

## PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CAMUNDONGOS MACHOS DAS LINHAGENS SWISS E C57BL/6 EM FASES PERIPUBERAL E PÓS-PUBERAL.

Déborah Dias Costa<sup>1\*</sup>, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>1</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>1,2</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>1,2</sup>

1 Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36016-000; \*E-mail:

2 Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG 36038-330

biologia\_deborah@yahoo.com.br

**Palavras-Chave:** Endogamia, Espermatogênese, Espermíogênese, Túbulos seminíferos

### INTRODUÇÃO

A utilização de camundongos como modelo animal para pesquisa teve início no século XIX, e desde então estes animais tornaram-se importantes instrumentos para investigações científicas. Hoje a utilização de animais de laboratório é considerada indispensável na evolução das ciências médicas e biológicas (CARVALHO & LOPES, 2006). A população dos biotérios é composta por colônias estabelecidas com a finalidade de se auto-perpetuar e gerar animais para experimentação. Essas colônias são geralmente compostas por animais resultantes de cruzamentos consanguíneos e, por conseqüência, altamente endogâmicos. O estabelecimento de tais colônias tem como vantagens a homozigocidade genética ou isogenicidade, o que leva a uniformidade em relação às características herdáveis. Apesar dessas vantagens, cruzamentos endogâmicos podem ter efeitos indesejáveis, como o aparecimento de mais pares de genes em homozigose e a manifestação de genes recessivos (ALCALÁ et al., 1995). Diversos estudos relatam que a endogamia pode afetar características reprodutivas, como a maturidade sexual, prolificidade, tamanho testicular e reserva folicular ovariana (FALÇÃO *et al.* 2001; FALCONER e MACKEY, 1996; e WEIGEL e LIN, 2000). O presente trabalho analisou características reprodutivas de camundongos machos de linhagens endogâmicas nas fases peri 44 à 49 dias e pós-puberal 110 à 120 dias, foram mensurados os túbulos seminíferos, além da análise de morfologia e peso testicular, motilidade e vigor espermático, o que tornou possível a comparação dos resultados e estabelecimento de parâmetros relevantes para a utilização das linhagens *C57BL/6* e *Swiss* nas pesquisas científicas relacionadas.

SP 3720

P.132

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados camundongos machos (N=34), das linhagens C57BL/6 e *Swiss*. Todos os machos foram submetidos ao mesmo manejo de luz, alimentação e alojamento. Cada animal foi identificado, por ocasião da sexagem das ninhadas, pela marcação com ácido pícrico e separados por ocasião do desmame em gaiolas individuais. Foram sacrificados, 21 animais da linhagem *Swiss* entre 44-49 dias de idade (período peripuberal) e entre 110-120 dias (período pós-puberal) e 13 da linhagem C57BL/6 nas mesmas faixas etárias. Os animais foram pesados e o sistema genital foi separado para avaliação.

Estabeleceu-se nesta ocasião o peso testicular e amostras de sêmen foram obtidas da cauda do epidídimo, que foi macerada (YAMAMOTO et al., 1998 & TAYAMA et al., 2005), em 200mL de solução fisiológica DPBS - Nutricell acondicionada em placa de Nunc e aquecida a 37°C em incubadora modelo A-LT. A solução obtida foi avaliada ao microscópio óptico para determinação dos parâmetros espermáticos. A motilidade foi avaliada em microscópio com objetiva de 40x (aumento final de 400x), utilizando-se lâmina coberta por lamínula previamente aquecidas e mantidas à 37°C em incubadora. O vigor foi classificado em escala de 0-5 onde zero caracteriza ausência de movimento progressivo e cinco caracteriza movimento veloz e vigoroso das células espermáticas (MIES FILHO & MEGALE, 1997). Os testículos dissecados foram pesados e fixados em 2 mL de formol a 10% em tubos diferentes para testículo direito e esquerdo. Foram feitas lâminas histológicas com o material fixado e as mesmas coradas com hematoxilina e eosina (HE), no Laboratório Exac, em Juiz de Fora, MG. Imagens representativas de animais das duas linhagens, nos períodos peri e pós-puberal, foram capturadas e arquivadas em formato digital (.TIF). O número de túbulos seminíferos por mm<sup>2</sup> foi avaliado em microscópio em aumento de 100X, com auxílio do software livre Image J, utilizando-se o aumento de 400X, foi estabelecida a área média dos túbulos, e contado o número de células de linhagem germinativa por túbulo.

