

## Efeitos da manipulação neonatal sobre a fertilidade de ratos machos

### Effects of neonatal handling on the fertility of male rats

*Mariana Nicolielo<sup>1</sup>, Suzana de Fatima Paccola Mesquita<sup>1</sup>, Beatriz Thiemi Michiyori<sup>1</sup>, Elaine Regina da Silva<sup>1</sup>, Mainara Ferreira Barbieri<sup>1</sup>, Marianne Orlandini Klein<sup>1</sup>, Isabel Cristina Cherici Camargo<sup>2</sup>*

---

#### Resumo

Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da manipulação neonatal na fertilidade de ratos machos adultos. Os filhotes foram separados de suas mães e submetidos a estímulos tácteis do primeiro ao décimo quarto dia de vida pós-natal: o número de espermátides maduras e a produção diária de espermatozóides foram calculados em homogeneizados dos testículos e das caudas dos epidídimos. Os ratos adultos submetidos à manipulação neonatal foram acasalados com fêmeas normais para observar sua capacidade de fertilização. Os resultados mostraram que a manipulação neonatal diminuiu o peso do epidídimo e reduziu a produção diária de espermatozóide e o número de espermátides maduras. Apesar destes efeitos deletérios no reprodutor masculino, os animais manipulados não reduziram sua capacidade de fertilização, visto que o número de descendentes obtidos do acasalamento de machos manipulados com fêmeas normais não foi reduzido quando comparado aos animais controles.

**Palavras-chave:** estresse, manipulação neonatal, fertilidade.

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of neonatal handling on fertility of adult male rats. The pups were separated from their mothers and submitted to 1 min of tactile stimulation from the 1st to the 14th day after delivery: number of mature spermatis, the daily sperm production were

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Londrina – PR, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis-São Paulo, Brasil

estimated in homogenates from testes and caud epididymis. The adult rats submitted to neonatal handling were mated with normal female to observe their fertilizing capacity. Results showed that neonatal handling decreased epididymis weight and reduced the daily sperm production and the number of mature spermatids. Despite this deleterious effects on male reproduction, the animals handled did not reduce their fertility capacity, since the number of offspring obtained from the mating of handled rats with normal female was not reduced when compared to the control animals.

**Key words:** Stress, neonatal handling, fertility.

---

## INTRODUÇÃO

Muitas formas de estresse podem afetar a fertilidade masculina e a reprodução.

A literatura mostra que em ratos adultos ocorre um déficit na performance sexual em resposta a estímulos estressores aplicados durante as duas primeiras semanas de vida<sup>(1-3)</sup>. Neste período, em mamíferos, a mãe é a fonte nutricional do recém-nascido (RN), no entanto, a relação RN-mãe vai além das necessidades nutricionais. A mãe é quem estimula o desenvolvimento pós-natal proporcionando um ambiente que influenciará nas respostas metabólicas durante toda a vida, tanto nos animais como em seres humanos<sup>(5-8)</sup>.

Modelos experimentais com roedores demonstram que a exposição ao estresse durante o período neonatal ou logo após o desmame (21 dias) podem alterar permanentemente o sistema nervoso assim como as reações comportamentais no rato adulto<sup>(9,10)</sup>. Dessa forma, a privação da mãe pode ser um fator estressante durante o início da vida.

Diferentes modelos experimentais são propostos para análise dos efeitos do estresse neonatal em roedores: manipulação neonatal<sup>(11)</sup>; separação materna de curta ou longa duração<sup>(12-15)</sup>.

Os efeitos da manipulação neonatal se manifestam tanto em animais do sexo masculino quanto feminino, embora apresentem maior magnitude nas ratas<sup>(1,2)</sup>. De acordo com os autores, ocorrem lesões cerebrais decorrentes do estresse no período neonatal, que causam um desbalanço na liberação de hormônios sexuais, repercutindo diretamente sobre o seu interesse sexual e a capacidade de procriação. Em trabalhos preliminares, Lucion *et al.*<sup>(16)</sup> observou que os machos quase não perseguem as fêmeas na época da ovulação, montam menos nas parceiras, ejaculam pouco e a sua produção de espermatozóide se reduz. Raineki<sup>(17)</sup> mostrou que ratas manipuladas no período neonatal apresentam uma menor concentração plasmática de estradiol no proestro, o que provavelmente estaria interferindo no mecanismo de retroalimentação positivo do estradiol sobre os neurônios GnRH.

Nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, os níveis basais de CRF (fator liberador de corticotrofina) no hipotálamo, do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da concentração plasmática de corticosterona são particularmente baixos, pois o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) está normalmente quiescente.

