



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THAMYRES RODRIGUES DAMASCENO

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TABELA DE ESCORES MORFOLÓGICOS PARA
AVALIAÇÃO DO TECIDO TESTICULAR BOVINO CRIOPRESERVADO: UMA
PROPOSTA**

FORTALEZA

2023

THAMYRES RODRIGUES DAMASCENO

PADRONIZAÇÃO DE UMA TABELA DE ESCORES MORFOLÓGICOS PARA
AVALIAÇÃO DO TECIDO TESTICULAR BOVINO CRIOPRESERVADO: UMA
PROPOSTA

Monografia submetida à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D162p Damasceno, Thamyres Rodrigues.
Padronização de uma tabela de escores morfológicos para avaliação do tecido testicular bovino criopreservado : uma proposta / Thamyres Rodrigues Damasceno. – 2023.
47 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte.
1. Morfologia. 2. Túbulo seminífero. 3. Criopreservação. 4. Tecido testicular. I. Título.
CDD 570
-

THAMYRES RODRIGUES DAMASCENO

PADRONIZAÇÃO DE UMA TABELA DE ESCORES MORFOLÓGICOS PARA
AVALIAÇÃO DO TECIDO TESTICULAR BOVINO CRIOPRESERVADO: UMA
PROPOSTA

Monografia submetida à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dr. Antonielia Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Roberto Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Aos meus pais, Liliane Rocha e Edilberto Rodrigues,
às minhas irmãs Jamylle e Kamille e aos meus avós
Francisca, Maria de Fátima e Raimundo, obrigado
por todo incentivo e apoio nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Às professoras Ana Beatriz e Antoniella pela orientação, incentivo e confiança neste trabalho.

Ao professor Ricardo Viana, pela ajuda nas análises deste trabalho.

Aos meus amigos Carla Cunha, Rodrigo Nobre e Valeska, pelas dicas e incentivos na hora de escrever esse trabalho.

Às minhas amigas Ana Júlia, Carla Letícia, futura médica, pelas maravilhosas conversas sobre a vida.

Aos meus amigos da Economia Ecológica, Amanda, Fernanda e Josafá, pelos maravilhosos momentos de descontração e risadas.

Às mestrandas Ana Cristina e Gabriela, pelas dicas e oportunidades de aprendizados.

A todos que contribuíram para esse trabalho, para meu desenvolvimento como ser humano, o meu muito obrigado.

“Todo mundo quer ter uma vida extraordinária.” (GREEN, John, 2012, p.155).

RESUMO

A criação de bancos de germoplasma destaca-se principalmente na criopreservação de gametas de animais ameaçados de extinção e em indivíduos submetidos a tratamentos como quimioterapia e radioterapia. Atualmente, a criopreservação é realizada por dois métodos principais: a congelamento lenta e a vitrificação. Apesar da eficácia da criopreservação para abordar desafios como a infertilidade, é importante destacar que o processo pode causar danos ao tecido gonadal. Diante disso, a avaliação histológica é crucial para determinar a qualidade dos tecidos após a criopreservação, especialmente para o sucesso da técnica. No entanto, a complexidade morfológica e a falta de padronização nas avaliações histológicas dos tecidos testiculares representam desafios persistentes, especialmente em contextos clínicos. Portanto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de uma nova tabela de escores para avaliação histopatológica para túbulos seminíferos bovinos criopreservados. O estudo desenvolveu uma padronização de avaliação histológica específica para danos do tecido bovino criopreservado, útil tanto para avaliadores com experiência ou para inexperientes. A adoção de análises padronizadas contribui para maior objetividade e redução da variabilidade nos resultados morfológicos. Essa abordagem sistemática promove uma base sólida para a interpretação dos dados, aumentando a confiabilidade e aplicabilidade entre as investigações nesse campo.

Palavras-chave: Morfologia, túbulo seminífero, criopreservação, tecido testicular

ABSTRACT

The creation of germplasm banks stands out primarily in the cryopreservation of gametes from endangered animals and individuals undergoing treatments such as chemotherapy and radiotherapy. Currently, cryopreservation is carried out through two main methods: slow freezing and vitrification. Despite the effectiveness of cryopreservation in addressing challenges such as infertility, it is important to note that the process can cause damage to gonadal tissue. In light of this, histological evaluation is crucial to determine the quality of tissues after cryopreservation, especially for the success of the technique. However, the morphological complexity and lack of standardization in histological assessments of testicular tissues pose persistent challenges, especially in clinical contexts. Therefore, this study proposes the development of a new scoring table for histopathological evaluation of cryopreserved bovine seminiferous tubules. The research established a standardization of histological evaluation specifically for cryopreserved bovine tissue damage, beneficial for both experienced and inexperienced evaluators. The adoption of standardized analyses contributes to increased objectivity and reduced variability in morphological results. This systematic approach promotes a solid foundation for data interpretation, enhancing reliability and applicability across investigations in this field.

