

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MARIA CLARA FIORAVANTI PONCE

Efeitos da idade e de deleções gênicas na qualidade espermática de camundongos

Uberlândia - MG

2025

MARIA CLARA FIORAVANTI PONCE

Efeitos da idade e de deleções gênicas na qualidade espermática de camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
da Universidade Federal de Uberlândia como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Coorientador: Prof. Dr. Murilo Vieira da Silva

Uberlândia - MG

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P792 Ponce, Maria Clara Fioravanti, 2002-  
2025 Efeitos da idade e de deleções gênicas na qualidade  
espermática de camundongos [recurso eletrônico] / Maria Clara  
Fioravanti Ponce. - 2025.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti .  
Coorientador: Murilo Vieira da Silva.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade  
Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária.  
Modo de acesso: Internet.  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. , Marcelo Emílio Beletti,1964-, (Orient.). II.  
Silva, Murilo Vieira da,1988-, (Coorient.). III. Universidade Federal  
de Uberlândia. Graduação em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

MARIA CLARA FIORAVANTI PONCE

Efeitos da idade e de deleções gênicas na qualidade espermática de camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 24 de setembro de 2025

Banca Examinadora:

---

Marcelo Emilio Beletti – Doutor (UFU)

---

Murilo Vieira da Silva – Doutor (UFU)

---

Flávia Batista Ferreira – Doutora (UFU)

---

Sandra Gabriela Klein – Mestre (UFU)

Dedico este trabalho à minha família, por me  
lembrar que há um lugar para onde sempre  
posso voltar.

## RESUMO

A homeostase do sistema reprodutor do macho é influenciada por mediadores inflamatórios e imunológicos, por isso, a deleção de genes específicos pode impactar na qualidade seminal e na espermatogênese. Nesse contexto, o presente estudo investigou os efeitos de alterações genéticas e da idade na função reprodutiva de camundongos knockout. Para isso, machos das linhagens C57BL/6 (tipo selvagem), Galectina-3<sup>-/-</sup>, Interferon Gama (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>) e Toll-Like Receptor 3 (TLR-3<sup>-/-</sup>) foram utilizados em duas idades distintas, de 8 e 12 semanas. Após a eutanásia, os pesos corporais e dos órgãos reprodutivos foram avaliados, e os espermatozoides coletados para análise de vitalidade, motilidade e morfologia. Não foram observadas diferenças significativas nos pesos corporais ou de órgãos reprodutivos entre os grupos. Entretanto, a análise espermática demonstrou que, nos animais TLR-3<sup>-/-</sup>, houve uma maior incidência de defeitos de inserção errada da peça intermediária. Já o grupo GAL-3<sup>-/-</sup> apresentou uma maior incidência de defeitos de cauda. De forma contrastante, a linhagem IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não apresentou anomalias detectáveis em nenhum dos parâmetros espermáticos analisados. A partir dos resultados encontrados conclui-se que a ausência de TLR-3 e Galectina-3 impactam de maneira distinta e negativa a qualidade espermática. Por outro lado, a ausência de alterações no grupo IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> sugere um papel modulador deste gene, onde sua falta pode estar associada a estabilidade funcional. Esses achados reforçam a influência seletiva de genes imunológicos na reprodução e apontam para potenciais aplicações terapêuticas no tratamento de problemas reprodutivos, sendo necessários mais estudos com este enfoque.

**Palavras-chave:** camundongos knockout; reprodução; espermatogênese; motilidade espermática; morfologia espermática.

## ABSTRACT

The homeostasis of the male reproductive system is influenced by inflammatory and immunological mediators, so the deletion of specific genes can impact semen quality and spermatogenesis. In this context, the present study investigated the effects of genetic alterations and age on the reproductive function of knockout mice. For this purpose, males of the C57BL/6 (wild type), Galectin-3-/-, Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ -/-) and Toll-Like Receptor 3 (TLR-3-/-) strains were used at two different ages, 8 and 12 weeks. After euthanasia, body and reproductive organ weights were assessed, and sperm were collected for analysis of vitality, motility, and morphology. No significant differences in body or reproductive organ weights were observed between the groups. However, sperm analysis showed that TLR-3-/-, animals had a higher incidence of midpiece insertion defects. The GAL-3-/- group, on the other hand, had a higher incidence of tail defects. In contrast, the IFN- $\gamma$ -/- lineage did not show detectable abnormalities in any of the sperm parameters analyzed. Based on the results found, it can be concluded that the absence of TLR-3 and Galectin-3 has a distinct and negative impact on sperm quality. On the other hand, the absence of changes in the IFN- $\gamma$ -/- group suggests a modulatory role for this gene, where its absence may be associated with functional stability. These findings reinforce the selective influence of immune genes on reproduction and point to potential therapeutic applications in the treatment of reproductive problems, requiring further studies with this focus.

**Keywords:** knockout mice; reproduction; spermatogenesis; sperm motility; sperm morphology.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Representação esquemática do sistema reprodutor masculino de camundongo .....	15
Figura 2. Ilustração esquemática da coleta de espermatozoides .....	20
Figura 3. Análise de vitalidade .....	21
Figura 4. Defeito de cauda .....	23
Figura 5. Defeito de cabeça .....	24
Figura 6. Defeito de peça intermediária .....	25
Figura 7. Gráficos de peso corporal (A), epidídimos (B), testículos (C) e vesícula seminal (D) de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3 <sup>-/-</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3 <sup>-/-</sup> com 8 e 12 semanas de idade .....	27
Figura 8. Gráfico de vitalidade (A) e motilidade (B) de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3 <sup>-/-</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3 <sup>-/-</sup> com 8 e 12 semanas de idade .....	30
Figura 9. Tipos de alterações morfológicas na cabeça dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3 <sup>-/-</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3 <sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B) .....	31
Figura 10. Tipos de defeitos de cauda dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3 <sup>-/-</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3 <sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B) .....	32
Figura 11. Tipos de defeitos de peça intermediária dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3 <sup>-/-</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3 <sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B) .....	33

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Média das variáveis de pesos corporal e reprodutivos de camundongos machos. Dados obtidos em 8 e 12 semanas de idade.....	28
Tabela 2. Média da vitalidade e motilidade de espermatozoides de camundongos machos. Os dados representam as médias dos grupos para as idades de 8 e 12 semanas.....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Linhagens.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1</b>	<b><i>C57BL/6</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.2</b>	<b><i>Interferon Gama (IFN-<math>\gamma</math> -/-)</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.3</b>	<b><i>Toll-Like Receptor 3 (TLR-3-/-)</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4</b>	<b><i>Galectina (Gal3-/-)</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Sistema Reprodutor .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Espermatogênese.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Avaliação Espermática .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Comissão de ética .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta dos espermatozóides .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da vitalidade .....</b>	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da motilidade .....</b>	<b>21</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da morfologia.....</b>	<b>22</b>
<b>4.7</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Peso corporal e dos órgãos reprodutores.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Vitalidade e Motilidade .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Patologias morfológicas.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Defeito de cabeça .....</i></b>	<b>30</b>
<b>5.3.2</b>	<b><i>Defeito de cauda.....</i></b>	<b>31</b>
<b>5.3.3</b>	<b><i>Defeito de peça intermediária.....</i></b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A relação entre o ser humano e a pesquisa com animais é histórica, com registros de experimentos do século V a.C. (Fernandes et al., 2017). Com o passar do tempo, a utilização de animais na ciência permitiu maior conhecimento sobre doenças, tratamentos e diversos mecanismos fisiológicos (Lafollette, 2020). Gradualmente, o avanço biotecnológico melhorou a compreensão dos experimentos e promoveu o estabelecimento de modelos animais, com destaque para o murino. Paralelamente, a forte presença da ética, do bem-estar e dos direitos dos animais contribuíram para significativa transformação na ciência de animais de laboratório (Kiani et al., 2022).

Neste ambiente de inovações, o refinamento na área de animais de laboratório trouxe técnicas de manipulação genética. Tais metodologias possibilitam a inserção de um gene de outra espécie, originando os camundongos transgênicos; a inserção gênica direcionada, na qual o gene é substituído por outro modificado e proveniente da mesma espécie ou editado a partir do próprio animal, os camundongos knock-in. (Hall et al., 2009; De Carvalho et al., 2006); além da deleção de genes, resultando em linhagens de camundongos knock-out (De Carvalho et al., 2006). Ao deletar um gene, isto é, bloquear a sua expressão, permite-se avaliar sua importância nas reações fisiológicas, ajudando a especificar seu papel biológico. (Hall et al., 2009). Em biotérios, diversos animais knockout são empregados para estudar mecanismos específicos. Por exemplo, camundongos com deleção de Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) apresentam uma deficiência na produção de antimicrobianos e uma expressão reduzida de MHC II (complexo principal de histocompatibilidade). Outros modelos, como os camundongos Galectina (Gal3 $^{-/-}$ ), possuem deficiência de galectina-3, prejudicando a resposta inflamatória, já os camundongos TLR-3 knockout (TLR-3 $^{-/-}$ ) não produzem citocinas inflamatórias (The Jackson Laboratory, 2025) (Hsu et al., 2000).

A utilização dos animais geneticamente modificados, assim como suas reproduções e criações, é uma tarefa que demanda considerável tempo e apresenta um elevado grau de dificuldade. O método tradicional de geração desses modelos fundamenta-se no cultivo e manipulação de células-tronco embrionárias, envolvendo etapas de eletroporação de vetores, seleção de alvos e o complexo cruzamento de animais quiméricos e seus descendentes, sendo um procedimento trabalhoso, demorado e de alto custo. Em contrapartida, a tecnologia CRISPR/Cas9 tornou-se a ferramenta predominante na autalidade por sua maior eficiência, a qual utiliza RNA guia único sintético (sgRNA) para o reconhecimento do sítio alvo no DNA (Xu et al., 2018). Além disso, a criação desses animais em colônias abertas pode resultar em

alterações genéticas, seja por acidentes, doenças ou pela redução da fertilidade (Soares et al., 2001). Portanto, para o progresso científico e a realização de experimentos, é essencial o uso de animais geneticamente modificados. No entanto, essa prática deve ser baseada nos princípios dos três Rs de Russell e Burch (Russell, Burch, 1959) que busca maximizar as informações obtidas com o uso de um número reduzido de animais (Ebiomedicine, 2022). Para alcançar esse objetivo, é fundamental aumentar a viabilidade e a eficiência reprodutiva, considerando que, assim como no acasalamento natural, onde as taxas de fertilidade dos camundongos variam, o background genético também influencia a fertilidade de camundongos geneticamente modificados. (Vasudevan et al., 2010).

