

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS
CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE TECIDO TESTICULAR DE
GATOS DOMÉSTICOS: INFLUÊNCIA DO TAMANHO DOS
FRAGMENTOS E AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES**

**Beatrice Ingrid Macente
Médica Veterinária**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS
CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE TECIDO TESTICULAR DE
GATOS DOMÉSTICOS: INFLUÊNCIA DO TAMANHO DOS
FRAGMENTOS E AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES**

Beatrice Ingrid Macente

**Orientador: Prof.Dr. Gilson Hélio Toniollo
Coorientadora: Profa. Dra. Maricy Apparício**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

2017

Macente, Beatrice Ingrid
M141q Qualidade das células espermáticas criopreservadas obtidas de
tecido testicular de gatos domésticos: influência do tamanho dos
fragmentos e avaliação dos crioprotetores / Beatrice Ingrid Macente. --
Jaboticabal, 2017
iv, 54 f. il. ; 29 cm

Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Gilson Hélio Toniollo
Coorientadora: Maricy Apparício
Banca examinadora: Fabrício Singaretti de Oliveira, Érika da Silva
Carvalho Morini, Georgia Modé Magalhães, Joaquim Mansano Garcia.
Bibliografia

1. Felino. 2. Criopreservação. 3. Crioprotetor I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: QUALIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS CRIOPRESERVADAS
OBTIDAS DE TECIDO TESTICULAR DE GATOS DOMÉSTICOS: INFLUÊNCIA
DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS E AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES

AUTORA: BEATRICE INGRID MACENTE

ORIENTADOR: GILSON HELIO TONIOLLO

COORIENTADORA: MARICY APPARÍCIO FERREIRA

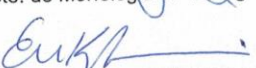
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



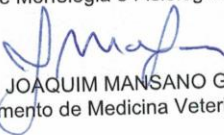
Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. ERIKA DA SILVA CARVALHO MORANI
INPRENHA LTDA / Jaboticabal/SP



Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES
Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal / Instituto Federal do Sul de Minas - Muzambinho/MG



Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Repr. Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BEATRICE INGRID MACENTE, filha de Donizete Aparecido Macente e Maria Imaculada da Costa Macente, nasceu na cidade de Campinas, São Paulo, em 26 de fevereiro de 1986; concluiu o ensino médio no colégio Integral – Tarsila do Amaral, na cidade de Indaiatuba/SP, em dezembro de 2003. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina/PR, em março de 2005, onde iniciou as atividades de pesquisa em reprodução animal com Iniciação Científica na área de biotecnologias do processamento do sêmem, sob orientação da Prof.^a Dra. Maria Isabel Mello Martins. Concluiu a graduação em dezembro de 2009. Ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional, no setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus Jaboticabal/SP, em fevereiro de 2010, concluindo-o em fevereiro de 2012. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e coorientação da Prof.^a Dra. Maricy Apparício Ferreira, no Programa de Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, na mesma Universidade, em março de 2012, com bolsa de mestrado Fapesp (Processo nº2011/15148-8), concluindo-o em fevereiro de 2014. Em março de 2014 ingressou, ainda na mesma universidade, no programa de pós-graduação, ao nível de Doutorado, no programa de Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, sob orientação do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo e coorientação da Prof.^a Dra. Maricy Apparício, com bolsa CAPES. Em 2017, participou do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE, CAPES, realizando as atividades no Center for Species Survival no Smithsonian’s National Zoological Park, Washington - DC, EUA, sob orientação no exterior do Prof. Dr. Pierre Comizzoli.

“Cristo não pediu muita coisa, não exigiu que as pessoas escalassem o Everest ou fizesse grandes sacrifícios. Ele só pediu que nos amássemos uns aos outros.” (Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço aos meus familiares, com especial destaque meus pais, Donizete Macente e Maria Imaculada da Costa, meu irmão Rodrigo Macente, minha tia Edna Costa, meus padrinhos Elza e Antenor Modanez e meu namorado Cleber Mansano, por todo apoio e incentivo desde o desejo em cursar veterinária quando criança, até a conclusão desse ciclo com a realização deste doutorado.

A meu orientador, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, por ter me acolhido no meio de uma tormenta e ter me feito entender “o quão bom é ter um bom orientador”. Na verdade acredito que um erro foi corrigido e como dizem “Deus sabe o que faz”.

A minha coorientadora, Prof.^a Dra. Maricy Apparício, por sempre ter sido MAIS, mais do que uma coorientadora, também uma amiga, uma conselheira, uma incentivadora, uma mãe, enfim, uma pessoa incrível que tive a sorte de ter na minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado pelo fornecimento da bolsa para a realização do doutorado sanduíche, PDSE.

Aos professores Georgia Modé Magalhães, Erika da Silva Carvalho Morani, Fabrício Singaretti e Joaquim Mansano Garcia, pela valiosa participação na banca examinadora, com correções e dicas valiosas.

A professora Lindsay, que com tanta dedicação e presteza, me ajudou durante a realização do projeto, na participação da banca de qualificação e nos problemas de última hora com a formação da banca examinadora.

A pós-doutoranda Luciana Padilha, pelo aceite em participar da minha banca de qualificação, com ótimas observações. Uma amiga de longa data, que espero levar ainda por muitos anos pela pessoa especial que é.

Ao Smithsonian Institution, em especial ao Prof. Dr. Pierre Comizzoli, pela concessão do estágio no Smithsonian National Zoological Park, durante o período de doutorado sanduíche. E também as pesquisadoras do Laboratório de Reprodução da mesma instituição, Trícia, Lara e Pei Chee, por toda atenção e presteza que me ajudaram na realização do projeto de doutorado sanduíche, possibilitando um enriquecimento do doutorado.

Aos Pós-graduandos Camila, Luciana, Ana Paula, Ricardo, Priscila; as Residentes Priscila, Talita, Letícia, Amanda; aos graduandos que fizeram estágio no setor de obstetrícia durante todos esses anos (desta universidade e de outras instituições) e me ajudaram muito, aqui vou representar pela Maria Eduarda, hoje médica veterinária formada. Todos foram especiais em vários momentos e só tenho agradecer principalmente a amizade.

As médicas veterinárias e amigas do coração Cíntia Bassoli, Raquel Gutierrez, Paloma Silva, Mariana Tavares e Elaine Rocha, por todo apoio, participação, companheirismo e torcida na execução deste projeto, não só na parte física, mas também psicológica, até o último segundo. Amizades que não tem preço.

Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, D. Izilda, Anésia, Arnildo, Ivo, Roberta, Edson, Marcelo e Zé Carlos, pela compreensão, paciência, companhia e amizade, durante os dias de experimento e análises laboratoriais.

Aos voluntários de proteção aos animais, com especial carinho à Sueli, Thaís e Regiane, e também ao Professor Jeffrey, coordenador do CECG, por terem conseguido todos os gatos que foram castrados no experimento, com muita dedicação e presteza, em meio a arranhões e miados. Vocês também foram fundamentais!!!

A todos os gatos (muitos) que foram utilizados neste projeto. A preservação de vocês, da sua espécie, seres incríveis que eu adoro, foi sempre o foco!

A Deus e São Francisco de Assis, por sempre iluminarem meu caminho

.....Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	05
INTRODUÇÃO.....	05
Objetivos.....	07
REVISÃO DE LITERATURA.....	08
Referências bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 2 - EVALUATION OF DIFFERENT FRAGMENT SIZES AND CRYOPROTECTANTS FOR CRYOPRESERVATION OF FELINE TESTICULAR TISSUE (Publicação Reproduction Domestic Animals).....	17
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO E DAS CÉLULAS TUBULARES SEMINÍFERAS OBTIDAS DE TECIDO TESTICULAR CRIOPRESERVADO DE GATOS DOMÉSTICOS: INFLUÊNCIA DOS CRIOPROTETORES E TAMANHO DO FRAGMENTO.....	24
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 013583/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação da qualidade celular e dos espermatozóides obtidos de tecido testicular de gatos domésticos, congelados pela técnica fast freezing"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de agosto de 2014.

Jaboticabal, 12 de agosto de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

QUALIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE TECIDO TESTICULAR DE GATOS DOMÉSTICOS: INFLUÊNCIA DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS E AVALIAÇÃO DOS CRIOPROTETORES

RESUMO – Esta pesquisa teve por justificativa ampliar os estudos acerca da criopreservação de tecido gonadal e células espermáticas de gatos domésticos, podendo servir de modelo experimental para felinos selvagens. Objetivou-se comparar os efeitos da criopreservação sobre diferentes tamanhos de fragmentos testiculares, empregando dois crioprotetores. Utilizaram-se os testículos de 31 gatos domésticos, submetidos à orquiectomia eletiva. Os testículos foram pesados e apenas os que apresentarem pesos entre 1 e 2 g foram empregados. O tecido testicular foi dissecado e cortado em fragmentos de tamanhos pré-determinados ($0,3\text{cm}^3$ e $0,5\text{cm}^3$). Uma amostra foi direcionada para as avaliações a fresco: integridade de membrana e do DNA; histopatologia; incidência de apoptoses por imuno-histoquímica; e índice de peroxidação lipídica - TBARS. A criopreservação foi feita em meio Tris-gema Equex STM suplementado com 3% de crioprotetores (glicerol e propanediol) através da técnica congelação rápida. Após a descongelação, foram realizados os mesmos testes iniciais. Os primeiros resultados obtidos com os 12 gatos iniciais apontaram na avaliação histomorfológica e pelo teste de lipoperoxidação lipídica que o glicerol foi mais eficiente que o propanediol na criopreservação de fragmentos testiculares de gatos domésticos de $0,5\text{cm}^3$ (Capítulo 2). No experimento seguinte, avaliaram-se os fragmentos testiculares de outros 31 gatos domésticos, seccionados nos mesmos tamanhos e criopreservados nas mesmas condições do experimento anterior, empregando-se 3% glicerol ou 3% propanediol no meio diluente Tris-gema Equex STM, utilizando a técnica de congelamento rápido, seguindo das avaliações pelos testes para dano ao DNA dos espermatozoides por meio da acridina laranja; e análise dos fragmentos teciduais semi-quantitativamente por histomorfológica e imuno-histoquímica. A avaliação imuno-histoquímica foi mais eficiente em verificar os danos às células tubulares seminíferas, sendo possível observar a marcação diferenciada da caspase presente no citoplasma e núcleo das células espermáticas, bem como na cabeça dos espermatozoides. Por meio da caspase foram verificado que os fragmentos frescos já apresentavam danos consideráveis às células teciduais e que não diferiram dos achados para os fragmentos criopreservados, demonstrando a eficiência do protocolo de congelação adotado, sem a observação de superioridade entre os dois tamanhos de fragmentos ou entre os crioprotetores. Contudo, a avaliação apenas do espermatozoides tanto pela técnica de acridina laranja, como pela imuno-histoquímica, pode-se verificar a inferioridade do propanediol em relação ao glicerol para fragmentos de $0,5\text{ cm}^3$ (Capítulo 3). Novas pesquisas que possam complementar os testes realizados neste estudo, como o cultivo dos fragmentos, a fertilização in vitro por meio de ICSI, ou ainda, o uso dos fragmentos para xenotransplantes poderiam avaliar com maior acurácia os achados das pesquisas reportadas nesta tese.