Este período, quando a resposta da adrenal ao estresse é mínima ou inexistente, tem sido denominado como Período Hiporresponsivo ao Estresse (SHRP). A não ativação do eixo HHA, nesse período, tem sido atribuída à retro alimentação negativa do corticosterona sobre o hipotálamo<sup>(18)</sup>.

O objetivo deste estudo foi investigar se a manipulação neonatal aplicada em filhotes machos de ratos interfere na fertilidade dos machos adulto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizadas 10 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) prenhes, provenientes do Biotério do CCB da UEL. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em dez filhotes (machos). Aos 21 dias de vida os animais foram desmamados e mantidos em caixas, com no máximo cinco animais, até a idade adulta.

### *Estimulação Neonatal*

*Não-manipulados (controle)*: animais que não sofreram qualquer tipo de manipulação. Apenas receberam os cuidados padrão de manejo para criação de animais de laboratório.

*Manipulados (experimental)*: os animais foram retirados da caixa por 20 minutos e gentilmente manipulados por um minuto, do 1º ao 14º dia de vida pós-natal (Figura 1), sempre no mesmo horário. Os filhotes machos após o desmame (21 dias) foram alojados em caixas com no máximo 5 animais.



**Figura 1.** Filhote macho sendo manipulado.

### *Acasalamento*

Aos 100 dias de vida, todos os animais foram acasalados com fêmeas sexualmente maduras, durante 15 dias (3 ciclos estrais) para análise do produto da gestação, na proporção de 1 macho para 2 fêmeas (1:2). Os filhotes resultantes do acasalamento foram contados e pesados.

### *Variáveis Analisadas*

Ao final do acasalamento os animais foram pesados e sacrificados através de overdose de anestésicos (Ketamina e Xilazina). Os testículos e epidídimo (cauda) foram coletados e pesados. O número de espermatozoides foi estimado pela contagem de cabeças de espermátides em homogeneizados diluídos do parênquima testicular e epididimário (cauda)<sup>(19)</sup>. Realizou-se a homogeneização em homogeneizador, utilizando-se como diluente a solução S.T.M. (Salina + Triton X-100 + Mertiolate) e a contagem foi efetuada em câmaras hemocitométricas do tipo Neubauer. Obteve-se a produção diária de espermatozoide (PDE) pela divisão do número total de espermátides contadas em cada órgão por 6,1 dias. O número de espermatozoides por grama de órgão foi calculado pelo número de espermatozoides encontrados tanto no testículo quanto no epidídimo dividido pelo peso do respectivo órgão.

### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos por Média  $\pm$  Erro padrão da média ( $\pm$  EPM). Os dados foram analisados através do teste *t* de Student, para amostras independentes. O nível de significância utilizado para os testes foi de 0,05 ( $\alpha=0,05$ ).

## RESULTADOS

Os dados das massas relativa e absoluta dos testículos, assim como a massa corpórea do animal, são mostrados na tabela 1. Não houve variação significativa em tais mensurações entre os grupos controle e experimental. No entanto, a produção diária de espermatozóides e o número de espermátides maduras estavam reduzidos nos testículos dos animais manipulados no período neonatal.

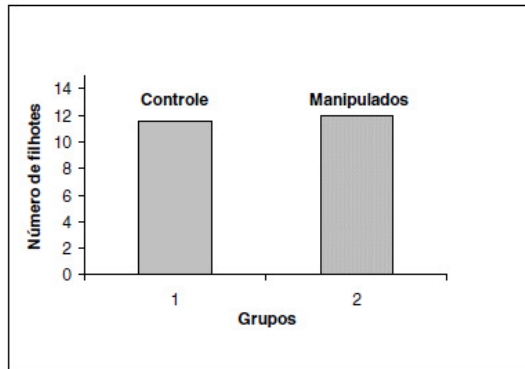
O peso absoluto e relativo da cauda epididimária foram significativamente menores nos ratos púberes submetidos à manipulação neonatal quando comparadas ao grupo controle. O número de espermatozóides foi reduzido cerca de 43% na cauda do epidídimo nos animais manipulados.

Apesar da redução no número de espermatozóides, os animais foram capazes de procriar. Os resultados dos acasalamentos (Figura 2) não mostraram diferenças significativas no número de filhotes nascidos do acasalamento de ratos adultos submetidos à manipulação neonatal com fêmeas normais.

**Tabela 1.** Peso corporal, parâmetros testiculares e epididimários de ratos manipulados e não-manipulados neonatalmente. Os dados são expressos por Média  $\pm$  Erro padrão da média ( $\pm$  EPM). Teste *t* de Student ( $\alpha=0,05$ ).

