



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Técnicas de coleta seminal em *Mus musculus* – linhagem *Swiss Albina*

Carine Dahl Corcini^{1,2}; Antonio Sergio Varela Junior³; Ligia Maria Piassi Ricardi², Andrea Panzardi²; João Carlos Deschamps²; Thomaz Lucia Jr. ²

¹*Centro de Biotecnologia- UFPel*

²*Faculdade de Veterinária – UFPel*

³*Instituto de Ciências Biológicas – FURG*

⁴*Graduanda em Ciências Biológicas– URI*

Resumo

O crescente progresso genético obtido a partir da transgênese trouxe a necessidade da implementação de biotécnicas reprodutivas como a produção in vitro de embriões e a criopreservação de gametas. Considerando a diversidade de novos modelos e linhagens, tornou-se importante a otimização dos recursos de técnicas experimentais de conservação de sêmen animal. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de duas técnicas de coleta sobre indicadores de qualidade de sêmen: volume do ejaculado, motilidade, vigor e concentração de células espermáticas de camundongos SWISS-ALBINO (heterogenético). A técnica 1 (T1) utilizou o rompimento das estruturas anatômicas, a partir de 5 a 7 cortes, com auxílio de agulha hipodérmica e a técnica 2 (T2) foi realizada por pressão da cauda do epidídimo, em direção ao ducto deferente, com auxílio de duas pinças anatômicas, a fim de se obter a suspensão. Foi observado que a motilidade e concentração espermática no T1 (74,0% e $178,4 \times 10^6$) foi superior ($P < 0,01$) ao T2 (63,5% e $105,4 \times 10^6$) respectivamente. A variável vigor apresentou diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos. A técnica de coleta

seminal através de cortes é mais vantajosa do que a técnica de coleta a partir de pressão das estruturas, pois resultou em menos efeitos negativos sobre indicadores de qualidade de sêmen e com número de espermatozoides coletados mais elevado.

Seminal collects technique in *Mus musculus* – Swiss Albina

Abstract

The genetic progress obtained with transgenesis required the development and consolidation of reproductive techniques such as in vitro embryo production and gamete cryopreservation. With the diversity of new models and genetic lines, it became critical to optimize the use of experimental techniques of cryopreservation of semen in different animal species. This report had as goal to evaluate the efficacy of two different collect techniques about semen quality index: ejaculated volume, motility, vigor and spermatic cells concentration of SWISS-ALBINO mouse (heterogenetic). The technique 1 (T1) used the anatomical structures rupturement, from 5 to 7 cuts, helped by na hipodermic needle and the technique 2 (T2) was done by the epididymis tail pression, directed to the ductus deferens, helped by two anatomical tweezers, in order to get the suspension. It was realized that the motility and the spermatic concentration in T1 (74,0% and $178,4 \times 10^6$) was superior ($P < 0,01$) to T2 (63,5% e $105,4 \times 10^6$) in this way. The vigor variable showed difference ($P < 0,05$) among the treatments. The semen collect technique through cuts is more advantageous then the structures pression technique, because the results brought less negative effects by the semen quality index and with a raised collected spermatozoa number.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de animais nos trabalhos experimentais de pesquisa científica tem sido de extrema importância, não só pelo conhecimento cada vez maior

dos mecanismos vitais, como também no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na medicina humana como na medicina veterinária. Animais de várias espécies têm sido utilizados ao longo deste último século de desenvolvimento científico, mas dentre todos eles o camundongo é o mais intensamente utilizado e o mais profundamente conhecido cientificamente.

Em função do amplo conhecimento genético e biológico sobre a espécie [4], por sua alta taxa de fertilidade e por seu ciclo de vida curto, o camundongo (*Mus musculus*) é a espécie animal mais utilizada como modelo na pesquisa biomédica, especialmente em reprodução [10]. Entre as áreas onde esta espécie é usada com frequência, podem ser citadas: criopreservação de gametas [1;5;6] fertilização *in vitro* [7], cultivo de embriões [7], e transgenia [2]. A criopreservação possibilita a formação de bancos genéticos, a partir do armazenamento de gametas. Entretanto, a coleta de sêmen pode ser executada de diferentes maneiras, possivelmente com diferentes níveis de eficiência. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de duas técnicas de coleta sobre indicadores de qualidade de sêmen: volume do ejaculado, motilidade, vigor e concentração de células espermáticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 camundongos sexualmente maduros, da linhagem Swiss, com 7 a 8 semanas de vida. Os machos doadores foram sacrificados por deslocamento cervical [2]. A abordagem dos testículos foi feita por laparotomia. A cauda do epidídimo e parte do ducto deferente foram removidos e colocados em placa de petri (35 mm), contendo 500 µl de Dulbeco's phosphate buffered saline (DPBS) [8], previamente aquecido e mantido a 37°C. A coleta do sêmen foi feita a partir de duas técnicas diferentes. A técnica 1 (T1) utilizou o rompimento das estruturas anatômicas, a partir de 5 a 7 cortes, com auxílio de agulha hipodérmica (30 G) e pinça, para obtenção de uma suspensão de espermatozoides [7;10]. A técnica 2 (T2)

foi realizada por pressão da cauda do epidídimo, em direção ao ducto deferente, com auxílio de duas pinças anatômicas, a fim de se obter a suspensão [2;11]. Para evitar o efeito individual de cada animal, cada técnica foi realizada no epidídimo contralateral do mesmo animal.

