

NOTABREVE

CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMATOGÊNICAS BOVINAS UTILIZANDO DIFERENTES MOLÉCULAS PROTETORAS

CRYOPRESERVATION OF BOVINE SPERMATOGENIC CELLS USING DIFFERENT PROTECTIVE MOLECULES

Barbosa, A.P.M.¹, Martins, C.F.^{1,2*} e Sereno, J.R.B.²

¹Centro Universitário de Brasília (UniCEUB-Projeto de Iniciação Científica-PIC). Departamento de Biologia. Brasília-DF. Brasil.

²Embrapa Cerrados. Departamento de Reprodução Animal. Br 020, Km 18. Caixa Postal 08223-73310-970. Planatina-DF. Brasil. *carlos.frederico@cpac.embrapa.br

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Espermátides. ICSI. Preservação celular. Reprodução assistida.

ADDITIONAL KEYWORDS

Spermatid. ICSI. Cell preservation. Assisted reproduction.

RESUMO

Objetivou-se isolar mecanicamente as células espermatogênicas bovinas e avaliar sua viabilidade antes e após a criopreservação com três diferentes moléculas crioprotetoras. As células isoladas apresentaram uma viabilidade inicial média de 76,5% e após a criopreservação de 51,7%; 55,5% e 58,8%, respectivamente para as soluções de DMSO, propanodiol e DMSO com propanodiol, onde a solução de DMSO com propanodiol foi significativamente superior ($p < 0,05$) que a solução contendo somente DMSO, preservando melhor a viabilidade celular. Foi possível verificar que as células espermatogênicas isoladas mecanicamente podem ser criopreservadas e descongeladas com viabilidade acima de 55% nas soluções contendo propanodiol. As células congeladas com a associação de DMSO e propanodiol apresentaram a maior taxa de integridade após o descongelamento, e podem ser aplicadas em estudos com a ICSI.

SUMMARY

The objective of this study was to isolate mechanically bovine spermatogenic cells and assess their viability before and after cryopreservation with three different cryoprotector molecules. The isolated cells presented an initial viability of 76.5%; after cryopreservation it was 51.7%, 55.5% and 58.8%, respectively for solutions with DMSO, propanodiol, and DMSO with

propanodiol. The solution of DMSO with propanodiol was significantly better ($p < 0.05$) than that with only DMSO, for preserve the cellular viability. Thus was possible to verify that spermatogenic cells isolated mechanically can be cryopreserved-thawed with larger viability than 55% in the solutions contends propanodiol. The cells frozen with the association of DMSO and propanodiol presented the largest integrity rate after the thawed, and can be applied in studies with ICSI.

INTRODUÇÃO

Descendentes normais têm sido obtidos pela microinjeção de espermátides em camundongos (Miki *et al.*, 2004), coelhos (Sofikitis *et al.*, 1994), ratos (Hirabayashi *et al.*, 2008) mastomys (Ogonuki *et al.*, 2003) e *Macacus rhesus* (Hewitson *et al.*, 2002). Nos bovinos somente há relatos de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto (Ock *et al.*, 2006a).

Para que as espermátides possam ser utilizadas pela ICSI, é fundamental que as células espermatogênicas passem por um processo de criopreservação e sejam mantidas em estoque. Por existirem poucos trabalhos explorando a criopreservação de células espermatogênicas nos bovinos, este

Recibido: 28-9-09. Aceptado: 22-10-09.

Arch. Zootec. 60 (230): 293-296. 2011.

estudo objetivou recuperar células espermatogênicas bovinas e verificar o potencial de preservação de diferentes soluções crioprotetoras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados testículos de 10 touros cruzados abatidos em frigoríficos locais. No fluxo laminar, os testículos foram isolados, o parênquima testicular foi exposto e várias amostras de aproximadamente 10 mm³ foram retiradas para o isolamento celular. Os fragmentos testiculares foram macerados com tesoura e pinça estéril para liberação das células espermatogênicas em meio *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM). Toda a suspensão celular foi filtrada em malha de 50 µm em um tubo cônico de 15 ml, e posteriormente centrifugada a 200 x g por 1 minuto para deposição das células.

Para a crioconservação das células espermatogênicas primordiais, a solução contendo as células foi distribuída entre os diferentes tratamentos. Nesta etapa foram comparadas três soluções de crioproteção contendo DMEM soro fetal bovino (10%), sacarose 250 mM e, 1) DMSO (10%); 2) 1,2-propanodiol (1,5 M) e, 3) DMSO e 1,2-propanodiol nas mesmas proporções anteriores. Em seguida, as suspensões foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, resfriadas a 5°C por 2 horas, equilibradas a -20°C por 24 horas e depois mergulhadas e armazenadas no nitrogênio líquido.

