

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES

(Canis lupus familiaris)

Autor: José Fabson Pinheiro dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso

Garanhuns-PE, Brasil

Abril - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES

(Canis lupus familiaris)

Autor: José Fabson Pinheiro dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS, no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, UAG – Área de Concentração: Produção Animal.

Garanhuns-PE, Brasil

Abril – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S237c Santos, José Fabson Pinheiro dos
Criopreservação de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*) / José Fabson Pinheiro dos Santos. - 2018.

50 f.

Orientadora: Rita de Cássia Soares Cardoso.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós
- Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Garanhuns,
BR - PE, 2018.

Inclui referências

1. Cão - Reprodução 2. Espermatozoides 3. Gametas 4. Cão
Fecundidade I. Cardoso, Rita de Cássia Soares, orient. II. Título

CDD 636.08926

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES
(Canis lupus familiaris)

Autor: José Fabson Pinheiro dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Soares Cardoso

Aprovado em 24/04/2018

Titulação: Mestre em Ciência Animal e Pastagens

Área de Concentração: Produção Animal

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
(UAG-UFRPE)

Prof. Dr. Jorge Eduardo C. Lucena
(UAG-UFRPE)

Prof^a. Dra. Rita de Cássia Soares Cardos
(UAG-UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Nessa jornada, minha família foi minha base, agradeço imensamente à cada um deles, meus pais, minhas irmãs, meus padrastos (Leandra e Henrique), meus tios, meus avôs, meu cunhado e sobrinha, bem como meus animais, muito obrigado a todos. Agradeço em especial a duas pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, apoiando e dando forças, minha mãe (Suzana) e meu pai (Fábio). Pai e Mãe, amo muito vocês, obrigado por ter confiado em mim e no meu potencial. Meus segundos pais, meus pais de coração, Dezia e Eduardo, aos dois muito obrigado por estarem comigo me apoiando de todas as formas. Minhas irmãs (Giselly, Yasmin e Rebecca). Tenho um agradecimento sem tamanho ao apoio da minha irmã mais velha (“Gica”) e meu cunhado (Dirceu). Aos meus irmãos de quatro patas agradeço por serem minhas alegrias, meus amigos, por estarem sempre do meu lado, Atyla, Madonna, Isabela, Rebeka, Luna, Doritos, Kiara e Morgana acho que eles não têm ideia do quanto são importantes para mim, mesmo talvez já tendo partido.

Tenho de agradecer aos excelentes professores que tive desde a graduação ao mestrado, em especial ao professor Gustavo Ferrer que contribuiu e imensamente para minha formação como médico veterinário especializado em biotecnologias da reprodução. Agradecimento especial a minha professora e orientadora Rita Cardoso, muito obrigado pelo empenho em me ensinar e orientar desde a graduação, e principalmente por me apresentar e me aperfeiçoar na área da reprodução de carnívoros, de verdade muito obrigado.

Agradeço pela parceria e toda ajuda dos meus amigos do LAGIC (Laboratório de Andrologia, Genecologia e Conservação de Carnívoros) e da turma do mestrado, Andressa, “Ari”, “Edy”, Elison, Hian, Luciana, Paula, Roberta, Sérgio, Wandson; bem como todos meus amigos da vida pessoal.

A equipe do Laboratório de Patologia Animal da UFRPE (Sede) foi de suma importância para conclusão do projeto, um obrigado especial para professora Alice e para os residentes Saulo, Romulo, Amanda e Mariana.

A todos, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A formação de um banco de germoplasma apresenta-se como uma importante ferramenta para a conservação da linhagem germinativa de animais de alto valor zootécnico, bem como de espécies ameaçadas de extinção. A criopreservação de tecidos é mais uma estratégia eficiente para contribuir com as ferramentas de conservação de gametas. Embora, não exista relato sobre a criopreservação de fragmentos testicular caninos na literatura, o cão doméstico apresenta-se como um bom modelo experimental para os canídeos ameaçados de extinção. O objetivo geral foi verificar a possibilidade de conservação de material genético de cães através da criopreservação de tecido testicular por vitrificação e congelamento em duas etapas. Foram utilizados testículos de animais pós-púberes sem raça definida (n=20 pares) provenientes do Centro de Controle Ambiental de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Após a orquiectomia bilateral, os testículos foram submetidos ao processo de criopreservação pelo método de vitrificação e duas etapas, os quais foram testados dois crioprotetores (dimetilsulfóxido e etilenoglicol) e a associação de ambos, em dois diferentes tempos de imersão (15 e 30 minutos). Os protocolos foram avaliados quanto à integridade de membrana e cromatina, bem como do tecido (células intratubulares e epitélio). O n amostral foi calculado em R (3.2.3) baseado nos principais trabalhos realizado em felinos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon. A associação entre dimetilsulfóxido e etilenoglicol trouxe melhor qualidade pós congelamento para integridade de membrana e cromatina, bem como melhor visualização dos nucléolos. Com relação ao método de congelamento, na maioria das avaliações o método de congelamento rápida (duas etapas) trouxe melhores resultados, menor condensação de núcleos e melhor visualização dos nucléolos. Já a congelamento ultrarrápida, a vitrificação, apresentou melhor conservação do tecido epitelial. Esse estudo mostrou a superioridade na combinação dos dois agentes crioprotetores, o dimetilsulfóxido e etilenoglicol em associação com método de duas etapas. Embora a vitrificação de tecido testicular de cães não tenha mostrado grandes resultados como o método de duas etapas, esse é um método excelente e prático capaz de contribuir para a conservação do germoplasmas. No entanto, esses são resultados primários em caninos, portanto, mais estudos são necessários para adaptação do protocolo. Ademais, ambos os tempos de imersão foram eficientes para os procedimentos de conservação de tecido.

ABSTRACT

Creating a germplasm bank is an important tool for germ cell conservation, mainly from animals of high zootechnical value as well as endangered species. Tissue cryopreservation is another efficient strategy to contribute with tools of gamete conservation. Although there is no report on cryopreservation of canine testicular fragments in the literature, the domestic dog presents a good experimental model for endangered canids. General objective was to verify the possibility of preservation of dog genetic material through the cryopreservation of testicular tissue by vitrification and two-step-freezing method. It was used testicles from post pubertal animals with no defined breed (n = 20 pairs) from the Environmental Control Center of Garanhuns, Pernambuco, Brazil. After bilateral orchiectomy, testicles were submitted to cryopreservation process by the vitrification method and two-step-freezing using two cryoprotectants (dimethylsulfoxide and ethylene glycol) in two different immersion times (15 and 30 minutes). Protocols were evaluated about membrane and chromatin integrity as well as tissue (intratubular cells and epithelium). For statistical analysis the number was calculated with 95% of confidence level, obtained data were subjected to normality test by Shapiro-Wilk. Wilcoxon-Test was used to compare treatments (P <0,05). The combination between dimethylsulfoxide and ethylene glycol presented better post-freezing quality for membrane and chromatin integrity and a better visualization of the nucleoli. Regarding the freezing method, in the most of evaluations the rapid freezing method (two-steps-freezing) showed better results, less condensation of nuclei and better visualization of the nucleoli. The ultrarapid freezing, vitrification, presented better preservation of the epithelial tissue. This study shows a superiority on the combination of dimethyl sulphoxide and ethylene glycol cryoprotectant agents in association with two-step-freezing method. Although vitrification did not show great results two-step-freezing method, it is an excellent practical method able to contribute to germoplasm conservation. Nevertheless, those are primo results for dogs, more studies must be performed for protocol adaptation. In addition, both times of immersion were efficient for tissue conservation procedures.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DE LITERATURA.....	14
OBJETIVOS.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 1 - CRYOPRESERVATION OF POSTPUBERTAL CANINE TESTICULAR TISSUE BY VITRIFICATION AND TWO-STEP-FREEZING.....	26
ABSTRACT.....	26
INTRODUCTION.....	27
MATERIAL AND METHODS.....	28
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	38
REFERENCES.....	40

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. The composition of media used in the experiment.....	30
Tabela 2. Percentage of testicular spermatozoa membrane integrity from control (fresh tissue) and frozen/thawed tissues in different methods.....	34
Tabela 3. Percentage of testicular spermatozoa chromatin integrity from control (fresh tissue) and frozen/thawed tissues.....	34

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1.	Fluxogram showing slicing of a pair of testes and destination of the fragments.....	29
Figura 2.	Observation of nucleoli comparison between freezing methods.....	36
Figura 3.	Nuclei condensation comparison between freezing methods.....	36
Figura 4.	Detachment of cells from the basement membrane comparison between freezing.....	37
Figura 5.	Gap formation comparison between freezing methods.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Bovine serum albumin
Cm – Centimeter
DMSO – Dimethyl sulphoxide
EG – Ethylene glycol
FCS – Foetal Calve Serum
M – Molar
mL – Milliliter
mM – Millimolar
PBS – Phosphate buffered saline
TCM-199 – Tissue culture medium-199
 μ L – Microliter

INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido gonadal é uma excelente estratégia na medicina veterinária por contribuir principalmente para conservação de espécies selvagens ameaçadas de extinção (THUWANUT e CHATDARONG, 2012), bem como *pets* de alto valor zootécnico, uma vez que o material genético conservado pode ser usado em reprodução assistida. Na medicina humana é importante para manter a fertilidade, especialmente após o tratamento oncológico (GOSDEN, 2011).