Keywords: Morphology, seminiferous tubule, cryopreservation, testicular tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura do testículo humano	15
Figura 2	- Sistema reprodutor bovino	15
Figura 3	- Espermatogênese em mamíferos	16
Figura 4	- Regulação hormonal	17
Figura 5	- Fluxograma de validação	24
Figura 6	- Coleta, lavagem e transporte das amostras	25
Figura 7	- Fragmentação, criopreservação e aquecimento das amostras	26
Figura 8	- Processamento histológico	26
Figura 9	- Membrana basal e Organização do epitélio	28
Figura 10	- Alterações nas células epiteliais	29
Figura 11	- Núcleos picnóticos e perda celular	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Padronização de avaliação Histológica	32
Tabela 2	- Médias dos escores de cada avaliador por características morfológicas no tecido testicular fresco	33
Tabela 3	- Médias dos escores de cada avaliador por características morfológicas no tecido testicular vitrificado	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACP's	Agentes Crioprotetores
ALA	Ácido alfa lipóico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CSs	Células de Sertoli
CGPs	Células germinativas primordiais
CRT	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
HE	Hematoxilina - Eosina
LH	Hormônio luteinizante
MEM-HEPES	Meio Essencial Mínimo
OTC	
SAC	Sacarose
SV	Solução de Vitrificação
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIT	Vitrificado
VSS	Vitrificação em superfície sólida

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	13
1.1	Morfologia e função testicular	14
1.2	Espermatogênese e regulação hormonal	16
1.3	Criopreservação do tecido testicular	18
1.4	Princípios e métodos para criopreservação de tecido	19
1.5	Avaliações de testículos criopreservados	20
2.0	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.1	Objetivos específicos	23
3.0	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Fase I: Identificação	24
3.1.1	Amostras e procedimentos	24
3.1.2	Protocolo de Vitrificação (VIT)	25
3.1.3	Análise morfológica	26
3.2	Fase II: Geração de escores	27
3.3	Fase III: Verificações e avaliações	31
3.3.1	Fase de teste	31
3.3.2	Treinamento	31
3.3.3	Avaliação	31
4.0	RESULTADOS	32
5.0	DISCUSSÃO	36

6.0	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO 1	

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, um considerável esforço científico tem sido aplicado na criação de bancos de germoplasma, tanto animal quanto humano visando criopreservar material genético de animais ameaçados de extinção e de seres humanos que serão submetidos a tratamentos clínicos que levam a infertilidade, como radioterapia ou quimioterapia (BOLTON et al., 2022). A criobiologia de tecido ovariano ou testicular tem sido uma ferramenta promissora na preservação de células reprodutoras, abrangendo a criopreservação de óvulos, espermatozoides ou embriões com objetivo de restaurar futuramente sua função (LAMBERTINI et al., 2016).

Os procedimentos para a criopreservação do tecido gonadal têm início com a coleta da amostra, a qual deve ser cuidadosamente lavada com a solução apropriada. Posteriormente, o tecido é fragmentado e submetido a um processo de desidratação e incubação com agentes crioprotetores (ACPs). Após esta etapa, os tecidos são preservados com o protocolo adequado, a fim de, em um momento oportuno, serem descongelados e submetidos ao processo de desenvolvimento. Cada fase desse procedimento deve ser minuciosamente analisada, dado que essas etapas têm um impacto direto no sucesso do procedimento de criopreservação (CARVALHO, 2016).

Atualmente, a criopreservação é viabilizada por meio de dois métodos distintos: a congelamento lenta e a vitrificação. A congelamento lenta se caracteriza pela redução gradual de temperatura, com uso ou não de equipamentos sofisticados (BOJIC et al., 2021). Já a vitrificação é descrita como processo de solidificação em baixas temperaturas com imersão direta no nitrogênio líquido (ELLIOTT et al., 2017). Ambos os métodos têm como objetivo principal manter o material biológico em condições de temperaturas criogênicas de -196°C , o que resulta na interrupção de reações químicas, processos biológicos e atividades metabólicas garantindo, dessa forma, a preservação integral do material (BAKHACH, 2009).

Embora a criopreservação seja uma solução válida para enfrentar questões como a infertilidade é crucial ressaltar que tanto o procedimento em si quanto a utilização equipamentos de alto custo e altas concentrações de ACPs podem gerar desequilíbrio osmótico, estresse térmico, formação de cristais de gelo intracelulares e provocar alterações estruturais e moleculares nas células e tecidos (ARKOUN et al. 2019). Os danos causados ao tecido e as células durante o processo de criopreservação é definido como crioinjúria. Em relação aos tecidos testiculares, é importante destacar que a crioinjúria é uma preocupação significativa, uma vez que pode resultar em danos moleculares, vacuolização e aumento do volume

citoplasmático nas células testiculares submetidas à criopreservação (DA SILVA et al., 2019; DEL VENTO et al., 2019).

