

INFLUENCIA DEL FOTOPERÍODO SOBRE LA MORFOLOGÍA GONADAL DEL RATÓN (*MUS MUSCULUS*): EFECTO DE LA FALTA DE ALTERNANCIA LUZ/OSCURIDAD*

SALVETTI, N. R.^{1,2}; LUDUEÑA, M. G.^{1,3}; RICCI, N.^{1,2};
LORENTE, J. A.¹; GAPEL, C. M.³ & ORTEGA, H. H.^{1,2}

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar las posibles modificaciones en la estructura gonadal de ratones sometidos a modificaciones extremas en el fotoperíodo (falta de alternancia luz/oscuridad). Un grupo de ratones (n=10) se mantuvo durante 12 semanas en un ambiente con luz continua y otro en un ambiente con oscuridad absoluta. Las gónadas fueron procesadas siguiendo protocolos histológicos de rutina. Los preparados se evaluaron mediante análisis digital de imágenes, efectuando una clasificación de los folículos en los ovarios y analizando el diámetro tubular, la altura del epitelio seminífero y la actividad espermatogénica en los testículos. Los resultados no indicaron variaciones en la morfología gonadal entre los diferentes grupos. Nuestros resultados, en conjunto con los de otros autores indican que el ratón doméstico es insensible a las variaciones del fotoperíodo, por más extremas que sean las mismas.

Palabras clave: fotoperíodo, ratón, ovario, testículo.

SUMMARY

Influences of the photoperiod on the gonad morphology of the mouse (*mus musculus*): effect of the lack of light and dark alternation.

The objective of this work was to study the possible modifications in the gonad structure of mice subjected to extreme modifications of the photoperiod (lack of light and dark alternation). A group of mice (n=10) remained during 12 weeks in an environment with continuous light and another group with absolute darkness. The gonads were processed following routine histological protocols. The slides were evaluated by means of digital images analysis, making a classification of the ovarian follicles and analyzing the tubular diameter, the height of the seminal epithelium and the spermatogenic activity in the testicles. The results didn't indicate variations in the gonads morphology among the different groups. Our results, together with those of other authors indicate that the domestic mouse is insensitive to the variations of the photoperiod.

Key words: photoperiod, mice, ovary, testicle.

1.- Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias,

Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.

2.- Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).

E-mail: bioterio@fcv.unl.edu.ar

3.- Instituto de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).

* Parte de los resultados del presente trabajo corresponden al proyecto "Influencia del fotoperíodo sobre el ciclo del epitelio seminífero en ratones" desarrollado por uno de los autores (Ludueña M.G.) en el marco de una Beca de Iniciación a la Investigación para Estudiantes Universitarios; Programa Cientibeca'99, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

Manuscrito recibido el 27 de marzo de 2001 y aceptado para su publicación el 9 de abril de 2002.

INTRODUCCIÓN

La fotoperiodicidad es la habilidad de plantas y animales para medir la longitud del día (fotoperíodo) en su ambiente. Esto les permite a las distintas especies determinar la estación del año en la que se encuentran y ajustar sus variables fisiológicas, para efectuar adaptaciones estacionales. Aunque el mecanismo preciso que la facilita difiere entre las diferentes taxas, los individuos que responden al fotoperíodo, se valen solamente de dos estímulos fundamentales: las horas de luz por día y el aumento o disminución de las mismas a través de los días (Nelson, 1999).

Este mecanismo ha evolucionado en todas las taxas de plantas y animales que experimentan cambios estacionales en sus ambientes. Dentro de los roedores, por ejemplo, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) representa el modelo más usado en investigaciones de laboratorio sobre fotoperiodicidad. En su hábitat natural, como muchos pequeños mamíferos, son “reproductores en días largos”. La gestación es relativamente corta en estos animales y el apareamiento, la preñez y la lactancia ocurren durante los días largos al final de la primavera y principios de verano (Carter & Goldman, 1983). Por otra parte, la oveja (*Ovis aries*) es otra especie modelo importante en el estudio de la fotoperiodicidad en mamíferos. Tal como otros mamíferos “grandes”, la oveja es “reproductora en días cortos”. En esta especie con períodos de gestación relativamente largos, el apareamiento ocurre típicamente en el otoño y las crías nacen y se amamantan en primavera, cuando la disponibilidad de alimento y otras condiciones ambientales son más favorables para la supervivencia (Ma-thews *et al.*, 1993).