Os parâmetros peso corporal, peso das gônadas, área de túbulos seminíferos e número de células por túbulo foram avaliados por análise de variância e diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey. A motilidade espermática foi avaliada pelo teste do qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espermatogênese é dividida nas fases impúbere, peripúbere, púbere e pós-púbere ou de maturidade sexual (ASSIS NETO et al., 2003). Em camundongos o período puberal inicia-se em

torno de 45 dias, fase em que as características globais e gerais do epitélio seminífero estão estabelecidas. (MARTINS et al. 1989).

Os resultados da avaliação de desenvolvimento somático e genital e das características espermáticas de camundongos das linhagens Swiss e C57BL6, nos períodos peripuberal e pós-puberal, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1:** Desenvolvimento somático, testicular e características espermáticas de camundongos da linhagem Swiss nos períodos peripuberal (44-49 dias) e pós-puberal (110-120 dias)

Característica (média ± E.P.M.)	Período	
	Peripuberal	Pós-puberal
Peso do animal (g)	38,01±1,24 <sup>a</sup>	43,43±1,75 <sup>b</sup>
CV	9,80%	13,93%
Testículo direito (g)	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>
CV	11,86%	16,82%
Testículo esquerdo (g)	0,13±0,00 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>
CV	7,81%	17,63%
Motilidade espermática (%)	16,11±6,86 <sup>a</sup>	41,50±8,42 <sup>a</sup>
CV	127,75%	70,26%
Animais apresentando motilidade espermática	44,44% <sup>a</sup>	100,00% <sup>b</sup>
Vigor espermático	1,28±0,53 <sup>a</sup>	2,40±0,30 <sup>a</sup>
CV	125,45%	43,70%

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05)

Nas duas linhagens, houve um aumento (P<0,05) no peso corporal. Na linhagem Swiss, contudo, não houve um aumento correspondente no peso das gônadas, sugerindo que no período avaliado (40 a 50 dias) o desenvolvimento morfológico das gônadas já estava completo. Esta observação sugere o estabelecimento precoce da puberdade, contrariando estudos anteriores (FRANCO, 2006).

Apesar da diferença numérica nos parâmetros espermáticos, sugestiva de uma maturação funcional do órgão no período, também não se observou diferença (P>0,05) para motilidade e vigor. Contudo, observa-se que estes parâmetros apresentam um alto coeficiente de variação, superior a 100% no período peri-puberal. Esta observação pode ser devida ao fato de que, no período avaliado (44 a 49 dias), alguns animais poderiam estar em estádios mais adiantados da puberdade que outros, uma vez que o CV diminuiu no período pós-puberal.

Na linhagem C57BL6 avaliada, a relação entre desenvolvimento somático, gonadal e da motilidade espermática foi mais clara, com aumento de todos os parâmetros entre os períodos peri

e pós-puberal. Apenas o vigor apresentou um aumento numérico, não significativo. Da mesma forma, os coeficientes de variação para os parâmetros espermáticos foram inferiores aos observados na linhagem Swiss, ainda que elevados. Na linhagem C57BL6, os períodos escolhidos caracterizaram melhor a progressão da puberdade. De fato, a maturidade sexual seria por volta dos 60 dias em *Mus musculus* (SANTOS, 2002).

**Tabela 2:** Desenvolvimento somático, testicular e características espermáticas de camundongos da linhagem C57BL/6 nos períodos peripuberal (44-49 dias) e pós-puberal (110-120 dias)

Característica (média±E.P.M.)	Período	
	Peripuberal	Pós-puberal
Peso (g)	20,66±1,37 <sup>a</sup>	27,83±1,02 <sup>b</sup>
CV	16,19%	9,73%
Testículo direito (g)	0,09±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,00 <sup>b</sup>
CV	15,05%	7,35%
Testículo esquerdo (g)	0,08±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,00 <sup>b</sup>
CV	17,68%	8,16%
Motilidade espermática (%)	12,50±4,23 <sup>a</sup>	25,71±8,20 <sup>b</sup>
CV	82,95%	84,33%
Vigor espermático	1,75±0,44 <sup>a</sup>	2,29±0,42 <sup>a</sup>
CV	61,94%	48,68%