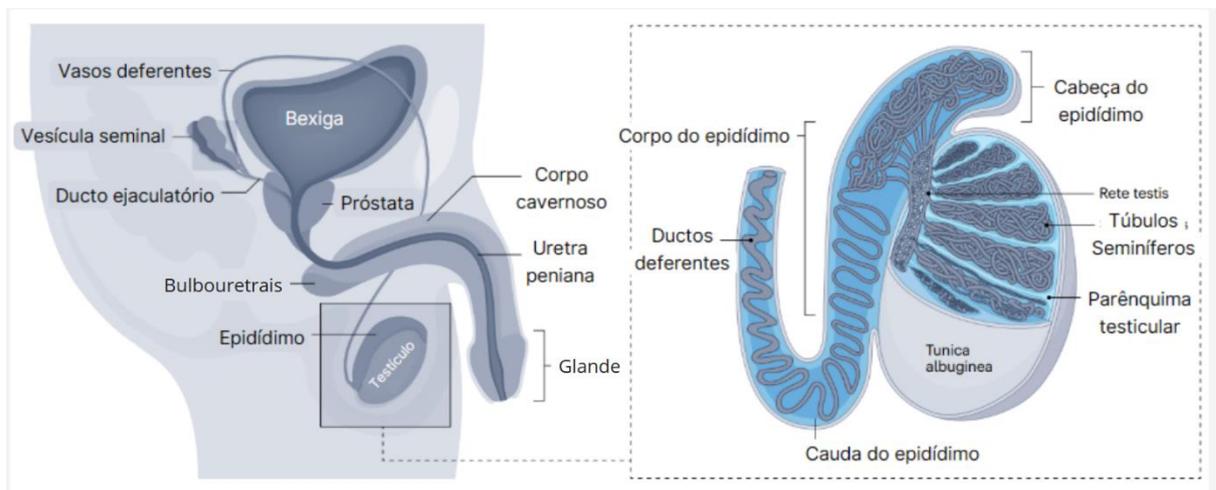
Para inferir o sucesso do procedimento de criopreservação do tecido testicular, são necessárias análises qualitativas e quantitativas para estimar a integridade dos componentes teciduais (MACENTE et al., 2017). Com coloração clássica com Hematoxilina e Eosina, se consegue analisar a arquitetura tecidual e após pontuada com escores permitindo determinar a integridade do túbulo seminífero (AMELKINA et al., 2021). Em resumo, os principais parâmetros avaliados encontrados na literatura são: danos ao epitélio seminífero e núcleo das células (SAULNIER et al., 2021; SILVA et al., 2022). Avaliações desse tipo têm sido empregadas em diversas espécies que passaram pela criopreservação, incluindo camundongos (ARKOUN et al., 2016), felinos (LIMA et al., 2018b), carneiros (YGNÁCIO, 2023), bodes (PATRA et al., 2021) e seres humanos (FAES; GOOSSENS, 2017).

No entanto, as avaliações histológicas do tecido testicular são desafiadoras devido à sua complexidade morfológica e à presença de diversos tipos celulares resultantes das diferentes fases da espermatogênese (ITO, 2021). Assim, mesmo com tabelas com os parâmetros e pontuações desenvolvidas na literatura para avaliações morfológicas dos testículos, a falta de uma padronização clara e a dificuldade na reprodutibilidade dos escores é uma problemática persistente, especialmente em contextos clínicos em que a precisão da avaliação é crucial, para a escolha de uma técnica ideal para a criopreservação de testículos. Portanto, este trabalho tem como objetivo padronizar uma tabela de escores com as características morfológicas mais relevantes e avaliar a sua reprodutibilidade para emprego nas análises das principais alterações histopatológicas do tecido testicular bovino após a criopreservação.

1.1 Morfologia e função testicular

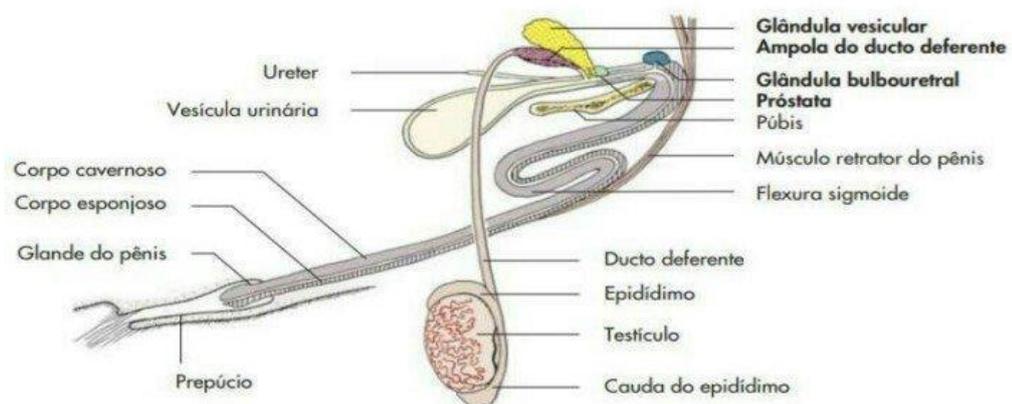
Os sistemas reprodutores de primatas e bovídeos apresentam compartimentos semelhantes, incluindo testículos, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, ductos ejaculatórios, uretra, glândulas acessórias e pênis, conforme ilustrado na figura 1 e 2 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; KONIG & LIEBICH, 2016). Nos mamíferos em geral, o testículo desempenha o papel principal na reprodução e é funcionalmente organizado em duas regiões: porção tubular, responsável pela produção de gametas; e a porção intersticial, ou intertubular, responsável pela produção e liberação de hormônios cruciais na espermatogênese e características secundárias masculinas (SILBER, 2018).