Palavras-chave: felino, criopreservação, crioprotetor

QUALITY OF CRYPRESERVED SPERM CELLS OF DOMESTIC CATS TESTICULAR TISSUE: IMPORTANCE OF FRAGMENT SIZE AND EVALUATION OF CRIOPROTECTANTS ACTION.

ABSTRACT – This research had the justification to broaden the studies about the cryopreservation of gonadal tissue and sperm cells of domestic cats, and could serve as an experimental model for wild cats. The objective of this study was to compare the effects of cryopreservation on different sizes of testicular fragments using two cryoprotectants. The testicles of 31 domestic cats submitted to elective orchiectomy were used. The testes were weighed and only those weighing between 1 and 2 g were used. The testicular tissue was dissected and cut into fragments of predetermined sizes (0.3cm^3 and 0.5cm^3). A sample was directed to fresh evaluations: membrane integrity and DNA; histopathology; incidence of apoptosis by immunohistochemistry; and lipid peroxidation index - TBARS. Cryopreservation was done on Tris-egg yolk Equex STM medium supplemented with 3% cryoprotectants (glycerol and propanediol) by the rapid freezing technique. After thawing, the same initial tests were performed. The first results obtained with the 12 initial cats showed that glycerol was more efficient than propanediol in the cryopreservation of testicular fragments of domestic cats of 0.5 cm^3 (Chapter 2). In the following experiment, the testicular fragments from 31 other domestic cats, sectioned in the same sizes and cryopreserved under the same conditions as in the previous experiment, were evaluated using 3% glycerol or 3% propanediol in the Tris- egg yolk Equex STM medium, using rapid freezing technique, followed by evaluations for DNA damage of the spermatozoa by acridine orange; and analysis of the tissue fragments semi-quantitatively by histomorphology and immunohistochemistry. The immunohistochemical evaluation was more efficient in verifying the damage to the seminiferous tubular cells, being possible to observe the differentiated marking of the caspase present in the cytoplasm and nucleus of the sperm cells, as well as in the spermatozoa head. By caspase, it was verified that the fresh fragments already presented considerable damage to the tissue cells and did not differ from the findings for the cryopreserved fragments, demonstrating the efficiency of the adopted freezing protocol, without the observation of superiority between the two sizes of fragments or between the cryoprotectants. However, the evaluation of spermatozoa by both acridine orange and immunohistochemistry, the inferiority of propanediol to glycerol can be verified for fragments of 0.5 cm^3 (Chapter 3). New research that could complement the tests performed in this study, such as the culture of fragments, in vitro fertilization using ICSI, or the use of fragments for xenotransplantation could more accurately assess the findings of the research reported in this thesis.

Keywords: feline, cryopreservation, cryoprotector

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

Introdução

Muitas espécies de felinos estão ameaçadas de extinção, como consequência da mortalidade pela caça predatória, destruição dos seus habitats e também pelo tráfico ilegal (PRIMACK; RODRIGUES, 2000). Os grandes felinos, necessitam ocupar extensas áreas para atender suas necessidades, sendo animais vulneráveis a fragmentação e degradação ambiental (SUTHERLAND, 2000). Entre estas, estão 36 espécies de felinos selvagens, como o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*) e o Lince-ibérico (*Lynx pardinus*), segundo dados do IUCN (2009). No Brasil, as oito espécies de felinos selvagens que compõem a fauna estão em risco de extinção, tal como a onça-pintada (*Panthera onca*) (OLIVEIRA; CASSARO, 2005; IBAMA, 2016).

Em consequência, há a redução na variabilidade genética, resultando em queda da fertilidade (WILDT et al., 2010). Neste prisma, as tecnologias da reprodução assistida são uma excelente forma de solucionar problemas como distúrbios físicos e comportamentais que impeçam a reprodução natural e descarta a necessidade de transportar os animais; ainda, estas tecnologias possibilitam a conservação de material genético das espécies ameaçadas (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004; ZENG et al., 2006; WILDT et al., 2010).

Entretanto, a manipulação e obtenção de exemplares de felinos selvagens são fatores limitantes para o desenvolvimento de pesquisas. Por isso, a utilização dos gatos domésticos como modelos experimentais é uma excelente opção, pois além de ser mais fácil a obtenção de material biológico dos mesmos, há crescente interesse de criadores nos avanços da reprodução assistida, decorrentes do aumento do mercado pet mundial e, ainda, de maneira ampla, servindo como modelo de estudo para alterações humanas (LUVONI, 2006; PUKAZHENTI et al., 2006).

A criopreservação do sêmen traz amplos benefícios, pois possibilita o armazenamento dos gametas masculinos por tempo indeterminado e o transporte de material genético por longas distâncias. Porém, o decréscimo na qualidade do sêmen, observados após a descongelação, reduzem a sua capacidade fertilizante. Este fato, somado as altas taxas de teratospermia (>60% de espermatozoides defeituosos) observadas nos espermatozoides dos felídeos (PUKAZHENTHI et al., 2006), dificulta o

seu sucesso na aplicação de biotecnologia e reforça a necessidade de buscar outras formas de processamento.

Novas possibilidades de criopreservação do material genético masculino já foram estudadas, como o uso de espermatozoides recuperados de epidídimo. Recentemente, a criopreservação do tecido testicular tem se mostrado uma alternativa plausível e inovadora, possibilitando a preservação do material genético masculino de qualquer espécie animal que venha a sofrer orquiectomia terapêutica, ou morra inesperadamente (BUARPUNG et al., 2012). Na medicina, a criopreservação do tecido testicular tem sido estudada para uso em técnicas de xenotransplante, principalmente para preservação das células espermáticas em casos de doenças oncológicas que necessitam de tratamento quimioterápico (SINOHARA et al., 2002) e, em algumas espécies, o sucesso da técnica foi comprovado pelo desenvolvimento de embriões e nascimento de descendentes viáveis (MARKS et al., 1994, HORI et al., 2004; HORI et al., 2011; THARASANIT, et al., 2012; THUWANUT, et al., 2013; BUARPUNG et al., 2013).

Independente da técnica de coleta dos espermatozoides, os danos ocorridos durante a criopreservação podem prejudicar sua viabilidade. A adição de crioprotetores aos meios diluentes garante a nutrição das células e evita danos morfológicos decorrentes do choque térmico e osmótico (WATSON, 2000). Entretanto, o tipo, a concentração e/ou associação de crioprotetores depende do tecido a ser congelado, do tamanho do fragmento e da espécie animal.

Neste sentido, esta pesquisa se justifica por ampliar os estudos acerca da criopreservação de tecido gonadal e células espermáticas, por meio da congelação de fragmentos testiculares, técnica que permite não apenas a conservação do material genético dos espermatozoides, mas também seu emprego em técnicas de xenotransplante em diferentes espécies. Aventou-se a hipótese de que o tamanho do fragmento poderia interferir na qualidade tecidual e espermática após a descongelação, uma vez que os crioprotetores glicerol e propanediol a 3% apresentariam eficiência diferente.

A escolha pelos crioprotetores glicerol e propanediol foi baseada nos últimos trabalhos para a espécie felina (COMIZZOLI et al., 2006; BUARPUNG et al., 2012; THARASANIT, et al., 2012; THUWANUT, et al., 2013; BUARPUNG et al., 2013; THUWANUT; CHATDARONG, 2012; ALI et al., 2016), na tentativa de obter um

crioprotetor que fosse adequado para a criopreservação tanto do tecido testicular quanto especificamente das células espermáticas. A concentração de 3% foi baseada nas observações de rotina do Laboratório de Reprodução da FCAV – Unesp, Jaboticabal.

Objetivos

Geral: Avaliar os efeitos de dois crioprotetores na preservação de tecido testicular de gatos domésticos e na qualidade de seus espermatozoides recuperados.

Específico:

- Avaliar se há diferença na qualidade de preservação entre o glicerol e o propanediol a 3% sobre tecidos testiculares de gatos domésticos criopreservados, comparando dois tamanhos de fragmentos.
- Avaliar se há diferença na qualidade de preservação entre o glicerol e o propanediol sobre a qualidade de espermatozóides recuperados (dano ao material genético) de tecidos testiculares de gatos domésticos criopreservados, comparando dois tamanhos de fragmentos.

Revisão de literatura

Na tentativa de preservar o potencial genético, a associação das técnicas de preservação de gametas e reprodução assistida está sendo aprimorada nos felinos domésticos e selvagens (WILDT et al., 2010). Entre elas, a criopreservação de gametas é importante para a preservação genética e manutenção das espécies ameaçadas de extinção por tempo indeterminado (PUKAZHENTHI et al., 2006).

Durante muito tempo, para os felinos, os esforços foram direcionados para a criopreservação de espermatozoides ejaculados obtidos por eletroestimulação, vagina artificial ou por cateterização uretral. Contudo, estes procedimentos foram inúteis se o macho viesse a óbito. Para estes casos, o aproveitamento dos espermatozoides presentes no tecido testicular e no epidídimo é uma importante ferramenta na produção de embriões, além da possibilidade de associar outras técnicas reprodutivas, como a fertilização in vitro ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (COCCHIA et al., 2010). Esta última, caracteriza-se pela inserção de um espermatozoide no ooplasma do gameta feminino. Este processo favorece o sucesso no processo de fertilização, pois elimina os passos de penetração nas células do cumulus, a ligação com a zona pelúcida e a fusão com o oolema (PALERMO et al., 1992), descartando a necessidade de motilidade do espermatozoide.

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido voltadas para técnicas de conservação, manipulação e propagação das células germinativas masculinas. As pesquisas visam à criopreservação não apenas dos espermatozoides, mas de todo o tecido testicular, possibilitando além do aproveitamento do material genético dos gametas, a preservação da produção das células espermáticas in vitro ou in vivo (xenotransplantes) (SHINOHARA et al., 2002; THUAWANUT, et al., 2012).

A criopreservação de tecidos testiculares já é uma realidade na medicina, na tentativa de conservar a fertilidade de homens que necessitem passar por tratamentos quimioterápicos gonadotóxicos (KEROS et al., 2007). Muitos estudos estão descritos na literatura empregando-se o tecido testicular em primatas (SCHLATT et al., 2002; JAHNUKAINEN et al., 2007), porcos (ABRISHAMI et al., 2010), roedores (SCHLATT et al., 2002; SHINOHARA et al., 2002; MILAZZO, et al., 2008; MILAZZO et al., 2010) e peixes (BONO-MESTRE et al., 2009). Wu et al. (2011) iniciaram o uso da técnica de criopreservação de tecido testicular na espécie bovina, objetivando obter mais

informações quanto aos melhores crioprotetores e os protocolos de descongelação extrapolando as informações obtidas para outras espécies.

Recentemente, estudos estão sendo feitos com felinos, com resultados satisfatórios utilizando espermatozoides testiculares refrigerados (testículos inteiros mantidos 4°C em meio Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), COMIZZOLI et al., 2006; BUARPUNG et al., 2012) ou criopreservados de gatos domésticos para fertilizações in vitro (fragmentos de 0,3 cm³ criopreservados glicerol 5%, THARASANIT et al., 2012). Thuwanut e Chatdarong (2012) atestaram a viabilidade da criopreservação (fragmentos de 0,3 cm³ com DMSO 11 a 15% e Etilenoglicol 15%) do tecido testicular com posterior recuperação de espermatozoides de qualidade para técnicas de reprodução assistida em felinos selvagens (*Felis Chaus* e *Panthera leo*), mesmo quando recolhidos de 2 a 24 horas post-mortem. No entanto, a metodologia e os protocolos da criopreservação do tecido testicular, como também sucessos na produção de embriões e o nascimento de descendentes férteis viáveis, ainda não estão bem estabelecidos, seja para felinos domésticos ou selvagens, necessitando-se da extrapolação de dados de outras espécies ou de protocolos para outros tipos celulares (COMIZZOLI; WILDT, 2012).

