

EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO NA PRESERVAÇÃO MORFOLÓGICA DO TECIDO TESTICULAR DE GATO DOMÉSTICO

(Vitrification effects during morphological preservation of testicular tissue from domestic cat)

Inara Tayná Alves EVANGELISTA^{1*}; Julyne Vivian Guimarães de CARVALHO^{1,2};
Elaine Cristina Batista TORRES¹; Rafael Evangelista da CRUZ¹; Ana Paula
Ribeiro RODRIGUES³; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES^{1,2}

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (UFPA). BR 316 Km 61, Castanhal/PA.

CEP: 68.740-970.; ²Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia (UFRuA);

³Laboratório de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (UECE).

*E-mail: inaraevangelista@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of domestic cats (*Felis Catus*) testicular parenchyma vitrification by Ovarian Tissue Cryosystem and conventional straw. Three (n=3) adult cats were submitted to routine orchietomy. For the vitrification, the samples were exposed to equilibrium solution composed by RPMI, containing 20% of ethylene glycol (EG) and 0,1M of sucrose at 20 °C, for 3 minutes. Subsequently, exposed to vitrification solution, containing RPMI added to 40% of EG and 0,1 M of sucrose at 20 °C, for 2 minutes. After devitrification, 10 seminiferous tubules of each treatment were analyzed by histology assay. The viability of spermatid and Sertoli cells were analysed with light histology, as well as the seminiferous tubules morphometry. The vitrified groups were inferior to the control group in the morphologically integral cells analysis. However, the OTC was superior to straw in terms of morphological preservation of the germinative cells. Nevertheless, in morphometric analysis there was no statistical difference between the treatments (control, OTC and straw). Therefore, the vitrification in OTC method showed better results than vitrification in straw based on histological evaluation of germ and Sertoli cells of domestic cats.

Key words: Domestic cat, cryopreservation, vitrification.

INTRODUÇÃO

Diversas espécies de felinos silvestres encontram-se em declínio populacional por consequência de ações antrópicas, o que os expõem à ameaça de extinção (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Por consequência, o aprimoramento de biotécnicas de reprodução, como a criopreservação, tem sido desenvolvidas visando a formação de bancos de germoplasma e a conservação da biodiversidade (SILVA *et al.*, 2012).

Para manter o potencial genético das espécies, a criopreservação foi desenvolvida para possibilitar a redução do metabolismo celular, a fim de permitir a manutenção de células viáveis por tempo indeterminado (STACEY e DAY, 2007). A palheta convencional, é um dos métodos mais utilizados na criopreservação seminal, e mostra-se como alternativa na redução de espaço no armazenamento em botijões criogênicos, além de ser menos oneroso (ZIARATI *et al.*, 2019), tendo poucos relatos em tecido gonadal de gato doméstico. O sistema Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) consiste em uma estrutura cilíndrica de aço inoxidável, e possui estudos na criopreservação de tecido ovariano (CARVALHO *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2015; BRITO *et al.*, 2016), entretanto, não há relatos com tecido testicular. Diante disso, este estudo

objetivou avaliar a diferença entre os métodos em palheta e OTC, na preservação morfológica do tecido testicular de gato doméstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Para realização deste estudo, os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA: 2890040516), todos os procedimentos foram acompanhados por um médico veterinário. O projeto foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Pará, no Laboratório de Biotecnologia e Medicina dos Animais da Amazônia (BIOMEDAM). Foram selecionados machos púberes saudáveis de gato doméstico, submetidos a orquiectomia eletiva. Foi utilizada apenas uma gônada de cada animal, sendo a outra destinada para outros experimentos.

Desenho experimental

As gônadas (n=3) foram transportadas até o laboratório em placas de Petri esterilizadas, contendo solução fisiológica (NaCl) a 20 °C. Em seguida, os testículos foram separados do epidídimo e seccionados longitudinalmente, para a obtenção de 3 fragmentos (3 mm³) de parênquima testicular. As amostras do Grupo Controle (n=3) foram imediatamente fixados em solução de Davidson para avaliação histológica. Os demais fragmentos foram vitrificadas por Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) (n=3) e em palhetas convencionais (n=3).