A análise de modelos de camundongos knockout revela que a infertilidade pode ser um efeito secundário de alterações genéticas em genes que não se expressam no sistema reprodutor. Isso ocorre por um efeito pleiotrópico, ou seja, quando um único gene influencia múltiplas características no organismo. Conforme estudos de Baker et al. (1995) e Toshimori et al. (2004), a interrupção de um gene funcional em outros tecidos pode ter um efeito indireto que, por sua vez, afeta a produção espermática e a fertilidade geral do animal.

Avaliando a fertilidade, a análise do sêmen tem sido o teste laboratorial mais importante para determinar a fertilidade masculina. Esse procedimento pode ser realizado em diferentes níveis, examinando as características mecânicas, físicas ou funcionais dos espermatozoides. Em animais machos, a fertilidade é mensurada pela análise do sêmen, que quantifica a capacidade dos espermatozoides de fertilizar o ovócito tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Tanga et al., 2021).

Com base nos dados apresentados, o presente estudo teve como objetivo analisar a morfologia, vitalidade e motilidade de espermatozoides em diferentes linhagens de camundongos geneticamente modificados, conhecidos como knock-out. O objetivo foi determinar se há diferenças significativas entre as linhagens analisadas e identificar quais grupos de animais apresentam essas alterações de forma mais pronunciada. Com isso, espera-se contribuir para o aumento da taxa de fertilidade, reduzir as perdas reprodutivas e aprimorar os protocolos de reprodução assistida, visando a melhoria da qualidade espermática nesses modelos animais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Linhagens

#### 2.1.1 C57BL/6

O camundongo C57BL/6 (B6) é um dos modelos mais utilizados na pesquisa biomédica, especialmente em estudos de genética, metabolismo e neurodegeneração (Mekada et al., 2021). Sua ampla utilização fundamenta-se em seu perfil biológico favorável, caracterizado por alta eficiência reprodutiva, proles estáveis e longevidade acentuada, além de uma baixa suscetibilidade a neoplasias com a idade (Newton; Aguilar; Bowl, 2025).

Desde sua introdução em 1921, a linhagem divergiu em sublinhagens fundamentais, como a C57BL/6J (B6J), mantida pelo Jackson Laboratory, e a C57BL/6N (B6N), estabelecida pelos National Institutes of Health (NIH) (Mekada et al., 2021). Embora o B6J tenha servido como referência para o sequenciamento do genoma do camundongo, a sublinhagem B6N consolidou-se como o padrão adotado para o desenvolvimento de modelos knockout. Essa diretriz técnica, estabelecida pelo Projeto Camundongo Knockout, justifica-se pelo fato das células-tronco embrionárias da linhagem 6J apresentarem baixas taxas de transmissão germinativa (Fontaine et al., 2015).

Atualmente, o C57BL/6 permanece central na ciência moderna, evidenciando que a variabilidade genética entre suas sublinhagens é um fator determinante, capaz de influenciar diretamente a reproduzibilidade e a interpretação de dados experimentais (BRYANT, 2011).

#### 2.1.2 Interferon Gama (IFN- $\gamma$ $^{-/-}$ )

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina que faz a regulação das respostas imunológicas inata e adaptativa, sendo produzido principalmente por linfócitos T e células NK (natural killer). Suas funções incluem a ativação de macrófagos e o aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o que promove a apresentação de抗ígenos e, por consequência, uma resposta imune mais eficaz. (Schoenborn; Wilson, 2007).

Alterações na expressão e na função do IFN- $\gamma$  estão associadas a diversas doenças. Isso se deve ao fato de que a citocina atua por meio da ligação aos receptores IFN $\gamma$ R1 e R2, ativando a via de sinalização mediada por Janus quinases (JAK) e proteínas ativadoras da transcrição

(STAT), coordenando diversas funções celulares, como a regulação da resposta imune, migração de leucócitos, proliferação celular, apoptose, além de efeitos antimicrobianos e antitumorais. (Ding et al., 2022).

O IFN- $\gamma$ , além de suas funções imunes, tem se mostrado um fator significativo na saúde reprodutiva masculina. A infiltração de células T produtoras dessa citocina em modelos animais, pode causar danos às células de Sertoli, essenciais para a espermatoценese, levando à sua interrupção (Chiu et al., 2024). Esses achados em animais são consistentes com observações clínicas em pacientes com prostatite crônica e infertilidade idiopática, que frequentemente exibem níveis elevados de IFN- $\gamma$  e outras citocinas inflamatórias no sêmen. Essa elevação está diretamente correlacionada com a qualidade seminal comprometida, manifestada por diminuição na contagem, motilidade e viabilidade dos espermatozoides (Paira et al., 2022).

### **2.1.3 Toll-Like Receptor 3 (TLR-3<sup>-/-</sup>)**

O TLR-3 (Toll-like receptor 3) é um receptor responsável por detectar RNA viral de dupla fita, ativando uma resposta imune inata essencial na defesa contra infecções virais (Takeda et al., 2005). Este receptor localiza-se nas membranas endossomais das células imunes e, ao reconhecer material viral, induz uma cascata de sinalização que resulta na produção de interferons do tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias (Arancibia et al., 2007).

Camundongos com o gene TLR-3 deletado mostram maior suscetibilidade a infecções virais, uma vez que a ausência do receptor compromete a capacidade de ativar uma resposta imune eficiente contra vírus de RNA. Além disso, a falta do TLR-3 pode afetar o equilíbrio do sistema imune, o que está ligado ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como o diabetes tipo 1 (Assmann et al., 2015).

A investigação sobre o papel do receptor TLR-3 na espermatoценese é motivada pela evidência de sua capacidade de induzir danos ao tecido testicular. Em camundongos, o receptor é expresso em células-chave como os espermatoцитos, e sua ativação pode levar a um processo de apoptose e a uma forte resposta inflamatória, criando um ambiente hostil ao desenvolvimento saudável dos espermatozoides (Nejsum et al., 2019; Wang et al., 2012). Embora a ativação do TLR-3 seja importante para a defesa antiviral, o impacto de sua deleção na espermatoценese ainda é uma lacuna a ser explorada. Portanto, a utilização de camundongos com deleção gênica deste receptor, torna-se a abordagem ideal para testar se a ausência de sua sinalização altera de alguma forma o processo reprodutivo.

### 2.1.4 Galectina (Gal3<sup>-/-</sup>)

A galectina-3 (Gal-3) é uma proteína de ligação a  $\beta$ -galactosídeos envolvida em processos como respostas imunes, apoptose e adesão celular (Zhang et al., 2022). É distribuída nos tecidos e presente em diferentes tipos celulares, como epiteliais, dendríticas e inflamatórias, atua tanto no meio intracelular quanto extracelular, influenciando a proliferação, a diferenciação e a regulação de respostas inflamatórias (Hsu et al., 2000).

Estudos com essa linhagem mostram que a ausência da Gal-3 pode ter efeitos opostos dependendo da situação: em alguns casos, como na peritonite ou em certas infecções, a resposta inflamatória é menor; já em outros, como na exposição à endotoxina, na aterosclerose induzida por dieta ou em lesões renais associadas ao diabetes, a patologia é mais grave. Isso deixa claro que a Gal-3 pode tanto proteger quanto contribuir para o dano, e que o modelo KO é fundamental para desvendar esses mecanismos (Pang et al., 2013).

Essa dualidade de papéis da Galectina-3 se estende à fisiologia testicular, onde a sua expressão é regulada positivamente durante o desenvolvimento e sua presença é fundamental na espermatogênese e na maturação das células de Sertoli (Lei et al., 2021)

## 2.2 Sistema Reprodutor

Os testículos, órgãos pares com formato oval, são revestidos pela túnica albugínea e pela túnica vaginal. Esses órgãos são essenciais para a reprodução, pois são responsáveis pela produção tanto de espermatozoides quanto de hormônios sexuais masculinos, além de manter as características secundárias do sexo masculino (Banks, 1992; Russell et al., 1995).

Os testículos são divididos em lóbulos por septos formados pela túnica albugínea, que cria um espaço chamado mediastino. Os lóbulos contêm os túbulos seminíferos, locais onde ocorre a espermatogênese. Estes túbulos são formados por um epitélio seminífero que abriga dois tipos de células: as células germinativas, que dão origem aos espermatozoides e as células de Sertoli, que desempenham um papel de suporte e nutrição (Knoblaugh et al., 2018; Matta et al., 2009).

Os túbulos seminíferos não possuem suprimento sanguíneo direto, mas são envolvidos por um tecido conjuntivo denso. A túnica própria, que envolve os túbulos, é composta por células mióides e fibras de colágeno, permitindo a movimentação dos fluidos e espermatozoides dentro do lúmen dos túbulos. As células mióides são contráteis e desempenham uma função importante na movimentação dos espermatozoides (Barros, 2005).

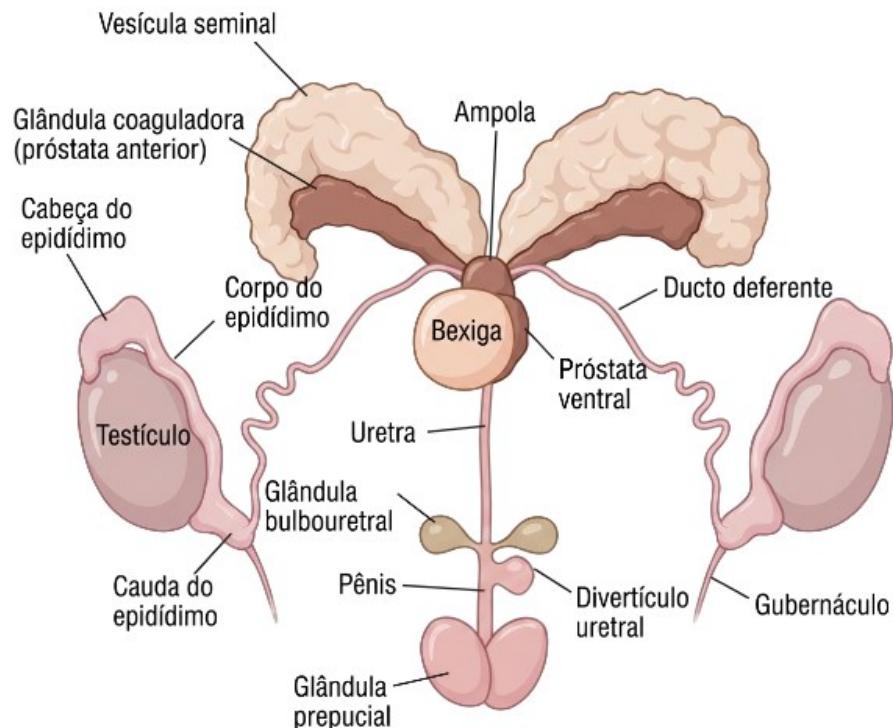
O epidídimo é um órgão composto por túbulos enrolados, os ductos dos epidídimos, e envolto por uma camada de tecido conjuntivo denso. Nos mamíferos, geralmente estão em pares, cada um localizado na borda posterior de um testículo. Anatomicamente é dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda, sendo esta última responsável por realizar a maturação e o armazenamento dos espermatozoides (Silva, 2020).