Figura 1- Estrutura do testículo humano



Fonte: Adaptado de EISENBERG, 2023.

Figura 2 - Sistema reprodutor bovino



Fonte: KONIG & LIEBICH, 2016.

A porção tubular ocupa a maior parte do tecido testicular, sendo composta pelos túbulos seminíferos. No epitélio dos túbulos, encontram-se as células de Sertoli (CSs), que são responsáveis por fatores essenciais, como suporte e nutrição, para a espermatogênese (O'DONNELL et al., 2020), além das células germinativas, que originam os espermatozoides (EISENBERG, 2023). Juntas, essas células formam o epitélio seminífero que envolvem o lúmen dos túbulos (HESS, 2009). Já o espaço intersticial se localiza entre os túbulos seminíferos e abrigam células isoladas ou em pequenos aglomerados no tecido conjuntivo. Essas células são as células mióides peritubulares e as células intersticiais de Leydig, a principal célula secretora do hormônio testosterona (SETCHELL; BREED, 2006).

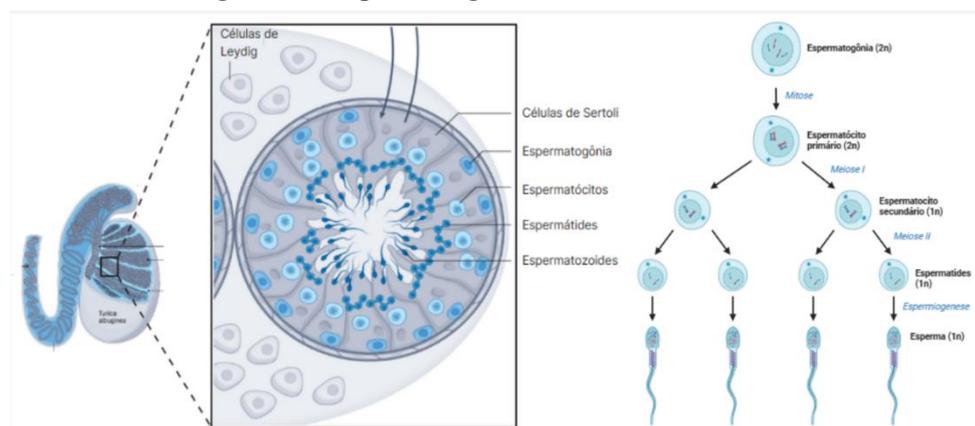
O epitélio seminífero encontra-se envolto pela barreira hematotesticular, a qual é constituída pelas células de Sertoli. Essa barreira desempenha um papel importante na proteção contra agentes imunológicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). É essa barreira que permite um ambiente especializado no desenvolvimento das células germinativas. O epitélio seminífero é dividido em dois compartimentos: porção basal, contendo as espermatogônias e espermatócitos primários, e o epitélio adluminal, contendo os espermatócitos secundários e espermatídes. Assim, durante o amadurecimento das células germinativas, elas se deslocam do epitélio basal para o adluminal, e liberam os espermatozoides do epitélio seminífero para o lúmen (CRISÓSTOMO et al., 2018).

1.2 Espermatogênese e regulação hormonal

As células germinativas primordiais (CGPs) são formadas durante o período embrionário. O processo de formação de espermatozoides é chamado de espermatogênese e tanto em humanos quanto em bovinos, tem início na puberdade e ocorre durante toda a fase reprodutiva do indivíduo. Resumindo, a espermatogênese pode ocorrer em três fases distintas (Figura 2): formação de espermatócitos primários; formação de espermatócitos secundários; formação de espermatídes e espermatozoides (OATLEY; GRISWOLD, 2017).

Na primeira fase da espermatogênese, há a proliferação celular, onde ocorrem divisões mitóticas das células-tronco espermatogoniais com o estímulo dos andrógenos na puberdade, que se formam em espermatogônias e, posteriormente, em espermatócitos primários. Na segunda fase, os espermatócitos primários, passam por meiose reducional e adquirem haploidia, gerando os espermatócitos secundários. Por fim, na terceira fase, os espermatócitos secundários, passam por divisão meiótica equacional e se desenvolvem em espermatídes e espermatozoides FIGURA 2 (SILBER, 2018; VERNET et al., 2008).

