacidades e atitudes que contribuem para alcançar as competências previstas no Perfil dos Alunos à Saída da Escolaridade Obrigatória.

Consulte online o protocolo/guião de atividade disponível em:

<https://drive.google.com/file/d/1JQxfNS-RJGbxEFsbpkvoxWOC3yhT6Myj/view?usp=sharing>