As vesículas seminais são glândulas pares e acessórias do sistema reprodutor masculino. Situadas atrás da bexiga urinária e ligadas à próstata anterior, elas produzem secreções que, junto com os fluidos da próstata e das glândulas bulbouretrais, formam uma estrutura gelatinosa conhecida como tampão copulatório. Este tampão evita que o sêmen retorne para fora da vagina após a ejaculação. A parede interna da vesícula é formada por músculo liso e um epitélio colunar alto que cria pregas ramificadas (Krinke; Weber, 2012, p. 175).

O processo de espermatogênese é regulado por hormônios, como o folículo-estimulante (FSH), que atua nas células de Sertoli, promovendo a maturação dos espermatozoides. As células de Sertoli são fundamentais para a nutrição e desenvolvimento das células germinativas durante a espermatogênese (Russell et al., 1995).

Em resumo, o sistema reprodutor masculino dos camundongos (Figura 1) é complexo e altamente especializado, com interações intrincadas entre as células germinativas e as células de suporte, todas fundamentais para a produção adequada de espermatozoides e a manutenção da fertilidade (Banks, 1992; Knoblaugh et al., 2018).

Figura 1. Representação esquemática do sistema reprodutor masculino de camundongo



Fonte: adaptada de KNÖBLAUGH et al., 2018, p. 338.

### 2.3 Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de formação de espermatozoides a partir das células germinativas nos testículos (Zorzetto, 2007). Em camundongos, esse processo ocorre em várias etapas, começando com as espermatogônias, que se dividem por mitose. Em seguida, algumas dessas células sofrem meiose, resultando em espermatócitos, que se diferenciam em espermatozoides maduros por meio da espermogênese (Phillips et al., 2010).

Esse processo é regulado por uma série de hormônios, sendo o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a testosterona os mais importantes (Zirkin, 1999). O FSH atua nas células de Sertoli, promovendo a nutrição e o suporte das células germinativas em desenvolvimento. Por sua vez, a testosterona atua na manutenção da espermatogênese (Holstein et al., 2003; Zirkin, 1999). A interação adequada entre esses hormônios é fundamental para garantir a formação de espermatozoides viáveis (Gartner; Hiatt, 1997).

Além disso, a integridade genética e o ambiente testicular são fundamentais para a espermatogênese normal. Alterações nesses fatores podem resultar em anomalias na espermatogênese, levando a problemas de fertilidade. A pesquisa sobre espermatogênese em

camundongos oferece informações para entender a reprodução e as possíveis disfunções associadas (Cooke; Saunders, 2002).

## 2.4 Avaliação Espermática

A infertilidade e a esterilidade no macho estão intimamente ligadas a alterações morfológicas nos espermatozoides. A morfologia espermática é um fator determinante tanto para o sucesso da fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial quanto para o êxito de tratamentos de reprodução assistida (Enciso et al., 2011). Em mamíferos, para que um espermatozoide seja considerado viável e com potencial fértil, é necessário atender três critérios: possuir a morfologia correta, uma atividade metabólica eficiente e membranas plasmáticas saudáveis. A integridade dessas membranas é fundamental, pois garante a sequência de eventos necessária para a fertilização bem-sucedida, incluindo a capacitação espermática, a penetração nas camadas do óvulo e, por fim, a fusão com o oolema. (Arruda et al., 2011).

A viabilidade funcional do espermatozoide está ligada à sua morfologia, com cada uma de suas estruturas desempenhando papel fundamental no processo de fertilização. A cabeça contém o material genético paterno e abriga o acrosomo, organela especializada na penetração da zona pelúcida do ovócito (Vieira et al., 2024). Já a peça intermediária é rica em mitocôndrias que fornecem a energia necessária para a motilidade da cauda. Anormalidades nessas estruturas podem resultar em infertilidade. Enquanto os defeitos na peça intermediária e na cauda afetam a motilidade, prejudicando o alcance do gameta feminino, as alterações na cabeça comprometem a interação espermatozoide-ovócito, que é essencial para a fecundação e a formação do zigoto (Vieira et al., 2024).

A integridade morfológica dos espermatozoides em camundongos, assim como em outras espécies mamíferas, é alcançada por meio de processos de maturação. Resumidamente, os espermatozoides recém-formados deixam os testículos em um estado imaturo, ainda contendo remanescentes de citoplasma, cromatina pouco condensada e composição incompleta de proteínas e outros componentes da membrana plasmática. Caso ocorra alguma interrupção durante a sua passagem pelo epidídimos, a maturação é impedida, resultando em alterações na morfologia. (Martins et al., 2016).

A descrição inicial da morfologia de espermatozoides de camundongos foi realizada por Wyrobek e Bruce (1975) em um estudo com animais expostos a compostos químicos. Os autores identificaram e categorizaram os espermatozoides anormais em poucos grupos: os que

não possuíam gancho, os amorfos, os em forma de banana, cauda dobrada ou dupla. A ausência de uma análise detalhada sobre defeitos na peça intermediária e na cauda destacou uma lacuna no conhecimento da área (Vieira et al., 2024).

A avaliação da vitalidade e motilidade espermática é padronizada no espermograma. A motilidade espermática progressiva é um indicador importante, já que sua função está diretamente ligada às taxas de gravidez. Da mesma forma, a vitalidade dos espermatozoides demonstra a integridade da membrana celular, sendo um teste para diferenciar espermatozoides vivos de mortos. (Organização Mundial da Saúde, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar os efeitos de alterações genéticas e da idade na função reprodutiva de camundongos com foco em parâmetros espermático.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o peso corporal, peso do epidídimos, testículo e vesícula seminal em animais de diferentes linhagens e faixa etária;
- Avaliar a vitalidade espermática em animais de diferentes linhagens e faixa etária;
- Analisar a motilidade espermática em animais de diferentes linhagens e faixas etárias;
- Analisar a influência da idade nas patologias morfológicas dos espermatozoides nas diferentes linhagens de camundongos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Comissão de ética

Utilizaram-se amostras provenientes do processo zootécnico de congelamento de gametas da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR/UFU), sob o protocolo A0001. O manejo e os cuidados com os animais foram conduzidos em total conformidade com as diretrizes e resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2025).

### 4.2 Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos machos das linhagens C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes em TLR-3, Galectina 3 e IFN- $\gamma$ , para cada grupo utilizou-se um N de quatro animais. Os animais tinham idade de 8 e 12 semanas e apresentavam padrão sanitário livre de patógenos especificados. O alojamento foi realizado em micro-isoladores do modelo Alesco ventilife, separados em racks, com a cama de maravalha de pinus autoclavada substituída semanalmente. A ração Nuvilab CR-1, assim como a água filtrada e autoclavada, foi fornecida *ad libitum*. As condições ambientais foram mantidas com temperatura de  $23 \pm 2$  °C, umidade do ar entre 50 e 60% e um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Adicionalmente, um programa de enriquecimento ambiental foi aplicado em todos os alojamentos durante todo o período do experimento. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU).

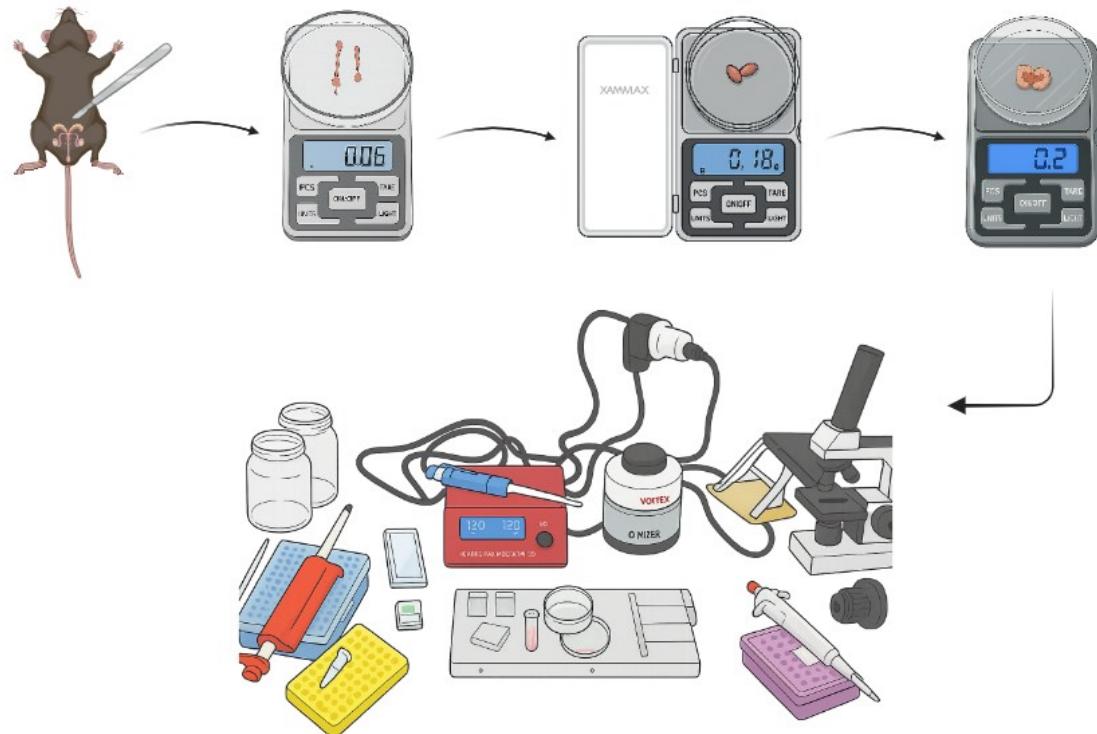
### 4.3 Coleta dos espermatozoides

Anteriormente a coleta de espermatozoides, todos os animais foram pesados, sendo em seguida anestesiados com a associação de Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil), pela via intraperitoneal. Após a detecção da ausência de reflexo doloroso ao pinçamento coccígeo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Precedido a eutanásia, realizou-se a assepsia da região abdominal inferior com álcool 70%, seguindo para corte da região inguinal para a localização dos testículos, epidídimos e vesícula seminal, com o uso de material cirúrgico autoclavado.