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05)

As características microscópicas dos testículos de camundongos das linhagens Swiss e C57BL6 estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Foram avaliados o número de túbulos seminíferos por área (mm<sup>2</sup>), a área da seção transversal dos túbulos (mm<sup>2</sup>) e o número de células germinativas por seção transversal, para cada um dos períodos avaliados

Apesar do menor coeficiente de variação dos parâmetros morfológicos, quando comparados aos espermáticos, observou-se aumentos apenas numéricos (P>0,05) nos valores obtidos entre os períodos peri e pós-puberal para ambas as linhagens. O aumento na espermatogênese pode estar mais relacionado ao aumento testicular, conforme observado na linhagem C57BL6, do que ao aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos. De fato, nesta linhagem observou-se até uma discreta redução na área média dos túbulos no período pós-puberal. A possibilidade de retração tecidual após o processamento histológico, contudo, limita as conclusões possíveis.

Já o número de células germinativas por seção transversal dos túbulos seminíferos, indicador da progressão da espermatogênese e espermiogênese, apresentou uma tendência mais consistente de progressão nas duas linhagens, mesmo não se observando diferença significativa. De fato, a passagem do animal para fase de maturidade sexual é caracterizada pelo aumento das células de

linhagem germinativa, ciclo do epitélio seminífero e onda espermática (MARTINS & SILVA, 2005).

**Tabela 3** - Características microscópicas dos testículos de camundongos da linhagem Swiss nos períodos peri e pós-puberal.

Característica (média±E.P.M.)	Período	
	Peripuberal	Pós-puberal
Número de túbulos seminíferos/mm <sup>2</sup>	29	29
Área dos túbulos seminíferos (mm <sup>2</sup> )	0,0254±0,0058 <sup>a</sup>	0,0304±0,0118 <sup>a</sup>
CV	16,73%	41,93%
Número de células / seção transversal dos túbulos	300,8±107,3 <sup>a</sup>	344,8±192,8 <sup>a</sup>
CV	14,85%	33,40%

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05)

**Tabela 4** - Características microscópicas dos testículos de camundongos da linhagem C57BL6 nos períodos peri e pós-puberal

Característica (média±E.P.M.)	Período	
	Peripuberal	Pós-puberal
Número de túbulos seminíferos/mm <sup>2</sup>	31	32
Área dos túbulos seminíferos (mm <sup>2</sup> )	0,0250±0,0042 <sup>a</sup>	0,0226±0,0095 <sup>a</sup>
CV	27,72%	38,75%
Número de células / seção transversal dos túbulos	223,2±33,2 <sup>a</sup>	254,4±85,0 <sup>a</sup>
CV	35,66%	55,91%

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem (P<0,05).

Os dados observados permitiram verificar na linhagem C57BL6 uma progressão dos parâmetros reprodutivos na transição do período de 60 a 120 dias de idade, associada ao desenvolvimento somático. Observa-se uma grande variância nas características reprodutivas associadas ao estabelecimento da puberdade em camundongos, mesmo em linhagens endogâmicas, o que sugere a importância dos efeitos de ambiente sobre o estabelecimento destas características e dificulta o estabelecimento de valores médios para estes parâmetros.

