

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool-Stage

Title: Efeitos do Estresse Térmico na Espermatogênese de Camundongos Pré-Púberes: Aspectos Celulares e Epigenéticos

Creator: Gláucia Helena Ferreira

Affiliation: Universidade Federal de São Paulo (unifesp.br)

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Template: Digital Curation Centre

Project abstract:

O efeito deletério do estresse térmico na fertilidade animal é um problema multifatorial, afetando tecidos e células do sistema reprodutor em mamíferos. No sistema reprodutor masculino, o estresse térmico compromete a espermatogênese afetando negativamente a morfologia, a cinética, e a capacidade fecundante do espermatozoide, induzindo ao estresse oxidativo e aos danos no DNA, entre outras alterações celulares e moleculares. Existem evidências de que a exposição de animais púberes a diferentes condições de estresse durante a espermatogênese causa alterações epigenéticas imediatas e transgeracionais no gameta masculino. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos imediatos e/ou tardios do estresse térmico em animais pré-púberes. Desta forma, este projeto visa determinar: 1) os efeitos do estresse térmico aplicado em camundongos machos pré-púberes e avaliado nos períodos pré-púbere (efeito imediato) e púbere (efeito tardio) sob aspectos morfofisiológicos, hormonais, epigenéticos e bioquímicos das células testiculares e dos espermatozoides; 2) os efeitos tardios do estresse térmico em camundongos pré-púberes sob a fertilidade destes animais. Para tanto, casais da linhagem CD1-Suíço serão utilizados para obtenção de ninhadas. No 10º dia de desenvolvimento pós-natal (P10), as fêmeas lactantes e seus filhotes serão aleatoriamente alojados em câmara climática sob as condições controle (21°C durante o dia todo) e estresse térmico (35°C por 12 horas do período de luz e 21°C por 12 h durante o período escuro) até o 21º dia de desenvolvimento pós-natal (P21). Em seguida, os animais serão mantidos na condição controle até o dia da eutanásia. No primeiro experimento, os camundongos serão eutanasiados nos períodos pré-púbere (P22) e púbere (P90) para coleta de sangue (avaliação dos níveis de testosterona sérica) e dos testículos. Um dos testículos será fixado em 4% (p/v) paraformaldeído visando a quantificação das células testiculares (histologia clássica e Escore de Johnsen), o outro testículo será congelado a -80°C para avaliação dos níveis de testosterona testicular. Exclusivamente no período púbere, os espermatozoides serão coletados do epidídimo para a avaliação da metilação de DNA (imunofluorescência), do perfil funcional (CASA) e bioquímico (Microespectroscopia Raman). Em um segundo experimento, os camundongos serão submetidos ao mesmo modelo de estresse térmico e acasalados com fêmeas controle para avaliação da fertilidade pela coleta de blastocisto no dia 3,5 após o acasalamento e a taxa de gestação.

Start date: 04-16-2020

End date: 04-16-2022

Last modified: 03-05-2021

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Efeitos do Estresse Térmico na Espermatogênese de Camundongos Pré-Púberes: Aspectos Celulares e Epigenéticos

No Experimento 1 – Efeito imediato e tardio do estresse térmico na espermatogênese de camundongos machos pré-púberes, serão coletados os seguintes dados: Peso corporal e testicular; Níveis de testosterona sérica e testicular; Quantificação e qualificação de células da espermatogênese; Níveis de metilação de DNA espermático; Perfil funcional e bioquímico de espermatozoides.

No Experimento 2 – Efeito do estresse térmico em camundongos machos pré-púberes sob a fertilidade, serão coletados os seguintes dados: (Taxa de blastocistos e taxa de gestação)

Expectativa de 3 a 5 réplicas por experimento.

Após os tratamentos os camundongos serão anestesiados, decapitados para coleta de sangue da região do tronco e dissecados para coleta das demais amostras. Assim, os dados serão coletados da seguinte forma:

- **Pesagem corporal:** Os animais serão pesados nos dias 10, 15, 21 de desenvolvimento pós-natal (n= 20 machos/grupo);
- **Pesagem testicular:** Os testículos coletados dos animais eutanasiados serão pesagem em balança analítica (n= 40 testículos/grupo);
- **Níveis de testosterona sérica:** Sangue será coletado da região do tronco do animal e seguirá para avaliação dos níveis de testosterona sérica por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (n= 20 amostras/grupo);
- **Níveis de testosterona testicular:** Os testículos esquerdos serão coletados, congelados e seguirão para avaliação da testosterona testicular por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (n= 20 testículos/grupo);
- **Perfil Bioquímico do espermatozoide:** Os espermatozoides serão coletados da cauda do epidídimo e seguirão para coleta dos espectros das cabeças dos espermatozoides por Espectrometria Raman. Os espectros serão tratados e analisados com o software IgorPro versão 8 (n= 10 espermatozoides/grupo);
- **Perfil Funcional do espermatozoide:** Os espermatozoides serão coletados da cauda do epidídimo e seguirão para avaliação do perfil funcional por *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Os seguintes parâmetros de cinética serão avaliados: velocidade curvilínea (VCL $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade média (VAP $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm) e linearidade (LIN %). Avaliação das imagens será feito no software CASA nova. (n= 20 vídeos /animal/grupo) ;
- **Quantificação e qualificação de células da espermatogênese:** Os testículos direitos coletados serão fixados em paraformoldeído, emblocados em parafina, seccionados e transferidos para uma lâmina de vidro para avaliação da histologia. Serão contabilizados o número de número de espermatogônias, espermátócitos, espermátides, células de Sertoli e Leydig, e avaliadas pelo Escore de Johnsen (n= 10 avaliações/animal/grupo);
- **Níveis de metilação de DNA espermático:** Os espermatozoides serão coletados da cauda do epidídimo, fixados, marcados com anticorpo fluoróforo e avaliados em microscópio de fluorescência. As imagens serão analisadas no programa Image J para a quantificação da intensidade de fluorescência da metilação de DNA por espermatozoide. Será utilizada a ferramenta de marcação circular para delimitar a região de interesse (espermatozoide) e quantificação da fluorescência média e a área total (10 avaliações/animal/grupo);
- **Taxas de blastocisto e gestação:** Fêmeas serão superovuladas e transferidas para gaiolas com um macho. A confirmação do cruzamento será através da observação do tampão vaginal na manhã seguinte, considerado dia 0,5 desenvolvimento embrionário. As fêmeas grávidas serão eutanasiadas no dia 3,5 para a coleta de

blastocistos contabilizados em estereomicroscópio. A taxa de gestação será calculada pelo número de fêmeas gestantes dividido pelo número de fêmeas disponíveis (40 fêmeas/grupo).

Os dados serão submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo método dos quadrados mínimos usando o procedimento *General Linear Models* (GLM) do statistical analysis systems (SAS). As variáveis dependentes e independentes serão estabelecidas de acordo com o delineamento experimental. Os modelos estatísticos usados para os experimentos conterão os efeitos principais.

Os dados serão inseridos em planilhas do programa Excel, em abas específicas, identificadas para cada tratamento, para cada análise realizada. Imagens e arquivamento de lâminas e, caso haja, amostras adicionais para repetir os dados. Posteriormente serão encaminhados para análise estatística em programa específico respectivo a cada análise.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição antes do início da execução, assegurando o cumprimento de todos os critérios de bioética.

Os dados gerados por este projeto serão de propriedade da Instituição Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Porém, estes podem ser disponibilizados para comunidade científica através da disponibilização em bancos públicos, além de artigos científicos publicados em revistas especializadas.

Durante o desenvolvimento do projeto, os dados serão armazenados no sistema de nuvem do Google Drive disponibilizado pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), nos computadores pessoais dos pesquisadores envolvidos, e em cópias armazenadas em um HD externo.

O acesso ao conteúdo será realizado pelos pesquisadores envolvidos no projeto que possuírem a senha de acesso. A senha será disponibilizada para aqueles que tenham legitimado e comprovado interesse nos dados obtidos e solicitado acesso a eles.

Serão armazenados os livros de laboratório e dados processados no projeto. Os dados brutos poderão ser depositados num repositório.

Os dados serão preservados por pelo menos 10 anos a contar do momento Início do projeto.

Os dados serão compartilhados por meio de apresentações em congressos e simpósios, além da publicação de artigos científicos e pelo repositório institucional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os dados estarão acessíveis a todos que tenham interesse científico e possam gerar novas conclusões a partir dos mesmos.

Os pesquisadores envolvidos no projeto serão responsáveis por todos os dados produzidos.

Os recursos necessários para execução deste projeto consistem em amplo acesso a plataformas online que permitam a coleta dos documentos e a conexão com os interessados.