Entre os fatores que precisam ser mais pesquisados para a espécie felina na criopreservação de tecido testicular estão as substâncias crioprotetoras, as quais são empregadas como forma de proteger o tecido das injúrias durante o processo de congelação. Estas substâncias podem penetrar ou não, na membrana plasmática, prevenindo a formação de cristais de gelo dentro das células (CABODELAVIA; TERUEL, 2001). Os crioprotetores penetrantes são o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanediol (PrOH) e o etilenoglicol. Já, entre os não penetrantes encontram-se sacarídeos, tais como, trealose, glicose e macromoléculas como a polivinilpirrolidona e o hialuronato de sódio (ENGLAND, 1993; GIL-SALOM et al., 1996; JEZEK et al., 2001; KEROS et al., 2005). Contudo, a eficácia dos crioprotetores depende de fatores como concentração empregada, tipo de célula ou tecido, taxa de congelação e a espécie estudada.

Em um único fragmento de tecido testicular pode ser encontrada uma grande variedade de células, desde as estruturais do tecido (Células de Leyding, Células de Sértoli e miócitos) como as germinativas (espermátogônias, espermátócitos 1 e 2 e

espermatozoides) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Autores relatam que há uma diferença na criopreservação entre estes diferentes tipos celulares quando estão isoladas ou em suspensões, em relação à criopreservação do tecido testicular como um todo, principalmente no que diz respeito ao crioprotetor utilizado (HOVATTA, 2000; CRABBÉ et al., 1999). O grau de crioproteção sobre um determinado tipo de célula depende muito das propriedades dos crioprotetores, tanto pela sua capacidade de penetração na membrana celular de cada célula como pela sua capacidade de difusão pelo tecido (FULLER; PAYNTER, 2004). Os crioprotetores, quando expostos em excesso às células podem ser citotóxicos (PEGG, 2002).

Desta forma, outros fatores podem afetar a qualidade das células testiculares e espermáticas: a técnica de congelação (KEROS et al., 2007) e o tamanho do tecido a ser congelado (CRABBÉ et al., 1999). Há dois protocolos de congelação comumente utilizados para a criopreservação de tecido testicular: congelação lenta e a congelação rápida. Congelação lenta é considerado o método convencional, no qual os crioprotetores são empregados em baixas concentrações para minimizar os danos celulares e a toxicidade. Já o método de congelação rápida expõe as células a uma alta concentração de crioprotetores com taxas de congelação ultrarrápidas, impedindo assim a formação de cristais de gelo (FULLER, 2004; PEGG, 2007). Esta última foi adaptada para emprego em gatos para a técnica denominada Congelação rápida em 2 passos por Thuwanut e Chatdarong (2012).

Para serem efetivos, os crioprotetores precisam ter uma adequada e rápida difusão por todo o tecido a ser criopreservado. Logo, o tamanho das amostras é um importante fator a ser considerado. Em um estudo humano, a criopreservação de testículos criptorquídicos de garotos pré-púberes, fragmentados em tamanhos de 2-9mm³ ocorreu com sucesso (WYNS et al., 2007). Até o presente momento não há pesquisas que avaliaram o tamanho ideal do fragmento de tecido testicular a ser congelado para a espécie felina. Buarpong et al. (2012) e Tharasanit et al. (2012) obtiveram sucesso ao utilizarem fragmentos de tecido testicular de gatos domésticos de aproximadamente 0,3 cm³.

Referências bibliográficas

ABRISHAMI, M.; ANZAR, M.; YANG, Y.; HONARAMOOZ, A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, v.73, p.86-89, 2010.

ALI, IKA; KADHIM, KK; AL-SALIHI, AR. Histological and immunohistochemical comparison of mature rat testes with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v.4, n.1, p.35-45, 2016.

BONO-MESTRE, C.; CARDONA-COSTA, J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Effects on cell viability of three zebrafish testicular cell or tissue cryopreservation methods. *Cryo Letters*, v.30, n.2, p.148-152, 2009.

BUARPUNG, S.; THARASANIT, T.; COMIZZOLI, P.; TECHAKUMPHU, M. Effects of cold storage on plasma membrane, DNA integrity and fertilizing ability of feline testicular spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.131, p.219-227, 2012.

BUARPUNG, S.; THARASANIT, T.; COMIZZOLI, P.; TECHAKUMPHU, M. Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v.79, p.149-158, 2013.

CABODEVILA, J.; TERUEL, M. Criopreservación de embriones bovinos. In: PALMA, G. A.; BREM, G. *Biotecnología de La Reproducción*. 1. ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, p.149-167, 2001.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*, v.18, p.1-8, 2010.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E. On the horizon for fertility preservation in domestic and wild carnivores. *Reproduction Domestic Animals*, v.47 (Suppl 6), p.261–265, 2012.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1659-1663, 2006.

CRABBÉ, E.; VERHEYEN, G.; TOURNAYE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *International Journal Andrology*, v.22, p.43-48, 1999.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47, p.243-255, 1993.

FULLER, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*, v.25, p.375-88, 2004.

FULLER, B.J.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproduction Biomedicine*, v.9, p.680-91, 2004.

GIL-SALOM, M.; ROMERO, J.; MINGUEZ, Y.; RUBIO, C.; DE LOS SANTOS, M.J.; REMOHÍ, J. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, v.11, p.1309-1313, 1996.

HORI, T.; ICHIKAWA, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.66, p.37-41, 2004.

HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda

epididymal sperm in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.73, p.1685-1688, 2011.

HOVATTA, O. Cryopreservation of testicular tissue. *Molecular Cell Endocrinology*. V.169, p.113-118, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). (2003). Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção. Disponível em: www.ibama.gov.br. Acesso em 20 de outubro de 2016.

INTERNATIONAL UNION FOR NATURE CONSERVATION (IUCN). (2009). Status survey and conservation action plan wild cats. Cambridge: IUCN/SSC Cat Special Group.

JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; HERGENROTHER, S.D.; SCHLATT, S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Human Reproduction*, v.22, p.1060-1067, 2007.

JEZEK, D.; SCHULZE, W.; KALANJ-BOGNAR, S.; VUKELIĆ, Z.; MILAVEC-PURETIĆ, V.; KRHEN, I. Effects of various cryopreservation media and freezing thawing on the morphology of rat testicular biopsies. *Andrologia*, v.33, p.368-378, 2001.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap.21, 9p.

KEROS, V.; ROSENLUND, B.; HULTENBY, K.; AGHAJANOVA, L.; LEVKOV, L.; HOVATTA, O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Human Reproduction*, v.20, p.1676-1687, 2005.

KEROS, V.; HULTENBY, K.; BORGSTRÖM, B.; FRIDSTRÖM, M.; JAHNUKAINEN, K.; HOVATTA, O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia

in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reproduction*, v.22, p.1384-1395, 2007.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, v.66, n.1, p.101-11, 2006.

MARKS, S.L.; DUPUIS, J.; MICKELSEN, W.D.; MEMON, M.A.; PLATZ, C.C.J.R. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.204, p.1639-1640, 1994.

MILAZZO, J.P.; VAUDREUIL, L.; CAULIEZ, B.; GRUEL, E.; MASSÉ, L.; MOUSSET-SIMÉON, N. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Human Reproduction*, v.23, n.1, p.17-28, 2008.

MILAZZO, J.P.; TRAVERS, A.; BIRONNEAU, A.; SAFSAF, A.; ARNOULT, C.; MACÉ, B. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *Journal Andrology*, 2010. [Epub ahead of print]

OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. Guia de campo dos felinos do Brasil. São Paulo: Instituto pró - carnívoros, Fundação parque zoológico de São Paulo, Sociedade de zoológicos do Brasil, Pró vida Brasil, 2005. 80 p.

PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, p.17-18, 1992.

PEGG, D.E. Principles of cryopreservation. *Methods of Molecular Biology*, v.368, p.39-57, 2007.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. Londrina: Midiograf, 2001.

PUKAZHENTI, B.; WILDT, D.E. Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife?. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.16, p.33-46, 2004.

PUKAZHENTI, B.S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, v.66, n.1, p.112-21, 2006.

SCHLATT, S.; FOPPIANI, L.; ROLF, C.; WEINBAUER, G.F.; NIESCHLAG, E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Human Reproduction*, v.17, p.55–62, 2002.

SHINOHARA, T.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; KANATSU-SHINOHARA, M.; MIKI, H.; NAKATA, K.; KUROME, M.; NAGASHIMA, H.; TOYOKUNI, S.; KOGISHI, K.; HONJO, T.; OGURA, A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Human Reproduction*, v.17, p.3039–3045, 2002.

THARASANIT, T.; BUARPUNG, S.; MANEE-IN, S.; THONGKITTIDILOK, C.; TIPTANAVATTANA, N.; COMIZZOLI, P.; TECHAKUMPHU, M. Birth of kittens after the transfer of frozen–thawed embryos produced by Intracytoplasmic Sperm Injection with spermatozoa collected from cryopreserved testicular tissue. *Reproduction Domestic Animal*, v.47 (Suppl. 6), p.305–308, 2012.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K. Cryopreservation of cat testicular tissues: effects of storage temperature, freezing protocols and cryoprotective agents. *Reproduction Domestic Animals*, v.47, p.777–781, 2012.

THUWANUT, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; WONGBANDUE, G.; TANPRADIT, N.; THONGPAKDEE, A.; TONGTHAINAN, D.; MANEE-IN, S.; CHATDARONG, K. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology*, v.67, p.244–247, 2013.

WATSON, P.F., The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60–61, p.481-92, 2000.

WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B.; SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction Development*, v.77, p.397-409, 2010.

WYNS, C.; CURABA, M.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A.; FRANCOIS- XAVIER, W.; DONNEZ, J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Human Reproduction*, v.22, p.1603-1611, 2007.

WU, J.; HU, T.; LIU, Y.; JIN, B.; CHE, G.; GUO, B.; YUE, Z.; LI, Z.; ZHANG, X. Cryopreservation Of Adult Bovine Testicular Tissue. *International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE)*, 2011.

ZENG, W.; AVELAR, G.F.; RATHI, R.; FRANCA, L.R.; DOBRINSKI, I. The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal Andrology*, v.27, p.527-533, 2006.

CAPÍTULO 2 – Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissue - DOI: 10.1111/rda.12828

CAPÍTULO 3 – Avaliação da fragmentação do DNA espermático e das células tubulares seminíferas obtidas de tecido testicular criopreservado de gatos domésticos: influência dos crioprotetores e tamanho do fragmento

Beatrice I Macente^{A*}, Maricy Apparicio^D, Cleber F M Mansano^E, Mariana R Tavares^A, Carlos Eduardo F Alves^C, Bruno P Sousa^D, Paulo Henrique L Bertolo^B, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos^B, Gilson H Toniollo^A

^ADepartamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, UNESP, Jaboticabal/SP, Brasil;

^BDepartamento de Patologia Veterinária, UNESP, Jaboticabal/SP, Brasil;

^CDepartamento de Clínica Veterinária, UNESP, Botucatu/SP, Brasil;

^DUniversidade de Franca, UNIFRAN, Franca/SP, Brasil;

^EUniversidade Brasil, Fernandópolis/SP, Brasil.