#### AGRADECIMENTOS:

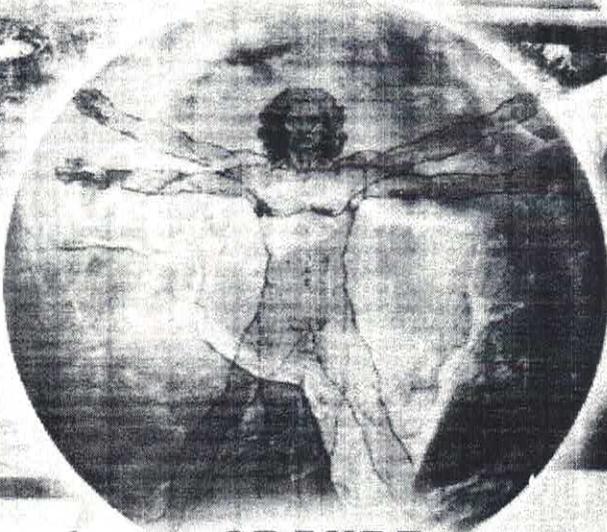
Ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES; Embrapa Gado de Leite; CNPq pela bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALÁ, A.M., FRANGANILLO, A.R., CÓRDOBA, M.V. 1995. Analisis genetico de los niveles de consanguinidad en la raza Retinta. *Arch. Zootec.*, 44(166-167):257-265.
- ASSIS NETO, A.C; MELO, M.I.V; CARVALHO, M.C.M; MIGLINO, M.A OLIVEIRA, M.F; MENEZES D.J.A; PAPA P.C; KFOURY JÚNIOR, J.R. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, supl 40, p.180-184. 2003.
- CARVALHO, T. H. F e LOPES, O.U. O emprego de camundongos geneticamente modificados como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. In. X Simposio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. Unifesp .Ribeirao Preto, 2006,v.39, p.110-116.
- FALCAO, A. J. S.; MARTINS FILHO, R. MAGNA BOSCO, C. Effects of inbreeding on reproductive and growth traits, and breeding values in closed Brown Swiss herd. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n.1, p.83-92, 2001.
- FALCONER D.S., MACKAY, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4.ed. New York: Longman Group Limited. 464p.
- FRANCO, M.G. *Animais de Laboratório*. Cobeia, São Paulo. Disponível em: [www.cobeia.org/animais.htm](http://www.cobeia.org/animais.htm): Acesso em:31 mai.2006.
- MARTINS, M.R.F.B; ORSI, A.M; VICENTINI, C.A. Evolução morfológica do testículo no hamster em diferentes idades. *Revista Ciência e Cultura*, n.41, v.12, 1203-1207, 1989.
- MARTINS, M.R.F.B & SILVA, P.J.R.C. Ultrastructural aspects of spermatids in isogenic black mouse C57BL/6. *Jornal of Morphology, Botucatu*, v.4, n23, p.323-328, 2005.
- MIES FILHO, A; MEGALE, F. *Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. Revista do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1997. Porto Alegre, n.02, p.12. 1997.
- SANTOS, B. F. Criação e Manejo de Camundongos. In: *Animais de Laboratório – Criação e Experimentação*, Rio de Janeiro, 2002 p.65-70 e 115-118, v.1.
- TAYAMA, K; FUJITA, H; TAKAHASHI.H; NAGASAWA, A; YANO, N; YAZAWA, K; OGATA, A. Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: A simple and inexpensive method. *Reproduction Toxicology*. Tokio. novembro. 2005 (in press).
- WEIGEL, K.A., LIN, W. 2000. Use of computerized mate selection programs to control inbreeding of Holstein and Jersey cattle in the next generation.
- YAMAMOTO, Y; ISOYAMA, E; SOFIKITIS, N; MIYAGAWA, I. Effects of smoking on testicular and fertilizing potential in rats. *Urology Research, Tottori*, v.26, p.45-48, 1998.

# XXX SEMANA DE BIOLOGIA

O MUNDO SE TORNOU PEQUENO PARA VOCE



MAS VOCÊ NÃO É GRANDE PARA O MUNDO

- ✓ XIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA
- ✓ V FEIRA MUNICIPAL DE CIÊNCIAS
- ✓ II MOSTRA DE PALEOBIODIVERSIDADE
- ✓ MINI-CURSOS

> CICLO DE PALESTRAS:

- BIOCÍCLICO
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CORREDORES ECOLÓGICOS
- AQUECIMENTO GLOBAL
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO
- PROTOCOLO DE KYOTO

INSCRIÇÕES: a partir de 01 de outubro  
no DA de Biologia ICB - UFJF

INFORMAÇÕES: [semanabio2007@gmail.com](mailto:semanabio2007@gmail.com)  
Tel.: 88297442 / 88148888 / 88364608 / 99462812

APÓIC



ICB

SIO

Ministério de Ciência e Tecnologia

REALIZAÇÃO

cbio

71