A viabilidade das células espermatogênicas primordiais criopreservadas e descongeladas foi determinada pelo corante *trypan blue* (Philips, 1973). As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas utilizando a análise de variância One-Way ANOVA. Para comparação dos valores médios dos tratamentos foi utilizado o teste de t. As diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento celular por maceração com

pinça e tesoura garantiu a liberação de uma população de células em diferentes estágios de diferenciação. De acordo com o tamanho e forma celular foram facilmente diferenciados as espermátides alongadas e espermatozóides. Presuntivamente por estes parâmetros foram identificadas as células redondas maiores como espermatócitos, e as redondas menores como espermátides. A viabilidade média das células frescas identificada pela coloração de *trypan blue* foi de 76,5%, sendo semelhante aos resultados alcançados por Meistrich (1972), que obteve 80% de células espermatogênicas viáveis.

Após os ciclos de criopreservação em nitrogênio líquido, as células espermatogênicas bovinas apresentaram viabilidade celular média de 51,7%; 55,5% e 58,8%, respectivamente para os crioprotetores DMSO, propanodiol, e DMSO com propanodiol (**figura 1**). A solução de DMSO e propanodiol preservou melhor a viabilidade das células espermatogênicas, sendo significativamente superior (p<0,05) ao grupo criopreservado somente com DMSO. Desta forma, foi possível verificar que as células espermatogênicas congeladas na presença do crioprotetor propanodiol apresentaram viabilidade acima de 55% (**figura 1**).

Os resultados obtidos demonstraram que é possível obter suspensões de células espermatogênicas bovinas de tecido testicular através do processo de dissociação mecânica.

Vários métodos podem ser utilizados para o isolamento de células espermatogênicas, no entanto, o mais comum é o método mecânico (Fishel *et al.*, 1995), como o utilizado neste estudo. De acordo com Aslam *et al.* (1998), o melhor método para obtenção de células espermatogênicas, com alta taxa de viabilidade é o uso da dissociação mecânica em associação com as enzimas tripsina e DNASE I. No entanto, para se atingir o melhor resultado através de digestão química é necessário no mínimo quatro horas de incubação antes do processo de seleção e armazenamento

CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMÁTIDES BOVINAS

(Salzbrunn *et al.*, 1996). No presente estudo, o tempo para a obtenção das células espermatogênicas foi em média 20 minutos. Além disso, foi priorizado o uso da dissociação mecânica devido ao baixo custo, boa resposta na obtenção de células viáveis e praticidade do processo.

Entre 51% e 58% das células sobreviveram aos procedimentos de congelamento e descongelamento, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos por Hovatta (2001), onde a viabilidade celular encontrada esteve entre 52-58% para as espermátides humanas. Segundo Avarbock *et al.* (1996) a melhor taxa de sobrevivência celular foi obtida utilizando propanodiol-sacarose e uma congelação lenta e programada em equipamento especializado. Suas taxas de sobrevivência para células testiculares de ratos e humanos foram 65% e 60%, respectivamente. Quando o DMSO foi utilizado, a taxa de sobrevivência para as células de ratos foi de 32%. Entretanto, outros autores, como Izadayar *et al.* (2002), demonstram que para diferentes tipos de espermátides, a criopreservação com o uso de DMSO é mais eficiente. Ogura *et al.* (1999) criopreservaram células testiculares de

hamster e verificaram que 43% dessas células continuavam viáveis após o descongelamento.

Em bovinos existem poucos estudos com a criopreservação de células espermatogênicas. Em um destes estudos, Ock *et al.* (2006b) descreveram a apoptose de 54% das espermátides criopreservadas em DMEM com 10% de DMSO e soro fetal bovino.

No presente estudo, os crioprotetores contendo propanodiol, e DMSO com propanodiol se comportaram de forma semelhante, sempre conservando mais de 55% da viabilidade das células espermatogênicas após o descongelamento. Comparando todos os tratamentos de criopreservação realizados nesse experimento com os descritos na literatura, independente da espécie foi possível observar que não houve uma diferença discrepante entre os métodos. Porém a solução contendo DMSO e propanodiol foi superior à solução contendo apenas DMSO, indicando que a presença do crioprotetor propanodiol é fundamental na preservação da viabilidade celular. Ainda ficou evidente uma pequena variação entre os tratamentos (**figura 1**), fato que pode ter ocorrido devido à curva empírica de congelação. Recomendam-se novos experimentos utilizando uma curva ou novas curvas controladas em aparelhos específicos.