Autor correspondente: Tel: 55 16 3202-6439

E-mail: beatrice.vetuel@yahoo.com.br (B. I. Macente)

Resumo

Este estudo objetivou avaliar os danos genéticos e moleculares ao tecido e espermatozoides testiculares de gatos domésticos, seccionados em fragmentos de 0,3 cm³ e 0,5 cm³ e submetidos a diferentes crioprotetores, propanediol ou glicerol. Os testículos obtidos de 31 gatos domésticos foram seccionados nos tamanhos desejados e imediatamente avaliados para dano ao DNA por meio da acridina laranja e semi-quantitativamente por histomorfologia e imuno-histoquímica. Os fragmentos restantes foram acondicionados em criotubos com 1 mL do diluente Tris-gema Equex STM 3% glicerol ou 3% propanediol criopreservadas pela técnica de congelamento rápido. Os fragmentos descongelados foram avaliados pelos mesmos testes iniciais. Na avaliação do dano ao DNA das células espermáticas avaliadas pela coloração acridina laranja, foi verificado que o

propanediol foi menos efetivo em relação ao glicerol, para criopreservação de fragmentos de 0,5 cm³. Nas avaliações histomorfológicas, foi verificada a superioridade da qualidade das células espermáticas frescas em relação às criopreservadas para os critérios avaliados (destacamento das células da membrana basal, retração do epitélio dos túbulos seminíferos, visibilidade do nucléolo das espermatogônias e condensação nuclear das espermatogônias), para os dois tamanhos de fragmentos. Após a criopreservação foi verificada a perda da qualidade nestes parâmetros, sem diferença relevante entre os tamanhos de fragmentos ou entre os crioprotetores. Na identificação das caspases 3 para verificação de apoptose celular, foram obtidas marcações diferenciadas para citoplasma, núcleo e espermatozoides. Porém, ao se avaliar as marcações no citoplasma e núcleo das células túbulo seminíferas, foi possível observar que os fragmentos frescos já apresentavam danos celulares consideráveis e que não diferiram dos achados para os fragmentos criopreservados, demonstrando a eficiência do protocolo de congelação adotado, sem a observação de superioridade entre os dois tamanhos de fragmentos ou entre os crioprotetores. Contudo, a marcação da cabeça dos espermatozoides demonstrou sensibilidade destas células ao crioestresse quando recuperadas de fragmentos de 0,5 cm³, criopreservados com propanediol.

Palavras-chaves: biotecnologia, reprodução, felinos, acridina laranja, imuno-histoquímica

1. Introdução

Na busca pela preservação das espécies, a conservação do material genético criopreservado, seja ele gametas ou embriões, é um recurso que há muito tempo vem sendo pesquisado em associação com as técnicas de reprodução assistida (Pukazhenthil et al., 2006; Buarpong et al., 2013). Ao se considerar um testículo, temos uma grande fonte de material genético que pode ser aproveitado, mesmo nos casos em que o macho apresenta oligozoospermia ou azospermia obstrutiva, ou mesmo que foram submetidos à orquiectomia terapêutica ou post-mortem (Wyns et al., 2008; Buarpong et al., 2012). Muitos trabalhos nas últimas décadas tem demonstrado que os espermatozoides obtidos de tecido testicular podem ser criopreservados e utilizados posteriormente em técnicas como a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI), resultando no desenvolvimento de embriões e o nascimento de descendentes viáveis (Marks et al., 1994; Schlatt et al., 2002; Shinohara et al., 2002; Hori et al., 2004; Jahnukainen et al., 2007; Milazzo et al., 2008; Bono-Mestre et al., 2009; Abrishami et al., 2010; Milazzo et al., 2010; Wu et al., 2011; Hori et al., 2011; Thuwanut et al., 2013; Buarpong et al., 2013).

Muitas espécies animais, entre elas os felinos selvagens, estão ameaçadas de extinção (Primack e Rodrigues, 2000). O gato doméstico configura um importante modelo para o desenvolvimento de estudos e elaboração de técnicas que possam vir a ser empregadas nos felinos selvagens (Luvoni, 2006; Tharasanit et al., 2012). Neste sentido, recentes estudos obtiveram importantes resultados com o uso de espermatozoides testiculares obtidos de tecidos criopreservados (Comizzoli et al., 2006; Buarpong et al., 2012). O nascimento de filhotes de gatos saudáveis foi o resultado mais expressivo para comprovar a manutenção da habilidade de fertilização de oócitos pós ICSI, dos espermatozoides testiculares de tecidos criopreservados (Tharasanit et al., 2012). Contudo, estes mesmos autores apontaram baixos índices de

desenvolvimento embrionário e este fato pode ser decorrente de problemas na criopreservação, seja de espermatozoides testiculares quanto de embriões.

Esses resultados demonstram a necessidade de novas pesquisas que melhorem a eficiência da técnica de criopreservação e determinem as particularidades para a espécie felina. Entre outros fatores que precisam ser melhor investigados estão os crioprotetores mais adequados para a preservação da qualidade do tecido e dos espermatozoides testiculares da espécie felina, garantindo a nutrição das células e prevenção de danos morfológicos causados pelo choque térmico e osmótico (Watson, 2000).

Considerando-se ainda a eficiência do crioprotetor, outro fator com importante participação na qualidade do tecido após descongelação é o tamanho do fragmento a ser criopreservado (Crabbé et al., 1999), uma vez que cada crioprotetor apresenta uma diferente penetração no tecido, dependendo e muito da sua densidade e peso molecular (Abrishami et al., 2010).

O presente estudo teve por objetivo comparar a eficiência de dois crioprotetores (Propanediol 3% e Glicerol 3%) na criopreservação de fragmentos ($0,3\text{cm}^3$ e $0,5\text{cm}^3$) de tecido testicular de gatos domésticos, por meio da avaliação da qualidade dos espermatozoides recuperados e dos túbulos seminíferos.

2. Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº 013583/14).

2.1 Coleta dos testículos, criopreservação e descongelação

Os testículos foram obtidos de 31 gatos domésticos (sem raça definida, 1 a 5 anos) submetidos à orquiectomia eletiva no Centro de Esterilização de Cães e Gatos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Brasil. Os testículos foram transportados dentro de tubos tipo Falcon de 50mL contendo NaCl 0,9% , acondicionados dentro de uma caixa de isopor (18°C), iniciando o processamento em no máximo 1 h. Para cada testículo, tecido testicular interno (túbulos seminíferos e tecido intersticial) foi separado dos vasos, túnica albugínea e epidídimo, sendo então lavados 3 vezes em NaCl 0,9% suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) + penicilina (100 UI/mL). Cada gato representou uma unidade experimental, sendo estabelecidos pools de fragmentos com os tamanhos desejados obtidos de ambos os testículos de um mesmo animal. O corte dos fragmentos procedeu-se com o a secção por meio de lâmina de bisturi (nº 15), no plano mediano e transversal dos testículos e o descarte das regiões periféricas (próxima a túnica albugínea e a região de mediastino), obtendo-se tiras no tamanho de largura desejados (0,3cm x 0,3 cm e 0,5 cm x 0,5 cm), obtendo-se assim as regiões de maior concentração de túbulos seminíferos. Estas porções foram então seccionadas em fragmentos de 0,3 cm³ (0,3x 0,3 x 0,3 cm) e 0,5 cm³ (0,5 x 0,5 x 0,5cm), medidos com paquímetro digital. Ao todos foram seccionados 9 fragmentos para cada tamanho pesquisado.

Para cada unidade experimental, um fragmento de cada tamanho (0,3 e 0,5 cm³) foi imediatamente avaliado para fragmentação do DNA dos espermatozoides. Outros dois fragmentos foram armazenado em solução fixadora para análise semi-quantitativa por histomorfologia e imuno-histoquímica. Dos fragmentos restantes, foram estabelecidos criotubos, dois com 3 fragmentos de 0,3 cm³ e outros dois com 3 fragmentos de 0,5 cm³, contendo cada um, 1 mL do diluente Tris-gema Equex STM contendo glicerol à 3% ou propanediol à 3%. Eles foram mantidos por 10 min à temperatura ambiente e em seguida, colocados em refrigerador a 4°C por 10 min.

Finalmente os criotubos foram deitados horizontalmente em uma rack a 4 cm sobre a coluna de nitrogênio líquido, reduzindo a temperatura com o vapor à -90°C por 30 min, sendo imersa em seguida no nitrogênio líquido (-196°C) para congelação. Após, as amostras foram armazenadas em botijão criogênico.

Na descongelação, as amostras foram expostas ao ar por 10 segundos e submergidas dentro do banho-maria a 37°C por 30 segundos. Os tecidos testiculares foram colocados no meio diluente TRIS à 37°C por 5 min. Os fragmentos descongelados foram então avaliados novamente para os mesmos testes citados anteriormente.

2.2 Fragmentação de DNA das células espermáticas

Os espermatozoides foram recuperados após fatiamentos sucessivos do fragmento testicular com lâmina de bisturi em placa de petri (35 x 10 mm) contendo ringer simples, seguido da agitação por meio de pipetagem (pipeta de 100µL). A solução obtida foi filtrada em malha de nylon 40µm (Falcon cell strainer BD®) para melhor individualização dos espermatozoides recuperados.

A avaliação da fragmentação do DNA dos espermatozoides recuperados dos tecidos foi realizada por microscopia de fluorescência, seguindo o protocolo de Unanian, (2000): 10µL do recuperado espermático foi utilizado para fazer um esfregaço em uma lâmina de vidro. Após o esfregaço, as lâminas foram secas ao ar e fixadas em solução de ácido acético glacial-metanol (1:3) (Solução de Carnoy), overnight à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram secas ao ar e coradas com solução de acridina laranja a 1% com pH 2,5 (10mL da acridina laranja a 10mg/mL, 40mL de solução ácido cítrico 0,1M e 2,5mL da solução de Na₂HPO₄ 0,3M) por 5 minutos e lavadas com água destilada. As amostras foram avaliadas em microscopia de epifluorescência. As fluorescências observadas foram classificadas: DNA íntegro (DNA nativo –

dupla fita) fluorescendo em verde; e DNA desnaturado fluorescendo em laranja, amarelo ou vermelho.

2.3 Avaliação Histomorfologica

Os fragmentos testiculares frescos e descongelados foram preparados para avaliação histológica de acordo com protocolo de rotina empregado no laboratório anatomia patológica da Universidade de Franca (UNIFRAN/SP): os mesmos foram fixados em Solução de Bouin por 6-10 h a 48°C. Após este período eles foram lavados com banhos em etanol 70% trocado a cada 48 h por 4 vezes, para remoção do excesso de pigmento amarelo da Solução do Bouin. Em seguida, os fragmentos foram acondicionados em cassetes devidamente identificados e prosseguiu-se com o processo de desidratação, banhando as amostras durante 10 min em soluções de concentração crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%, 3 x em cada concentração), finalizando com a imersão das mesmas em solução de xilol em dois banhos de 10 minutos cada. Para finalizar as amostras foram embebidas em parafina histológica (56-58° Synth[®]).