Conservar o tecido testicular por meio da criopreservação, teoricamente, oferece um método prático quando outras técnicas, tal como a criopreservação de espermatozoides ejaculados não é aplicável (TOURNAYE et al., 2004), podendo ser aplicado para a conservação de material genético de animais sexualmente imaturos de alto valor zootécnico ou em risco de extinção, bem como na restauração da fertilidade para meninos pré-púberes em tratamento oncológico gonadotóxico.

O banco de germoplasma é atualmente uma ferramenta importantíssima para manter a linha germinal de espécies de felinos selvagens ameaçados (THUWANUT e CHATDARONG, 2012), podendo ser aplicada a outras espécies, tais como canídeos. É importante ressaltar que a preservação da fertilidade por meio de banco de tecidos ainda está em fase experimental.

Muitos cães mantidos como animais de companhia são castrados antes de atingir a maturidade sexual. Contudo, muitos proprietários de cães arrependem-se da decisão posteriormente. Nesse sentido, a criopreservação do testículo após a castração pode ser uma alternativa, no qual o transplante do tecido preservado permitiria a formação de espermatozoides mesmo que sejam doadores imaturos sexualmente (ABRISHAMI et al., 2010).

Da mesma forma que para os *pets*, o xenotransplante do tecido criopreservado pode ser a única alternativa para canídeos ameaçados de extinção que morreram prematuramente. O xenotransplante já se mostrou como uma alternativa para a preservação de tecido, permitindo o restabelecimento do desenvolvimento do testículo pré-púbere de felídeos (SNEDAKER; HONARAMOOZ; DOBRINSKI, 2004).

Os mamíferos da Ordem Carnívora são animais que geralmente ocupam o topo da pirâmide alimentar, sendo por isso muito importantes para o equilíbrio dos ecossistemas em que ocorrem. No Brasil temos 28 espécies de carnívoros terrestres, divididos em cinco famílias: Felídeos, Canídeos, Mustelídeos, Procionídeos e Mefitídeos. Na família *Canidae*,

temos as espécies *Cerdocyon thous* (raposa), *Atelocynus microtis* (Cachorro-do-mato-de-orelha-curta), *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre), *Lycalopex gymnocercus* (Graxaim-do-campo), *Chrysocyon brachyurus* (Lobo-guará) e *Lycalopex vetulus* (Raposinha-do-campo). Segundo ICMBio, *Atelocynus microtis*, *Speothos venaticus*, *Lycalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus* apresentam-se ameaçados de extinção, na categoria vulnerável.

Cães domésticos são considerados animais de companhia, além de modelo experimental conveniente, podendo muitas vezes servir como receptores de embriões de outras espécies, devido ao pequeno número de exemplares de espécies selvagens em zoológicos e reservas (FARSTAD, 2000). Não há relatos de criopreservação de tecido testicular na espécie canina, e o cão apresenta-se como um potencial modelo experimental visto ser inviável a utilização de tecido testicular das espécies selvagens ameaçadas.

REVISÃO DE LITERATURA

Métodos de criopreservação de tecido testicular

A capacidade de preservar tecido testicular apresenta-se como um importante essencial nas técnicas emergentes de reprodução assistida (ABRISHAMI et al., 2010), tendo em vista que, nem sempre, o transplante imediato é possível ou desejável. Desta forma, o espaço de tempo entre a recuperação das espermatogônias e sua subsequente reintrodução implica na criopreservação destas células, de modo a mantê-las viáveis. Esse procedimento de criopreservação de tecido gonadal pode ser realizado pela criopreservação, pelo método convencional ou pelo método de vitrificação (POELS et al., 2012). O método convencional, caracteriza-se por congelamento lento, enquanto a vitrificação, por congelamento rápido e ultrarrápido (HOVATTA, 2003). Alguns autores ainda citam o método de congelamento em duas etapas como rápido (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2016).

O tecido testicular pode ser criopreservado em três apresentações possíveis: suspensão de células, pequenos fragmentos teciduais ou gônada inteira. A suspensão de células possui as desvantagens de ser um método trabalhoso e prejudicial à proliferação e diferenciação celular, uma vez que não existe interação célula a célula. Já a conservação da gônada inteira, mesmo sendo uma forma provável, não é relatada. Portanto, a maioria das pesquisas têm trabalhado com pequenos fragmentos testiculares (MILAZZO et al., 2008).

Criopreservação tecido testicular pelo método convencional

O método convencional de criopreservação é o mais amplamente utilizado para conservação de tecido gonadal. Apresenta a vantagem de ser um método menos tóxico para as células, pois requer baixas concentração de crioprotetores (KEROS et al., 2005). Em contrapartida, uma das principais razões para a falha na criopreservação pelo método convencional é a incapacidade de prevenir a formação de cristais de gelo no tecido. O gelo quando formado pode causar problemas na estabilização e armazenamento das células e tecidos. Tecidos congelados têm extensa formação de cristais de gelo extracelulares, mesmo durante os procedimentos que resultem em excelente viabilidade celular (BROCKBANK et al., 2000).

Criopreservação de tecido testicular pelo método de Vitriificação

Embora a criopreservação de tecido testicular por vitriificação seja um método novo, já demonstra sucessos, principalmente pela vantagem de prevenir a formação de cristais de gelo. Considerado um método estratégico inovador (POELS et al., 2012), o qual se baseia essencialmente na solidificação do tecido pelo nitrogênio líquido (BROCKBANK et al., 2000) com uma velocidade de congelação ultrarrápida e altas concentrações de crioprotetores, de forma que os cristais de gelo não sejam formados, prevenindo assim, os danos teciduais (POELS et al., 2012). Alguns estudos classificam a congelação rápida como congelação em duas etapas (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2016) portanto com as mesmas características da vitriificação.

A matriz extracelular e as células de sustentação são extremamente importantes para a sobrevivência e funcionamento das células germinativas. A vitriificação pode ser a resposta para manter esse sistema celular intacto para maior viabilidade, pois apresenta como vantagem a preservação das células de Leydig (células intersticiais) e células de Sertoli (células de sustentação) (SONG et al., 2010).

As células espermatogoniais, de Leydig e de Sertoli são ricas em citoplasma, portanto, são mais vulneráveis à congelação e descongelação. A grande quantidade de água no interior destas células aumenta o risco de destruição das organelas pela formação de cristais de gelo (KEROS et al., 2005). Assim, além de congelação adequada, se na descongelação, o aquecimento fornecido for rápido o suficiente para evitar a recristalização de água, a sobrevivência é geralmente maior (GOUK et al., 2011).

Experimentos com vitriificação de tecidos demonstraram que, com algum esforço para alterar protocolos e equipamentos, esse foi um procedimento eficaz quando aplicado ao tecido ovariano (SONG et al., 2010) de ratas (WANG et al., 2011), codornas (LIU et al., 2010) e humanos (KEROS et al., 2009; SANFILIPPO et al., 2015; SUZUKI et al., 2015).

Quanto ao tamanho do tecido testicular, é normalmente congelado em pequenos fragmentos e, posteriormente, descongelados para a recuperação de células germinativas (SONG et al., 2010). Com este objetivo temos a vitriificação como um método que apresenta bons resultados para esta prática, tendo sido bem-sucedida na preservação da fertilidade do macho em várias espécies animais, inclusive na humana.

Diversos estudos realizados com murinos são reportados na literatura. Gouk et al. (2011) hipotetizaram que a criopreservação por vitriificação poderia ser um método melhor que o método de criopreservação convencional para conservar tecido testicular imaturo de

camundongos. Dentre os resultados, os autores observaram que o método de vitrificação foi superior à congelação pelo método convencional preservando a arquitetura e integridade celular por evitar a formação de cristais de gelo extracelular. Concluem, ainda, que a vitrificação de tecido testicular é uma eficiente estratégia de tempo e custo na preservação das células tronco espermatogoniais. Curaba et al. (2011b) afirmam que a vitrificação é um método promissor e tão eficiente quanto a congelação convencional na conservação de tecido testicular imaturo de camundongos, sendo, porém, um processo mais rápido e conveniente. Além disso, no mesmo modelo experimental, outro grupo de pesquisadores observou que a vitrificação resultou num maior grau de integridade de células germinativas e, quando comparado à congelação convencional, o método produziu ainda um número mais elevado de células germinativas intactas com uma maior viabilidade (NERI et al., 2002).

Excelentes resultados também foram obtidos na vitrificação de tecido testicular imaturo de suínos (ABRISHAMI et al., 2010; KANEKO et al., 2013), de primata não humano (*Macaca mulatta*) (POELS et al., 2012) e, inclusive na preservação de tecido testicular imaturo de animais não mamíferos, como aves, utilizando codornas japonesas (*Coturnix japonica*) como modelo experimental (LIU et al., 2012; LIU et al., 2013) e peixes (*Danio rerio*) (BONO-MESTRE; CARDONA-COSTA; GARCÍA-XIMÉNEZ, 2009).

Thuwanut e Chatdarong (2012) obtiveram bons resultados com a vitrificação de tecido testicular de gatos domésticos adultos, embora não tenha sido o melhor método para conservação. O método convencional de congelação também foi melhor para conservação de tecido testicular imaturo de ovinos (PUKAZHENTHI et al., 2015) e para conservação de tecido testicular adulto de equinos (MARTIN et al., 2014) quando comparado com a vitrificação.

Com relação à espécie humana, em um estudo realizado por Curaba et al. (2011a), a vitrificação apresentou ótimos resultados na conservação de tecido testicular imaturo, sendo capaz de manter a integridade dos túbulos seminíferos, além da sobrevivência e capacidade proliferativa das espermatogônias. Os autores consideraram, também, o método mais barato e rápido quando comparado à criopreservação pela congelação convencional.