As suspensões de espermatozóides permaneceram em placa aquecida, até serem realizadas as avaliações de volume (VOL), motilidade (MOT), e vigor (VIG), concentração espermática (CE) [8] e número de espermatozóides por coleta (NEC). Para o cálculo do VOL foi estimada a diferença entre o volume inicial e o final da suspensão presente na placa de Petri. Para avaliação da CE foi utilizada a câmara de *Neubauer*, sendo a suspensão de espermatozóides diluída em formol salina (1:200). O NEC foi obtido a partir da multiplicação do número de espermatozóides pelo VOL. As avaliações de MOT e VIG foram feitas de modo subjetivo através de microscopia óptica (aumento de 200 x, com contraste de fases), utilizando aproximadamente 10 µl em lâmina sob lamínula, ambas pré-aquecidas a 37 °C. Para avaliação da MOT, estimou-se o percentual de células móveis no campo do microscópio, enquanto que o VIG foi estimado em uma escala de 1 a 5, considerando o movimento progressivo das células. A associação entre o VIG e os tratamentos foi avaliada pelo teste de qui-quadrado. Para as demais variáveis foi realizada análise de variância, com comparação entre médias pelo teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistix® [9].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias observadas para os diferentes indicadores de qualidade de sêmen foram: CE = 141,9 milhões de espermatozóides/ml; MOT = 68,7%; VOL = 4,9 µL; e NEC = 706,1 mil. Devido ao VOL entre os tratamentos não terem diferido, a CE tem uma alta correlação (0,80) com NEC.

Na Tabelas 1 estão descritos os valores médios observados para CE, MOT, NEC e VOL, por tratamento. Na Tabela 2, está descrito o percentual de

amostras classificadas como tendo VIG igual a 3 ou 4, nos diferentes tratamentos.

Tabela 1: Concentração espermática (CE), motilidade (MOT) e volume espermático (VOL). E número de espermatozoides por coleta (NEC) por tratamento (n= 20 por tratamento)

Tratamentos	CE ($\times 10^6/\text{ml}$)	MOT (%)	NEC ($10^3\text{celulas}/\mu\text{l}$)	VOL (μl)
T1	178,4 ^a	74,0 ^a	911,6 ^a	5,1 ^a
T2	105,4 ^b	63,5 ^b	505,5 ^b	4,7 ^a

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,01$).

Tabela 2: Percentual de amostras com vigor espermático classificado como 3 ou 4 por tratamento (n= 20 por tratamento)

Tratamentos	Vigor = 3 (%)	Vigor = 4 (%)
T1	70,0 ^a	30,0 ^a
T2	95,0 ^b	5,0 ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

O T1 apresentou CE, MOT e NEC superiores ao T2 ($P < 0,01$), bem como um maior percentual de amostras com VIG classificado com o escore igual a 4 ($P < 0,05$). Portanto, o método T1 preserva melhor a qualidade espermática no momento da coleta, minimizando os danos causados aos espermatozoides. Este fato pode ser atribuído à execução das técnicas, pois, no T2, a pressão exercida no órgão provavelmente provoca lesões nos tecidos. Já no T1, em função da menor agressão tecidual, as células espermáticas são menos lesadas, mantendo sua integridade e funcionalidade com maior frequência.

No entanto, apesar da diferença observada no NEC, o VOL não foi afetado pelo método de coleta ($P > 0,05$). Portanto, a execução mais agressiva do T2

seria mais prejudicial à qualidade do sêmen coletado, os efeitos negativos sob o ponto de vista quantitativo seriam menos característicos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a técnica de coleta seminal através de cortes é mais vantajosa do que a técnica de coleta a partir de pressão das estruturas, pois resultou em menos efeitos negativos sobre indicadores de qualidade de sêmen e com número de espermatozóides coletados mais elevado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2002, 187, p. 77-81.
- [2] HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986, p. 107
- [3] LANDEL, C.P. Archiving mouse strains by Cryopreservation. **LabAnimal**. 2005, 34, p- 50-57. <http://www.labanimal.com/labanimal/index.html>.
- [4] MOCHIDA, K.; OHKAWA, M.; INOUE, K.; VALDEZ JR, D.M.; KASAI, M.; OGURA, A. Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures. **Theriogenology**, 2004, 64, p. 135-43.
- [5] NAKAGATA, N.. Cryopreservation of mouse spermatozoa. **Mamm Genome**. 2000, 11, p. 572-576.
- [6] NAKATA, N. Use of Cryopreservation techniques of embryos and spermatozoa for production of transgenic (Tg) mice and for maintenance of Tg mouse lines. **Laboratory Animal Science**. 1996, 46, p. 236-238.
- [7] REVEL, A.; MOSHE, N.; HELMAN, A.; SAFRAN, A.; SIMON, A.; KOLER, M. Mouse embryos generated from frozen-thawed oocytes can successfully survive a second cryopreservation. **Human Reproduction**. 2004, 19, p.666-669.
- [8] SONGSASEN, N and LEIBO, S.P. Cryopreservation of mouse spermatozoa: Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. **Cryobiology**, 1997, 35, p. 240-254.
- [9] STATISTIX®. Statistix® 8 Analytical Software. User's manual. Tallahassee. FL. 2003. 396 p.
- [10] SZTEIN, J.M.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. In Vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. **Biology of Reproduction**, 2000, 63, p.1774-1780.
- [11] SZTEIN, J.M.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, 2001, 41, p.28-39.