As amostras foram seccionadas em (5-6µm) e, após montagem das lâminas, as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Uma análise semi-quantitativa não computadorizada para integridade e alterações estruturais foram avaliadas em microscopia de luz. Cinco áreas de cada secção foram escolhidas aleatoriamente e classificadas de acordo com adaptação de Milazzo et al. (2008): Avaliação da integridade do revestimento epitelial dos túbulos seminíferos - (i) destacamento das células da membrana basal, classificadas como 0, se ausente, 1 <75% e 2 > 75% da circunferência; (ii) retração do epitélio como 0 se ausente, 1 se ligeira e 2 se óbvia; Avaliação da integridade do núcleo das espermatogônias - (iv) visibilidade do nucléolo da espermatogônia classificada em 0 se fácil (visível em 40% das células) e 1 se indistinguível; (v)

visibilidade de condensação nuclear nas espermatogônias classificada como 0 se ausente, 1 se <40% e 2 se >40% picnóticas.

2.4 Avaliação Imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada para verificar a apoptose das células (Fragmentação de DNA) pelo sistema de detecção por antígeno livre de biotina (Reveal[®]).

Depois da separação dos cortes histológicos, secções dos fragmentos com 4 µm de espessura foram usadas após serem desparafinizadas e reidratadas. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com imersão em solução citrato 10 mM (pH 6) em panela de pressão (Elite Platinum) por 30 minutos. Após, as amostras foram resfriadas em banho-maria com água e gelo por 20 minutos e lavadas com água deionizada. Consequente as amostras foram para a fase de bloqueio de peroxidase endógena com o Bloqueador de Peroxidase (reagentes do kit Reveal Spring), seguido do bloqueio de proteínas inespecíficas (Reveal Spring cod. SPD-125) e incubadas a 27°C por 30 minutos. Em seguida as amostras foram marcadas com anticorpo primário (1:300, Caspase 3, Cell Insight[®]) e armazenadas em refrigerador 4°C por 18 h . Passo seguinte, as amostras foram lavadas com solução tampão Tris (pH 7,4) e marcadas com o anticorpo secundário (Polymers Reveal HRP, kit Spring– Cód. SPD -125), sendo incubadas novamente a 27°C por 1 hora em câmara escura. As lâminas foram então, lavadas novamente com solução tampão Tris e iniciou-se a reação de revelação com o substrato cromógeno diaminobenzidine (DAB chromogen, kit Reveal Spring – Cód. SPD -125). Seguinte, a reação foi parada com água destilada e as lâminas contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1-2 minutos, sendo lavadas em seguida em água corrente. Logo em seguida, as amostras foram hidratadas com banhos em etanol em concentração crescente e xilol.

Na finalização, retirou-se o excesso de água por baixo das lâminas, seguido da cobertura das amostras com resina Entelan e sobrepostas com lamínula, sendo mantidas sobre uma superfície horizontal para secar. Para leitura das lâminas, foi utilizada microscopia de luz (Leica DM 2500), sendo avaliadas em objetivas de 20x e quantificadas em objetivas de 40x. A intensidade de expressão da caspase 3 nas amostras foi semi-quantificada de acordo com Walker (2006) modificado, sendo diferenciada a marcação do citoplasma, núcleo e espermatozoides, e cada uma classificada em: 0 – negativo, 1 <10% de células coradas, 2- 10 a 50% de células coradas e 3 >50% de células coradas.

2.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o Statistical Analysis Systems software package (Version 9.4; SAS Institute Inc., 2014, NC, USA). Para as análises semi-quantitativas foi empregado à ferramenta Proc-freq para obtenção das frequências, sendo testada a probabilidade e associação das características pelo Teste Chi-quadrado e Teste Exato de Fischer. As diferenças estatísticas para medidas repetidas foram avaliadas pelo One-way ANOVA. O teste Student-Newmann-Keuls post hoc foi usado para avaliar aos valores encontrados para as amostras frescas e criopreservadas dos espermatozoides recuperados e tecido testicular. P foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0.05$.

Resultados

Em relação ao dano do DNA das células espermáticas recuperadas dos tecidos testiculares (n=16) e coradas pela acridina laranja, não foi verificada diferença estatística significativa entre os fragmentos frescos nos dois tamanhos avaliados ($0,22 \pm 0,03$ para $0,3\text{cm}^3$ e $0,30 \pm 0,05$ para $0,5\text{cm}^3$, média $\pm$ SEM) ou entre as amostras criopreservadas com glicerol ($0,27 \pm 0,05$ $0,3\text{cm}^3$ e

0,31 $\pm$ 0,05 0,5cm³) ou propanediol (0,35 $\pm$ 0,09 0,3cm³ e 0,47 $\pm$ 0,07 0,5cm³). Contudo, diferença significativa foi observada entre propanediol (0,47 $\pm$ 0,07) e os grupos fresco (0,30 $\pm$ 0,05) e o glicerol (0,31 $\pm$ 0,05) para o tamanho 0,5 cm³ (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação dos espermatozoides recuperados do tecido testicular de gatos domésticos para dano ao DNA, antes e após a criopreservação, usando coloração de acridina laranja. Jaboticabal, 2017.

Grupos	Tamanho dos fragmentos	
	0.3 cm ³	0.5 cm ³
Fresco (controle)	0,22 $\pm$ 0,03 ^A	0,30 $\pm$ 0,05 ^A
Glicerol 3%	0,27 $\pm$ 0,05 ^A	0,31 $\pm$ 0,05 ^A
PrOH* 3%	0,35 $\pm$ 0,09 ^A	0,47 $\pm$ 0,07 ^B

*PrOH= propanediol.

Médias na mesma coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). n=16.

Foram verificadas muito poucas alterações no destacamento das células da membrana basal para os fragmentos frescos durante a avaliação histomorfologica da integridade do revestimento epitelial dos túbulos seminíferos, em ambos os tamanhos. Ao todo, 16,3% das amostras estavam sem estas alterações (Tabela 2; Figura 1 A e B). Quanto às amostras criopreservadas, foi verificado que o tamanho de 0,5cm³ apresentou alta frequência (13,04%) em grau 1, tanto para o glicerol quanto para o propanediol, com presença de destacamento de membrana, mas acometendo menos que 75% da circunferência tubular (Tabela 2; Figura 3 A e B).

No critério de retração do epitélio, os melhores resultados foram para as amostras frescas com a maioria das amostras sem alteração visível em ambos os tamanhos (17,39% - 0,3cm³ e 16,30% - 0,5cm³). Contudo, foi verificado que os fragmentos de 0,5cm³ criopreservadas, tanto com glicerol, quanto com propanediol, apresentaram a maioria das amostras classificadas em grau 1 com ligeira retração (11,96% - 0,3cm³ e 10,87% - 0,5cm³) (Tabela 3; Figura 3 A e B).

Tabela 2. Avaliação histomorfologica do tecido testicular de gatos domésticos para destacamento das células da membrana basal. Jaboticabal, 2017.

Tamanho do fragmento	Grupos	Classificação		
		0 - não há	1 < 75%	2 > 75%
0,3 cm ³	Fresca (controle)	16,30 ^{A,a}	1,09 ^{B,c}	0,00 ^{C,d}
	Glicerol 3%	3,26 ^{C,c}	8,70 ^{A,b}	4,35 ^{B,a}
	PrOH* 3%	6,52 ^{B,b}	8,70 ^{A,b}	1,09 ^{C,c}
0,5cm ³	Fresca (controle)	16,30 ^{A,a}	1,09 ^{B,a}	0,00 ^{C,c}
	Glicerol 3%	1,09 ^{C,e}	13,04 ^{A,a}	2,17 ^{B,b}
	PrOH* 3%	2,17 ^{A,d}	13,04 ^{B,c}	1,09 ^{C,d}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). n=31.

Tabela 3. Avaliação histomorfologica do tecido testicular de gatos domésticos para retração do epitélio dos túbulos seminíferos. Jaboticabal, 2017.

Tamanho do fragmento	Grupos	Classificação		
		0 - não há	1 - ligeira	2 - óbvia
0,3 cm ³	Fresca (controle)	17.39 ^{A,a}	0.00 ^{B,f}	0.00 ^{B,e}
	Glicerol 3%	3.26 ^{B,d}	6.52 ^{A,d}	6.52 ^{A,a}
	PrOH* 3%	7.61 ^{A,c}	7.61 ^{A,c}	1.09 ^{B,d}
0,5cm ³	Fresca (controle)	16.30 ^{A,b}	1.09 ^{B,e}	0.00 ^{C,e}
	Glicerol 3%	1.09 ^{C,d}	11.96 ^{A,a}	3.26 ^{B,c}
	PrOH* 3%	1.09 ^{A,d}	10.87 ^{A,b}	4.35 ^{B,b}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$). n=31.

Quanto à avaliação da integridade do núcleo das espermatogônias foi verificado que a visibilidade do nucléolo apresentou grande diferença entre as amostras frescas e as criopreservadas, para ambos os tamanhos e crioprotetores. Todas as mostras á fresco apresentaram-se classificadas de fácil visibilidade do nucléolo em mais de 40% em cada corte. Já as amostras criopreservadas apresentaram quase que sua totalidade com nucléolo indistinguível como pode ser visto na Tabela 4. Com relação à presença de condensação nuclear das

espermatogônias, onde o núcleo é visto picnótico, foi verificado que as amostras frescas apresentaram-se, em sua maioria, classificadas como grau 1 (11,96%; <40% das células com núcleo picnótico) para ambos crioprotetores. Quanto às amostras criopreservadas, em todas foi apresentaram esta alteração, sendo que a maioria foi classificada em grau 2, com mais de 40% das células com núcleo picnótico (Tabela 5).

Tabela 4. Avaliação histomorfologica do tecido testicular de gatos domésticos para visibilidade do nucléolo das espermatogônias. Jaboticabal, 2017.

Tamanho do fragmento	Grupos	Classificação	
		0 - fácil (>40%)	1 - indistinguível
0,3 cm ³	Fresca (controle)	17,39 ^{A,a}	0,00 ^{B,c}
	Glicerol 3%	0,00 ^{B,c}	16,30 ^{A,a}
	PrOH* 3%	2,17 ^{B,b}	14,13 ^{A,b}
0,5cm ³	Fresca (controle)	17,39 ^{A,a}	0,00 ^{B,c}
	Glicerol 3%	0,00 ^{B,c}	16,30 ^{A,a}
	PrOH* 3%	0,00 ^{B,c}	16,30 ^{A,a}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). n=31.

Tabela 5. Avaliação histomorfologica do tecido testicular de gatos domésticos para condensação nuclear das espermatogônias. Jaboticabal, 2017.

Tamanho	Grupos	Classificação		
		0 - não picnótico	1 < 40% picnótico	2 - >40% picnótico
0,3 cm ³	Fresca (controle)	4,35 ^{B,a}	11,96 ^{A,a}	1,09 ^{C,d}
	Glicerol 3%	0,00 ^{C,b}	1,09 ^{B,b}	15,22 ^{A,b}
	PrOH* 3%	0,00 ^{C,b}	1,09 ^{B,b}	15,22 ^{A,b}
0,5cm ³	Fresca (controle)	0,00 ^{C,b}	11,96 ^{A,a}	5,43 ^{B,c}
	Glicerol 3%	0,00 ^{B,b}	0,00 ^{B,c}	16,30 ^{A,a}
	PrOH* 3%	0,00 ^{B,b}	0,00 ^{B,c}	16,30 ^{A,a}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). n=31.