Parâmetros	Controle	Manipulados
Peso corporal (g)	417 $\pm$ 37,67	425 $\pm$ 40,30
Testículo		
Peso absoluto (g)	1,70 $\pm$ 0,13	1,65 $\pm$ 0,10
Peso relativo (g/100g p.c.)	0,40 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,03
N.º. Espermatozóides ( $10^6$ )	133,55 $\pm$ 7,64	99,74 $\pm$ 15,10*
Produção diária de espermatozóide (PDE)	21,89 $\pm$ 1,25	16,34 $\pm$ 2,47*
Cauda do epidídimo		
Peso absoluto (g)	0,27 $\pm$ 0,017	0,19 $\pm$ 0,005*
Peso relativo (g/Kg p.c.)	0,64 $\pm$ 0,081	0,45 $\pm$ 0,046*
N.º. Espermatozóides ( $10^6$ )	266,72 $\pm$ 52,76	150,86 $\pm$ 59,17

\*  $\alpha < 0,05$



**Figura 2.** Número de filhotes nascidos de pais não-manipulados e manipulados neonatalmente.

## DISCUSSÃO

O período neonatal é crítico ao desenvolvimento do organismo, pois processos como migração celular, proliferação, diferenciação e alguns sistemas de neurotransmissão de excitação e inibição alcançam a maturidade<sup>(20,21)</sup>. Esse período caracterizado pela quiescência do eixo HHA em causar aumento de corticosterona por influências externas (Período Hiporesponsivo = SHRP) é encontrado somente em roedores e pode prevenir e adequar respostas do eixo às atividades futuras<sup>(14,22,18)</sup>.

Além da separação materna, os animais foram, no presente estudo, acariciados durante o período SHRP. Isso alterou alguns parâmetros reprodutivos dos animais experimentais em relação aos controles.

Embora a magnitude da resposta ao estresse seja diferente, a liberação de corticosterona é influenciada pelos esteróides sexuais tanto nos neonatos como no adulto<sup>(22)</sup>.

Estudos recentes têm mostrado que a manipulação neonatal diminui o comportamento sexual, tanto de ratos machos como de fêmeas<sup>(1,2)</sup>. Além disso, as fêmeas que sofreram esta intervenção apresentaram significativa diminuição de ovulação, sendo que a maioria delas apresentou ciclos anovulatórios, diminuição do comportamento sexual e redução de FSH e LH no proestro<sup>(3)</sup>.

Nossos resultados estão de acordo com os de Mazaro e Lamano-Carvalho<sup>(4)</sup> que observaram, sob as mesmas condições experimentais, marcada redução no número de espermátides maduras e na produção diária de espermatozóides nos animais experimentais.

Segundo França e Chiarini-Garcia<sup>(23)</sup> a célula de Sertoli possui capacidade de suporte para células germinativas relativamente fixa para cada espécie, por isso, a taxa de produção espermática já está estabelecida durante o período de proliferação da célula de Sertoli. No período em que foi realizado este experimento, as células de Sertoli encontravam-se na fase de proliferação que é controlada por vários fatores incluindo os hormônios hipofisários e fatores intratesticulares.

O principal fator mitogênico para as células de Sertoli é o FSH<sup>(24,25)</sup>. Não encontramos na literatura se a manipulação neonatal afeta a liberação imediata de FSH, mas esta hipótese não pode ser desprezada, pois caso tenha havido supressão dos níveis de FSH neste período, o número de células de Sertoli pode estar reduzido com conseqüente alteração na produção espermática. A redução no número de núcleos de células de Sertoli foi observada por Mazaro e Lamano-Carvalho<sup>(4)</sup> em associação à redução do peso testicular e do número de espermatozóides em animais púberes submetidos à manipulação neonatal.

A diferenciação do epitélio seminífero inicia-se na segunda semana de desenvolvimento pós-natal<sup>(26)</sup>. O epidídimo



transporta e armazena os espermatozoides e a manutenção de sua função está sob regulação hormonal de andrógenos testiculares e seus metabólitos<sup>(26,27)</sup>. Uma das substâncias importantes para a função do epidídimo é a proteína ligadora de andrógeno (ABP) a qual é secretada no fluído epididimário pelas células de Sertoli. Esta proteína garante o transporte de testosterona até o epidídimo<sup>(28)</sup>. Considerando que o processo espermatogênico, nos animais adultos, está sob controle da testosterona sugerimos que a redução significativa no número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, aqui observada, pode ter sido decorrência de uma redução no número de células de Sertoli. Esta redução foi acompanhada pela redução na produção de ABP o que pode ter causado o déficit espermático.