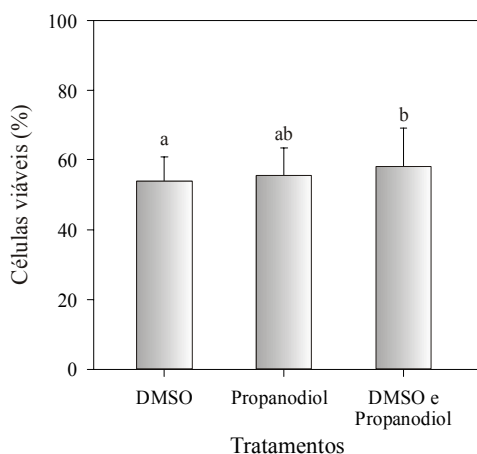


Figura 1. Viabilidade das células espermatogênicas na criopreservação. $p < 0,05$. (Viability of spermatogenic cells in cryopreservation).

CONCLUSÕES

Foi possível verificar que o método de dissociação mecânica com pinça e tesoura é adequado para se obter células espermatogênicas primordiais do tecido testicular, uma vez que é barato, prático e mantém a maioria das células íntegras. Além disso, ficou evidente que as células espermatogênicas primordiais isoladas podem ser congeladas e descongeladas com viabilidade acima de 55% nas soluções contendo propanodiol, podendo ser utilizadas em estudos com a ICSI. De forma geral, o estudo da criopreservação células espermatogênicas é de extremo valor para a reprodução e conservação

animal, uma vez que o germoplasma (células espermatogênicas primordiais) armazenado

pode ser estudado e aplicado em associação com as biotécnicas de reprodução assistida.

BIBLIOGRAFIA

- Avarbock, M.R., Brinster, J.B. and Brinster, R.L. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat. Med.*, 2: 693-696.
- Aslam, I., Robins, A., Dowell, K. and Fishel, S. 1998. Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 13: 639-645.
- Fishel, S., Green, S. and Bishop, M. 1995. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 345: 1641-1642.
- Hewitson, L., Martinovich, C., Simerly, C., Takahashi, D. and Schatten, G. 2002. Rhesus offspring produced by intracytoplasmic injection of testicular sperm and elongated spermatids. *Fertil. Steril.*, 77: 794-801.
- Hirabayashi, M., Kato, M. and Hochi, S. 2008. Factors affecting full-term development of rat oocytes microinjected with fresh or cryopreserved round spermatids. *Exp. Anim. Tokyo*, 57: 401-405.
- Hovatta, O. 2001. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum. Reprod.*, 7: 378-383.
- Izadayar, F., Rijsenbilt-Matthijs, J.J., Den Ouden, K., Creemers, L.B., Woelders, H. and Rooij, D.G. de. 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Androl.*, 23: 537-545.
- Meistrich, L.M. 1972. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity of sedimentation. *J. Cell. Physiol.*, 80: 299-312.
- Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., Kohda, T., Nagashima, H., Ishino, F. and Ogura, A. 2004. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J. Reprod. Develop.*, 50: 131-137.
- Ock, S.A., Kwack, D.O., Lee, S.L., Cho, S.R., Jeon, B.G., Kumar, B.M., Choe, S.Y. and Rho, G.J. 2006a. *In vitro* development of bovine oocytes reconstructed with round spermatids. *Theriogenology*, 65: 1242-1253.
- Ock, S.A., Lee, S.L., Jeon, B.G., Cho, S.R., Kumar, B.M., Choi, Y.S., Choe, S.Y. and Rho, G.J. 2006b. Isolation and viability of presumptive spermatids collected from bull testes by Percoll density gradient. *Anim. Reprod. Sci.*, 93: 144-156.
- Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K. and Ogura, A. 2003. Fertilization of oocytes and birth of normal pups following intracytoplasmic injection with spermatids in mastomys. *Biol. Reprod.*, 68: 1821-1827.
- Ogura, A., Inoue, K. and Matsuda, J. 1999. Mouse spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum. Reprod.*, 14: 1294-1298.
- Phillips, H.J. 1973. Evaluation of culture dynamics. Dye exclusion test for cell viability. In: Kruse, P.K. and Patterson, M.K. (eds.). *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Press, New York, NY. USA. 1: 406-408.
- Salzbrunn, A., Benson, D.M. and Holstein, A.F. 1996. A new concept for the extraction testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum. Reprod.*, 11: 752-755.
- Sofikitis, N.V., Miyagawa, I., Agapitos, E., Pasyanos, P., Toda, T., Hellstrom, W.J. and Kawamura, H. 1994. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J. Assist. Reprod. Gen.*, 11: 335-341.