Sin embargo, no todos los mamíferos son influenciados por el fotoperíodo, luego de

algunos intentos no han podido encontrar influencias del mismo sobre el sistema reproductivo del ratón doméstico (*Mus musculus*) (Bronson, 1979). Debido a que el sistema reproductivo no es afectado, esta especie, junto con las cepas de laboratorio de ratas (*Rattus norvegicus*) han sido consideradas tradicionalmente especies no foto-periódicas.

Aunque en la rata (*Rattus norvegicus*) la exposición a un corto fotoperíodo tiene poco o ningún efecto en la respuesta reproductiva (Kinson & Robinson, 1970; Wallen *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1994); la ausencia de alternancia entre luz y oscuridad causa importantes alteraciones en el ciclo estral (Dempsey & Searles, 1943; Maekawa, 1959; Hoffmann, 1967).

En el caso del ratón, no se han encontrado antecedentes sobre los efectos en la morfología gonadal, de la falta de alternancia entre luz y oscuridad, ya que todos los trabajos previos que hemos discutido, han basado sus conclusiones en el cambio de la duración de los períodos de luz y oscuridad. Por lo tanto, el objetivo fundamental de este trabajo fue intentar dilucidar las posibles modificaciones en la estructura gonadal de ratones sometidos a modificaciones extremas en el fotoperíodo, no descriptas en la bibliografía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron ratones, de la cepa Balb/c provenientes del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Los mismos se mantuvieron hasta el inicio de la experiencia, con un ciclo de luz-oscuridad controlado (luces encendidas entre las 6:00 y las 20:00 hs), y a una temperatura de 20-22 °C con libre acceso a agua y balanceado comercial. Como animales experimentales se seleccionaron

hembras y machos púberes, de 12 semanas de edad formándose 3 grupos experimentales de 10 animales para cada sexo:

Grupo C: Animales control, mantenidos en las condiciones ya descriptas.

Grupo L: Animales mantenidos en un ambiente con luz continua.

Grupo O: Animales mantenidos en un ambiente con oscuridad absoluta.

En toda la experiencia se respetaron las normas éticas en el manejo de los animales experimentales siguiendo los principios vigentes en el tema (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – National Research Council, 1996).

Toma y procesamiento histológico de las muestras:

Luego de 12 semanas de experimentación, 5 animales de cada sexo, en cada grupo experimental, fueron anestesiados y sacrificados. Los testículos se disecaron y fijaron en Bouin por un periodo de 12 hs; mientras que los ovarios fueron disecados y fijados en formol al 10% bufferado durante 12 hs a temperatura ambiente. Luego de la fijación, las muestras se lavaron en buffer fosfato salino (PBS), procesándose siguiendo protocolos de rutina para efectuar la inclusión en parafina (Woods & Ellis, 1994).

Se efectuaron cortes seriados de 4 mm de espesor que se montaron en portaobjetos previamente tratados con VECTABOND (Vector Lab. Inc., USA). Como coloración general para el estudio histológico se utilizó la técnica de hematoxilina-eosina.

Evaluación de los preparados:

El análisis de imágenes fue efectuado utilizando el sistema digital Image Pro-Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA), conectada a una PC Pentium III Intel®. Las imágenes fueron generadas a través de una video cámara color Sony CCD-IRIS, conectada a un microscopio

Olympus CH30 con lámpara de tungsteno-halógeno de 12V/30W con fuente de energía estabilizada. Se utilizaron lentes objetivas de 4, 10, 40 y 100 aumentos. El microscopio fue calibrado para lograr una iluminación de tipo Koehler y una imagen de referencia se utilizó para efectuar la calibración espacial y de iluminación.