Após a retirada dos órgãos, estes foram pesados em uma mini balança digital eletrônica de precisão. Os pesos dos testículos, dos epidídimos e das vesículas seminais, juntamente com o peso corporal, foram utilizados para verificar se havia correlação entre anormalidades espermáticas e esses pesos, ou se os valores estavam dentro da normalidade esperada.

Posteriormente a essas etapas, a cauda do epidídimo, juntamente com uma porção de 1 cm do ducto deferente, foi retirada e transferida para 250  $\mu$ L de meio FertiCult (meio de cultivo FertiCult Flushing Medium with Phenol Red and Gentamicin) em uma placa de Petri. A placa foi colocada sobre mesa aquecedora a 37 °C. Foram feitos de 6 a 7 cortes na estrutura coletada com o auxílio de duas agulhas 26G (agulha marrom). A estrutura foi mantida na placa por 3 minutos, a cada intervalo de 1 minuto, realizaram-se movimentos circulares delicados com a placa. Logo em seguida, os resíduos de tecidos do epidídimo foram retirados das gotas após os 3 minutos de incubação, para posterior análise dos espermatozoides contidos no meio de acordo com cada objetivo experimental.

Figura 2. Ilustração esquemática da coleta de espermatozoides

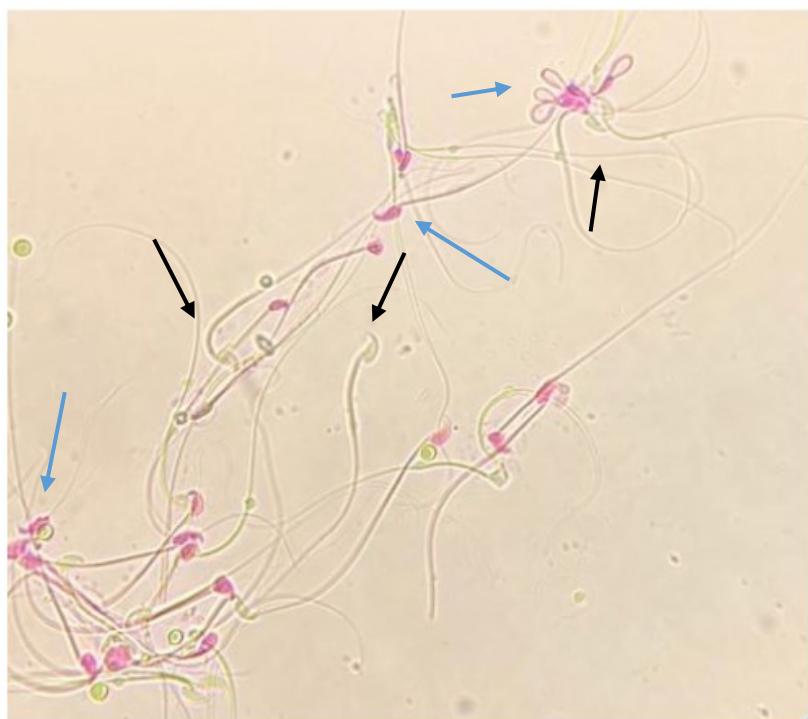


Fonte: elaborada pela autora (2025).

#### 4.4 Avaliação da vitalidade

A vitalidade dos espermatozoides foi verificada com a técnica da eosina (Figura 3). Para isso, 20  $\mu$ L da amostra de sêmen (FertiCult + espermatozoides) foram misturados com a mesma quantidade (20  $\mu$ L) de solução de eosina a 0,5% (preparada com NaCl a 0,9% em água Milli-Q). 10  $\mu$ L da mistura foram colocados em uma lâmina com lamínula e observada em um microscópio óptico com aumento de 400x. Contaram-se pelo menos 200 espermatozoides, os que absorveram o corante e ficaram vermelhos sendo classificados como mortos, e os que permaneceram incolores, como vivos.

Figura 3. Análise de vitalidade



Legenda: Imagem representativa da vitalidade espermática. Espermatozoides com coloração rosa avermelhada (eosina) indicam células mortas (setas azuis). Enquanto espermatozoides sem coloração, translúcidos, são considerados viáveis (setas pretas).

Fonte: elaborado pela autora (2025).

#### 4.5 Avaliação da motilidade

A motilidade dos espermatozoides foi analisada em uma solução preparada com 20  $\mu$ L da amostra (FertiCult + espermatozoides) e 80  $\mu$ L de meio FertiCult. Dessa mistura, pegou-se 10  $\mu$ L, qual foi transferido para uma lâmina de microscópio coberta por uma lamínula.

Utilizando um microscópio óptico a 400x de aumento, 200 espermatozoides foram avaliados e classificados de acordo com seu movimento (Organização Mundial da Saúde, 2021). A classificação foi a seguinte:

- Progressiva: Movimento ativo e com deslocamento.
- Não progressiva: Movimento limitado, sem deslocamento efetivo.
- Imóvel: Ausência de movimento.

A motilidade total da amostra foi definida como a soma das porcentagens de espermatozoides com motilidade progressiva e não progressiva.

#### 4.6 Avaliação da morfologia

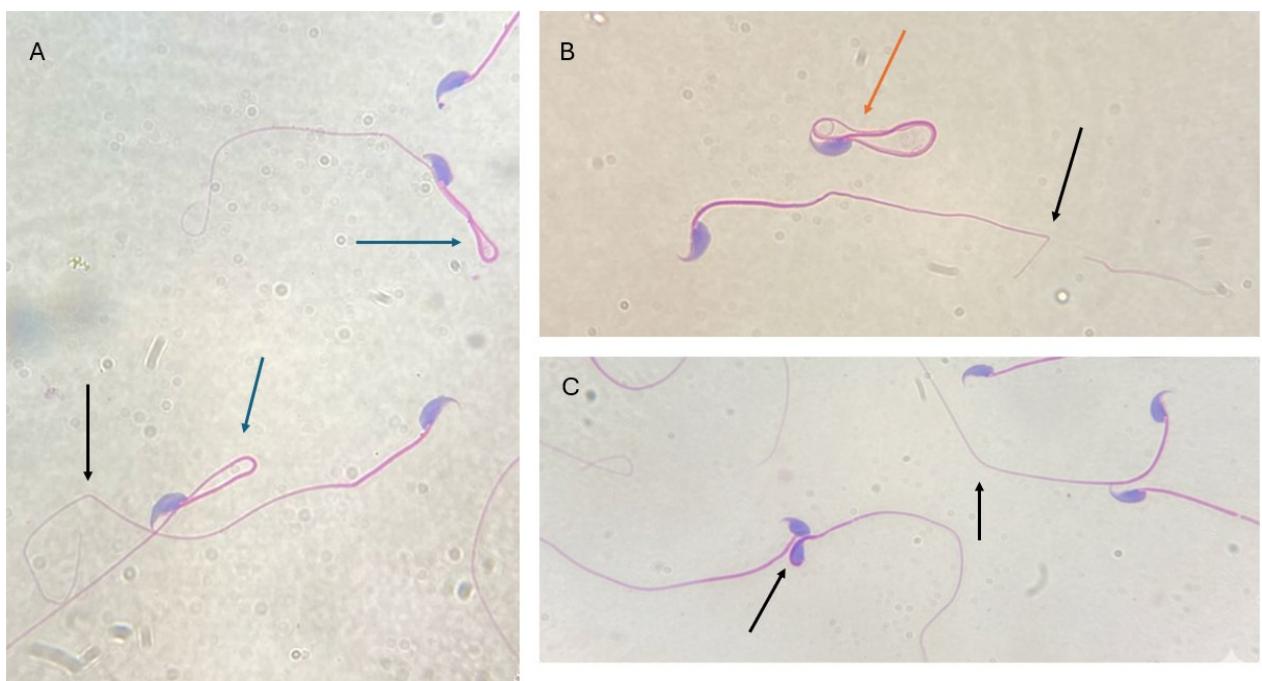
Para a avaliação morfológica espermática, foram coletados 10 µL do meio FertiCult contendo o sêmen para a confecção de um esfregaço espermático. Para isso, o volume foi depositado sobre uma lâmina de microscópio e espalhado de maneira uniforme sobre a superfície da lâmina com o uso de uma lâmina auxiliar.

A fixação dos esfregaços foi realizada em duas fases. Primeiramente, as amostras foram fixadas em uma solução de etanol-ácido acético (3:1, v/v) por um minuto. Na segunda fase, foram transferidas para etanol 70% por três minutos. Após a conclusão do processo, as amostras foram secas em temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à técnica de coloração com HE, adaptada de Aksoy (2012), que consistiu em uma série de imersões. Primeiramente, as lâminas foram coradas com hematoxilina histológica por 5 minutos, e o corante não ligado foi removido com água corrente. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina histológica por mais 5 minutos, lavadas novamente em água corrente e deixadas para secar ao ar.

Por fim, as lâminas foram examinadas em microscopia de 100x, com óleo de imersão. Para evitar a contagem repetida dos mesmos espermatozoides, a análise foi feita em um padrão de zigue-zague, onde 200 espermatozoides foram contados por lâmina. Os defeitos morfológicos foram identificados, e separados em defeitos de cauda (cauda enrolada, cauda fortemente enrolada e cauda dobrada – Figura 4), defeitos de cabeça (sem cabeça, cabeça isolada normal, cabeça isolada patológica, cabeça amorfa, duas cabeças - Figura 5) e defeitos de peça intermediária (pseudogota, gota intermediária distal e inserção errada - Figura 6).