Quanto a espécie canina, não há relatos na literatura atual sobre vitrificação de fragmentos de tecido testicular, no entanto, Lee et al. (2016) vitrificaram com sucesso células testiculares desta espécie utilizando o dimetilsulfóxido. Até o momento a literatura é relativamente escassa com relação a criopreservação de tecido testicular por vitrificação em todas as espécies.

Objetivando limitar os riscos de lesões ao tecido durante a congelação dois fatores devem estar bem estabelecidos em um protocolo de congelação, o crioprotetor mais adequado e o tempo de imersão neste. Existem dois tipos de agentes crioprotetores: agentes penetrantes, tais como dimetilsulfóxido, glicerol ou 1,2 propanodiol, que limitam a formação de gelo intracelular; e os agentes não-penetrantes, tais como sacarose e soro fetal bovino, que são utilizados para reduzir a formação de gelo extracelular. O tempo de imersão nos agentes crioprotetores por pouco tempo, leva a uma baixa penetração dos mesmos não impedindo a formação de cristais de gelo, ao contrário, penetração excessiva será prejudicial quer por um efeito tóxico celular direto ou por desidratação excessiva das células causada pelas alterações osmóticas. (WOELDERS e CHAVEIRO, 2004), ou seja, altas concentrações de crioprotetores associada a uma taxa de congelação ultrarrápida pode prevenir a formação de cristais de gelo, porém pode ser tóxico para o tecido.

Estudos sobre a toxicidade de agentes crioprotetores são muito importantes para minimizar a morte celular e/ou perda de potencial funcional após a descongelação (THUWANUT e CHATDARONG, 2012). Existem vários estudos quanto aos diferentes agentes crioprotetores, no entanto, dimetilsulfóxido é referido ser a escolha para conservação tecido testicular de murinos e humanos (GOOSSENS et al., 2008), sendo a melhor escolha tanto para tecido imaturo (WYNS et al., 2008) quanto maturo (KEROS et al., 2005). Porém, o etilenoglicol tem a vantagem de ser bem tolerado por ambos os tecidos imaturo e maturo, mesmo em altas concentrações (SREEPOORNA et al., 2012). Já o dimetilsulfóxido é relatado ser tóxico em concentrações elevadas desnaturando proteínas e desestabilizando as bicamadas de fosfolípidos (ANCHORDOGUY; CARPENTER; CROWE, 1992).

Dentre as principais associações de crioprotetores, o dimetilsulfóxido com etilenoglicol tem mostrado ser a combinação mais utilizada na maioria dos protocolos experimentais sobre vitrificação de tecido testicular em várias espécies, como murinos (CURABA et al., 2011b; GOOSSENS et al., 2008; HAJIAGHALOU et al., 2016), ovinos (PUKAZHENTHI et al., 2015), equinos (MARTIN et al., 2014), felinos (THUWANUT e CHATDARONG, 2012; LIMA et al., 2017), suínos (ABRISHAMI et al., 2010), primata não humano (Poels et al., 2012) e humano (CURABA et al., 2011a), inclusive de aves (LIU et al., 2012; LIU et al., 2013) e peixes (BONO-MESTRE; CARDONA-COSTA; GARCÍA-XIMÉNEZ, 2009).

Abrishami et al. (2010) realizaram a vitrificação de tecido testicular imaturo de suínos utilizando três diferentes crioprotetores em duas combinações: etilenoglicol associado dimetilsulfóxido e a sacarose; etilenoglicol associado ao glicerol e a sacarose em três diferentes tempos de imersão, expondo 5, 15, ou 30 minutos. Dentre os resultados, não houve diferença significativa entre os três tempos de imersão ou as duas associações de crioprotetores para a viabilidade celular.

Em um experimento realizado por Thuwanut e Chatdarong (2012) utilizando dimetilsulfóxido, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido associado ao etilenoglicol para vitrificação de tecido testicular de gatos domésticos adultos, os dois crioprotetores e a combinação mostraram similaridade quanto à integridade de membrana espermática ($p > 0.05$), porém, o dimetilsulfóxido foi o melhor na proteção da integridade de DNA. A influência do dimetilsulfóxido também foi observada na vitrificação de tecido testicular de camundongos imaturos, onde o tecido conservado com a combinação de etilenoglicol e dimetilsulfóxido apresentou menos alterações histológicas quando comparado ao etilenoglicol associado a sacarose (HAJIAGHALOU et al., 2016).

Com relação ao tempo de imersão no crioprotetor, Kaneko et al. (2013) vitrificaram tecido testicular imaturo de suínos utilizando dois tempos diferentes de imersão, expondo as amostras aos crioprotetores durante 10 ou 20 minutos. Através da análise histológica do tecido xenotransplantado e dosagem de testosterona e inibina observaram não haver diferença significativa, indicando que ambos os tempos de imersão foram eficientes na conservação do tecido. Na vitrificação de tecido testicular de camundongos a imersão por 25 e 35 minutos não mostrou diferença significativa quanto à viabilidade (GOUK et al., 2011)

Transplante de tecido testicular vitrificado

Preservar o tecido testicular de forma adequada e transplantar para modelos experimentais, como murinos, é um procedimento emergente que vem apresentando bons resultados, podendo ser de grande utilidade na restauração da fertilidade em diversas espécies.

A criopreservação de tecido testicular imaturo emergiu como uma abordagem promissora eticamente aceitável para restaurar a fertilidade após autotransplante em humanos (TOURNAYE et al., 2004). A Avaliação *in vivo* demonstrou a sobrevivência, proliferação e diferenciação de espermatogônias humanas congeladas e descongeladas após xenotransplante (WYNS et al., 2008) no tecido subcutâneo de camundongos

imunodeficientes e orquiectomizados (ZENG et al., 2009; ABRISHAMI et al., 2010; KANEKO et al., 2013). Estudos têm sido limitados ao tecido conservado pela congelação convencional, contudo, a vitrificação pode melhor manter a estrutura de tecido, um fator que aumentaria o potencial de alternativa para transplantes (SONG et al., 2010).

Existem estudos significativos realizados com tecidos testiculares conservados pelo método de congelação convencional, no qual os tecidos xenotransplantados para camundongos, hamsters e macacos castrados foram capazes de manter a espermatogênese (SCHLATT; KIM; GOSDEN, 2002). A produção bem-sucedida de proles foi relatado por Ogonuki et al. (2006), utilizando material genético de gônadas de camundongos congeladas. Shinohara et al. (2002) também relataram o nascimento de filhotes de camundongos gerados a partir de tecido testicular, por injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Embora, a grande maioria dos experimentos com xenotransplante tenha sido realizada com tecido criopreservado pelo método lento de congelação, alguns autores realizaram com tecido testicular criopreservado pelo método de vitrificação, como Abrishami et al. (2010) e Zeng et al. (2009) com suínos; e Pukazhenthil et al. (2015) com ovinos. Em primata não humano o tecido vitrificado e transplantado para camundongos demonstrou capacidade de manter a proliferação das espermatogônias e a funcionalidade das células de Leydig (POELS et al., 2012).

Kaneko et al. (2013) foram mais além, recuperaram espermatozoides dos tecidos testiculares imaturos vitrificados de suínos transplantados para camundongos, e pelo método de injeção intracitoplasmática de espermatozoide fertilizaram oócitos maturados, os quais foram transferidos para oito porcas sincronizadas. Ao término da gestação, dentre as oito fêmeas fertilizadas, uma deu à luz a dois leitões e outra a cinco leitões. O sucesso em obter proles de tecido testicular vitrificado também foi alcançado por Liu et al. (2013) em codornas japonesas (*Coturnix japonica*).

O transplante de tecido testicular fornece uma nova opção para preservar células germinativas de machos, no entanto, a falha no desenvolvimento do tecido transplantado pode ocorrer. Uma justificativa para esta falha no procedimento, seria que mesmo a sobrevivência de muitas células do sistema multicelular à congelação e descongelação não é garantia de preservação de toda funcionalidade do tecido (PEGG, 2007). Ademais, Poels et al. (2012) afirmam que a perda do tecido transplantado pode ser devido a hipóxia.

OBJETIVOS

Geral

Verificar a possibilidade de conservar material genético de cães através da criopreservação de tecido testicular.

Específico

Verificar a eficiência dos crioprotetores dimetilsulfóxido, etilenoglicol e a associação dos mesmos na criopreservação de tecido testicular canino por congelamento ultrarrápido (vitrificação) e por congelamento rápido, denominada duas etapas.

Comparar dois tempos de imersão (15 e 30 minutos) quanto à viabilidade de espermatozoides caninos oriundos de fragmentos testiculares e qualidade tecidual após as congelamentos.

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. 86–96, 2010. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.08.004.

ANCHORDOGUY, T. J.; CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. **Biophys Acta**, 1104, 117-122, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369290139D>>. Acesso em: 20 agosto. 2016.

BONO-MESTRE, C.; CARDONA-COSTA, J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Effects on cell viability of three zebrafish testicular cell or tissue cryopreservation methods. **CryoLetters**, v. 30, n. 2, p. 148-152, 2009. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2009/00000030/00000002/art00008>>. Acesso em: 20 agosto. 2016.

BROCKBANK, K. G. et al. Storage of tissues by vitrification. **Transplant Proc**, v. 32, p. 3–4, 2000. DOI: 10.1016/S0041-1345(99)00851-9.

CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL. The Development of cat testicular sperm criopreservation protocols: effect of tissue fragments or sperm cell suspension. **Theriogenology**, v. 85, p. 200-206, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.030.

CURABA, M. et al. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? **Fertility and sterility**, v. 95, n. 6, p. 2123e9–2123e12. 2011a. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.01.014.

CURABA, M. et al. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 4, p. 1229-1234a1, 2011b. DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.04.062.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.375-387, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00106-8.

GOOSSENS, E. et al. Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 3, p. 725-727. 2008. DOI:10.1016/j.fertnstert.2007.03.044.

GOSDEN, R. Cryopreservation a cold look at technology for fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 96, p. 264-268, 2011. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.06.029.

GOUK, S. S. et al. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p 2399-2403, 2011. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.

HAJIAHALOU, S. et al. Comparison of apoptosis pathway following the use of two protocols for vitrification of immature mouse testicular tissue. **Theriogenology**. 2016 v.86, n. 8, p. 2073-82. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.027.

HOVATTA, O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. **Best pract res clin obstet ginaecol**, v. 17 p. 331-342. 2003. DOI: 10.1016/S1521-6934(02)00125-6.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Dados gerados das unidades de conservação**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/2787-mamiferos-carnivoros>>. Acesso em: novembro de 2017.

KANEKO, H. et al. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. **Plos One**, v. 8, n. 7, p.1-8, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0070989.

KEROS, V. et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulfoxide as cryoprotectants. **Hum Reprod**, v. 20, n. 6, p. 1676–1687, 2005. DOI:10.1093/humrep/deh797.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p.1670-1683, 2009. DOI:10.1093/humrep/dep079.

LEE, K. H. et al. Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11 2016. DOI: 10.1038/SREP21919.

LIMA, D. B. C. et al. Vitrification testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology** 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.037.

LIU, J. et al. A simple vitrification method for cryobanking avian testicular tissue^{1,2}. **Poultry Science**, v. 91, n. 12, p. 3209-3213, 2012. DOI: 10.3382/ps.2012-02454.

LIU, J. et al. Production of Live Offspring from Testicular Tissue Cryopreserved by Vitrification Procedures in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). **Biology Of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 124-124, 2013. DOI:10.1095/biolreprod.113.108951.

MARTIN, J. L. et al. Cryopreservation of testicular tissue from normospermic stallions. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 34, p. 74, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.048.

MILAZZO, J. P. et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. **Hum Reprod**, v. 23, n. 1, p. 17-29. 2008. DOI:10.1093/humrep/de.

NERI, Q. V. et al. Vitrification of testicular tissue is more gentle on germ cells. **Fertility and Sterility**, 82, 184, 2002. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.07.483.

OGONUKI, N. et al. Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. **Proc Natl Acad Sci, U S A** 29, 13098–13103. 2006. DOI: 10.1073/pnas.0605755103.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Methods Mol Biol**, 368, 39–57. 2007. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.

POELS, A. et al. 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. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.10.015.

PUKAZHENTHI, B. S. et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **Plos One**, 10, n. 4, p. 1-15, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0123957.

SANFILIPPO, S. et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, n. 1, p.1-7, 2015. DOI:10.1186/s12958-015-0065-5.

SCHLATT, S.; KIM, S.; GOSDEN, R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and grafting. **Reproduction**, 124, 323–329. 2002. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/124/3/339.long>>. Acesso em: 20 agosto. 2016.

SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Hum Reprod Update**, v. 9, p.583–605, 2003. DOI: 10.1093/humupd/dmg041.

SHINOHARA, T. et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. **Hum Reprod**, 17, 3039–3045. 2002. DOI: 10.1093/humrep/17.12.3039.

SNEDAKER, A.K.; HONARAMOOZ, A.; DOBRINSKI ,I. A game of cat and mouse: xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host. **Journal of Andrology**, v. 25, p.926–930, 2004. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb03163.x.

SONG, Y. et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. **Cryobiology**, v. 60, n. 3, p. 60-65, 2010. DOI:10.1016/j.cryobiol.2009.09.009.

SREEPOORNA, U. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, 2012. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.10.018200.

SUZUKI, N. et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 608-615, 2015. DOI:10.1093/humrep/deu353.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K. Cryopreservation of Cat Testicular Tissues: Effects of Storage Temperature, Freezing Protocols and Cryoprotective Agent. **Reproduction in Domestic Animals** v. 47, p. 777–781, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01967.

TOURNAYE, H. et al. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: Current concepts and future prospects. **Hum Reprod Update** 10, 525–532. 2004. DOI: 10.1093/humupd/dmh038.

WANG, X. et al. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v. 141, n. 2, p. 183-191, 2010. **BioScientifica**. DOI:10.1530/rep-10-0383.

WOELDERS, H.; CHAVEIRO, A. Theoretical prediction of “optimal” freezing programmers. **Cryobiology**, 49, 258-271. 2004. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.09.001.

WYNS, C. et al. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. **Hum Reproduction**, 23, 2402-2414. 2008. DOI: 10.1093/humrep/den272.

ZENG, W. et al. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, n. 3, p. 489–497, 2009. DOI: 10.1071/RD08235.

CAPÍTULO I

CRYOPRESERVATION OF POSTPUBERTAL CANINE TESTICULAR TISSUE BY VITRIFICATION AND TWO-STEP-FREEZING

Santos, J.F.P; Ferrer, E. M.; Gonçalves, S.R.F; and Cardoso, R.C.S

Postgraduate Program in Animal Science and Pasture of Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Garanhuns - Garanhuns, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT

Cryopreservation of testicular tissue conservation can mainly help endangered species, specially offering a practical method when other techniques such as cryopreservation of ejaculated sperms are not available or applicable. Cryopreservation can be classified in slow, rapid or ultra-rapid freezing. The first is the conventional, the most widely used method, second and third, the two-step-freezing and vitrification are emerging strategy. There are no reports in the current literature about vitrification of fragments of canine testicular tissue. Thus, the aim of this study was to verify the possibility to cryopreserve fragments of canine testicular tissue by two methods: vitrification (ultra-rapid) and two-step-freezing (rapid) as well as two different cryoprotectant agents and their combination and two different times of immersion. Twenty post-pubertal mongrel dogs from the Center of Environmental Control, Garanhuns, Pernambuco, Brazil were used. Dogs were neutered for adoption and testis-epididymis complexes were used in the study. After orchiectomy, testicles were processed and assessed. Testicular sperm membrane integrity was assessed by fluorescent microscopy, using the combination of two stains, SYBR 14 and Propidium Iodide; chromatin integrity was performed using the Toluidine Blue stain; and after fixation in Bouin's solution for 24 hours, testicular fragment tissue was evaluated about intratubular cell nuclei and the epithelium. For statistical analysis the number was calculated with 95% of confidence level, obtained data were subjected to normality test by Shapiro-Wilk. Wilcoxon-Test was used to compare treatments ($P < 0,05$). This study shows a superiority on the combination of dimethyl sulphoxide and ethylene glycol cryoprotectant agents in association with two-step-freezing method. Although vitrification did not show great results as two-step-freezing method, it is an excellent practical method able to contribute to germoplasm conservation. Nevertheless, those are primo results for dogs, more studies must be performed for protocol adaptation. In addition, both times of immersion were efficient for tissue conservation procedures.

Key-words: Dog, freezing, spermatozoa, tissue cryoinjury, testicular fragment.

INTRODUCTION

There are great studies presenting excellent results about gonadal tissue cryopreservation on many animal species and human. On the field of veterinary medicine, testicular tissue conservation can mainly help endangered species (THUWANUT and CHATDARONG, 2012), especially offering a practical method when other techniques such as cryopreservation of ejaculated sperms are not available or applicable (TOURNAYE et al 2004). For instance, such techniques can be applied to salvaging genetic potential of immature endangered species or valuable animals, moreover, conservation of fertility for prepubertal boys undergoing gonadotoxic oncologic treatment.

There are two classification methods of tissue cryopreservation: conventional freezing and vitrification. The former is characterized by slow freezing and the latter is considered rapid or ultra-rapid freezing (HOVATTA, 2003). Some researchers also classify the rapid method as two-step-freezing (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2016). In this paper we will use this classification. In addition, cryopreservation of testicular tissue has been investigated in two forms, small tubular pieces or cell suspension. Nevertheless, the most researchers have been working with tubular pieces (MILAZZO et al. 2008).

Conventional freezing is a widely used method, although it has lower toxicity effects since uses fewer cryoprotectant agents, it is not able to prevent ice crystal formation (KEROS et al., 2005). On the other hand, vitrification method uses a high concentration of cryoprotectant agents to prevent crystallization of ice and so tissue damage (POELS et al. 2012).

Excellent results were obtained on vitrification of porcine (ABRISHAMI et al., 2010; KANEKO et al., 2013), non-human primate (*Macaca mulatta*) (POELS et al., 2012) and feline (CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2016) testicular tissue, as well as, a testicular tissue of non-mammalian species, such as japanese quail (*Coturnix japonica*) (LIU et al., 2012; LIU et al., 2013) and zebrafish (*Danio rerio*) (BONO-MESTRE; CARDONA-COSTA; GARCÍA-XIMÉNEZ, 2009).

Germplasm banking is an important tool for wild endangered felids conservation (THUWANUT e CHATDARONG, 2012), and can be applied to other species, such as canids. Tissue cryopreservation is a special step for emerging assisted reproductive techniques (ABRISHAMI et al., 2010), therefore, essentially contributing to germplasm banking.