Figura 3 – Espermatogênese em mamíferos

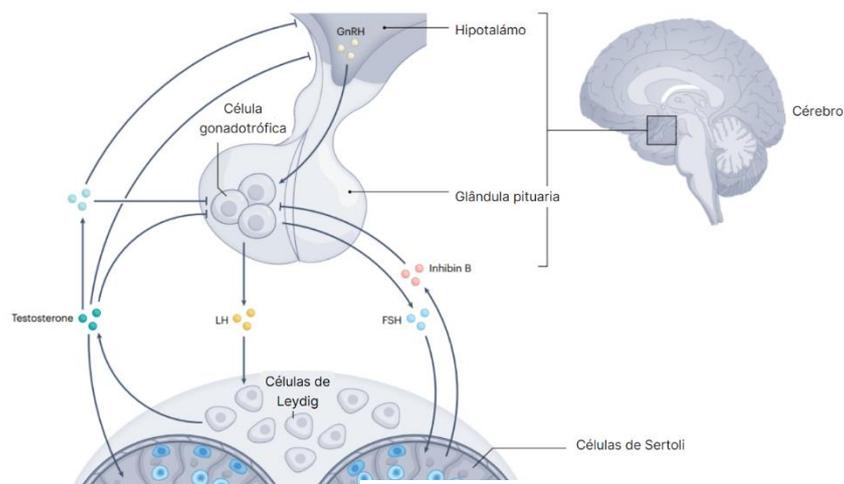


Fonte: Adaptado de EISENBERG, 2023.

No epitélio seminífero existem dois tipos de espermatogônias: tipo A, que exibem um núcleo esférico ou ovóide e um núcleo eucromático, e B que são células redondas e possuem um núcleo que reage mais intensamente a hematoxilina, porém não são facilmente identificadas ao microscópio (SHARMA et al., 2019). Já os espermatócitos são classificados em dois tipos: os espermatócitos primários, que se caracterizam pelo núcleo esférico, e os espermatócitos secundários, com formato celular esférico e núcleo heterocromático (MECKLENBURG; HERMANN, 2016). As espermatídes são células com núcleo esféricos e menores que os espermatócitos secundários, que durante a espermiogênese se tornam alongadas passando a ser chamadas de espermatozoides (SILBER, 2018).

A espermatogênese é regulada pela interação de diferentes estímulos hormonais (Figura 3). O desenvolvimento e manutenção dos espermatozoides dependem de hormônios como o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O GnRH estimula células cromófilas basófilas na hipófise anterior a secretar as gonadotrofinas na circulação sistêmica (EHMCKE, 2005; JAN, 2012). Por sua vez, os níveis de FSH e LH se regularizam pelo feedback negativo dos esteróides sexuais, que diminuem a secreção de GnRH e mantêm a homeostase do eixo 'hipotálamo-hipófise-gonadal' (HAYES, 2001; MANETTI, 2011).

Figura 4 - Regulação hormonal



Fonte: Adaptado de EISENBERG, 2023.

Cada hormônio exerce ações individuais na espermatogênese. As células de Sertoli (CSs) possuem receptores para o hormônio FSH e são estimuladas para secreção de fatores como a inibina B, que regula a disponibilidade de FSH e a androgen-binding protein (ABP),

responsável por regular a ação da testosterona no tecido testicular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Já as células de Leydig possuem receptores para o LH, que estimula a produção de testosterona nestas células. A testosterona é um hormônio crucial para o estimular a espermatogênese, além de influenciar na aquisição das características sexuais masculinas e regulação da secreção de GnRH. O desenvolvimento puberal dos testículos ocorre com o aumento da frequência de GnRH pelo hipotálamo e a produção de FSH e LH que provoca a maturação das CSc e estimula as células espermatogoniais a entrarem em processo de diferenciação e maturação (MILLER; AUCHUS, 2011).

1.3 Criopreservação do tecido testicular

A criopreservação é um procedimento que utiliza baixas temperaturas com o propósito de conservar a longo prazo material biológico e restaurar a função de células e tecidos, como os espermatozoides ou tecido testicular (LAMBERTINI et al., 2016). O material biológico pode ficar armazenado em nitrogênio líquido a -196°C por décadas e congelado em bancos de germoplasma (HAGEDORN et al., 2019). Essa técnica é essencial para preservar a integridade celular (LEONQUINTO et al., 2009) e se desenvolveu ao longo do tempo a partir da compreensão sobre as técnicas de criopreservação (NAGY et al., 2017).

A criopreservação de tecido testicular é uma alternativa para a preservação da fertilidade masculina eficiente em animais pré-púberes, os quais não apresentam produção espermática, o que impossibilita a criopreservação de sêmen (PUKAZHENTHI, 2015). Em animais adultos, a criopreservação de tecido é frequentemente necessária quando há risco de morte ou exposição a tratamentos que levam à infertilidade, como no caso de pacientes em tratamento de câncer (DELESSARD, 2020). Além disso, a criopreservação do sêmen não é sempre bem-sucedida devido à redução de motilidade e de quantidade de espermatozoides durante o processo de resfriamento e aquecimento, o que limita as possibilidades de inseminação (YOKONISHI, 2016; KALSI, 2011).