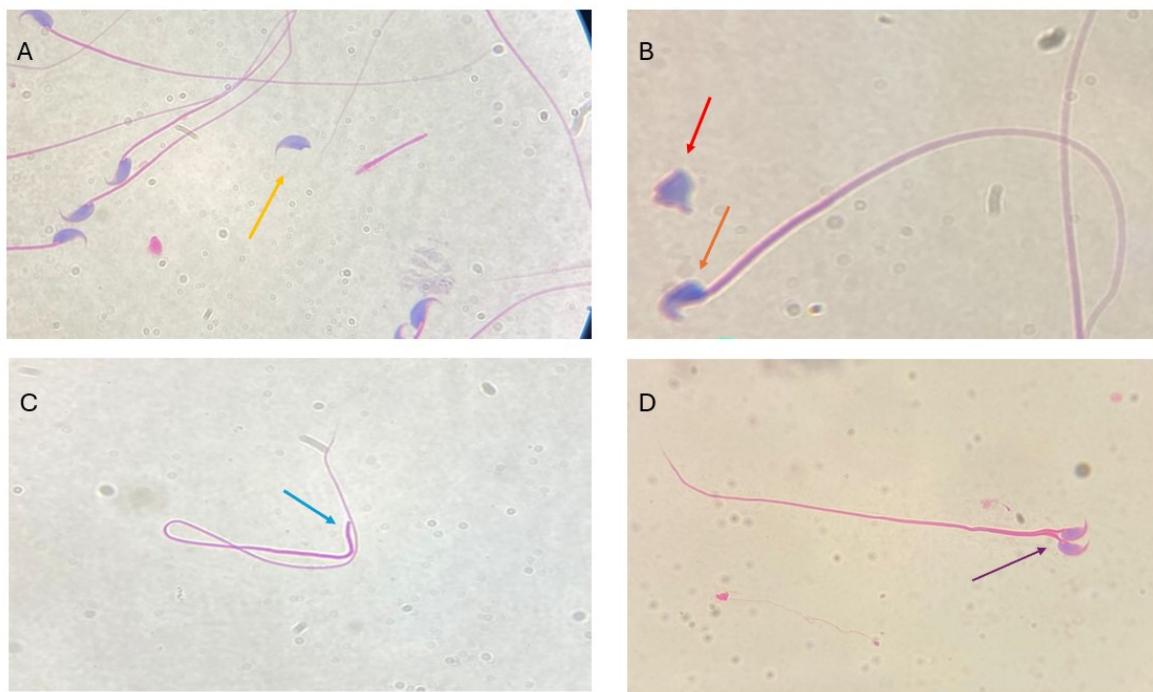
Figura 4. Defeito de cauda



Legenda: Imagens representativas de espermatozoides com defeitos de cauda. Seta preta aponta para um espermatozoide com cauda dobrada e as setas azuis indicam espermatozoides com cauda enrolada (A). A seta preta destaca espermatozoide com cauda dobrada e a seta laranja aponta para espermatozoides com cauda fortemente enrolada (B). As setas pretas indicam espermatozoides com caudas dobradas (C).

Fonte: elaborada pela autora (2025)

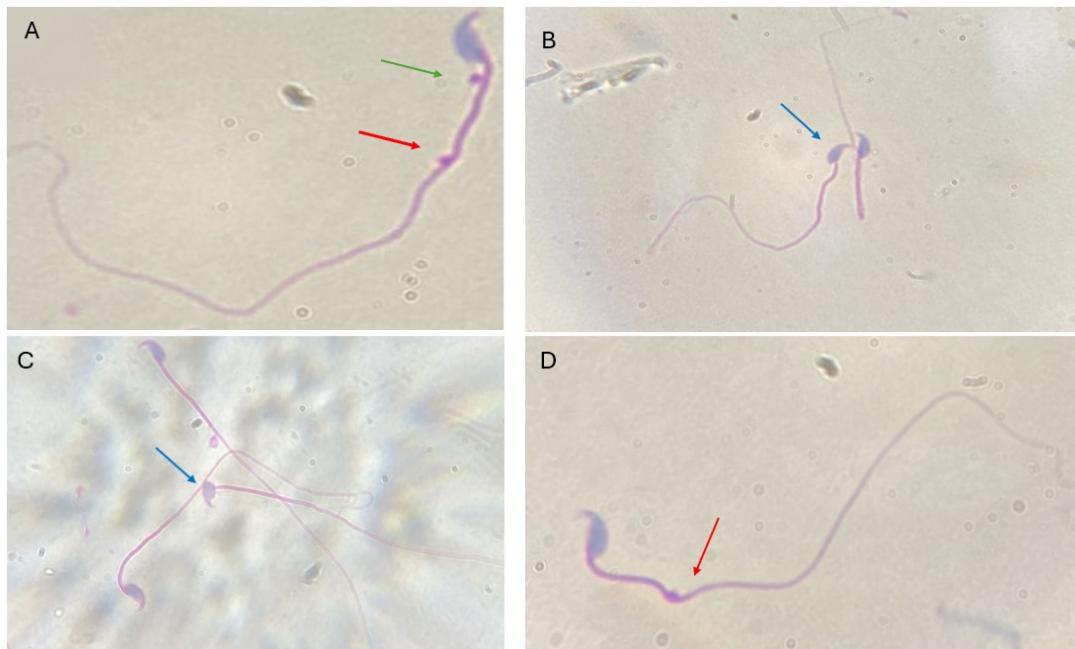
Figura 5. Defeito de cabeça.



Legenda: Imagens representativas de espermatozoides com defeito de cabeça. Seta amarela aponta para uma cabeça isolada normal (A). A seta vermelha destaca uma cabeça isolada patológica; a seta laranja mostra um espermatozoide com cabeça amorfa (B). A seta azul aponta para um espermatozoide sem cabeça (C). A seta roxa indica um espermatozoide com duas cabeças (D).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

Figura 6. Defeito de peça intermediária.



Legenda: Imagens representativas de espermatozoides com defeito de peça intermediária. A seta verde aponta para uma pseudogota; a seta vermelha indica uma gota citoplasmática distal (A). A seta azul destaca um espermatozoide com inserção errada (B). A seta azul aponta para uma inserção errada (C). Seta vermelha indica uma gota citoplasmática distal (D).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

#### 4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Inicialmente, a normalidade da distribuição de cada grupo foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov (KS).

Para os grupos que apresentaram distribuição normal, as diferenças foram analisadas pelo teste de Two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Valores para  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

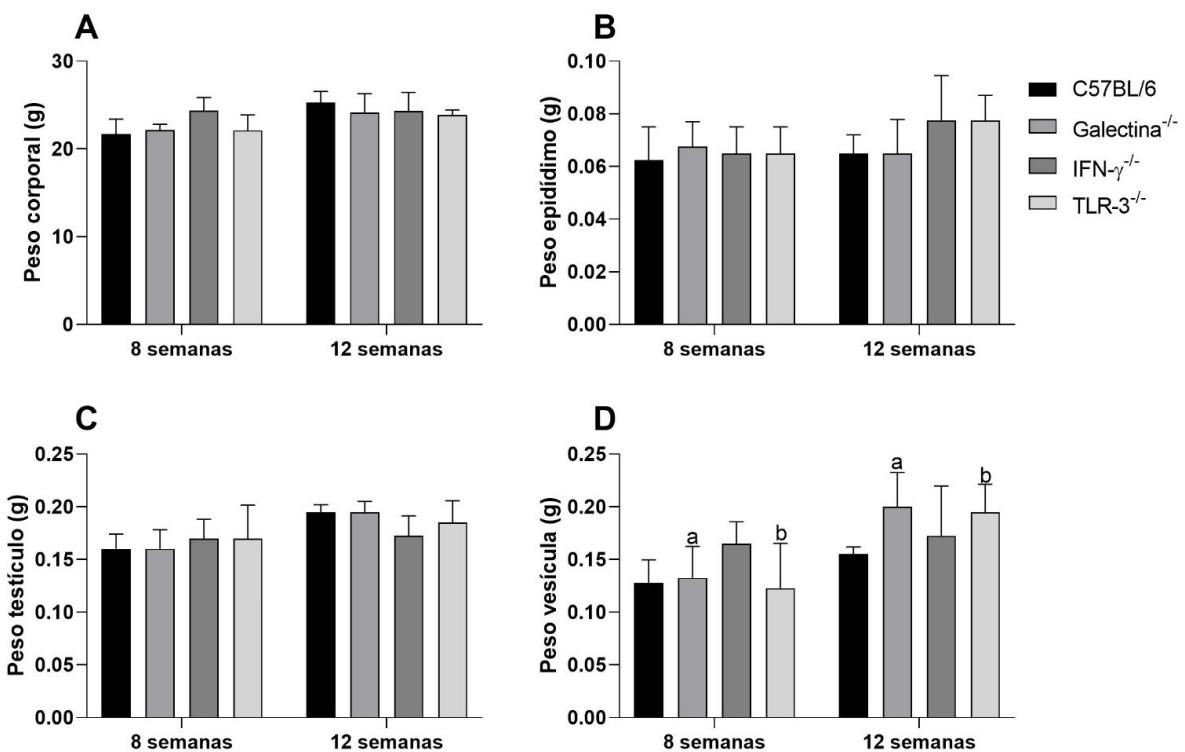
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal e dos órgãos reprodutores

Inicialmente para a análise de possíveis diferenças de características reprodutivas de camundongos das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> de duas idades distintas (8 e 12 semanas) foi realizado a pesagem corporal, do epidídimos, testículo e da vesícula seminal. Para uma análise completa e comparativa, os dados foram apresentados tanto em tabelas quanto em gráficos. Nossos resultados demonstraram que para as variáveis de pesos corporais, de epidídimos e de testículos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados (C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup>), dentro de cada semana, somente uma tendência desse aumento de peso foi observado, exceto no grupo IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Tabela 1; Figura 7, A, B, C).

Já para a análise do peso da vesícula seminal, observou-se uma distinção estatística importante. Embora os grupos C57BL/6 e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não tenham apresentado essa variação, as linhagens Gal-3<sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> mostraram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) no peso da vesícula seminal entre a 8<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana, representadas respectivamente por "a" e "b" (Figura 7, D).

Figura 7. Gráficos de peso corporal (A), epidídimo (B), testículo (C) e vesícula seminal (D) de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> com 8 e 12 semanas de idade.



Legenda: Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas ( $P<0.05$ ) foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni). Letras iguais representam diferenças estatísticas na mesma linhagem, mas em idades diferentes.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

Tabela 1. Média das variáveis de pesos corporal e reprodutivos de camundongos machos. Dados obtidos em 8 e 12 semanas de idade.

