



Vitrificação testicular de felinos pré-púberes *Testicular vitrification of prepubertal feline*

David Baruc Cruvinel Lima[‡], Lúcia Daniel Machado da Silva

Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

Resumo

Todas as espécies felinas encontram-se ameaçadas de extinção, exceto o gato doméstico, o que tem despertado interesse na otimização dos protocolos de conservação do material genético desses animais para utilização futura na reprodução artificial. Apesar das diferentes biotécnicas reprodutivas existentes, a criopreservação do tecido gonadal representa a única opção para resgatar e preservar o material biológico de animais pré-púberes que tenham ido a óbito precoce ou que foram submetidos a tratamentos que resultem em infertilidade. Em relação aos machos felinos, a vitrificação do tecido testicular é uma biotécnica reprodutiva com aplicações recentes na conservação do material biológico de felinos pré-púberes e os resultados obtidos são promissores. Utilizando o gato doméstico como modelo experimental, já foi possível desenvolver protocolos que propiciam menores danos aos túbulos seminíferos e suas populações celulares ao utilizar diferentes técnicas de vitrificação. Apesar dos avanços, ainda são necessários novos estudos no intuito de estabelecer protocolos ideais para o aquecimento dos fragmentos testiculares, assim como métodos para o desenvolvimento em cultivo da espermatogênese, o que irá possibilitar a utilização das células espermatogênicas obtidas na reprodução assistida de espécies felinas ameaçadas.

Palavras-chave: conservação, criopreservação, felídeo, testículo, impúbere.

Abstract

All the feline species are threatened, except the domestic, which has aroused interesting in the optimize the protocols of the genetic material conservation of these animals for future utilization in the artificial reproduction. Despite the different reproductive biotechniques, the gonadal tissue cryopreservation represents the only alternative to rescue and preserve the biological material from prematurely dead prepubertal animals or those undergoing treatments that cause infertility. In terms of male felines, vitrification of the testicular tissue is a reproductive biotechnology with recent applications in the conservation of the biological material of prepubertal animals and the results obtained are promising. Using the domestic cat as an experimental model, it has been possible to develop protocols that provide less injury to the seminiferous tubules and their cell populations using different vitrification techniques. Despite advances, new studies are still needed to establish optimal protocols for the warming testicular fragments, as well as methods for the development spermatogenesis in culture, which will allow the use of spermatogenic cells obtained in the assisted reproduction of the threatened feline species.

Keywords: *conservation, cryopreservation, feline, testicle, prepubescent.*

Introdução

As espécies mamíferas sofreram uma redução acentuada da população de vida livre nas últimas décadas com expectativa para que em 2020 a biodiversidade de populações de vertebrados ao redor do planeta decline 67% (WWF, 2016). Ademais, nos dias atuais aproximadamente 75% das espécies mamíferas encontram-se ameaçadas de extinção (Ceballos et al., 2017). Em relação aos mamíferos da ordem carnívora, um elevado número de espécies encontra-se ameaçada de extinção, incluindo todos os canídeos e felídeos selvagens pertencentes à fauna brasileira (ICMBIO, 2016).

Neste contexto, de todas as espécies felinas existentes no mundo, o gato doméstico é o único que não se encontra ameaçado de extinção. Outrossim, apesar das diferenças fisiológicas existentes entre as espécies felinas, o gato doméstico é a espécie que possui a biologia mais próxima dos felinos selvagens, o que coloca este animal como um excelente modelo experimental para avanços reprodutivos nas demais espécies (Villaverde et al., 2009; Baggio Júnior e Cavalcanti, 2014). Ainda, o gato doméstico tem sido utilizado como modelo experimental para diferentes estudos voltados à sanidade da população humana, o que reforça sua utilização em experimentos científicos (Giudice et al., 2017; Lee et al., 2018).

A reprodução é uma etapa essencial para a conservação da biodiversidade (Comizzoli et al., 2010). Neste contexto, pesquisas foram desenvolvidas no intuito de preservar o material biológico de diferentes espécies para utilização futura em programas de reprodução artificial e formação de biobancos (Selvaraj et al., 2011; Buarpong et al., 2013). Além do mais, utilizando o material biológico de animais púberes, diferentes estudos demonstraram a

[‡]Correspondência: davidbarucvet@gmail.com

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 10 de abril de 2019



habilidade de células espermáticas em sobreviver e manter as características estruturais após a criopreservação, como em homens (Yango et al., 2014), gatos (Lima et al., 2016a) e cães (Cartula-Sánchez et al., 2018).

Entretanto, as biotécnicas reprodutivas comumente utilizadas para recuperação das células espermáticas de animais púberes, tais como a eletroejaculação, vagina artificial, coleta de espermatozoides epididimários e cateterismo uretral, não representam uma alternativa para resguardar o potencial reprodutivo de animais pré-púberes (Lima et al., 2017). Para esses animais, a única possibilidade de manter a fertilidade é por meio do cultivo *in vitro* ou por meio do xenotransplante do tecido testicular (Poels et al., 2012; Baert et al., 2015). Todavia, os protocolos envolvendo a utilização do tecido testicular contendo apenas células espermatogênicas primordiais como as espermatogônias e os espermátócitos primários ainda necessitam de aprimoramentos na maioria das espécies (Pothana et al., 2015).