Los ovarios se evaluaron clasificando los distintos tipos de folículos en desarrollo de acuerdo con el número de células de la granulosa, siguiendo los parámetros propuestos por Pedersen (1970). La clasificación se basa en el tamaño de los ovocitos, el tamaño de los folículos definido por el número de células que lo constituyen y su morfología general. Esto permite dividir a los folículos en tres grandes grupos: pequeños (con ovo-cito menor a 20 μm), medianos (con ovocito entre 20 y 70 μm) y grandes (con ovocito mayor a 70 μm). Estos grupos a su vez fueron subdivididos de acuerdo con el número de células foliculares (Fig. 1).

En los testículos se midió el diámetro tubular y la altura del epitelio seminífero. La actividad espermatogénica fue calculada analizando 100 túbulos seminíferos por preparado y clasificándolos como: a) espermatogénicamente inactivos (túbulos con espermatogonias y células de Sertoli solamente); b) en espermatogénesis temprana (túbulos con espermatogonias y espermatocitos, sin espermátides) y c) en espermatogénesis avanzada (túbulos con espermatogénesis completa y espermato-zoides en la luz) (Bernard & Hall, 1995).

Evaluación Estadística:

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados mediante el programas Statistica 4.5 (Statsoft Inc. USA), utilizando pruebas no-paramétricas (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) (Siegel, 1956).

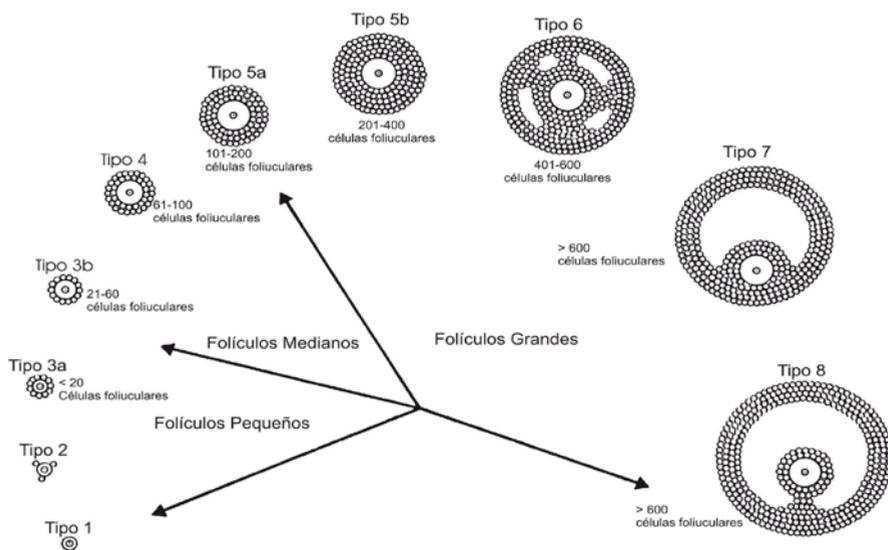


Fig. 1: Clasificación de los folículos ováricos (Adaptado de Pedersen, 1970).

Cuadro 1: Distribución proporcional de los diferentes tipos de folículos en los ovarios: Los datos representan promedio \pm desvío estándar. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p > 0,05$).

	Grupo Experimental		
	Control	Luz	Oscuridad
Folículos pequeños	55,04 \pm 2,00	54,49 \pm 2,88	54,45 \pm 1,25
Folículos medianos	31,28 \pm 3,13	30,43 \pm 3,94	31,48 \pm 3,17
Folículos grandes	13,66 \pm 3,05	15,07 \pm 2,56	14,07 \pm 2,60

RESULTADOS

En los ovarios, se evaluaron los diferentes tipos de folículos, de acuerdo a clasificaciones previamente descripta. Los resultados no indican variación en la morfología de los ovarios en los tres grupos de hembras, encontrándose similar cantidad y proporción de folículos en los diferentes estadios de desarrollo (Cuadro 1, Figs. 2 y 3).