Devido à crescente extinção em massa causada pelos seres humanos, cerca de 41% dos anfíbios, 26% dos mamíferos e 14% das espécies de aves estarão ameaçados de extinção (CEBALLOS & EHRLICH 2018, IUCN 2021). Assim, a criopreservação, a formação de bancos de germoplasma animal aliadas às tecnologias de reprodução assistida vem como uma ferramenta de auxílio para preservação dessas espécies ameaçadas de extinção (MITCHELL & WILLIAMS, 2022). Nas últimas décadas, a preservação de tecidos somáticos e gonadais expandiu-se para diversas espécies, tanto em animais silvestres quanto domésticos (SILVA et al., 2020). Entre as espécies que tiveram sucesso no processo de criopreservação

estão os humanos (BAERT et al., 2013), ovinos (PUKAZHENTHI et al., 2015), murinos (DUMONT et al., 2017; PERRARD et al., 2016), felinos (LIMA et al., 2018b), suínos (KANEKO et al., 2019), primatas (FAYOMI et al., 2019), caprinos (PATRA et al., 2021), caninos silvestres (ANDRAE et al., 2021) e bovinos (LI et al., 2018).

Assim, a criopreservação de células-tronco espermatogoniais isoladas ou inclusas em fragmentos do tecido testicular se apresenta como uma alternativa viável para preservação do material genético animal e humano. Diversas abordagens podem ser utilizadas para a obtenção de espermatozoides a partir de amostras do tecido testicular, incluindo o transplante de espermatogônias, o enxerto de tecido testicular e a espermatogênese in vitro (YOKONISHI, 2016). No entanto, o sucesso dessas técnicas está intimamente relacionado aos protocolos de criopreservação utilizados: congelamento lento ou vitrificação (PUKAZHENTHI et al., 2015; SILVA et al., 2019)), às condições de descongelamento ou aquecimento dos fragmentos (LIMA et al., 2018a) e da idade do indivíduo (pré-púberes ou púberes) em que o fragmento foi criopreservado (AMELKINA et al., 2021).

1.4 Princípios e métodos para criopreservação de tecido

A preservação da viabilidade celular ou tecidual após a interrupção do metabolismo no processo de criopreservação depende de alguns fatores como: o tipo e concentração dos crioprotetores, o método de criopreservação e resfriamento utilizado, como também o armazenamento e o processo de descongelamento ou reaquecimento (FAUSTINO, 2011). Os crioprotetores são substâncias utilizadas para que as células sejam criopreservadas sem crioinjúrias causadas pela drástica queda de temperatura e pela formação de cristais de gelo. Entre os crioprotetores mais utilizados, estão dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol e glicerol, que entram nas células causando a redução da pressão osmótica e formam um filme protetor ao redor da membrana celular impedindo a formação de cristais de gelo (RAPOSO et al., 2016). Além desses crioprotetores, a utilização de gemas de ovo, leite em pó, sacarose, e até água de coco também já foram utilizados e atuam como coadjuvantes na proteção aos possíveis danos causados com o congelamento (GONÇALVES et al. 2008). Porém, a entrada e saída dos crioprotetores da membrana celular, bem como sua alta concentração utilizada, podem causar danos osmóticos e/ou toxicidade às células (CASTRO et al. 2011).

A criopreservação do tecido testicular pode ser realizada por meio de dois métodos principais: a congelação lenta e a vitrificação. Na congelação lenta, a temperatura é gradualmente diminuída, permitindo a saída controlada da água intracelular, minimizando a formação de cristais de gelo intracelulares (YONG et al., 2020). Por outro lado, a vitrificação

envolve uma rápida diminuição da temperatura com taxas de resfriamento extremamente elevadas, resultando na formação de um meio vítreo que evita a formação de cristais de gelo intracelular (ELLIOTT et al., 2017). Os protocolos de vitrificação incluem etapas de exposição a crioprotetores permeáveis e não permeáveis, seguidas por um mergulho direto no nitrogênio líquido (-196°C) (PATRA et al., 2021). A escolha entre sistemas abertos e fechados para armazenamento influencia os riscos de contaminação microbiana, sendo que os sistemas abertos permitem o contato direto com o nitrogênio líquido, acelerando a queda de temperatura (BIELANSKI; VAJTA, 2009).

A vitrificação em superfície sólida (VSS) é outro método, no qual as amostras são transferidas para uma superfície plana resfriada em nitrogênio líquido e posteriormente acondicionadas em criotubos. O aquecimento do tecido criopreservado é realizado por imersão rápida em banho-maria a 37°C, seguido pela remoção gradual dos crioprotetores para prevenir alterações osmóticas, danos celulares e mudanças na arquitetura dos tecidos (CARVALHO, 2016). O controle adequado do tempo de exposição e concentrações de crioprotetores é essencial para evitar toxicidade nos tecidos e células durante todo o processo (PECG, 2007; RALL et al.1983; KARLSSON; TONER, 1996).

Após o aquecimento, os fragmentos testiculares podem restaurar sua funcionalidade reprodutiva e ser empregado nas técnicas de reprodução assistida como a fertilização e a produção in vitro de embriões (PATRA; GUPTA, 2019). Com isso, o sistema de cultivo in vitro de tecido testicular de animais com alto valor zootécnico e/ou ameaçados de extinção vêm sendo investigados em diversas espécies e diferentes técnicas tem sido empregadas, como o cultivo bidimensional (2D) em camundongos (SATO et al., 2015), caprino (PATRA et al.,2019) ou tridimensional (3D) em humanos (JORGENSEN et al.,2014).