In Brazil, there are 28 species of terrestrial carnivores, divided into five families: Felids, Canids, Mustelids, Procyonids and Mephitids. At Canidae family, we have six species: *Cerdocyon thous* (Crab-eating fox), *Atelocynus microtis* (Short-eared dog), *Speothos venaticus* (Bush dog), *Lycalopex gymnocercus* (Pampas fox), *Chrysocyon brachyurus* (Maned wolf) and *Lycalopex vetulus* (Small-toothed dog). According to ICMBio, *Atelocynus microtis*, *Speothos venaticus*, *Lycalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus* are all endangered, in the vulnerable category.

Concerning about canine species, there are no reports in the current literature about vitrification of fragments of testicular tissue, however, Lee et al. (2016) successfully vitrified testicular cells of this species. Although there are no reports of cryopreservation of testicular tissue in the canine species, dogs present a potential experimental model since the use of testicular tissue of endangered wild species is not feasible.

Thus, the aim of this study was to verify the possibility to cryopreserve fragments of canine testicular tissue by two methods: vitrification (ultra-rapid) and two-step-freezing (rapid) as well as two different cryoprotectant agents and their combination and two different times of immersion.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Twenty post-pubertal mongrel dogs from the Center of Environmental Control, Garanhuns, Pernambuco, Brazil were used. Dogs were neutered for adoption and testis-epididymis complexes were used in the study.

Transporting testis-epididymis complexes

After orchiectomy, pair of testis-epididymis complexes were washed with saline solution containing 1% gentamycin and wrapped in gauze moistened with the same solution and placed in an isothermal box at room temperature until processing in laboratory.

Testicles processing

Processing of testes was performed within two hours after orchietomy. Testicles were macroscopically evaluated. Therefore, when able to use in the experiment they were washed three times with solution above cited for removing blood and the epididymis dissected from testes.

Each pair of testes was sliced and divided into four parts through a longitudinal incision with a surgical blade. Then, the pieces were randomly fragmented into 39 fragments of 0.4x0.4x0.4cm, three fragments for the control group and three fragments for each of the twelve treatments (Figure 1). For each treatment or control, one of the fragments fixed in Bouin's solution for histological analysis. The third fragment was submitted to the process of sperm retrieval for assessment, which explained later.

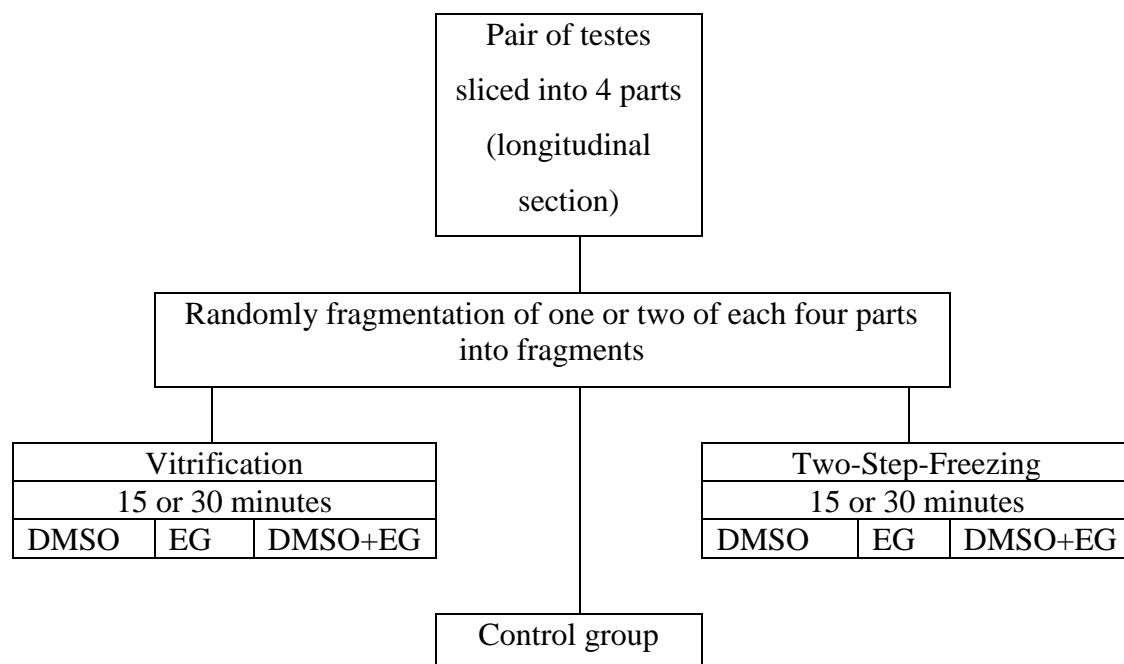


Figure 1. Fluxogram showing slicing of a pair of testes and destination of the fragments.

Media

Media used in this study were retrieval, equilibration, freezing, and thawing. In addition, all media were composed of modified TCM 199, the base media (THUWANUT; CHATDARONG, 2012) (Table1).

Table 1. The composition of media used in the experiment.

Media	Composition
Retrieval	Base media plus 10% FCS
Equilibration I	Base media plus 20% FCS and 15% DMSO
Equilibration II	Base media plus 20% FCS and 15% EG
Equilibration III	Base media plus 20% FCS and 7,5% DMSO and 7,5% EG
Freezing I	Base media plus 20% FCS, 30% DMSO and 0,5M sucrose
Freezing II	Base media plus 20% FCS, 30% EG and 0,5M sucrose
Freezing III	Base media plus 20% FCS, 15% DMSO and 15% EG and 0,5M sucrose
Thawing	Base media plus 20% FCS and 1M sucrose

Foetal Calve Serum = FCS; Dimethyl sulphoxide = DMSO; Ethylene glycol = EG

Testicular tissue freezing

Testicular fragments containing tunica albuginea, seminiferous tubules, Leydig and Sertoli cells were placed in one well of the 12-Well-plate containing 1mL equilibrium medium at room temperature for 10 minutes, then, transferred to another well filled with 1 mL freezing medium at 4° C for 15 or 30 minutes. After exposure to equilibration and freezing media, testicular tissue fragments were subjected to freezing by vitrification or two-step-freezing.

The testicular tissues were vitrified by laying them on an aluminum surface over the liquid nitrogen, and with thumb forceps transferred to cryotubes previously frozen by immersion in liquid nitrogen and finally kept in a liquid nitrogen tank (-196°C).

For two-step-freezing, testicular fragments were placed inside the precooled cryotubes. Cryotubes were disposed horizontally 4 cm above the liquid nitrogen for 10 minutes and then stored in a liquid nitrogen tank (-196°C).

Thawing testicular tissue

After one week, all samples were thawed placing the cryotubes at room temperature for 30 seconds. Then, fragments were transferred to the thawing medium at room temperature for 10 minutes and then moved to the retrieval medium for sperm retrieval.

Sperm retrieval

For sperm retrieval, the fresh and post-thawed testicular tissues were placed in a Petri dish with 1 ml retrieval medium and then minced by a surgical blade. After 10 minutes, the suspensions containing the spermatozoa were stored in cryotubes at room temperature protected from light (surrounded by aluminum foil) for further analysis.

Testicular Sperm Analysis

Sperm Concentration was only performed in control tissue fragments. After sperm extraction, a 100 μ L aliquot of the recovered sperm suspension was diluted in 1000 μ L of water. Supported by a Neubauer chamber, counting was performed as described by the Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). The number of spermatozoa was recorded per 0.4x0.4x0.4cm testicular tissue fragment.

Testicular sperm membrane integrity was determined by fluorescent microscopy, using the combination of two stains, SYBR 14 and Propidium Iodide (Live/Dead® Sperm Viability Kit L - 7011, Molecular Probes). 20 μ L of sperm suspension was diluted in 100 μ L of HEPES-saline buffer containing bovine serum albumin-BSA (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 7.4). After this step, in a room protected from the light, the stains were added. First, 1 μ L of the diluted SYBR 14 in PBS (0.5 μ L of the SYBR 14 diluted in 25 μ L phosphate buffer saline-PBS) were added and then 1 μ L of the propidium iodide were added and incubated for 10 minutes. After incubation, under fluorescent microscopy, the stained spermatozoa (200 cells) were classified as intact/live (bright green color) or lesioned/dead (red color).

The chromatin integrity was performed using the Toluidine Blue stain. For this analysis a smear of the testicular sperm sample was fixed in 10% formalin for 1 minute, followed by three minutes washing in 70% ethanol, then stained by 0.025% toluidine blue (in McIlvaine buffer, pH 4.0). Under optical microscopy, 100 cells were counted,

differentiating them by color: light blue, cells showing intact chromatin (condensed chromatin), while dark blue to violet those with chromatin damaged (decondensed chromatin).

Histological analysis

Testicular tissue samples were fixed in Bouin's solution for 24 hours and submitted to histological processing. For processing, samples were dehydrated in alcohols; diaphanized in xylenes and embedded in paraffin. On second step, fragments were cut (3 μ m) in order to make the slides and stained with hematoxylin-eosin. For analysis, the structural characteristics of the post-thawed tissue were compared to controls. The intratubular cell nuclei (spermatogonia and Sertoli cells) and the epithelium were evaluated using a score previously described by Milazzo et al. (2008) and Hajiaghalou et al. (2016). Nuclei of intratubular cells (spermatogonia and Sertoli cells) were scored as follow: first: distinction between Sertoli cells and spermatogonia was scored as 0 if easy, 1 if difficult and 2 if impossible; second: observation of nucleoli was scored as 0 if easy and scored as 1 if indistinguishable; and third: nuclei condensation was scored as 0 if absent or present in only 1 nucleus, as 1 if ,40% of nuclei were condensed and as 2 if .40% were pyknotic. The epithelium was assessed by detachment of cells from the basement membrane was scored as 0 if absent, 1 if mild, as 2 if partial and as 3 if total or observed on 75% of the circumference and gap formation that was scored as 0 if absent, as 2 if slight and as 3 if more obvious.