Equilíbrio, Vitriificação e aquecimento

Na vitriificação, os fragmentos foram expostos à solução de equilíbrio composta por RPMI, contendo 20% de etilenoglicol (EG) e 0,1M de sacarose a 20 °C, por 3 minutos. Posteriormente, adicionadas à solução de vitriificação, contendo RPMI acrescido de 40% de EG e 0,1M de sacarose a 20 °C, por 2 minutos. O experimento foi realizado em duplicata, vitrificadas pelo sistema OTC segundo Carvalho, *et al.* (2013) e em palhetas convencionais (BRITO *et al.*, 2018), e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C). Após 1 semana, as amostras foram submetidas a 30 segundos em temperatura ambiente (25 °C) e 1 minuto a 37 °C em banho maria, seguido de três banhos de lavagem utilizando 1mL de RPMI com concentração decrescente de sacarose (0,05, 0,025 e 0 M) por 3, 5 e 7 minutos, respectivamente. Feito isso, os fragmentos foram fixados em solução de Davidson e processados para análise histológica.

Avaliação histológica

As amostras foram processadas para histologia clássica e submetidas a cortes seriados de 7µm, coradas por hematoxilina e eosina. A avaliação foi feita considerando 10 túbulos seminíferos de cada amostra, com auxílio do software *NIS Element* para contagem de células e obtenção de fotomicrografia, no aumento 400x. Foi realizada a contagem das células de linhagem espermática (espermatogônias, espermátides e espermátócitos) e células de Sertoli, classificadas em íntegras e degeneradas (quando houve alterações como núcleo picnótico e

vacuolização citoplasmática), sendo quantificadas todas as células no interior de cada túbulo e expressas em percentual de integridade. Também foram mensurados a área total; o diâmetro maior e menor e a altura do epitélio dos túbulos seminíferos avaliados (SILVA *et al.*, 2009).

Análise Estatística

A análise estatística foi feita pelo programa *Statview 5.0* e a os resultados expressos em média±desvio padrão. Foi utilizado ANOVA para determinar a diferença estatística, seguido de teste de *Fisher* para a diferença entre as médias. Todos os testes foram realizados com 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise histológica das células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e células de Sertoli, os métodos de vitrificação em palheta e *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) apresentaram resultados inferiores ao grupo controle (Tab. 01). Contudo, o grupo OTC não diferiu estatisticamente do controle para as células de Sertoli ($p=0,058$). Comparando os grupos palheta e OTC entre si, a vitrificação pelo método OTC demonstrou resultados superiores à palheta em função da preservação morfológica das células da linhagem espermática e de Sertoli ($p=0,012$).

Tabela 01: Avaliação histológica a partir da contagem de 10 túbulos seminíferos ($n=3$), células germinativas e células de sertoli, expressas em percentual de integridade.

(%)	Controle	OTC	Palheta
Espermatogônias	77±6 ^a	56±5 ^b	29±8 ^c
Espermatócitos	77±3 ^a	28±5 ^b	11±10 ^c
Espermátides	93±5859 ^a	46±5 ^b	27±9 ^c
Células de Sertoli	83±9 ^a	66±11 ^a	39±7 ^b

a,b,c: A utilização destas letras na mesma linha indica diferença estatística nas médias entre os tratamentos ($p\leq 0,05$).

Esse resultado pode ser atribuído a qualidade do dispositivo OTC por não permitir o contato do material biológico com o nitrogênio líquido e agilizar a adição e remoção da solução de vitrificação minimizando os danos decorrentes da manipulação do material (FAUSTINO *et al.*, 2015). Além disso, o aço inoxidável do qual o dispositivo é feito diminui o tempo da condutibilidade térmica, permitindo que o material atinja a temperatura de vitrificação mais rapidamente (CARVALHO *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2014).