1.5 Avaliações de testículos criopreservados

O sucesso na criopreservação do tecido testicular é necessário para que a maioria das células permaneçam viáveis após o aquecimento (CARVALHO, 2016). Dessa forma, as análises mais empregadas para verificar a viabilidade do tecido testicular são as avaliações histológicas, onde são avaliadas a morfologia das células e a arquitetura dos tecidos. Para essas análises, a coloração mais comumente utilizada é a histologia clássica com Hematoxilina e Eosina (HE). A técnica de coloração com HE permite a análise da morfologia do tecido testicular, incluindo a integridade da membrana basal e a estrutura dos túbulos seminíferos, a identificação dos diferentes tipos celulares, além da presença de vacuolização e a organização

estrutural epitélio seminífero. Dessa forma, é possível avaliar os danos causados pelo processo de criopreservação que venham a comprometer a morfologia do tecido e das células ali presentes (LIMA et al., 2018a). Nesse sentido, as análises devem estabelecer os parâmetros e características a serem avaliados qualitativa e quantitativamente e pontuações baseadas nessas características podem ser empregadas.

Dentre as primeiras classificações histológicas de tecido testicular está a classificação de Johsen (1970), que se baseia na contagem de escores em fragmentos de testículos humanos submetidos a biópsia, atribuindo pontuações de 1 a 10 de acordo com a presença ou ausência dos tipos celulares nos túbulos seminíferos. Parâmetros como a presença de espermatozoides, espermátides, espermátócitos, espermátogônias ou apenas células de Sertoli receberam notas decrescentes de 10 a 2 e finalmente o escore 1, onde nenhuma célula estava presente (JOHSEN, 1970).

Outra classificação amplamente utilizada é a proposta de Cosentino (1985), que envolveu a análise de túbulos seminíferos de ratos pré-púberes. Nessa abordagem, 12 parâmetros histológicos foram avaliados e pontuados em uma escala de 0 a 4, de acordo com a extensão do dano observado. Dentre os parâmetros avaliados, foram incluídos a integridade dos túbulos e das células germinativas. Pontuações foram atribuídas com base na presença de espermatozoides e espermátides, redução do diâmetro tubular ou ruptura, além de proliferação das células de Leydig (CONSENTINO, 1985).

Recentemente, Faes e Gossens (2017) desenvolveram uma classificação histológica para a avaliação de fragmentos de testículo humano submetidos à criopreservação. Nessa abordagem, quatro parâmetros foram considerados e pontuados em uma escala de 0 a 3. Esses parâmetros englobam a histoarquitetura dos túbulos seminíferos incluindo a ruptura da membrana basal, inchaço e perda das células do epitélio, com a adição de considerações sobre a sua condensação nuclear ou picnose. Outra avaliação significativa em relação aos tecidos testiculares criopreservados foi abordada por Ygnácio (2023), utilizando tecido testicular de carneiros como modelo. Essa avaliação combinou os parâmetros definidos por Johsen (1970) e Faes e Gossens (2017), considerando alterações nos túbulos seminíferos e alterações celulares, em uma escala que varia de 0, indicando um tecido saudável, a 3, indicando maior grau de danos causados (FAES E GOOSSENS, 2017; YGNÁCIO, 2023).

Embora as classificações tenham incluído parâmetros e escores, as avaliações histológicas permanecem complexas e demandam tempo e treinamento devido à alta complexidade da morfologia do tecido testicular e dos diversos tipos celulares presentes, resultantes das diversas etapas de espermatogênese (LUPOLD, 2013; ITO, 2021). Portanto, é

essencial estabelecer análises de fácil aplicação e compreensão e ao mesmo tempo confiáveis e reprodutíveis, a fim de permitir que o avaliador analise e pontue o tecido com precisão e que a metodologia empregada seja reprodutível e que fique disponível para outros pesquisadores empregarem em trabalhos futuros. Além disso, a falta de padronização nas classificações dos túbulos seminíferos é um fator que afeta a consistência e a confiabilidade das análises. Portanto, a definição e padronização dos parâmetros e escores empregados na avaliação do tecido testicular são de extrema importância para uma compreensão aprimorada do nível de danos causados aos fragmentos testiculares submetidos às técnicas de criopreservação e/ou cultivo in vitro.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar as características morfológicas mais relevantes dos túbulos seminíferos e avaliar a reprodutibilidade da tabela de escores utilizada para analisar o nível de dano do tecido testicular bovinos após o processo de vitrificação.