No entanto, apesar da redução espermática aqui observada, os animais manipulados não foram inférteis quando adultos. Mesquita e Hayashi<sup>(28)</sup> demonstraram que animais pré-púberes, monorquídeos e submetidos, ainda, a 25% de ressecção testicular apresentaram capacidade reprodutiva normal quando adultos. Dessa forma, pode-se sugerir que a redução no número de espermatozoides não foi suficiente para impedir os animais submetidos à manipulação neonatal de apresentarem capacidade de procriação quando adultos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomes CM., Frantz PJ., Sanvitto GL., Anselmo-Franci JA., Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res*, 32(10): 1239-1242, 1999.
2. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci*, 115(6): 1332-1340, 2001.

3. Bregeiron MK, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL, Sanavitto GL. Efeitos da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor masculino de ratos adultos. In: *Congresso de Integração em Biologia da Reprodução*, Ribeirão Preto, 2003. Resumos. Ribeirão Preto, 2003. CD-ROM.
4. Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Prolonged deleterious effects of neonatal handling on reproductive parameters of pubertal male rats. *Reprod Fertil Dev*, 18: 497-500, 2006.
5. De Bellis MD, Keshavan MS, Clark DB, Casey BJ, Giedd JN, Boring AM, Frustaci K., Ryan ND. Brain development. *Biol Psychiatry*, 45: 1235-6, 1999.
6. Teicher MH. Wounds that time won't heal: the neurobiology of child abuse. *Cerebrum*, 2: 50-67, 2000.
7. Pryce C R, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, 27: 57-71, 2003.
8. Lucion MK, Raineki C, Barp J, Belló-Klein A, Anselmo-Franci J, Franci CR. *Efeito da manipulação neonatal sobre a produção hipotalâmica de óxido nítrico (NO) em ratas em diferentes fases do ciclo estral*. Pró-Reitoria de pesquisa – ProPesq. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2003.
9. Hall FS. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol*, 12: 129-162, 1998.
10. Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 26: 457-470, 2002.
11. Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobena A, Battig K. Infantile (handling) stimulation and behavioral in young roman high – and – low avoidance rats. *Physiol Behav*, 50: 563-565, 1991.
12. Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny, IJ, Tatarewicz JE, Sapolsky, RM. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci*, 99: 765-770, 1993.

13. Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KM, Takahashi K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 961-967, 1994.
14. Pham TM, Söderstrom S, Henriksson BG, Mohammed AH. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growthfactor. *Behav Brain Res*, 86: 113-120,1997.
15. Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol*, 405: 149-160, 2000.
16. Lucion AB, Cadore LP, Charchat H, Barros HMT, Padoin MJ. Effects of noxious stimulation during the stress-hypo-responsive period on behaviors of pre-pubertal and adult male and female rats. *27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 1997.
17. Raineki C. et al. Estradiol and progesterone plasma levels throughout the estrous cycle in neonatal handled rats. *J Endocrinol*, 2002.
18. Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav*, 73: 255-260, 2001.
19. Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert*, 54: 103-7, 1978.
20. González AS, Rodrigues Echandía EL, Cabrera R, Fóscolo MR, Fracchia LN. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim and endocrine responses. *Physiol Behav*, 47: 735-741, 1990.
21. González AS, Rodrigues Echandía EL, Cabrera R, Fóscolo MR. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. II. Effects on estrous cycle in females. *Physiol Behav*, 56: 591-595, 1994.
22. Mc Comick CM, Furey BF, Child M, Sawyer MJ, Donohue SM. Neonatal sex hormones have "organizational" effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of male rats. *Dev Brain Res*, 105: 295-307, 1998.

23. França LR, Chiarini-Garcia H. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzato, CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Manole: São Paulo, p. 302-324.
24. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds., E. Knobil and J.D. Neill. New York: Raven Press, pp. 1363-1434, 1994.
25. Sharpe RM, McKinnel C, Kivlin C, Fisher S. Proliferative and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125: 769-784, 2003.
26. Robaire B, Syntin P, Jervis K. The coming of age of epididymis. In: Jigon B, Pineau C, Sag J. Eds. Testis, epididymis and technologies in the year 2000. Chapt 14. Springer, Ernest Acherer Research Foundation. *Workshop Supplement*, 6: 229-62, 2000.
27. Pastor-Soler N, Inard-Bagnis C, Herok -Kramberger C, Sabolic I, Van Hoek A, Brown D, Breton S. Expression of Aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biol Reprod*, 66: 1716-22, 2002.
28. Suzana FPM, Hayashi H. *Índice de fertilidade de ratos pré-púberes monorquídeos em relação ao volume do parênquima testicular preservado*. Tese de Mestrado. UNIFESP, São Paulo, 1983.