VARIÁVEL	GRUPOS	8 SEMANAS	12 SEMANAS
<b>Peso Corporal (g)</b>	C57BL/6 GALECTINA <sup>-/-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> TLR-3 <sup>-/-</sup>	21,7 22,15 24,40 22,10	25,30 24,30 24,30 23,85
<b>Peso Epidídimos (g)</b>	C57BL/6 GALECTINA <sup>-/-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> TLR-3 <sup>-/-</sup>	0,06 0,07 0,07 0,07	0,07 0,07 0,08 0,08
<b>Peso Testículos (g)</b>	C57BL/6 GALECTINA <sup>-/-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> TLR-3 <sup>-/-</sup>	0,16 0,16 0,17 0,17	0,20 0,20 0,17 0,18
<b>Peso Vesícula Seminal (g)</b>	C57BL/6 GALECTINA <sup>-/-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> TLR-3 <sup>-/-</sup>	0,13 0,13 0,17 0,12	0,16 0,20 0,17 0,19

Fonte: elaborado pela autora (2025).

## 5.2 Vitalidade e Motilidade

Após a análise de pesos corporal e reprodutivos das diferentes linhagens de camundongos em duas idades distintas, nosso próximo passo foi avaliar a vitalidade e motilidade espermática desses animais. A vitalidade espermática foi similar entre todos os grupos experimentais, com valores variando entre 51% e 56% nas duas faixas etárias. Uma leve

redução na vitalidade foi observada na maioria das linhagens com o avanço da idade (12 semanas), mas sem diferenças significativas entre os grupos, (Tabela 2; Figura 8).

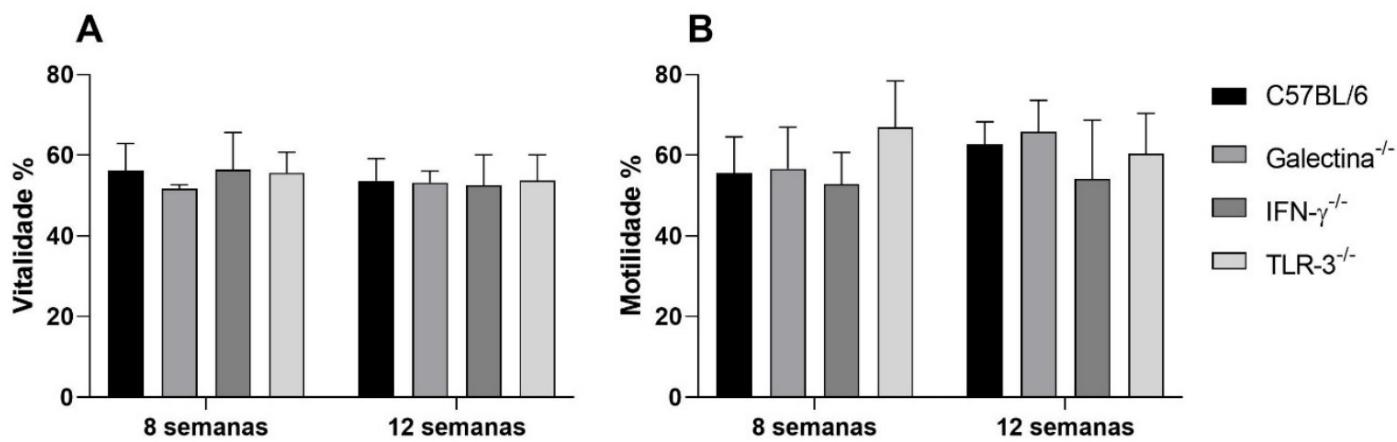
Nossos resultados em relação a motilidade espermática demonstraram que as linhagens utilizadas neste estudo apresentaram padrões distintos. Os grupos C57BL/6 e Gal-3<sup>-/-</sup> demonstraram uma tendência no aumento da motilidade espermática entre 8 e 12 semanas, não apresentando diferenças estatísticas. Por outro lado, a linhagem IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> exibiu uma variação mínima, com um percentual de motilidade que se manteve praticamente constante. Já o grupo TLR-3<sup>-/-</sup> se destacou por apresentar um declínio na motilidade espermática no mesmo período (Figura 8).

Tabela 2. Média da vitalidade e motilidade de espermatozoides de camundongos machos. Os dados representam as médias dos grupos para as idades de 8 e 12 semanas.

VARIÁVEL	GRUPOS	8 SEMANAS	12 SEMANAS
<b>Vitalidade (%)</b>			
C57BL/6	56,17	53,66	
GALECTINA <sup>-/-</sup>	51,76	53,26	
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	56,47	52,55	
TLR-3 <sup>-/-</sup>	55,63	53,70	
<b>Motilidade (%)</b>			
C57BL/6	55,59	62,72	
GALECTINA <sup>-/-</sup>	56,61	65,81	
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	52,92	54,058	
TLR-3 <sup>-/-</sup>	66,99	60,45	

Fonte: elaborado pela autora (2025).

Figura 8. Gráfico de vitalidade (A) e motilidade (B) de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> com 8 e 12 semanas de idade.



Legenda: Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Fonte: elaborado pela autora (2025).

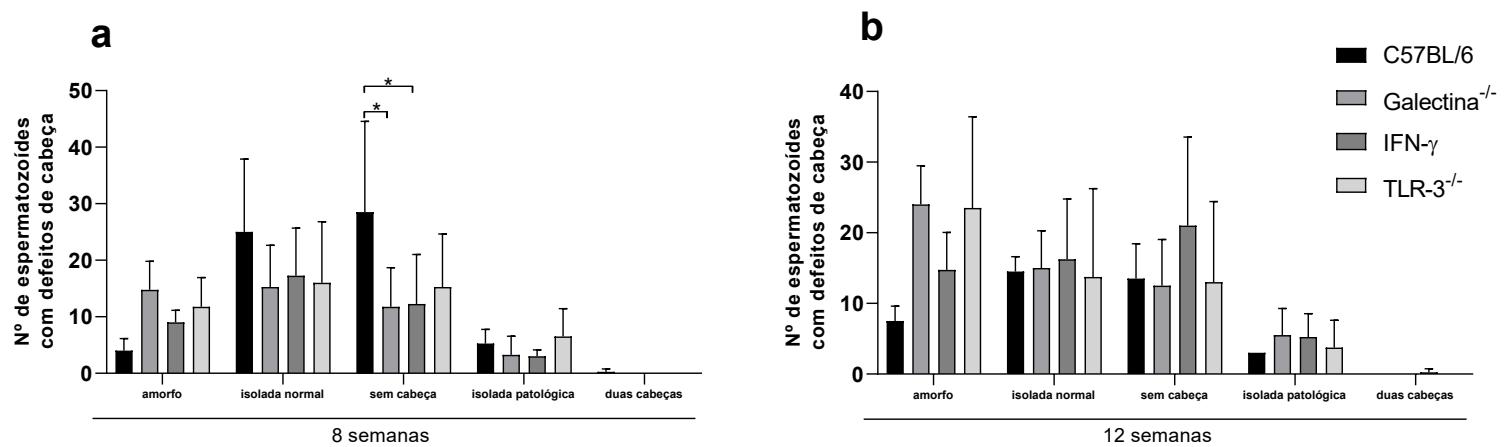
### 5.3 Patologias morfológicas

Outro fator importante para o estudo da influência da espermatogênese na qualidade dos espermatozoides é a análise patológica espermática. Neste estudo os defeitos morfológicos em espermatozoides foi dividida em três categorias principais: defeitos de cabeça, de peça intermediária e de cauda. Os resultados, apresentados em gráficos comparativos para as 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas, indicam variações importantes entre as linhagens, dentro da mesma idade (Figura 9; Figura 10 e Figura 11), como descrito abaixo.

#### 5.3.1 Defeito de cabeça

Conforme demonstrado no gráfico (Figura 9a), na 8<sup>a</sup> semana, a linhagem C57BL/6 exibiu a maior incidência de espermatozoides com o defeito sem cabeça, com diferença estatística em relação aos grupos Gal-3 KO e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> ( $P<0,05$ ). No entanto, na 12<sup>a</sup> semana (Figura 9b), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os defeitos de cabeça.

Figura 9. Tipos de alterações morfológicas na cabeça dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B).



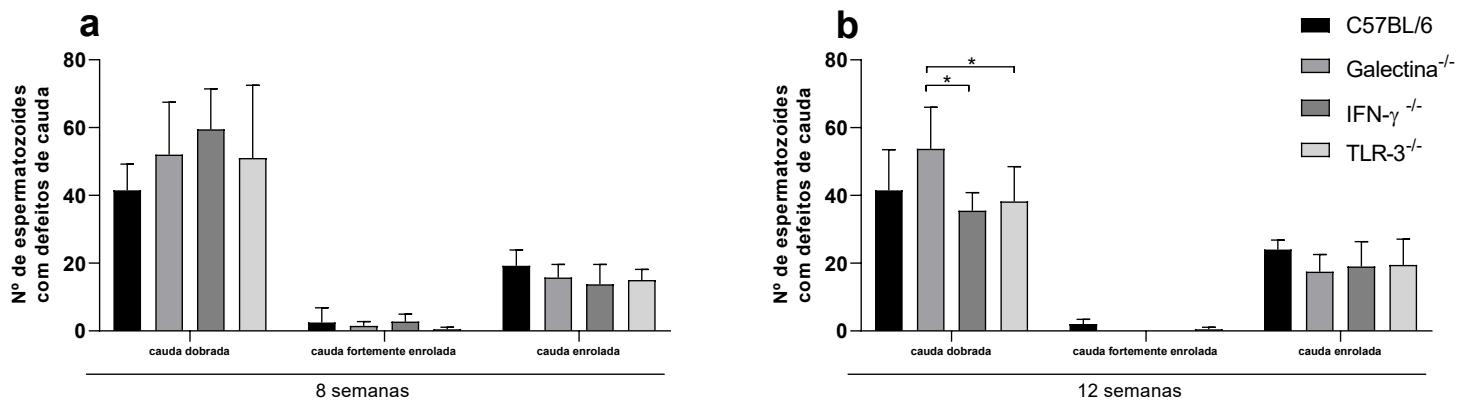
Legenda: Os parâmetros analisados incluem cabeça amorfia, isolada normal, sem cabeça, isolada patológica e duas cabeças. Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas ( $*P<0.05$ ) foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

### 5.3.2 Defeito de cauda

Os resultados dos defeitos de cauda (Figura 10a) na 8<sup>a</sup> semana não revelou diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Entretanto, na 12<sup>a</sup> semana (Figura 10b), a linhagem Gal-3 KO apresentou uma quantidade estatisticamente maior ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides com defeito de cauda dobrada em comparação com os grupos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup>.

Figura 10. Tipos de defeitos de cauda dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B).