Células imaturas cultivadas de camundongos imediatamente após o processamento testicular ou após criopreservação de fragmentos testiculares já foram utilizadas para desenvolvimento *in vitro* com posterior inseminação artificial e obtenção de proles saudáveis (Sato et al., 2011; Yokonishi et al., 2014). Em felinos, essa possibilidade mostra-se desafiadora, pois em condições *a fresco*, as células imaturas de gatos domésticos utilizadas para progressão *in vitro* não demonstraram a capacidade de se diferenciarem em espermátides e espermatozoides após 6 semanas de cultivo (Silva et al., 2018).

Em termos de técnicas para criopreservação, os primeiros trabalhos envolvendo a criopreservação testicular de felinos utilizaram a congelamento lenta (Wyns et al., 2013). Entretanto, na busca de melhores resultados para preservação do tecido testicular criopreservado, a técnica da vitriificação começou a ser utilizada, após resultados satisfatórios em estudos envolvendo tecido gonadal de fêmeas (Amorim et al., 2011). Em diferentes espécies, a vitriificação do tecido testicular tem demonstrado resultados satisfatórios na preservação das estruturas e funções biológicas, incluindo os felinos (Thuwanut et al., 2013, Lima et al., 2016b).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi descrever os principais avanços obtidos na vitriificação do tecido testicular de felinos pré-púberes.

Vitriificação do tecido testicular de felinos pré-púberes

A vitriificação do tecido testicular representa uma excelente oportunidade para o resgate e conservação do material biológico de animais pré-púberes (Lima e Silva, 2017a). O princípio básico da vitriificação tecidual se baseia na exposição prévia de fragmentos teciduais a elevadas concentrações de crioprotetores e posterior taxa de resfriamento ultra-rápida para solidificação tecidual, formando um estado tecidual vítreo (Brockbank et al., 2000). Por meio dessa biotécnica é possível evitar a formação de cristais de gelo intracelulares que são prejudiciais às células (Curaba et al., 2011). Em termos da manutenção da arquitetura tecidual e recuperação das funções celulares após o aquecimento dos fragmentos, essa técnica de criopreservação tem apresentado excelentes resultados quando utilizada para criopreservação do tecido testicular (Gouk et al., 2011, Yokonishi et al., 2014).

Poucos estudos foram desenvolvidos utilizando o tecido testicular criopreservado de felinos púberes (Thuwanut et al., 2013) e em relação aos felinos pré-púberes, os resultados existentes na literatura ainda são escassos. Em termos da técnica de vitriificação, os experimentos conduzidos até o presente momento utilizaram o tecido testicular do gato doméstico pré-púbere como modelo experimental para as demais espécies felinas (Lima et al., 2016c). Foram avaliados diferentes aspectos da morfologia testicular após vitriificação com associações de crioprotetores amplamente utilizados na criopreservação tecidual, sendo eles o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido.

Em um estudo realizado por Lima et al. (2016d) utilizando o tecido testicular de gatos domésticos pré-púberes, a associação de crioprotetores que propiciou menores efeitos deletérios aos túbulos seminíferos e suas populações celulares após vitriificação por superfície sólida dos fragmentos foi a glicerol/dimetilsulfóxido (DMSO). Neste trabalho, os autores observaram quantidade de túbulos seminíferos com separação e retração da membrana basal semelhante ao grupo tratado *a fresco*. Ainda, as células germinativas mantiveram um elevado potencial de proliferação celular utilizando a associação glicerol/DMSO, não diferindo dos resultados observados no grupo controle.

Ao aplicarem a técnica de vitriificação em criotubos utilizando fragmentos testiculares de gatos domésticos pré-púberes, Lima et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes associações de crioprotetores sobre a viabilidade celular após o aquecimento dos fragmentos. Os autores observaram que a associação glicerol/DMSO foi a única a apresentar taxa de sobrevivência celular igual a evidenciada no grupo *a fresco*.

Apesar dos avanços obtidos nesses estudos, outros aspectos relacionados ao processo de vitriificação necessitam ser elucidados, como a influência do protocolo de aquecimento dos fragmentos testiculares, a capacidade de sobrevivência do tecido vitrificado em meios de cultivo *in vitro* e a continuidade da espermatogênese após o processo de vitriificação e cultivo com vistas a obtenção de células espermáticas maduras que possam ser utilizados na reprodução artificial (Lima e Silva, 2017b).



Conclusão

A vitriificação do tecido testicular de felinos pré-púberes tem apresentado resultados promissores utilizando o gato doméstico como modelo experimental. Todavia, novos estudos ainda são necessários para o desenvolvimento de protocolos que permitam a diferenciação de populações celulares primordiais em células espermáticas maduras utilizando meios, tais como o xenoenxerto e o cultivo *in vitro*, para que essa biotécnica possa ser empregada na reprodução assistida de felinos selvagens e, dessa forma, possa contribuir para a conservação dos felinos ameaçados de extinção.