A análise de imuno-histoquímica para verificação de apoptose pela caspase 3 permitiu uma diferenciação de marcação entre o citoplasma e núcleo das células tubulares, além da marcação da cabeça dos espermatozoides, em diferentes intensidades (Figuras 4-6). Na avaliação do citoplasma, os melhores resultados foram verificados para as amostras frescas de 0,3cm³, onde 7,88% não apresentaram marcação. Para as amostras frescas de 0,5cm³, a maioria das amostras (8,48%) apresentou ao menos uma leve marcação (grau 1 <10%) (Figura 4). Após a criopreservação, os dois tamanhos de fragmentos apresentaram-se semelhantes na porcentagem das amostras com marcação para caspase 3. Ao menos 10% das células visualizadas nos campos avaliados (Tabela 6), foram coradas, sem destaque para nenhum crioprotetor (Figuras 5 e 6).

Tabela 6. Avaliação imuno-histoquímica com caspase 3 do tecido testicular de gatos domésticos com marcação do citoplasma das células túbulo-seminíferas. Jaboticabal, 2017.

Tamanho	Grupos	Caspase+ Citoplasma			
		0 - não há	1 <10%	2 - 10 a 50%	3 >50%
0,3 cm ³	Fresca (controle)	7,88 ^{A,a}	3,64 ^{B,c}	3,64 ^{B,c}	3,03 ^{C,d}
	Glicerol 3%	1,21 ^{D,d}	3,64 ^{C,c}	4,85 ^{B,b}	6,67 ^{A,a}
	PrOH* 3%	1,21 ^{C,d}	5,45 ^{A,b}	5,45 ^{A,a}	4,24 ^{B,c}
0,5cm ³	Fresca (controle)	5,45 ^{B,b}	8,48 ^{A,a}	2,42 ^{C,d}	2,42 ^{C,e}
	Glicerol 3%	1,21 ^{D,d}	1,82 ^{C,e}	5,45 ^{B,a}	6,06 ^{A,b}
	PrOH* 3%	2,42 ^{D,c}	3,03 ^{C,d}	3,64 ^{B,c}	6,67 ^{A,a}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). n=31.

A presença de marcação de caspase 3 no núcleo das células tubulares foi verificada na maioria das amostras, com a maior frequência classificada como grau 2 (10 a 50% dos núcleos marcados), tanto para os fragmentos frescos, quanto para os congelados, independente do tamanho e crioprotetor empregado (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação imuno-histoquímica com caspase 3 do tecido testicular de gatos domésticos com marcação do núcleo das células túbulo-seminíferas. Jaboticabal, 2017.

Tamanho	Grupos	Caspase+ Núcleo			
		0 - não há	1 <10%	2 - 10 a 50%	3 >50%
0,3 cm ³	Fresca (controle)	1,21 ^{C,a}	4,24 ^{B,b}	12,73 ^{A,b}	1,21 ^{C,d}
	Glicerol 3%	0,61 ^{D,b}	3,03 ^{B,b}	10,30 ^{A,c}	2,42 ^{C,b}
	PrOH* 3%	0,61 ^{D,b}	4,24 ^{B,b}	10,30 ^{A,c}	1,21 ^{C,d}
0,5cm ³	Fresca (controle)	0,61 ^{C,b}	1,82 ^{B,d}	13,33 ^{A,a}	1,82 ^{B,c}
	Glicerol 3%	0,00 ^{D,c}	3,03 ^{B,c}	9,70 ^{A,d}	1,82 ^{C,c}
	PrOH* 3%	1,21 ^{D,a}	4,85 ^{B,a}	6,67 ^{A,e}	3,03 ^{C,a}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). $n=31$.

Os espermatozoides presentes nos cortes histológicos também apresentaram marcação significativa pela caspase 3 (Tabela 8). Para o tamanho de fragmento de 0,3cm³, tanto as amostras frescas (8,54%) como as criopreservadas (9,15%) foram classificadas em grau 1 (<10% das amostras coradas). De modo semelhante, o tamanho de 0,5 cm³ de fragmento, foi verificado que as amostras frescas apresentaram maior frequência também classificada em grau 1 (9,15%). No entanto, entre as amostras criopreservadas, a maior frequência foi observada em grau 2 (entre 10 a 50% dos espermatozóides corados), sendo 7,32% para o glicerol e 7,93% para o propanediol.

Tabela 8. Avaliação imuno-histoquímica com caspase 3 do tecido testicular de gatos domésticos com marcação nos espermatozoides. Jaboticabal, 2017.

Tamanho	Grupos	Caspase+ Espermatozoides			
		0 - não há	1 <10%	2 - 10 a 50%	3 >50%
0,3 cm ³	Fresca (controle)	5,49 ^{B,b}	8,54 ^{A,b}	3,05 ^{C,e}	0,61 ^{D,a}
	Glicerol 3%	1,22 ^{C,c}	9,15 ^{A,a}	5,49 ^{B,c}	0,61 ^{D,a}
	PrOH* 3%	0,00 ^{D,d}	9,15 ^{B,a}	6,10 ^{A,b}	0,61 ^{C,a}
0,5cm ³	Fresca (controle)	6,10 ^{B,a}	9,15 ^{A,a}	4,27 ^{C,d}	0,00 ^{D,b}
	Glicerol 3%	1,22 ^{C,c}	6,71 ^{B,c}	7,32 ^{A,a}	0,00 ^{D,b}
	PrOH* 3%	1,22 ^{C,c}	5,49 ^{B,d}	7,93 ^{A,a}	0,61 ^{D,a}

*PrOH= propanediol.

Medidas na mesma linha/coluna seguida por diferentes letras sobrescritas (maiúscula/minúscula) diferem significativamente pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). n=31.

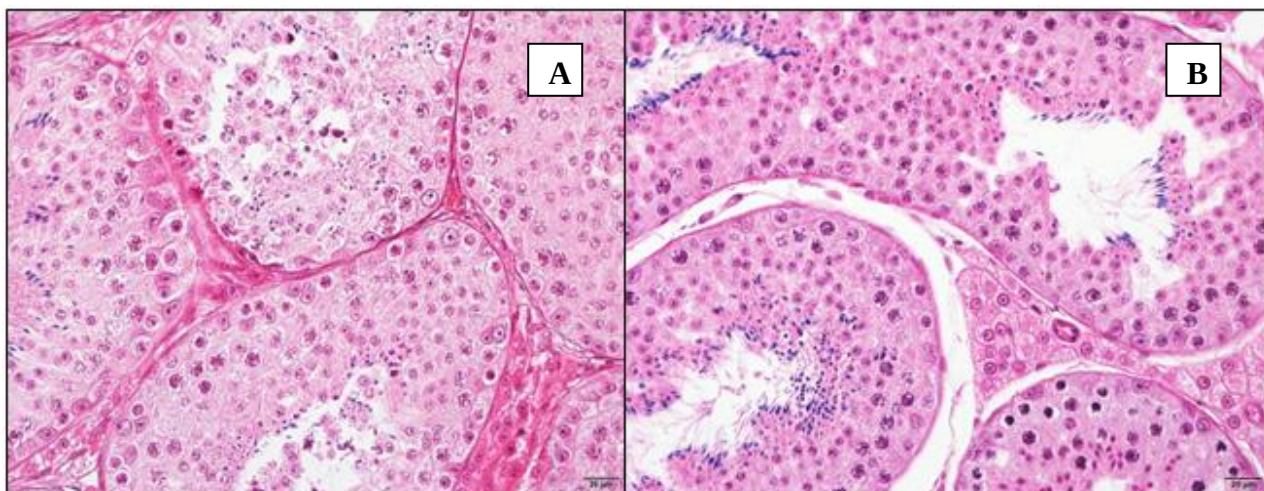


Figura 1 - Fotomicrografia dos cortes histológicos dos fragmentos testiculares de gatos domésticos. A e B – fragmento testicular fresco cortado em 0,3 e 0,5 cm³, respectivamente, onde é possível verificar a qualidade das células túbulo-seminíferas, com ausência de destacamento das células da membrana basal e picnose nuclear das espermatogônias. Hematoxilina-eosina, 40x.

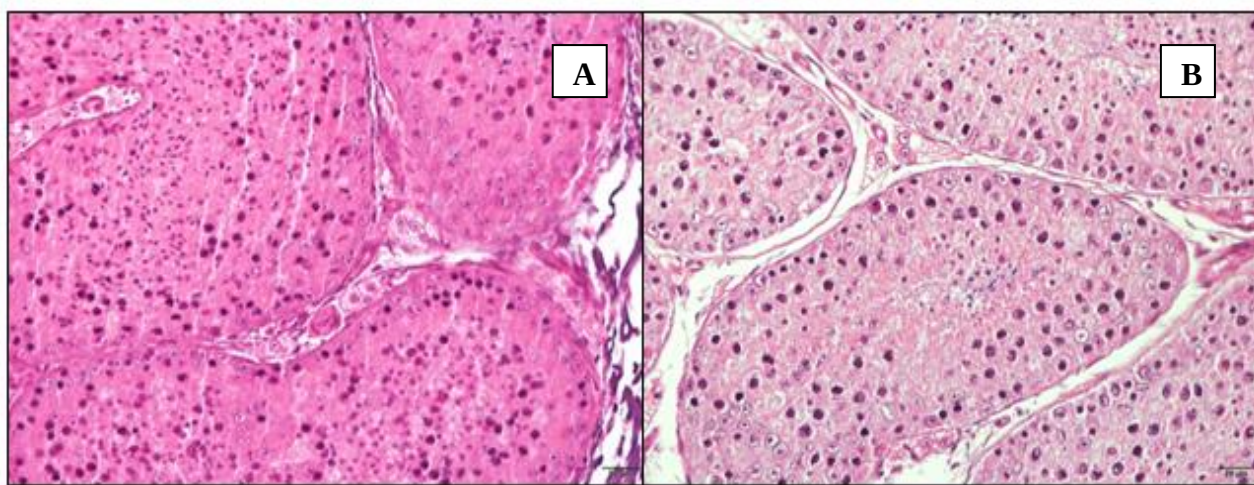


Figura 2 - Fragmentos testiculares de 0,3 cm³, criopreservados com propanediol (A) e glicerol (B). Nestes cortes é possível observar facilmente os danos de picnose das espermatogônias (cabeça de setas) e retração do epitélio tecidual (setas). Hematoxilina-eosina, 40x.

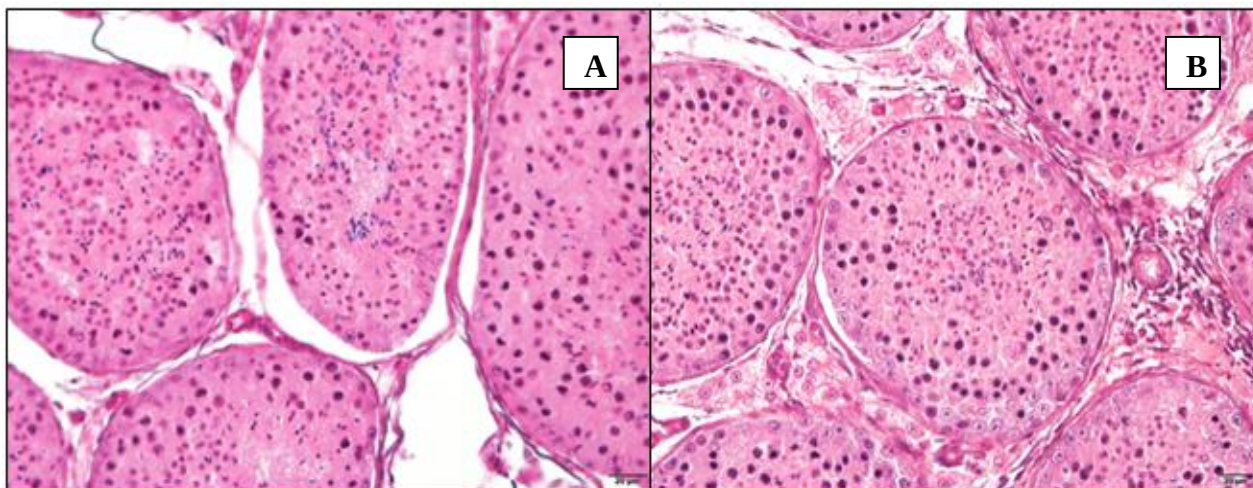


Figura 3 - Fragmentos testiculares de 0,5 cm³, criopreservados com propanediol (A) e glicerol (B). Nestes cortes é possível observar facilmente os danos de picnose das espermatogônias (cabeça de setas) e retração do epitélio tecidual (setas). Hematoxilina-eosina, objetiva 40x.

