

Criopreservação de tecido testicular por congelamento lento como alternativa para preservação do potencial reprodutivo de ovinos Morada Nova adultos

R.H. Celiz¹, M.A.S. Novaes¹, N.A.R. Sá¹, L.V.S. Ñaupás¹, F.D.R. Gomes¹, G.J.Q. Palomino¹, A.P.R. Rodrigues¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UECE, Fortaleza, CE, Brasil

Introdução

A criopreservação é uma metodologia amplamente utilizada para preservação da fertilidade masculina através da conservação dos gametas, i.e., espermatozoides. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como, por exemplo, a preservação de germoplasma de animais com alto valor genético ou ameaçados de extinção que morrem acidentalmente ou que ainda não atingiram a maturidade sexual. Dentro deste contexto, nos últimos anos tem sido desenvolvidas alternativas para preservação da fertilidade, dentre as quais destacamos a criopreservação do tecido testicular. Assim, a criopreservação de tecido testicular se destaca por possibilitar a preservação da fertilidade de machos pré-púberes, permitindo a preservação de diferentes células testiculares, mantendo as células testiculares em seu "nicho" e fornecendo contatos entre as células germinativas e somáticas (Yokinoshi *et al.*, 2014). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do método de criopreservação no tecido testicular de ovinos Morada Nova adultos.

Metodologia

Foram retirado fragmentos (9 mm³) de tecido testicular de ovinos M. Nova com um ano de idade, colocados em placa contendo meio MEM-HEPES e distribuídos aleatoriamente nos grupos: **controle fresco**, **congelamento lento** e **vitrificação**. Foram utilizados seis fragmentos por tratamento. Quanto à congelamento lento, os fragmentos foram expostos em MEM-HEPES com soro fetal bovino e dimetilsulfóxido (DMSO) e transferidos para um freezer a -80 ° C no *Mr. Frosty*, posteriormente armazenados em nitrogênio líquido (NL). Para a vitrificação, os fragmentos foram colocados em no dispositivo *ovarian tissue cryosystem* (OCT) e expostos em duas soluções crescentes de MEM-HEPES suplementado com DMSO e etileno glicol e, posteriormente armazenados em NL. Ao final do período de armazenamento, as amostras foram aquecidas por imersão sequencial em soluções de MEM-HEPES com concentrações decrescentes de sacarose. Após o aquecimento, as amostras foram destinadas para análise histológica, sendo realizada avaliação da morfologia tecidual mediante classificação em scores com escala de 0 até 3, onde 0 o tecido foi considerado íntegro e 3, o tecido muito danificado. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste H de Kruskal-wallis para comparação entre os grupos, com nível de significância de 5%.

maior quando comparado com os fragmentos frescos (p<0,05), sem, no entanto, apresentar diferenças significativas em comparação com o tecido vitrificado (Tabela 1). Finalmente, a organização das células peritubulares foi afetada apenas quando utilizada a vitrificação (p<0,05). Nossos resultados corroboram com os dados reportados anteriormente que suportam a importância da taxa de congelamento lento para minimizar a crioinjúria aos componentes do tecido em comparação com a vitrificação. Como foi relatado na criopreservação de tecido testicular de ovinos pré-púberes, (Pukazhenth et al., 2015). Além disso, Yildiz et al., 2018, ao compararem a congelamento lento e vitrificação na criopreservação de tecido testicular de camundongo, demonstraram que a congelamento lento apresentou maiores taxas de sobrevivência em comparação com outros protocolos vitrificados.

Tabela 1. Avaliação da histomorfologia do tecido testicular de ovinos adultos após congelamento lento e vitrificação. Dados expressos como média ± sem (n = 5 animais por tratamento).

Parâmetros	Controle fresco	Congelamento lento	Vitrificação
Distinção de nucléolos	0.37 ± 0.06 ^a	1.45 ± 0.08 ^b	2.30 ± 0.07 ^c
Condensação de núcleos	0.51 ± 0.05 ^a	1.66 ± 0.07 ^b	2.38 ± 0.06 ^c
Ruptura da membrana basal	0.04 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.07 ^b	0.76 ± 0.08 ^c
Retração da membrana basal	0.39 ± 0.07 ^a	1.11 ± 0.10 ^b	1.51 ± 0.12 ^b
Perda de células do túbulo seminífero	0.80 ± 0.08 ^a	1.57 ± 0.08 ^b	2.23 ± 0.08 ^c
Organização das células peritubulares	1.28 ± 0.08 ^a	1.49 ± 0.06 ^a	1.71 ± 0.06 ^b

^{a,b,c} Diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05).

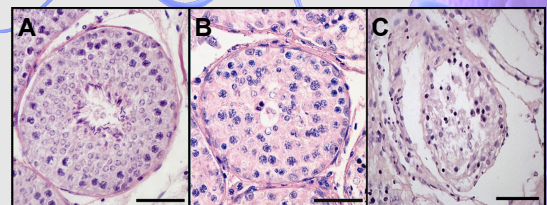


Figura 2. Histologia de tecido testicular de ovinos adultos nos grupos controle fresco (A), congelamento lento (B) e vitrificação (C). Barra de escala = 100 µm.

Considerações finais

Os resultados do estudo demonstraram que a criopreservação utilizando o método de congelamento lento se apresenta como uma excelente ferramenta para a preservação do tecido testicular adulto. Mais estudos são necessários para avaliar a retomada funcional do tecido utilizando cultivo *in vitro* como ferramenta de avaliação.

Referencias

1. B.S. Pukazhenth, J. Nagashima, A.J. Travis, G.M. Costa, E. N. Escobar, L.R. França, D.E Wildt. Slow Freezing, but Not Vitrification Supports Complete Spermatogenesis in Cryopreserved, Neonatal Sheep Testicular Xenografts. PLOS ONE, v.10(4), p. e0123957, 2015
2. C. Yildiz, B. Mullen, K. Jarvi, C. McKerlie, K.C Lo. Comparison of cryosurvival and spermatogenesis efficiency of cryopreserved neonatal mouse testicular tissue between three vitrification protocols and controlled-rate freezing. Cryobiology, v. 84, p.4–9, 2018
3. T. Yokinoshi, T. Sato, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Ogawa. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. Nature Communications, v. 5(1), p.4320, 2014



Figura 1. Criopreservação de tecido testicular de ovinos M. Nova

Resultados e discussão:

A avaliação histomorfológica da alteração nuclear (distinção de nucléolos e condensação de núcleos, ver Tabela 1) dos fragmentos criopreservados por congelamento lento mostraram scores mais altos em comparação com o controle fresco, no entanto, foram menores que os fragmentos vitrificados. Além disso, os fragmentos de tecido testicular frescos e criopreservados apresentavam poucos túbulos seminíferos com ruptura da membrana basal (Figura 2). Entretanto, nos fragmentos criopreservados por congelamento lento, a retração da membrana basal é