Referências

- Amorim CA, Curaba M, Langendonck AV, Dolmans MM, Donnez J.** Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, v.23, p.160-186, 2011.
- Baert Y, Braye A, Struijk RB, Van Pelt AM, Goossens E.** Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter *in vitro* cell dynamics. *Fertility and Sterility*, v.104, p.1244-1252, 2015.
- Baggio Júnior R, Cavalcanti PV.** Análise de organelas espermáticas de gato doméstico (*Felis catus*) como modelo biológico para conservação de gametas de felídeos em extinção. *Revista Educação*, v.9, n.2, 2014.
- Brockbank KGM, Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot FG, Boggs JM, Taylor MJ.** Storage of tissues by vitrification. *Transplantation Proceedings*, v.32, p.3-4, 2000.
- Buarpong 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, n.1, p.149-158, 2013.
- Cartula-Sánchez E, Sánchez-Calabuig MJ, Pérez-Gutiérrez JF, Cerdeira J, Castaño C, Santiago-Moreno J.** Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, v.80, p.126-129, 2018.
- Ceballos, G.; Ehrlich, P. R.; Dirzo, R.** Biological annihilation via ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *PNAS*, v.114, p.E6089-E6096, 2017.
- Comizzoli P, Songsasen N, Wildt DE.** Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat Res*, v.156, p.87-100, 2010.
- Curaba M, Verleysen M, Amorim CA, Dolmans MM, Langendonck AV, Hovatta O, Wyns C, Donnez J.** Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. *Fertility and Sterility*, v.95, p.1229-1234, 2011.
- Giudice MG, Michele F, Poels J, Vermeulen M, Wyns C.** Update on fertility restoration from prepubertal spermatogonial stem cells: how far are we from clinical practice? *Stem Cell Research*, v.21, p.171-177, 2017.
- Gouk SS, Loh YFJ, Kumar SD, Watson PF, Kuleshova LL.** Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v.95, p.2399-2403, 2011.
- ICMBIO.** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, 2016. 76 p.
- Lee PC, Wildt DE, Comizzoli P.** Proteomic analysis of germinal vesicles in the domestic cat model reveals. *Molecular Human Reproduction*, v.24, p.14-26, 2018.
- Lima DBC, Silva LDM.** Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, v.47, p.1-8, 2017a.
- Lima DBC, Silva LDM.** Obtenção e conservação do material biológico do gato doméstico macho. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, p.278-282, 2017b.
- Lima DBC, Silva TFP, Annice-Cortez A, Leiva-Revilla J, Silva LDM.** Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology*, v.110, p.110-115, 2017.
- Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Pinto JN, Magalhães FF, Caldini BN, Silva LDM.** Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and tris extenders. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.68, n.4, p.873-881, 2016a.
- Lima DBC, Silva, Silva TFP, Morais GB, Aquino-Cortez A, Xavier Júnior FAF, Evangelista JSAM, Silva LDM.** Histomorphological evaluation of prepubertal cat testicular tissue submitted to vitrification. In: 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR, Paris: IVIS, 2016b. p.62.
- Lima DBC, Silva, Morais GB, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Viana DA, Evangelista JSAM, Silva LDM.** Proliferation of spermatogonia from prepubertal cat testicular tissue after vitrification. In: 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR, Paris: IVIS, 2016c. p.160.
- Lima DBC, Silva TFP, Morais GB, Aquino-Cortez A, Evangelista JSAM, Xavier Júnior FAF, Viana DA, Silva LDM.** Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reprod Dom Anim*, v.51, p.1-7, 2016d.
- Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, Donnez J, Wyns C.** Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology*, v.77, p.1008-1013, 2012.



- Pothana L, Makala H, Devi L, Varma VP, Goel S.** Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology*, v.83, p.625-633, 2015.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T.** In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, v.471, p.504-508, 2011.
- Selvaraj V, Wildt DE, Pukazhenti BS.** Induced pluripotent stem cells for conserving endangered species? *Nature Methods*, v.8, p.805-807, 2011.
- Silva AF, Escada-Rebello S, Amaral S, Tavares RS, Schlatt S, Ramalho-Santos J, Mota PC.** Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an in vitro tissue culture approach? *PLoS ONE*, v.13, p.1-14, 2018.
- 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.
- Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD.** Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim Reprod Sci*, v.114, p.434-442, 2009.
- WWF.** World Wide Fund for Nature. Living planet report 2016. Risk and resilience in a new era. Switzerland, 2016. 74 p.
- Wyns C, Abu-Ghannam G, Poels J.** Vitriificação du tissu testiculaire: évolution ou révolution? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, v.41, p.558-561, 2013.
- Yango P, Altman E, Smith JF, Klatsky PC, Tran ND.** Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v.102, p.1491-1498, 2014.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T.** Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*, v.5, p.1-6, 2014.
-