Experimental design

Testes from postpubertal dog were obtained from orchiectomy (n = 20). Testes were divided into four parts and the pieces were randomly fragmented into 39 testicular tissue fragments of 0.4x0.4x0.4cm. Three fragments directed to control group and three fragments for each of the twelve treatments. Testicular tissues were cryopreserved with two different methods: vitrification and two-step-freezing; also tying two cryoprotectant agents and their combination: DMSO, EG and DMSO+EG; at two times of immersion: 15 and 30 minutes.

Statistical analysis

Sample calculation was performed in R (3.2.3) through the results of the standard deviation of sperm membrane integrity from the main studies performed in feline testicular tissue cryopreservation (BUARPUNG et al., 2013; CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL, 2016; THUWANUT and CHATDARONG, 2012), such data does not exist for dogs yet.

The power of test performed was calculated, being the same of 0.92 (R3.2.3, Package PWR). The number calculated was 20, with 95% of confidence level.

Obtained data were subjected to normality test by Shapiro-Wilk. Wilcoxon-Test was used to compare treatments ($P < 0,05$).

RESULTS

Number of spermatozoa

Number of spermatozoa retrieved from fresh fragment was $7,33 \pm 2,87 \times 10^5$.

Testicular spermatozoa membrane integrity

Concerning about the effect of cryoprotectant agents on membrane integrity in the vitrification and two-step-freezing methods at 15 minutes of immersion, the combination of DMSO and EG protected significantly better from freezing damage when compared to DMSO or EG alone (Table 2). On the other hand, at 30 minutes of immersion none cryoprotectant agents or combination enhanced testicular spermatozoa membrane integrity in both freezing methods ($P > 0,05$).

Immersion time did not significantly influence on the testicular spermatozoa membrane integrity on both methods of freezing ($P > 0,05$).

Concerning about the methods, the two-step-freezing method provided a greater protection than vitrification to spermatozoa membrane using those three cryoprotectant agents in both time of immersion ($P < 0,05$) (Figure 1).

Testicular spermatozoa chromatin integrity

DMSO+EG enhanced testicular spermatozoa chromatin integrity, when compared to EG alone, otherwise, it did not improve the number of intact chromatin when compared to

DMSO alone on vitrification method at 15 minutes immersion. Moreover, on vitrification at 30 minutes and two-step-freezing at 15 minutes immersion, DMSO combined to EG made a greater protection to the chromatin than the DMSO or EG alone. Cryoprotectant agents on two-step-freezing at 30 minutes immersion had similar spermatozoa chromatin integrity ($P>0,05$) (Table 2).

Immersion time did not significantly influence on the testicular spermatozoa chromatin integrity on both methods ($P>0,05$). In addition, vitrification and two-step-freezing had similar efficiency preserving testicular spermatozoa chromatin ($P>0,05$).

Table 2. Percentage of testicular spermatozoa membrane integrity from control (fresh tissue) and frozen/thawed tissues in different methods.

Control	Cryoprotectant agents	Vitrification		Two-step-freezing	
		15 minutes	30 minutes	15 minutes	30 minutes
79,30± 21.23	<i>DMSO</i>	8.95±6.93 aeA	13.25±13.05 aeA	38.84±16.22 aeB	41.39±15.18 aeB
	<i>EG</i>	8.45±4.71 aeA	9.63±6.92 aeA	37.65±13.01 aeB	37.65±15.79 aeB
	<i>DMSO+EG</i>	14.06±8.73 beA	13.74±12.63 abeA	51.53±13.21± beB	46.33±23.71 aeB

Dimethyl sulphoxide = DMSO; Ethilene glycol = EG.

Letters a and b means statistical difference among cryoprotectant agents.

Letter c means no statistical difference between times of immersion ($P>0,05$).

Capital letters means statistical difference between freezing methods

Table 3. Percentage of testicular spermatozoa chromatin integrity from control (fresh tissue) and frozen/thawed tissues.

Control	Cryoprotectant agents	Vitrification		Two-step-freezing	
		15 minutes	30 minutes	15 minutes	30 minutes
89,42± 5.61a	<i>DMSO</i>	72.95±10.66 aeA	69.82±9.77 aeA	70.32±10.11 aeA	69.00± 8.82 aeA
	<i>EG</i>	70.00±10.40 aeA	66.72±14.07 aeA	67.06±7.53 aeA	72.19±9.30 aeA
	<i>DMSO+EG</i>	75.88±7.93 beA	75.00±11.09 aeA	75.72±9.79 beA	75.71±10.61aeA

Dimethyl sulphoxide = DMSO; Ethilene glycol = EG.

Letters a and b means statistical difference among cryoprotectant agents.

Letter e means no statistical difference between times of immersion ($P>0,05$).

Capital letters means no statistical difference between freezing methods ($P>0,05$).

Histological Evaluation

For each histological score, statistically analyzed (observation of nucleoli, nuclei condensation, detachment of cells from the basement membrane and gap formation), we compared cryoprotectant agents inside the times of immersion (15 or 30 minutes) and both times on vitrification and two-step-freezing methods. Also, both methods of freezing were compared.

The distinction between Sertoli cells and spermatogonia was not statistically analyzed because all histological slides were easy to distinguish Sertoli cell from Spermatogonia.

Concerning about the observation of nucleoli, all protocols on vitrification were similar to control group (fresh tissue), except EG at 15 minutes and DM at 30 minutes immersion, otherwise, two-step-freezing did not perform a great nuclei conservation ($P < 0,05$). Only EG and DM+EG at 30 minutes immersion on two-step-freezing method differed from each other ($P = 0,04$), among all the protocols. There was no statistical difference between freezing methods (Figure 2).

On vitrification and two-step-freezing, Nuclei condensation was scored equal to fresh testicular tissue ($P > 0,05$) on the most treatments. EG only made a great chromatin protection at 30 minutes immersion on vitrification, on the other hand, DM did not yield nuclei condensation on vitrification at 30 minutes. In addition, statistical difference was found when compared vitrification to two-step-freezing with the use of DM combined to EG at 30 minutes immersion ($P = 0,042$) (Figure 3).

Epithelium was assessed by: detachment of cells from the basement membrane and gap formation. In the first epithelium score, vitrification protocols were all similar, however on two-step-freezing method DM differed from EG and from DM+EG at 15 minutes immersion, also, DM at 15 minutes made a better conservation than 30 minutes immersion. Vitrification and two-step-freezing were similar only at 15 minutes immersion using DM ($P = 0,17$) (Figure 4), although, two-step-freezing was more efficient. Concerning about the evaluation between control and treatment groups, a higher detachment of cells from the basement membrane was observed on two-step-freezing ($P < 0,05$), therefore, vitrification made a better conservation ($P > 0,05$).

Second epithelium score assessed: gap formation, was more observed ($P < 0,05$) on vitrification using DM and DM+EG at 30 minutes. And on two-step-freezing at 15 minutes using DM in relation to fresh tissue. Also, there was difference between vitrification and two-step-freezing in all protocols, except DM at 15 minutes immersion (Figure 5). Inside cryoprotection agents, DM differed from DM+EG at 30 minutes immersion on vitrification and DM from EG at 15 times on two-step-freezing. In Addition, the comparison of times of immersion presented difference only using DM as cryoprotectant agent on two-step-freezing.

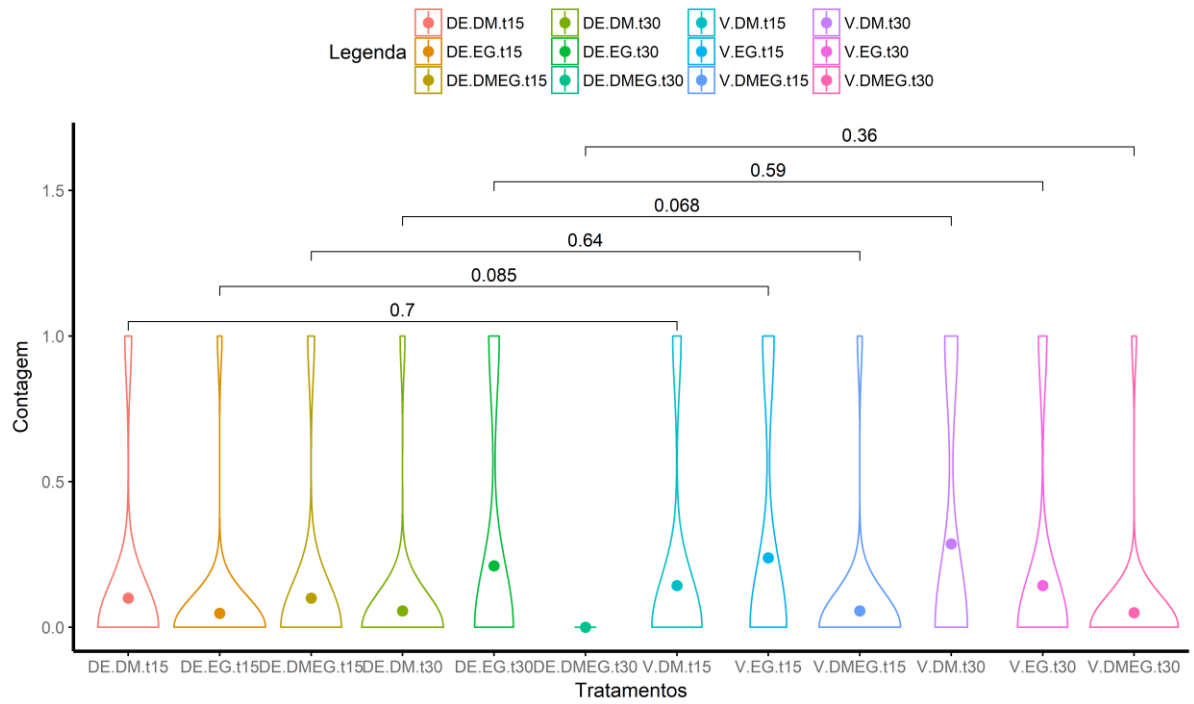


Figure 2. Observation of nucleoli comparison between freezing methods.