Em relação a avaliação morfológica dos túbulos seminíferos, as medidas da área total, altura do epitélio, diâmetro maior e menor não diferiram estatisticamente entre os grupos, ou seja, ambos os métodos de vitrificação OTC e palheta obtiveram resultados semelhantes ao grupo controle ($p>0,05$). Portanto, os métodos de vitrificação empregados nesta pesquisa não demonstraram alterações quanto à preservação da morfometria dos túbulos seminíferos (Tab. 02), permanecendo de acordo com os valores normais para a espécie (NEUBAUER *et al.*, 2004).

Tabela 02: Análise morfométrica a partir da avaliação histológica de 10 túbulos seminíferos, considerando área total, altura do epitélio, diâmetro maior e menor.

	Controle	OTC	Palheta
Área Total (µm²)	36344,6±25419,7 ^a	18432,7±3237,1 ^a	35756,7±15905,9 ^a
Diâmetro Maior(µm)	220,3±53,3 ^a	191,4±15,6 ^a	374,3±200,5 ^a
Diâmetro Menor(µm)	156,8±29,9 ^a	127,9±9,7 ^a	152,8±45,5 ^a
Altura Epitélio(µm)	55,0±5,5 ^a	59,7±6,4 ^a	60,9±6,8 ^a

A utilização da letra “a” na mesma linha indica que não houve diferenças estatísticas nas médias entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÕES

Portanto, infere-se que o método de vitrificação OTC obteve maior eficiência na preservação morfológica das células de linhagem germinativa e células de Sertoli quando comparado ao método de vitrificação em palhetas convencionais, baseado na análise histológica dos túbulos seminíferos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADI, S.M.H.; MAXUELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v.99, n.3/4, p.223-243, 2007.
- BANDEIRA, F.T.; CARVALHO, A.A.; CASTRO, S.V.; LIMA, L.F.; VIANA, D.A.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; PEREIRA, M.J.S.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. *Reproduction of Domestic Animals*, v.50, n.1, p.177–185, 2015.
- BRITO, D.C.; DOMINGUES S.F.S.; RODRIGUES A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; SANTOS R.R.; PIECZARKA J.C.; *Vitrification of domestic cat (Felis catus) ovarian tissue: Effects of three different sugars*, *Cryobiology*, v.10, p.1016, 2018.
- CARVALHO A.A.; FAUSTINO L.R.; SILVA C.M.G.; CASTRO S.V.; LOPES C.A.P.; SANTOS R.R.; BÁO S.N.; FIGUEIREDO J.R.; RODRIGUES A.P.R. *Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)*. *Animal Reproduction Science*, v.138, n.3/4, p.220–227, 2013.
- CURABA, M.; VERLEYSSEN, M.; AMORIM, C.A.; DOLMANS, M.M.; LANGENDONCKT, A.V.; HOVATTA, O.; WYNS, C.; DONNEZ, J. *Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification*. *Fertility and Sterility*. v.95, n.4, p.4-15, 2011.
- FAUSTINO, L.R.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; ROSSETO, R.; LOPES, C.A.P.; TILBURG, M.F.; CARNEIRO, P.B.M.; BÁO, S.N.; MOURA, A.A.A.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; *Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex*. *Reproduction, Fertility and Development*. v.27, p.440–448, 2015.

NEUBAUER, K.; JEWGWNOW, K.; BLOTTNER, S.; WILDT, D.E.; PUKASHENTH, B.S. Quantity Rather Than Quality in Teratospermic Males: A Histomorphometric and Flow Cytometric Evaluation of Spermatogenesis in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v.71, n.3, p.1517–1524, 2004.

SILVA, A.R.; SOUZA, A.L.P.; SANTOS, E.A.A.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, P.C.; CASTELO, T.S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. *Ciência Animal*, v.22, n.1, p.219-234, 2012.

STACEY, G.N.; DAY, J.G. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2^a ed., Humana Press, 2007. 347p.

ZIARATI, N.; TOPRAGGALEH, T.R.; RAHIMIZADEH, P.; MONTAZERI, L.; MAROUFIZADEH, S.; GILANI, M.A.S.; SHAVERDI, A. Micro-quantity straw as a carrier for cryopreservation of oligozoospermic semen samples: Effects of storage times and cryoprotectant. *Cryobiology*, v.86, n.1, p.1-24, 2019.