En el análisis histomorfológico se demostró que los testículos de todos los machos eran espermatogénicamente activos,

con más de un 90% de túbulos seminíferos en espermatogénesis avanzada. Esto se evidenció además en el diámetro de los túbulos seminíferos y en la altura del epitelio seminífero, donde no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Cuadro 2).

Histológicamente, en todos los grupos experimentales, los túbulos seminíferos mostraban la presencia de diferentes estadios de la espermatogénesis, correspondientes a un testículo plenamente funcional (Fig. 4).

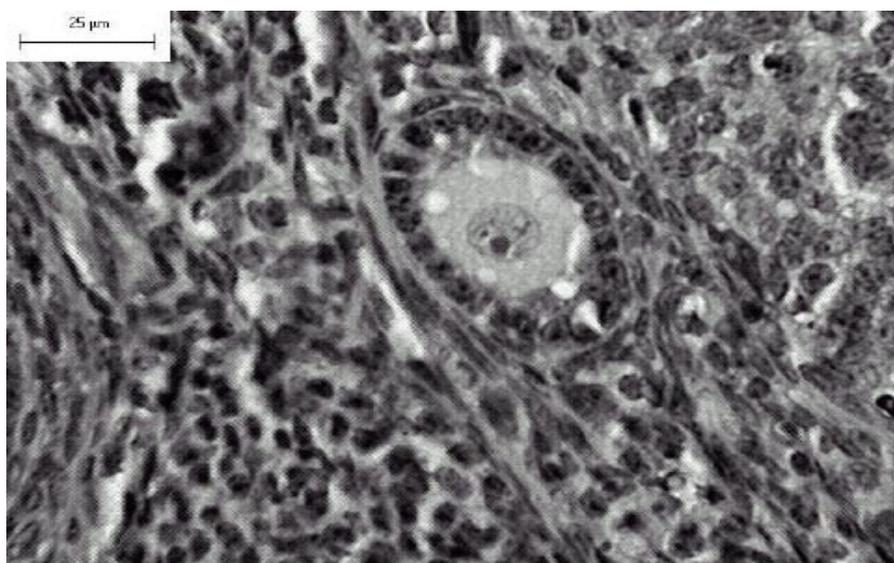


Fig. 2: Características histológicas de un folículo tipo 3b en el ovario de un animal mantenido en condiciones de oscuridad permanente.