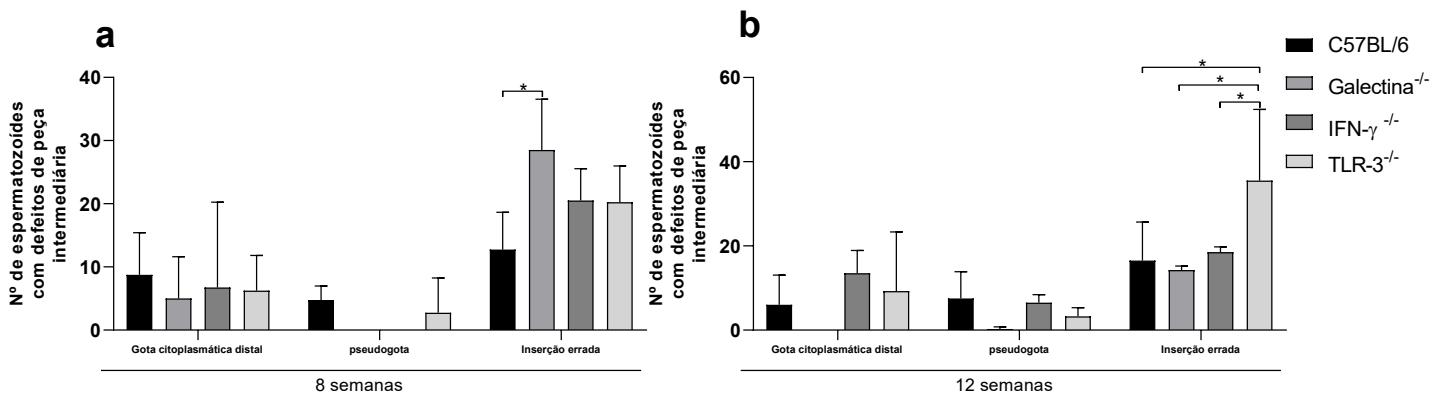
Legenda: Os parâmetros analisados incluem cauda dobrada, cauda fortemente dobrada e cauda enrolada. Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas (\*P<0.05) foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido dos pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

### 5.3.3 Defeito de peça intermediária

O gráfico de defeitos de peça intermediária (Figura 11a) mostra que, na 8<sup>a</sup> semana, a linhagem Gal-3 KO apresentou o maior número de espermatozoides com defeito de inserção errada, com uma diferença estatística em relação ao grupo C57BL/6. Na 12<sup>a</sup> semana (Figura 11b), a linhagem TLR-3<sup>-/-</sup> se destacou, apresentando um número significativamente maior de espermatozoides com defeito de inserção errada em comparação com os outros grupos.

Figura 11. Tipos de defeitos de peça intermediária dos espermatozoides de animais das linhagens C57BL/6, Gal-3<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e TLR-3<sup>-/-</sup> com 8 semanas (A) e 12 semanas (B).



Legenda: Os parâmetros analisados incluem gota citoplasmática distal, pseudogota e inserção errada.

Resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças estatísticas (\*P<0.05) foram realizadas a partir do teste Two-way ANOVA seguido dos pós teste de múltipla comparação (Bonferroni).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

## 6 DISCUSSÃO

As variações de peso corporal observadas nos animais estão dentro dos parâmetros de normalidade, uma vez que se enquadram na faixa de referência de 24-30g (The Jackson Laboratory, 2025). Por outro lado, as pesquisas existentes têm produzido resultados diversos sobre os pesos dos órgãos reprodutivos, o que dificulta a comparação entre estudos já presentes na literatura. Essa falta de padronização, em grande parte, se deve à ausência de diretrizes oficiais, o que gera uma lacuna no conhecimento de técnicas e parâmetros confiáveis para análises espermáticas (Martinez et al., 2022).

Apesar desses desafios metodológicos, o peso dos testículos, está relacionado à quantidade total de espermatozoides produzidos, já o peso da vesícula seminal reflete os níveis de andrógenos essenciais para a espermatogênese, sendo ambos parâmetros importantes para avaliar a qualidade geral do esperma (Vieira et al., 2024). No presente estudo, os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo e de uma pequena parte do ducto deferente (aproximadamente 1 cm). A escolha desse método foi baseada na comprovação que a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo é um processo de amadurecimento importante para o desenvolvimento da motilidade e da capacidade de fertilização dos espermatozoides (Monteiro et al., 2019).

A motilidade espermática é um requisito fundamental para que o espermatozoide alcance o óvulo, e sua baixa taxa é um fator limitante para a fertilidade (Ali; Khatun, 2026). Por isso, para uma avaliação completa do sêmen, a vitalidade espermática é analisada em conjunto. Essa avaliação permite determinar a porcentagem de espermatozoides vivos e mortos, confirmando a integridade da membrana celular. Em nossos estudos, animais da linhagem C57/BL6 e geneticamente modificados não apresentaram alterações tanto de motilidade quanto de vitalidade.

A morfologia dos espermatozoides é um indicador essencial de sua saúde e qualidade, e diversos defeitos podem ocorrer durante o processo de maturação no epidídimo e após a ejaculação. Nesse contexto, as anomalias na cabeça do espermatozoide são consideradas defeitos graves, pois a ausência de material genético os torna inférteis. Essas células, que aparecem como filamentos soltos no ejaculado, estão associadas a quadros de baixa fertilidade e até esterilidade em altas porcentagens. A ocorrência de cabeças soltas pode ser de natureza permanente, resultado de alterações congênitas ou genéticas, ou transitória, causada por fatores ambientais ou patológicos (Almeida et al., 2022).

Além dos defeitos de cabeça, outras anomalias podem ocorrer em diferentes estruturas do espermatozoide. A gota citoplasmática distal, por exemplo, forma-se no final da maturação espermática e pode indicar uma disfunção epididimária. Em contraste, a pseudogota é uma anomalia rara, caracterizada por um espessamento denso e irregular na peça intermediária que pode ser confundida com a gota citoplasmática (Blom, 1973). Já os defeitos de cauda apresentam diferentes causas. A cauda dobrada é frequentemente causada por estresse ou por um choque térmico. A cauda enrolada pode ser leve, aparecendo após a ejaculação ou o transporte da amostra, ou ser fortemente enrolada, um defeito mais grave de caráter hereditário, que está associado a altos teores de zinco. Por fim, a inserção errada, uma falha na implantação da peça intermediária, pode afetar significativamente a fertilidade em alta porcentagem (Araújo et al., 2025).

Considerando a complexidade dessas anomalias, a investigação de fatores imunológicos torna-se fundamental. Clinicamente, observa-se que o IFN- $\gamma$  é encontrado em concentrações normais em sêmenes férteis ( $3,68 \pm 0,30$  fmol/ml), mas eleva-se significativamente no grupo infértil ( $6,36 \pm 0,72$  fmol/ml;  $P < 0,002$ ) (Paradisi et al., 1996). Nesse sentido, a literatura aponta que a presença de interferon-gama causa danos à espermatozóide, seja por mecanismos que afetam as células de suporte ou por processos de supressão molecular que comprometem a qualidade seminal. Evidências indicam que a citocina induz ferroptose nas células de Sertoli, as principais células de suporte e nutrição da espermatozóide (Chiu et al., 2024). A aplicação de modelo knockout para essa citocina permite investigar se a ausência do IFN- $\gamma$  pode ter um efeito protetor (Sharkey et al., 2018). Em termos de intervenção, o tratamento com anticorpos IFN- $\gamma$  ou o uso de inibidores JAK, como o Filgotinib, mostra-se uma via promissora para restaurar a qualidade seminal em contextos inflamatórios (Chiu et al., 2024; Reinisch et al., 2023). Por fim, conforme demonstrado por Lei et al. (2021), a perda da galectina-3 em camundongos resultou em atrasos na espermatozóide e maior taxa de apoptose testicular. Esses achados indicam que a galectina-3 é essencial para a manutenção da saúde testicular, agindo de forma protetora para prevenir a morte celular e assegurar o desenvolvimento normal do processo reprodutivo.

## 7 CONCLUSÃO

A análise comparativa entre os grupos experimentais evidenciou que os camundongos C57BL/6, TLR-3<sup>-/-</sup> e Gal-3<sup>-/-</sup> apresentaram diferentes tipos de anomalias espermáticas, ao passo que os animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> não exibiram alterações morfológicas detectáveis. Esses resultados indicam que a deleção do gene IFN- $\gamma$  pode estar relacionada à manutenção da integridade estrutural dos espermatozoides, sugerindo um possível papel desta citocina como moduladora negativa da qualidade espermática. Dessa forma, investigações futuras acerca dos mecanismos imunorregulatórios envolvidos na espermatozóide e sua influência sobre a fertilidade masculina devem ser conduzidas para melhor elucidar tais achados.

## REFERÊNCIAS

- AKSOY, E. et al. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. **Int J Morphol**, v. 30, n. 4, p. 1544-1550, 2012.
- ALI, M. Y.; KHATUN, A. Sericin in semen cryopreservation: A review of its potential and challenges. **Veterinary Integrative Sciences**, v. 24, n. 1, e2026019, 2026. DOI: 10.12982/VIS.2026.019.
- ALMEIDA, S. M.; SEVERO, N. C. Morfologia espermática em touros: quais os principais defeitos e o porquê ocorrem. In: REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL, 6., 2022, **Anais da VI Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal**. Campinas: Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2022. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.010.
- ARANCIBIA SA, BELTRÁN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F, HERMOSO MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**. 2007;40(2):97-112. doi: 10.4067/s0716-97602007000200001. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18064347.
- ARAÚJO, A. A.; KEHL, E. C.; SILVA, I. L. M.; LEITÃO, I. P. A.; TONIOLLI, R. Morfologia e patologias espermáticas em mamíferos domésticos. **Ciência Animal**, v. 35, n. 2, p. 96-119, 2025.
- ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abr./jun. 2011.
- ASSMANN, T. S., BRONDANI, L. DE A., BOUÇAS, A. P., CANANI, L. H., & CRISPIM, D. (2015). Toll-like receptor 3 (TLR3) and the development of type 1 diabetes mellitus. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 59(1), 4–12. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000003>
- Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliott EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, Flavell RA, Liskay RM. Camundongos machos com deficiência no gene de reparo de incompatibilidade de DNA PMS2 apresentam sinapses cromossômicas anormais na meiose. **Cell**. 1995;82(2):309–319. doi: 10.1016/0092-8674(95)90318-6.
- BANKS, W.J. Sistema reprodutor masculino. In: BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, p.546-564, 1992.
- BARROS, J.B.G. de. Análise morfológica do testículo e espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, Diagnóstico e Controle de Doenças; Epidemiologia e Controle de Qualidade de Produtos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.25, n.7, p.383-339, 1973.