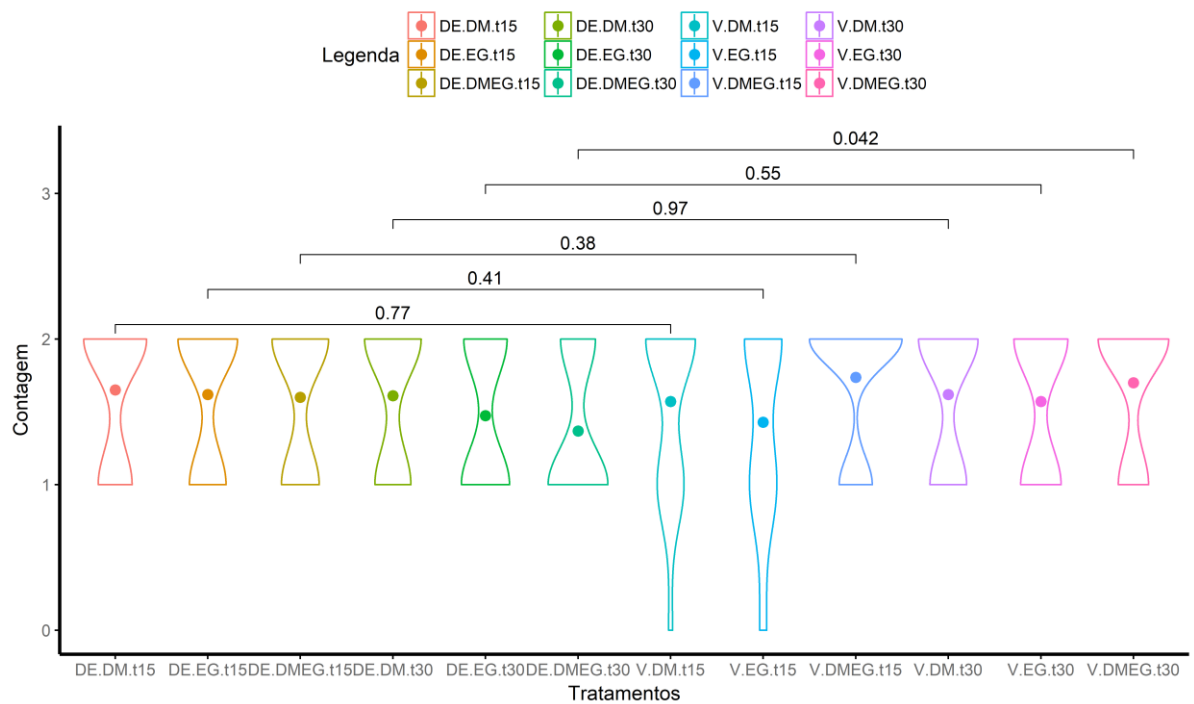


Figure 3. Nuclei condensation comparison between freezing methods.

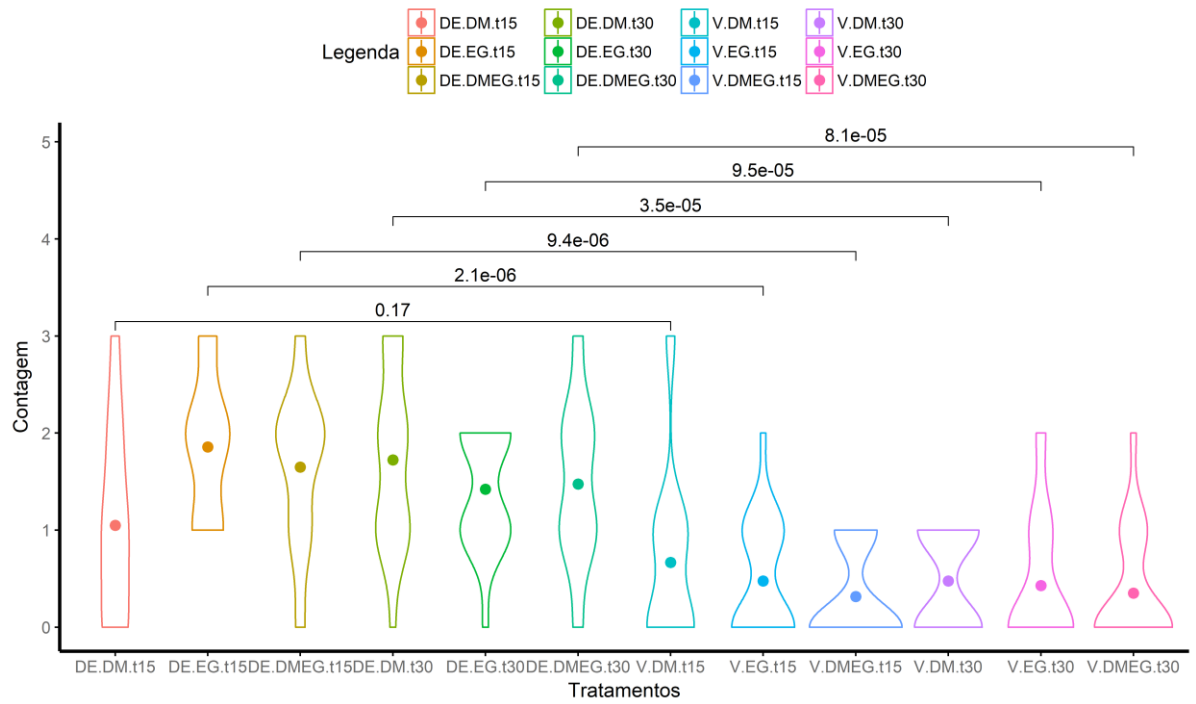


Figure 4. Detachment of cells from the basement membrane comparison between freezing methods.

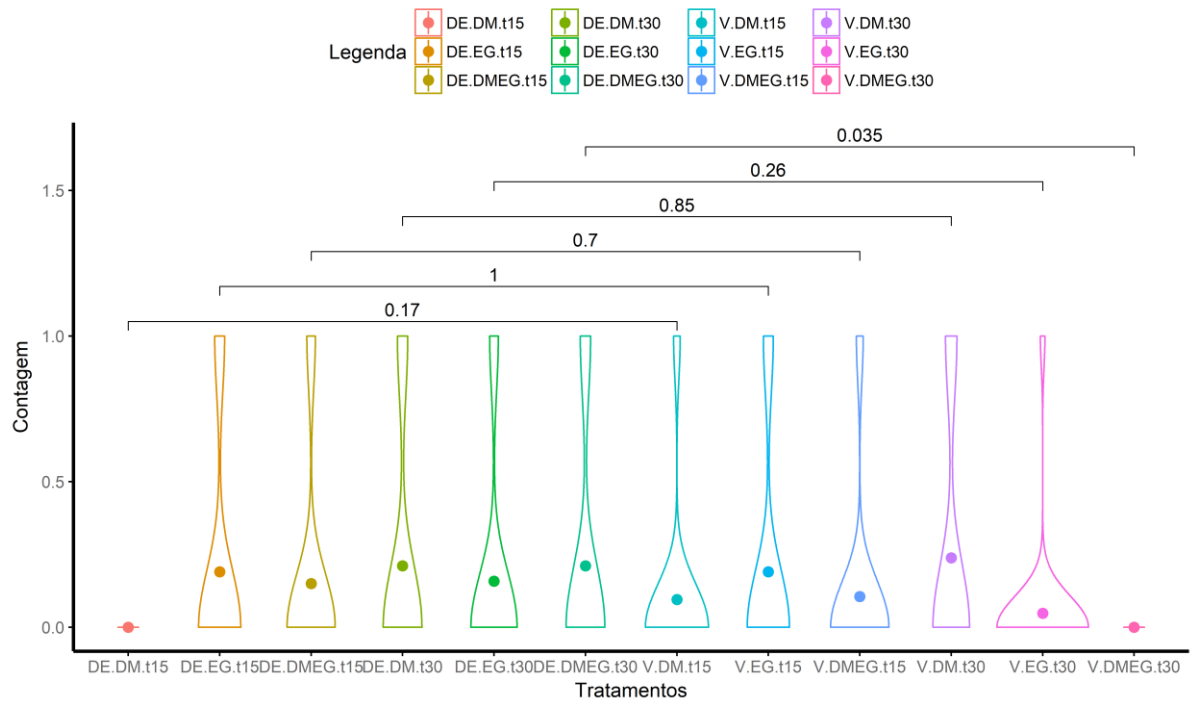


Figure 5. Gap formation comparison between freezing methods.