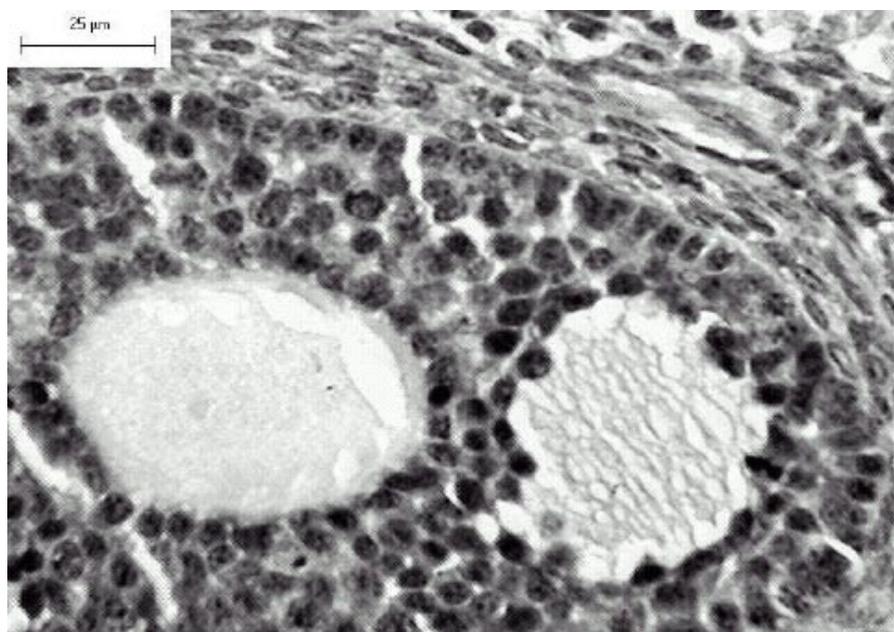


Fig. 3: Características histológicas de un folículo tipo 6 en el ovario de un animal mantenido en condiciones de luz permanente.

Cuadro 2: Resumen de las observaciones efectuadas en los testículos: Los datos representan promedio \pm desvío estándar. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ($p > 0,05$).

	Grupo Experimental		
	Control	Luz	Oscuridad
Diámetro de los túbulos seminíferos (μm)	219,21 \pm 23,27	234,14 \pm 19,16	227,62 \pm 31,15
Altura del epitelio seminífero (μm)	68,33 \pm 11,14	71,91 \pm 8,85	70,64 \pm 12,14
Túbulos seminíferos en espermatogénesis avanzada (%)	95,19 \pm 0,82	94,84 \pm 1,48	95,04 \pm 0,91
Túbulos seminíferos en espermatogénesis temprana (%)	4,81 \pm 0,82	5,16 \pm 1,48	4,96 \pm 0,91

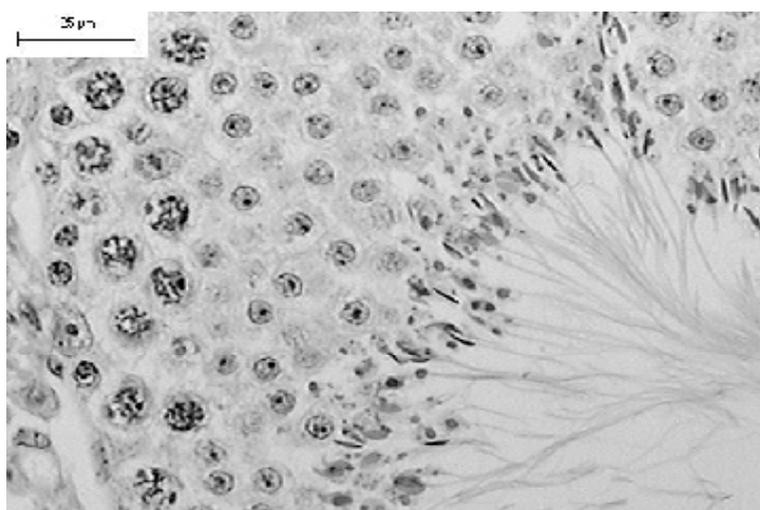


Fig. 4: Epitelio testicular de un ratón mantenido en condiciones de oscuridad permanente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se han reportado variaciones individuales en las respuestas al fotoperíodo en roedores, demostrándose que estas variaciones pueden tener una base genética (Desjardins *et al.*, 1986; Heideman & Bronson, 1991). En distintos géneros de este orden de mamíferos, se han observado respuestas extremadamente diferentes. Por ejemplo, en *Peromyscus maniculatus* (ratón ciervo) se observa un muy marcado patrón estacional, con una estación reproductiva

que comienza en primavera y termina en otoño (Whitsett & Miller, 1982; Moffatt *et al.*, 1993). Este tipo de estacionalidad reproductiva se hace más marcada en el hámster de siberia (*Phodopus sungorus*) que vive en ambientes de alta latitud (Carter & Goldman, 1983; Maywood *et al.*, 1995). Opuestamente a lo que sucede en estas especies, el *Zygodontomys brevicauda*, una especie de ratón silvestre de Venezuela, que habita en ambientes cercanos al ecuador, se reproduce a lo largo de todo el año y se ha demostrado que no es sensible a modi-

ficaciones en la reproducción mediante la manipulación del fotoperíodo (Bronson & Heideman, 1992).