BRYANT, C. D. (2011). The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1245(1), 31–33. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06325.x

CARVALHO, TAIS H. F. DE; LOPES, OSWALDO U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. Ribeirão Preto, **X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, v. 39, n. 1, p. 110-116, jan./mar. 2006. Capítulo XI.

CHIU, P. C. N. et al. P-015 Impaired spermatogenesis in colitis: the role of interferon- $\gamma$  mediated ferroptosis in sertoli cells by colitic CD4+ T cells. **Human Reproduction**, v. 39, 2024. DOI: 10.1093/humrep/deae108.394.

COOKE, HOWARD J, AND PHILIPPA T K SAUNDERS. "Mouse models of male infertility." **Nature reviews. Genetics** vol. 3,10 (2002): 790-801. doi:10.1038/nrg911

DING, H.; WANG, G.; YU, Z.; SUN, H.; WANG, L. Role of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and IFN- $\gamma$  receptor 1/2 (IFN $\gamma$ R1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN- $\gamma$ -dependent or independent pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 155, p. 113683, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113683>.

EBIOMEDICINE. "The 3Rs of Animal Research." **EBioMedicine** vol. 76 (2022): 103900. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103900.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J. L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 23-32, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.034.

FERNANDES, M.R., PEDROSO, A.R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Rev Assoc Med Bras** (1992). 2017 Nov;63(11):923-928. doi: 10.1590/1806-9282.63.11.923. PMID: 29451652

FONTAINE DA, DAVIS DB. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. **Diabetes**. 2016 Jan;65(1):25-33. doi: 10.2337/db15-0982. PMID: 26696638; PMCID: PMC4686949.

GANEVA, R.; PARVANOV, D.; VELIKOVA, D.; VASILEVA, M.; NIKOLOVA, K.; STAMENOV, G. Morfologia espermática e fragmentação do DNA após seleção da zona pelúcida. **Reprodução e Fertilidade**, v. 2, n. 3, p. 221-230, 2021. DOI: 10.1530/RAF-21-0041.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1999.

HALL B, LIMAYE A, KULKARNI AB. Overview: generation of gene knockout mice. **Curr Protoc Cell Biol.** 2009 Sep;Chapter 19:Unit 19.12 19.12.1-17. doi: 10.1002/0471143030.cb1912s44. PMID: 19731224; PMCID: PMC2782548.

HOLSTEIN AF, SCHULZE W, DAVIDOFF M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reprod Biol Endocrinol.** 2003;1:107. Published 2003 Nov 14. doi:10.1186/1477-7827-1-107

HSU DK, YANG RY, PAN Z, YU L, SALOMON DR, FUNG-LEUNG WP, LIU FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am J Pathol.** 2000 Mar;156(3):1073-83. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64975-9. PMID: 10702423; PMCID: PMC1876862.

KIANI, AYSHA KARIM, et al. "Ethical considerations regarding animal experimentation." **Journal of preventive medicine and hygiene** vol. 63,2 Suppl 3 E255-E266. 17 Oct. 2022, doi:10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2768.

KNOBLAUGH, S.E.; TRUE, L.; TRETIAKOVA, M.; HUKKANEN, R.R. Male reproductive system. In: TREATING, P.M.; DINTZIS, S.M.; MONTINE, K.S. (Ed.). **Comparative anatomy and histology**. 2. ed. London: Academic Press, 2018. p. 335-363. ISBN 9780128029008.

Krinke, GJ; Weber, K. Capítulo 2.3 — Histologia. Em **The Laboratory Mouse** , 2<sup>a</sup> ed.; Hedrich, HJ, Ed.; Academic Press: Boston, MA, EUA, 2012; pp. 161–192.

LAFOLLETTE H. Ética na prática: uma antologia , 4<sup>a</sup> ed. Nova York: Wiley & Sons; 2020.

LEI, T. et al. Targeted disruption of galectin 3 in mice delays the first wave of spermatogenesis and increases germ cell apoptosis. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 78, n. 7, p. 3621–3635, 2021. DOI: 10.1007/s00018-021-03757-2.

MARTINEZ, G. et al. Herança heterozigótica oligogênica de anormalidades espermáticas em camundongos. **Elife**, v. 11, e75373, 2022.

MARTINS, Carlos Frederico; DODE, Margot Alves Nunes; SILVA, Antônio Emídio Dias Feliciano (ed.). Atlas de morfologia espermática bovina. Brasília, DF: **Embrapa**, 2016. 100 p.

MATTA, S.L.P.; OLIVEIRA, J.A.; NEVES, C.A.; NEVES, M.M.; ROCHA, J.S. Morfologia e morfometria testicular de camundongos adultos submetidos a exposição crônica ao arsenato. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.

MEKADA K, YOSHIKI A. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. **Exp Anim.** 2021 May 13;70(2):145-160. doi: 10.1538/expanim.20-0158. Epub 2021 Jan 14. PMID: 33441510; PMCID: PMC8150240.

MONTEIRO, G. A.; RAMIRES, C.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; OLIVEIRA, L. Z.; AQUA, C. P. F. D.; HARTWIG, F. P.; PAPA, P. M.; PANTOJA, J.; SILVA, D. F.; PAPA, F. O. Efeito da adição de plasma seminal oriundo de animais de alta e baixa fertilidade na

criopreservação de espermatozoides da cauda do epidídimo e do ejaculado de garanhões subférteis. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 752-760, 2019. DOI: 10.1590/1678-4162-10234

NEJSUM, L. N. et al. Systemic LPS induces toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptosis in testicular mouse tissue. **Cell and tissue research**, v. 378, n. 1, p. 143–154, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03022-w.

Newton S, Aguilar C, Bowl MR. C57BL/6-derived mice and the *Cdh23<sup>ahl</sup>* allele - Background matters. *Hear Res*. 2025 Jun;462:109278. doi: 10.1016/j.heares.2025.109278. Epub 2025 Apr 10. PMID: 40305983.

OLIVEIRA, M. A. P. DE . et al.. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 83–88, mar. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6. ed. Geneva: World Health Organization, 2021

PAIRA, D. A. et al. Interferon  $\gamma$ , IL-17, and IL-1 $\beta$  impair sperm motility and viability and induce sperm apoptosis. **Cytokine**, v. 152, p. 155834, 2022. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155834.

PANG J, RHODES DH, PINI M, et al. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. **PLoS One**. 2013;8(2):e57915. doi:10.1371/journal.pone.0057915

PARADISO, R. et al. Increased levels of interferon-gamma in seminal plasma of infertile men. *Andrologia*, v. 28, n. 3, p. 157–161, 1996. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1996.tb02775.x.

PHILLIPS BT, GASSEI K, ORWIG KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2010;365(1546):1663-1678. doi:10.1098/rstb.2010.0026

REINISCH, W. et al. Effects of filgotinib on semen parameters and sex hormones in male patients with inflammatory diseases: results from the phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled MANTA and MANTA-RAY studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 82, n. 8, p. 1049–1058, 2023.

RUSSELL, LONNIE D.; FRANÇA, LUIZ RENATO DE. Building a testis. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 2, p. 129-147, 1995. DOI: 10.1016/S0040-8166(95)80016-6.

RUSSELL, William M. S.; BURCH, Rex L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SCHOENBORN JR, WILSON CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv Immunol**. 2007;96:41-101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2

SHARKEY, D. J. et al. Interferon-gama inibe a indução do fator 2 estimulador de colônias no plasma seminal em células epiteliais do trato reprodutivo de camundongos e humanos. **Biologia da Reprodução**, v. 99, n. 3, p. 514-526, set. 2018. DOI: 10.1093/biolre/iy071.

SILVA, Anderson Arnaldo da. A infecção pelo vírus Zika causa alterações morfológicas testiculares e espermáticas em camundongos balb/C adultos. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SOARES, C. M. T.; MACHADO-NEVES, M. O papel da gota citoplasmática na funcionalidade de espermatozoides em mamíferos: uma revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 44, n. 3, p. 83-88, jul./set. 2020.

SOARES, MILENA BOTELHO PEREIRA; CARVALHO, LAIN CARLOS PONTES DE; SANTOS, RICARDO RIBEIRO DOS. Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados: Uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, maio/jun. 2001.

TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol**. 2005 Jan;17(1):1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186. PMID: 15585605.

TANGA, B. M. et al. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. **Animal Bioscience**, v. 34, n. 8, p. 1253-1270, ago. 2021. Disponível em: doi:10.5713/ab.21.0072. Acesso em: 17 ago. 2025.

THE JACKSON LABORATORY. Strain 005217. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 2025. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/005217>. Acesso em: 3 ago. 2025.

THE JACKSON LABORATORY. Strain Data Sheet: B6 Body Weight Chart (000664). Bar Harbor, ME. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>. Acesso em: 10 ago.2025.

Toshimori K, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Saxena DK. Comprometimento da espermatogênese levando à infertilidade. **Anat Sci Int**. 2004;79(3):101–111. doi: 10.1111/j.1447-073x.2004.00076.x.

VASUDEVAN K, RABER J, SZTEIN J. FERTILITY comparison between wild type and transgenic mice by in vitro fertilization. **Transgenic Res**. 2010;19(4):587-594. doi:10.1007/s11248-009-9336-2.

VIEIRA, C. P. et al. Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol. **Tissue and Cell**, v. 89, 2024. Artigo n. 102463. ISSN 0040-8166.

Wang T, Zhang X, Chen Q, Deng T, Zhang Y, Li N, Shang T, Chen Y, Han D. Toll-like receptor 3-initiated antiviral responses in mouse male germ cells in vitro. **Biol Reprod**. 2012 Apr 12;86(4):106. doi: 10.1095/biolreprod.111.096719. PMID: 22262694.

XU, Ming; XU, Hongzhi; CHEN, Jian; CHEN, Chunjui; XU, Feng; QIN, Zhiyong. Generation of conditional *Acvrl1* knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 37, p. 32-38, 2018. DOI: 10.1016/j.mcp.2017.11.003.

ZHANG, C., ADLER, H. J., MANOHAR, S., SALVI, R., SUN, W., YE, M., & HU, B. H. (2022). Galectin-3 protects auditory function in female mice. **Hearing research**, 424, 108602. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108602>

ZIRKIN, B. R. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 9, n. 4, p. 417-421, 1998.

ZORZETTO, Júlio Cezar. Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.