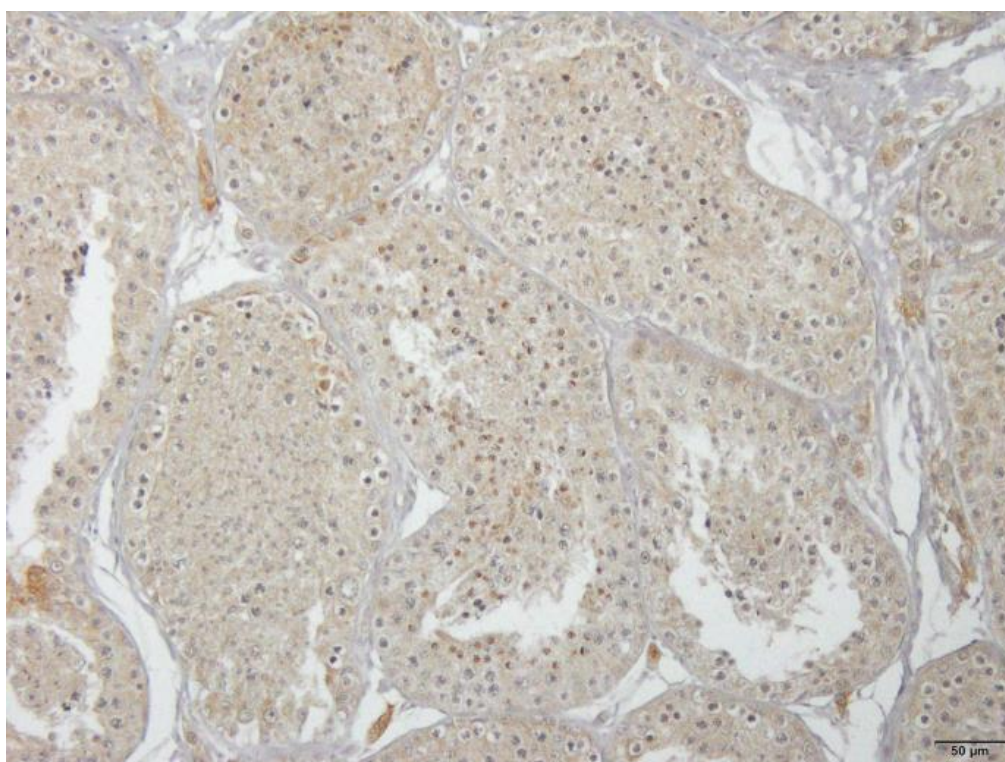


Figura 4 - Fotomicrografia do corte para imuno-histoquímica, do fragmento testicular fresco de gatos domésticos, cortado em 0,5 cm³, onde é possível verificar a marcação de caspase 3 apenas no citoplasma das células túbulo-seminíferas. Hematoxilina-eosina, 20x.

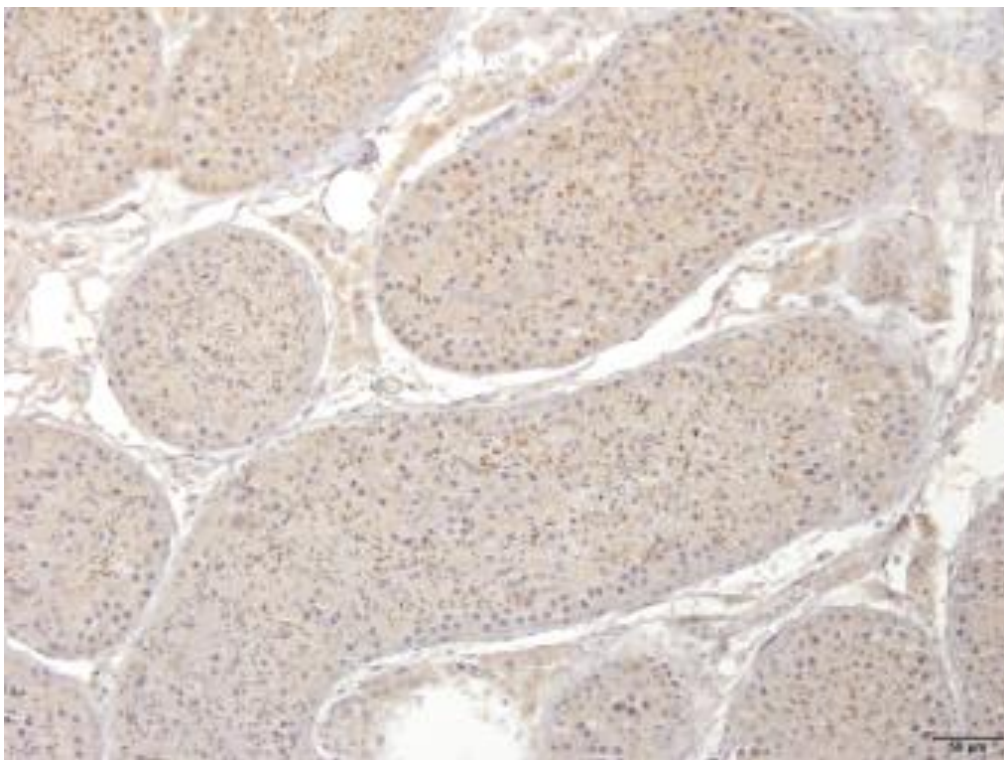


Figura 5 - Fotomicrografia dos cortes para imuno-histoquímica, de fragmentos testiculares de gatos domésticos. Fragmentos testiculares de 0,3cm³, criopreservado com propanediol onde é possível observar a marcação da caspase 3 com predomínio no citoplasma e espermatozoides, mas pouca marcação nuclear. Hematoxilina-eosina, 20x.

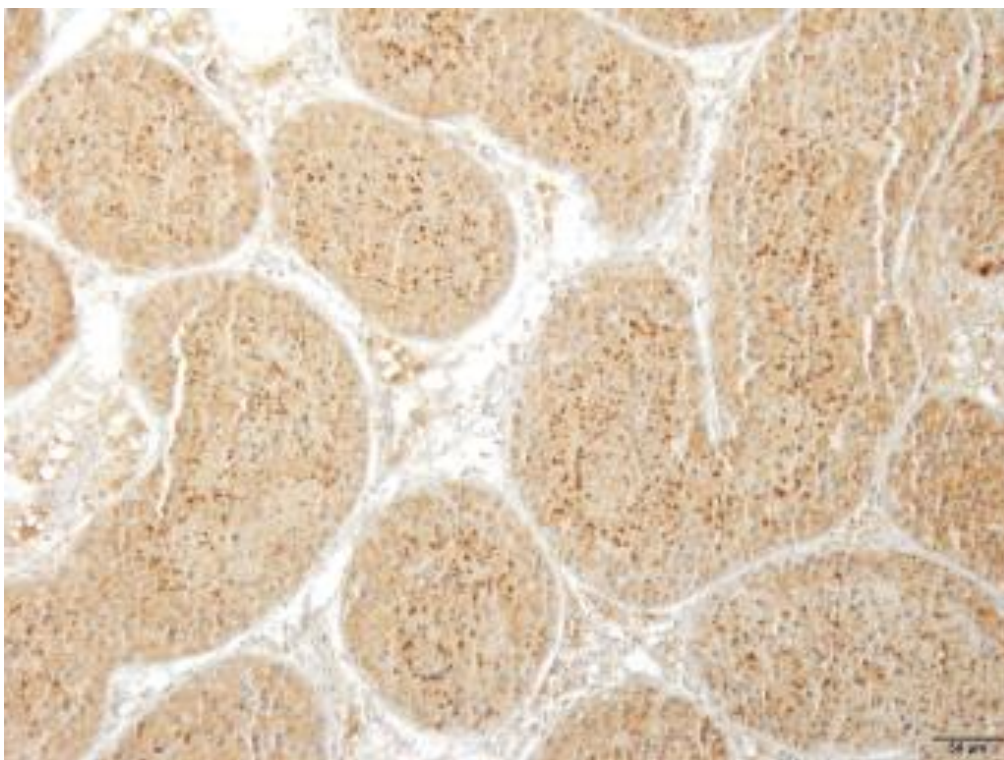


Figura 6 - Fotomicrografia dos cortes para imuno-histoquímica, de fragmentos testiculares de gatos domésticos. Fragmento testicular de 0,5cm³, criopreservado com propanediol. É possível observar a marcação da caspase 3, em todas as estruturas (citoplasma, núcleo e espermatozoides). Hematoxilina-eosina, 20x.

Discussão

A criopreservação de tecido testicular é uma ferramenta muito importante de preservação de material genético (Wyns et al., 2008; Buarpung et al., 2012). Contudo, para que os fragmentos possam ser utilizados após a descongelação, é necessário que os protocolos de criopreservação preservem a integridade do DNA das células espermáticas e/ou a qualidade estrutural do tecido (Thuwanut et al., 2013). Neste presente estudo, um ótimo crioprotetor, assim como o tamanho do fragmento, foram avaliados para a eficiência de criopreservação do tecido testicular e espermatozoides testiculares recuperados de gatos domésticos.

A ocorrência de fragmentação do DNA nas células espermáticas avaliadas pela coloração de acridina laranja demonstrou que os fragmentos de 0,5 cm³ criopreservadas com propanediol apresentaram o pior resultado (47% das células com dano no DNA), diferindo significativamente do glicerol (31% das células com dano no DNA) e das amostras frescas (30% das células com dano no DNA), nas mesmas condições. Esses achados podem indicar a ineficiência do propanediol em relação ao glicerol, na proteção dos espermatozoides presentes em fragmentos de 0,5cm³, assim como observado em estudos prévios (Macente et al., 2016).

Autores ao comparar o glicerol com a combinação do Etilenoglicol com DMSO, não observaram diferença entre estes para dano ao DNA das células espermáticas de fragmentos testiculares de gato doméstico (0,3 cm³) (Chatdarong et al., 2016). As diferenças de atuação dos crioprotetores podem ser justificadas por suas propriedades, como o tamanho e peso molecular que podem afetar a velocidade de penetração e saída no tecido testicular (Abrishami et al., 2010) ou sobre a penetração nas membranas plasmáticas entre os diferentes tipos celulares (Pegg, 2000).

Na histomorfologia, podemos inferir que as amostras frescas apresentavam preservação do revestimento epitelial no momento da coleta, mas essa qualidade regrediu após os processos de

criopreservação, demonstrando que a qualidade tecidual sofre queda independente da metodologia utilizada (Ball e Vo, 2001).