Es importante recalcar que los animales deben convivir con el problema de la variabilidad ambiental y en muchos casos, estas variables se han convertido en factores importantes en los mecanismos de selección natural en el proceso evolutivo.

La selección natural favorece las adaptaciones que causan que la reproducción ocurra en armonía con variables ambientales. Dado que la mayoría de los ambientes explorados por los mamíferos se caracterizan por variaciones estacionales de distintos tipos, muchos mamíferos exhiben al menos una tendencia hacia la estacionalidad en sus esfuerzos reproductivos y pueden criar solo durante una parte restringida del año. Por otra parte, en muchos mamíferos domésticos, la pérdida de la estacionalidad reproductiva, posiblemente se deba a que las presiones selectivas para dicha estacionalidad han sido minimizadas (Wallen & Turek, 1981).

El ratón doméstico (*Mus musculus*) puede subsistir y reproducirse en un sorprendentemente amplio rango de dietas. Esto, junto con su habilidad excepcional de reproducirse en un rango muy amplio de condiciones climáticas, ha favorecido su dispersión mundial (Bronson, 1979). El ratón doméstico, al igual que muchas otras especies de pequeños roedores e insectívoros de pequeño tamaño, tienen una vida muy corta. Esta expectativa de vida favorece un alto índice reproductivo y un rápido desarrollo. Esta última característica, junto con una corta gestación y un temprano estro post-parto, permite un intervalo generacional de menos de 2 meses.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores (Bronson, 1979) que indican que el ratón doméstico (*Mus musculus*) es insensible a las variaciones en el fotoperío-

do, por más extremas que sean las mismas. La falta de respuesta en esta especie a estos cambios podría explicar su distribución cosmopolita sobre todo cuando vive como comensal en un ambiente relativamente estable (relacionado con el hombre), donde no tiene dificultades en reproducirse durante todo el año (Pelikan, 1981; Bromford, 1987; Efford *et al.*, 1988). De acuerdo a la terminología de Negus & Berger (1972), es un reproductor estacional "facultativo" más que "obligatorio". Dicho de otra forma, el ratón doméstico ha desarrollado una estrategia reproductiva puramente oportunista que le ha permitido expandirse sin dificultades en todo el mundo, constituyendo en muchos casos una plaga de difícil control.

AGRADECIMIENTOS

A los alumnos pasantes del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.L.), por su indispensable y abnegada colaboración en el cuidado de los animales. Al Dr. Pablo Beldoménico, por su asistencia técnica en la elaboración de este manuscrito. Al Licenciado Guillermo Casanovas de SIREX S.A., por el aporte del equipo utilizado para el análisis digital de imágenes. Al Dr. Enrique Luque del Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - U.N.L.), por facilitarnos parte del equipamiento necesario para el procesamiento de los materiales.

BIBLIOGRAFÍA

BERNARD, R.T.F. & HALL, J. 1985. Failure of the Estrous Cycle and Spermatogenesis to Respond to Day Length in a Subtropical