DISCUSSION

Cryopreservation of testicular tissue is challenging because several cell types in the compartments are involved (HOVATTA 2003). Vitrification methods use high concentrations of cryoprotectant agents (POELS et al., 2012), thus, a thorough investigation on toxicity of cryoprotectant agents is very important to minimize cell death and loss of functional potential after thawing.

This study shows that combination of DMSO and EG enhance spermatozoa quality after cryopreservation corroborating to some authors. That combination yielded higher percentage of living cells and a better preservation of the murine testicular tissue integrity (HAJIAGHALOU et al., 2016). DMSO has the high potency to preserve testicular tissue structures avoiding cryodamage (MILAZZO et al., 2008). Whereas, ethylene glycol has the advantage to be well tolerated even at high concentrations by both immature and mature samples (SREEPOORNA et al. 2012).

Some researchers also compared DMSO + EG to other protocols on porcine and feline testicular tissue conservation, however, there was no statistical difference (ABRISHAMI et al., 2010; LIMA et al., 2017; THUWANUT and CHATDARONG, 2012). That combination was also successfully performed by many researchers in many species for testicular tissue cryopreservation, such as: murine (CURABA et al., 2011b; HAJIAGHALOU et al., 2016), sheep (PUKAZHENTHI et al., 2015), equine (MARTIN et al., 2014), feline (CHATDARONG et al., 2016; THUWANUT and CHATDARONG, 2012; LIMA et al., 2017), porcine (ABRISHAMI et al., 2010), non-human primate (POELS et al., 2012), human (CURABA et al., 2011a), quail (LIU et al., 2012; LIU et al., 2013) and fish (BONO-MESTRE; CARDONA-COSTA; GARCÍA XIMÉNEZ, 2009).

Time of immersion with a low penetration of cryoprotectant agents will not prevent ice crystal formation, on the contrary, excessive penetration will be deleterious either by a direct cell toxic effect or by excessive cell dehydration induced by medium osmotic changes (WOELDERS and CHAVEIRO 2004). Although, immersion time did not influence on spermatozoa quality in any freezing method, corroborating to Abrishami et al. (2010) and Gouk et al. (2011).

When compared to conventional freezing, vitrification showed to be better on murine testicular tissue cryopreservation (GOUK et al., 2011; NERI et al., 2002). In addition, vitrification is a fast and cheap method (CURABA et al., 2011a) and an excellent strategy for genetic conservation (POELS et al., 2012). Liu et al., (2012) provided evidence that

vitrification could allow avian testicular tissue to survive vitrification leading to revascularization. Nevertheless, more studies must be performed for in vivo for determining the benefits of the method (CURABA et al., 2011b).

Corroborating our results, Thuwanut and Chatdarong, (2012) obtained a higher membrane integrity on two-step-freezing than that frozen by the other methods, vitrification and conventional freezing, also, chromatin integrity was not affected by the freezing methods. Similar results were observed by Buarpong et al. (2013), however they compared two-step-freezing only to conventional freezing. Chatdarong; Thuwanut; Morrell, (2016) obtained similar chromatin and membrane integrity by two-step and conventional freezing.

Abrishami et al. (2010) performed three different immersion times, 5, 15, and 30 minutes. No statistical difference was found about sperm viability. Similar results were observed on cells viability by Gouk et al. (2011) with 25 and 35 minutes of immersion. Kaneko et al. (2013) experimented 10 and 20 minutes of immersion time. Both immersion times were able to preserve testicular tissue.

Histological evaluation was made in many studies with different techniques (ABRISHAMI et al., 2010; CURABA et al., 2011b; HAJIAGHALOU et al., 2016; KANEKO et al., 2013; LIMA et al., 2017; MARTIN et al., 2014; MILAZZO et al., 2008; POELS et al., 2012; PUKAZHENTHI et al., 2015; WYNS, 2008). Most authors considered intact tubules in their assessment when no sclerosis, good adhesion of cells to the basement membrane and good cell cohesion were observed intact (WYNS, 2008). Martin et al. (2014) measured the maximum and minimum diameter, and the assessed cellularity, scoring as absent, absent/rare, rare, rare/present and present on five randomly selected seminiferous tubules. On the other hand, in our study we used same technique and score cited by Milazzo et al. (2008) and Hajiaghalou et al. (2016).

The distinction between Sertoli cells and spermatogonia was easy to perform in all histological slides, in disagreement to Milazzo et al. (2008) affirmation that the distinction between spermatogonia and Sertoli cells was generally easy only in mild alteration.

Milazzo et al. (2008) considered major detachment from the basal compartment and by the presence of numerous pyknotic nuclei as severe cryoinjuries. We could avoid a high amount of pyknotic nuclei using DM combined to EG. A low number of pyknotic nuclei was also obtained by Hajiaghalou et al. (2016) with same combination. Otherwise, Lima et al., (2017) found a well-preservation of feline testicular morphology using DMSO combined to Glycerol. In present study DM+EG showed less detachment from the basal compartment,

whereas DM+EG had greatest detachment from the basal compartment on a study performed by Lima et al., (2017)

We observed in fresh tissue a tunica albuginea filled with dense connective tissue, that observation was also reported by Lima et al., (2017) on feline testicular tissue, even though we did not find a scarce interstitial tissue, it was a finding observed by them.

Non-human primate post-vitrified testicular tissue was structurally intact with proliferative spermatogonia and functional Leydig cells after short-term xenografting to nude mice, also, that cryopreservation was performed using DMSO+EG (POELS et al., 2012).

In conclusion, our study shows a superiority on the combination of dimethyl sulphoxide and ethylene glycol cryoprotectant agents in association with two-step-freezing method. Although vitrification did not show great results as two-step-freezing method, it is an excellent practical method able to contribute to germoplasm conservation. Nevertheless, those are primo results for dogs, more studies must be performed for protocol adaptation. In addition, both times of immersion were efficient for tissue conservation procedures.

REFERENCES

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. 86–96, 2010. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.08.004.

BONO-MESTRE, C.; CARDONA-COSTA, J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Effects on cell viability of three zebrafish testicular cell or tissue cryopreservation methods. **CryoLetters**, v. 30, n. 2, p. 148-152, 2009. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2009/00000030/00000002/art00008>>. Acesso em: 20 agosto. 2016.

BUARPUNG, S. et al. 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. 74, p. 149-158, 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.022.

CHATDARONG; THUWANUT; MORRELL. The Development of cat testicular sperm criopreservation protocols: effect of tissue fragments or sperm cell suspension. **Theriogenology**, v. 85, p. 200-206, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.030.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013.

CURABA, M. et al. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? **Fertility and sterility**, v. 95, n. 6, p. 2123e9–2123e12. 2011a. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.01.014.

CURABA, M. et al. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 4, p. 1229-1234a1, 2011b. DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.04.062.

GOUK, S. S. et al. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 7, p 2399-2403, 2011. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.

HAJIAHALOU, S. et al. Comparison of apoptosis pathway following the use of two protocols for vitrification of immature mouse testicular tissue. **Theriogenology**. 2016 v.86, n. 8, p. 2073-82. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.027.

HOVATTA, O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. **Best pract res clin obstet ginaecol**, v. 17 p. 331-342. 2003. DOI: 10.1016/S1521-6934(02)00125-6.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Dados gerados das unidades de conservação**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/2787-mamiferos-carnivoros>>. Accessed in: November of 2017.

KANEKO, H. et al. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. **Plos One**, v. 8, n. 7, p.1-8, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0070989.

KEROS, V. et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulfoxide as cryoprotectants. **Hum Reprod**, v. 20, n. 6, p. 1676–1687, 2005. DOI:10.1093/humrep/deh797.

LEE, K. H. et al. Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11 2016. DOI: 10.1038/SREP21919.

LIMA, D. B. C. et al. Vitrification testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology** 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.037.

LIU, J. et al. A simple vitrification method for cryobanking avian testicular tissue^{1,2}. **Poultry Science**, v. 91, n. 12, p. 3209-3213, 2012. DOI: 10.3382/ps.2012-02454.

LIU, J. et al. Production of Live Offspring from Testicular Tissue Cryopreserved by Vitrification Procedures in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). **Biology Of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 124-124, 2013. DOI:10.1095/biolreprod.113.108951.

MARTIN, J. L. et al. Cryopreservation of testicular tissue from normospermic stallions. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 34, p. 74, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.048.

MILAZZO, J. P. et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. **Hum Reprod**, v. 23, n. 1, p. 17-29. 2008. DOI:10.1093/humrep/de.

NERI, Q. V. et al. Vitrification of testicular tissue is more gentle on germ cells. *Fertility and Sterility*, 82, 184, 2002. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.07.483.

POELS, A. et al. 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. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.10.015.

PUKAZHENTHI, B. S. et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **Plos One**, 10, n. 4, p. 1-15, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0123957.

SREEPOORNA, U. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, 2012. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.10.018200.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K. Cryopreservation of Cat Testicular Tissues: Effects of Storage Temperature, Freezing Protocols and Cryoprotective Agent. **Reproduction in Domestic Animals** v. 47, p. 777–781, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01967.

TOURNAYE, H. et al. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: Current concepts and future prospects. **Hum Reprod Update** 10, 525–532. 2004. DOI: 10.1093/humupd/dmh038.

WOELDERS, H.; CHAVEIRO, A. Theoretical prediction of “optimal” freezing programmers. **Cryobiology**, 49, 258-271. 2004. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.09.001.

WYNS, C. et al. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. **Hum Reproduction**, 23, 2402-2414. 2008. DOI: 10.1093/humrep/den272.