Entre as amostras criopreservadas, a avaliação da integridade do revestimento epitelial do tecido testicular apresentou as piores classificações para os fragmentos de 0,5 cm³, tanto para o glicerol quanto para o propanediol. Já na avaliação da integridade do núcleo das espermatogônias pode ser verificado que as amostras criopreservadas sofreram graves alterações, independente do tamanho do fragmento e tipo de crioprotetor. Em ratos, a criopreservação do tecido testicular (testículo inteiro) com DMSO demonstrou-se mais eficiente que o glicerol e o propanediol nas avaliações histomorfológicas e ultraestrutural (Ali et al., 2016). Wu et al. (2011) observaram maior eficiência do DMSO na criopreservação de tecido testicular de bovinos fragmentados em 0,3 e 0,5 cm³, ao compará-lo ao propanediol e o etilenoglicol. Contudo, a avaliação entre as associações do DMSO com o glicerol, o DMSO com Etilenoglicol e Glicerol com Etilenoglicol para criopreservar fragmentos de 0,1cm³ de gatos domésticos apontou a eficiência apenas dos grupos que continham glicerol (Lima et al., 2016). Pode-se verificar que o DMSO e o glicerol se sobressaem aos demais crioprotetores citados na proteção estrutural dos tecidos testiculares. No entanto, ainda não foi estabelecido qual o melhor crioprotetor para a espécie felina, sendo extrapolados dados destas outras espécies ou, ainda, de sucessos obtidos na criopreservação de tecidos ovarianos.

Sobre a avaliação imuno-histoquímica, a caspase 3 é uma proteína que participa da cascata de apoptose celular. Sua sinalização citoplasmática indica que a célula iniciou processo de degeneração celular, mas é a marcação nuclear que atesta a morte celular (Earnshaw et al., 1999).

No presente estudo, foram observadas marcações bem evidentes e distintas para citoplasma, núcleo e espermatozoides. Neste sentido verificamos que os achados para a caspase 3 citoplasmática apresentaram uma distribuição semelhante na classificação das amostras

criopreservadas, independente do tamanho ou crioprotetor. Toda via, a marcação para caspase 3 nuclear foi evidente entre 10 a 50% das amostras, independente do tamanho e grupo avaliado, mesmo para as amostras frescas. A avaliação das amostras por meio da imuno-histoquímica mostrou-se mais precisa na determinação dos efeitos deletérios da criopreservação em relação à avaliação histológica básica, assim como observado para a técnica TUNEL (Negoescu et al., 1996). Este é o primeiro estudo a empregar a caspase 3 na avaliação de apoptose celular em tecido testicular de felinos. Por meio dela foi possível verificar, à semelhança das observações de Thuwanut et al. (2013), a fragilidade do tecido testicular, sendo necessária adequada refrigeração durante o transporte do material logo após a coleta, bem como agilidade no início do processamento das amostras. Os achados deste estudo demonstram que 1 h entre a coleta após a cirurgia de orquiectomia eletiva até o início do processamento pode comprometer ao menos 50% das células espermáticas.

Os valores observados para a marcação de caspase 3 nos espermatozoides também demonstraram danos nas amostras frescas. Estas foram semelhantes aos achados para as amostras criopreservadas em 0,3 cm³, independente do crioprotetor. Entretanto, para o tamanho de fragmento de 0,5 cm³, as amostras criopreservadas apresentaram-se com até 5 vezes mais espermatozoides marcados com caspase 3, sendo o pior resultado observado para o crioprotetor propanediol. Estes resultados demonstram que o propanediol é menos efetivo na proteção de espermatozoides testiculares criopreservados dentro do tecido testicular.

Os achados de marcação da caspase 3 para espermatozoides reforçam e ampliam os resultados para danos ao DNA pela acridina laranja, deste e de estudos anteriores (Macente et al., 2016), onde os fragmentos de 0,5 cm³ não são adequadamente crioprotégidos pelo propanediol em relação ao glicerol. Resultados semelhantes foram observados ao avaliarem o efeito do glicerol, etilenoglicol, propanediol e DMSO, para criopreservar tecido testicular de gatos domésticos

adultos, objetivando espermatozoides viáveis para realização de ICSI. Neste caso, os resultados foram superiores com o glicerol a 10% (Buarpung et al., 2013).

Com base nos resultados, podemos observar a diferença na atuação dos crioprotetores, com relação à proteção que oferecem ao tecido testicular ou aos espermatozoides. Muitos estudos já apontam a superioridade do glicerol para algumas espécies na criopreservação das células espermáticas de ejaculados, recuperados epididimários e suspensões de células obtidas de fragmentos testiculares, mesmo para a espécie felina (Crabbé et al., 1999; Axné et al., 2004; Chatdarog et al., 2016). Em nossos estudos, podemos concluir por meio da imuno-histoquímica que tanto o glicerol quanto o propanediol na concentração de 3% proporcionaram proteção aos danos causados pela criopreservação para ambos os tamanhos de fragmentos pesquisados, podendo prevenir até 50% das células teciduais testiculares. Contudo, os espermatozoides obtidos de fragmentos de 0,5 cm³, demonstraram-se mais sensíveis ao crioestresse quando na utilização do propanediol.

Novas pesquisas que possam complementar os testes realizados neste estudo, como o cultivo dos fragmentos, a fertilização in vitro por meio de ICSI, ou ainda, o uso dos fragmentos para xenotransplantes poderiam ampliar os conhecimentos a cerca dos crioprotetores e tamanhos dos fragmentos pesquisados.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Roberta Vantini/ Laboratório de Reprodução Unesp, Jaboticabal/SP e Sr. José Luis de Souza/ Laboratório de Anatomia Patológica Unifran, Franca/SP, pelo suporte técnico e laboratorial e também ao Professor Jeffrey Frederico Lui (CECG) e seu time pelo material biológico.

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

Referências

Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A, 2010: Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology* 73, 86-89.

Ball BA, Vo A, 2001: Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and the Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability, and Mitochondrial Membrane Potential. *Journal of Andrology* 21, 1061-1069.

Benson EE, 2004: Principles of Cryobiology. In: Lane NJ, Benson EE, Fuller BJ (ed.) *Life in the frozen states*. Boca Raton: CRC Press. p328.

Buarpung S, Tharasanit T, Comizzoli P, Techakumphu M, 2012: Effects of cold storage on plasma membrane, DNA integrity and fertilizing ability of feline testicular spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 131, 219-227.

Buarpung S, Tharasanit T, Comizzoli P, Techakumphu M, 2013: Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 79, 149-158.

Chatdarong K, Thuwanut P, Morrel JM, 2015: The development of cat testicular sperm cryopreservation protocols: Effects of tissue fragments or sperm cell suspension. *Theriogenology*, 85, 1-7.

Crabbé E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A, 1999: Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *International Journal Andrology* 22, 43-48.

Comizzoli P, Wildt DE, 2012: On the horizon for fertility preservation in domestic and wild carnivores. *Reproduction Domestic Animals* 47 (Suppl 6), 261–265.

Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthil BS, 2006: In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology* 66, 1659-1663.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann AH, 1999: Mammalian Caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 383-424.

Fuller BJ, 2004: Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 2004; 25: 375-388.

Honaramooz A, 2012: Cryopreservation of Testicular Tissue, *Current Frontiers in Cryobiology, InTech*. Available from: <http://www.intechopen.com/books/currentfrontiers-in-cryobiology/cryopreservation-of-testicular-tissue>. Access: 28 de abril de 2016.

Hori T, Ichikawa M, Kawakami E, Tsutsui T, 2004: Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science* 66, 37-41.

Hori T, Matsuda Y, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T, 2011: Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science* 73, 1685-1688.

Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S, 2007: Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Human Reproduction* 22, 1060-1067.

Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O, 2005: Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 20(6), 1676-87.

Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O, 2007: Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 22, 1384-1395.

Luvoni GC, 2006: Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66 (1), 101-11.

Macente BI, Toniollo GH, Apparício M, Masano CFM, Thomé HE, Canella CL, Tozato MEG, Gutierrez RR. 2016: Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissues. *Reproduction Domestic Animal*, 51(Suppl 5), 1-6.

Marks SL, Dupuis J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CCJR, 1994: Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 204, 1639-1640.

Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, 2008: Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Human Reproduction* 23 (1), 17-28.

Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, Safsaf A, Arnoult C, Macé B, 2010: Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *Journal Andrology*. [Epub ahead of print]

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guilhermet C, Brambilla C, Brambilla E, 1996: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Histochem. Cytochem.* 44, 959-968.

Statistical Analyses System SAS. Version Release 8.4. for Windows, 2014. CD ROM.

Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E, 2002: Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. *Human Reproduction* 17, 55–62.

Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A, 2002: Birth of offspring following

transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Human Reproduction* 17, 3039–3045.

Pegg DE, 2002: The history and principles of cryopreservation. *Seminars Reprod Med* 20, 5-13.

Primack RB, Rodrigues E, 2001: *Biologia da conservação*. E. Rodrigues, Londrina, 328p.

Pukazhenti BS, Neubauer K, Jewgenow K, Howard J, Wildt DE, 2006: The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 66 (1), 112-21.

Tharasanit T, Buarpong S, Manee-In S, Thongkittidilok C, Tiptanavattana N, Comizzoli P, Techakumphu M, 2012: Birth of kittens after the transfer of frozen–thawed embryos produced by Intracytoplasmic Sperm Injection with spermatozoa collected from cryopreserved testicular tissue. *Reproduction Domestic Animal* 47 (Suppl. 6), 305–308.

Thuwanut P, Srisuwatanasagul S, Wongbandue G, Tanpradit N, Thongpakdee A, Tongthainan D, Manee-In S, Chatdarong K, 2013: Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology* 67, 244–247.

Unanian MM, 2000: Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. *Embrapa*, 56, 21p.

Walker RA, 2006: Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment. *Histopathology* 49(4), 406-410.

Watson PF, 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60–61, 481-92.

Wu J, Hu T, Liu Y, Jin B, Che G, Guo B, Yue Z, Li Z, Zhang X, 2011: Cryopreservation Of Adult Bovine Testicular Tissue. *International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE)*.

Wyns C, Van Langendonckt A, Wese FX, Donnez J, Curaba M, 2008. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Hum Reprod.* 23:2402-2414.

Considerações finais

Através de nossos estudos foi possível verificar que a criopreservação de tecidos testiculares possibilita a conservação de toda gama de células presentes em um pequeno fragmento tecidual. Contudo, essa variabilidade de células em vários estágios de desenvolvimento e com características muito específicas, como as células estruturais e as células germinativas dos túbulos seminíferos, torna-se um desafio na busca por um crioprotetor que atue de forma eficiente para todas, necessitando-se ainda, considerar as particularidades entre cada espécie. O foco em determinada linhagem de células ou a combinação de crioprotetores pode ser uma alternativa para maior efetividade na criopreservação.

Os resultados encontrados em nossos estudos servirão para otimizar futuras pesquisas sobre a criopreservação de tecido testicular na espécie felina. Entretanto, a complementação do estudo com a realização de fertilização in vitro por meio de ICSI utilizando os espermatozoides recuperados dos tecidos criopreservados ou o cultivo in vitro das células tubulares seminíferas; ou ainda o uso dos fragmentos para realização de xenotransplantes; poderiam servir como perspectivas futuras como uma melhor forma de determinar a acurácia destes achados.