- African Rodent, the Pouched Mouse (*Saccostomus campestris*). *Biol. Reprod.* 52: 1291-1295.
- BROMFORD, M.** 1987. Food and reproduction of wild house mice. I. Diet and breeding seasons in various habitats on irrigated cereal farms in New South Wales, Australia. *Aust. Wildl. Res.* 14: 183-196.
- BRONSON, F.H.** 1979. The reproductive ecology of the house mouse. *Q. Rev. Biol.* 54: 265-299.
- BRONSON, F. H. & HEIDEMAN, P. D.** 1992. Lack of reproductive photoresponsiveness and correlative failure to respond to melatonin in a tropical rodent, the cane mouse. *Biol. Reprod.* 46: 246-250.
- CARTER, D. S. & GOLDMAN, B. D.** 1983. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 113 :1261-1267.
- DEMPSEY, E. J. & SEARLES, H.F.** 1943. Environmental modification of certain endocrine phenomena. *Endocrinology* 32: 119-128
- DESJARDINS, C.; BRONSON, F.H.; BLANK, J. L.** 1986. Genetic selection for reproductive photoresponsiveness in deer mice. *Nature (Lond)*. 322: 172-173.
- EFFORD, M. G.; KARL, B. J.; MOLLER, H.** 1988. Population ecology of *Mus musculus* on Mana Island New Zealand. *J. Zool.* 216: 539-564.
- HEIDEMAN, P. D. & BRONSON, F. H.** 1991. Characteristics of a genetic polymorphism for reproductive photoresponsiveness in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Biol. Reprod.* 44: 1189-1196.
- HOFFMANN, J. M.** 1967. Effect of light deprivation on the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology* 2: 1-10.
- KINSON, G. A. & ROBINSON, S.** 1970. Gonadal function of immature male rats subjected to light restriction, melatonin administration and removal of the pineal gland. *J. Endocrinol.* 47: 391-392.
- MAEKAWA, K.** 1959. Vaginal estrus during gestation and lactation in persistent-estrous rats. *Annot. Zool. Jap.* 32: 185-190.
- MATTHEWS, C. D.; GUERIN, M. V.; DEED, J. R.** 1993. Melatonin and photoperiodic time measurement: seasonal breeding in the sheep. *J. Pineal Res.* 14: 105-116.
- MAYWOOD, E. S.; BITTMAN, E. L.; EBLING, F. J.; BARRETT, P.; MORGAN, P.; HASTINGS, M. H.** 1995. Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J. Neuroendocrinol* 7: 215-23.
- MOFFATT, C. A.; DEVRIES, A. C.; NELSON, R. J.** 1993. Winter adaptations of male deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and prairie voles (*Microtus ochrogaster*) that vary in reproductive responsiveness to photoperiod. *J. Biol. Rhythms* 8: 221-232.
- NEGUS, N. C. & BERGER, P. J.** 1972. Environmental factors and reproductive processes in mammalian populations. (pp. 89-98) En: VELARDO, J.T. & KASPROW, B.A. (eds.). *Basic and Clinical Studies, Third American Congress on Anatomy.* New Orleans.
- NELSON, R. J.; MOFFATT, C. A.; GOLDMAN, B.D.** 1994. Reproductive and nonreproductive responsiveness to photoperiod in laboratory rats. *J. Pineal Res.* 17: 123-131.
- NELSON, R. J.** 1999. Photoperiodism, Vertebrates. (pp. 779-789) En: KNOBIL, E. & NEILL, J.D. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction Vol.2.* Academic Press, San Diego, California.
- PEDERSEN, T.** 1970. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* 64: 304-323.
- PELIKAN, J.** 1981. Patterns of reproduction in the house mouse. (pp. 205-229) En: BERRY, R.J. (ed.). *Biology of the House Mouse,*

- Symposia of the Zoological Society of London, Vol. 47. Academic Press, New York.
- SIEGEL S.** 1956. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill. New York.
- WALLEN, E. P. & TUREK, F. W.** 1981. Photoperiodicity in the male albino laboratory rat. *Nature*; 289: 402-404.
- WALLEN, E. P.; DEROSCH, M. A.; THEBERT, A.; LOSEE-OLSON, S.; TUREK, F. W.** 1987. Photoperiodic response in the male laboratory rat. *Biol. Reprod.*; 37: 22-27.
- WHITSETT, J. M. & MILLER, L. L.** 1982. Photoperiod and reproduction in female deer mice. *Biol. Reprod.* 26: 296-304.
- WOODS, A. & ELLIS, C. R.** 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference.* Longman Group Limited. Londres.