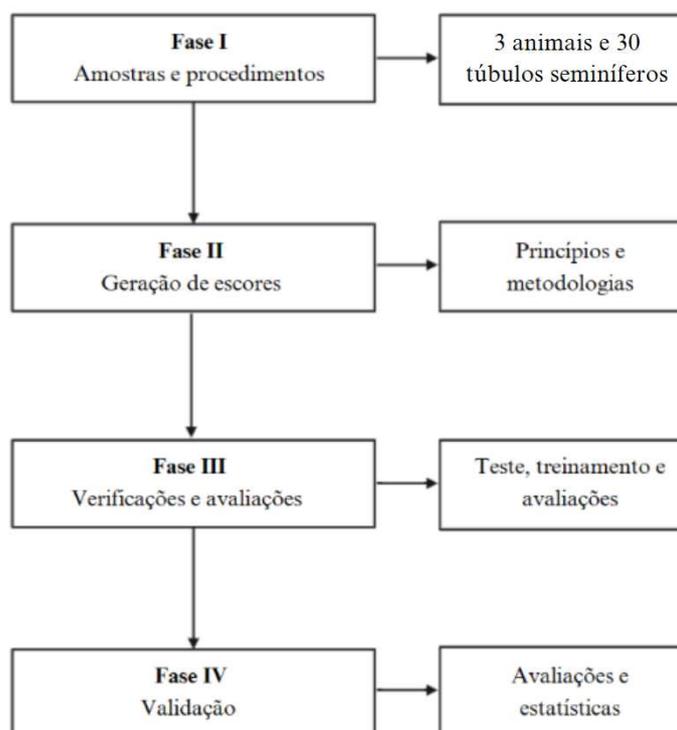
2.2 Objetivos específicos

1. Identificar quais são os principais danos morfológicos causados pela vitrificação na arquitetura dos túbulos e no epitélio seminífero antes e após esse procedimento;
2. Definir quais os critérios e parâmetros morfológicos mais relevantes a serem considerados na avaliação morfológica dos túbulos e das células do epitélio seminífero antes e após o processo de vitrificação;
3. Testar, com diferentes avaliadores, a reprodutibilidade e a confiabilidade das características ou critérios morfológicos relevantes.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo é de natureza experimental e segue um desenho para avaliação histológica adaptado de Trevisan (2018). Foi fundamentado em três metodologias padrão, uma destinada avaliar a integridade estrutural dos túbulos seminíferos (CONSENTINO et al., 1985), outra tem como objetivo validar uma pontuação para epitélio seminífero (JOHANSEN, 1970) e para avaliar os núcleos picnóticos das células germinativas (FAES E GOOSSENS, 2017). Para aprimorar ainda mais o delineamento, foram definidas quatro fases distintas, conforme o fluxograma a seguir.

Figura 5 - Fluxograma de validação



Fonte: Elaborado pela autora

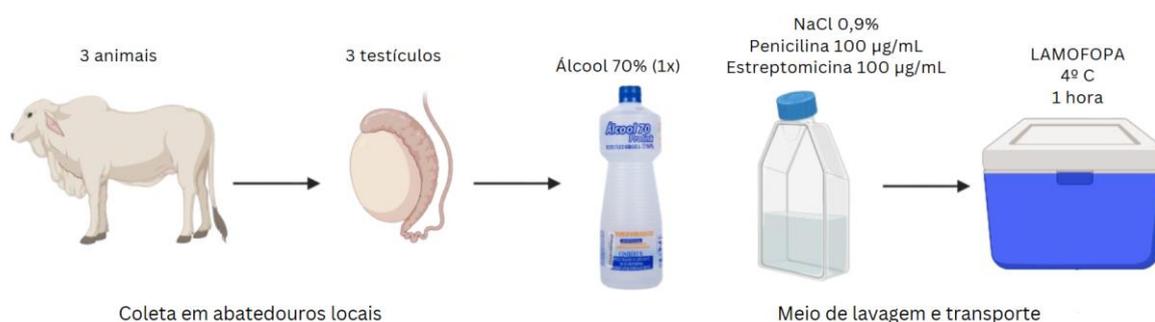
3.1 Fase I: Identificação

Foi realizada uma seleção de um grupo controle e um grupo vitrificado, e definiu-se analisar 10 túbulos seminíferos de cada animal, um total de 30 túbulos seminíferos de cada grupo, para estabelecer os objetivos da análise morfológica dos túbulos seminíferos.

3.1.1 Amostras e procedimentos

Foram coletados 3 pares de testículos animais adultos provenientes de abatedouros locais. Foi selecionado um testículo de cada par dos três animais distintos e submetidos a uma lavagem única com álcool 70% e, em seguida, lavados em meio contendo NaCl 0,9%, penicilina e estreptomicina a 100 µg/mL. Posteriormente, os órgãos foram transportados para o Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA) da Universidade Estadual do Ceará a uma temperatura de 4° C, uma hora após a coleta onde foram fragmentados segundo Ygnácio, 2023. Os fragmentos do tecido testicular foram distribuídos aleatoriamente em duas condições experimentais (tratamentos): controle, no qual os fragmentos foram diretos para processamento histológico, ou seja, testículo fresco, e os vitrificados, os quais os fragmentos foram submetidos a técnica de vitrificação e após o aquecimento foram destinados ao processamento histológico. Em ambos os grupos, fragmentos frescos e vitrificados foram submetidos à histologia clássica e análise morfológica.

Figura 6 – Coleta, lavagem e transporte das amostras



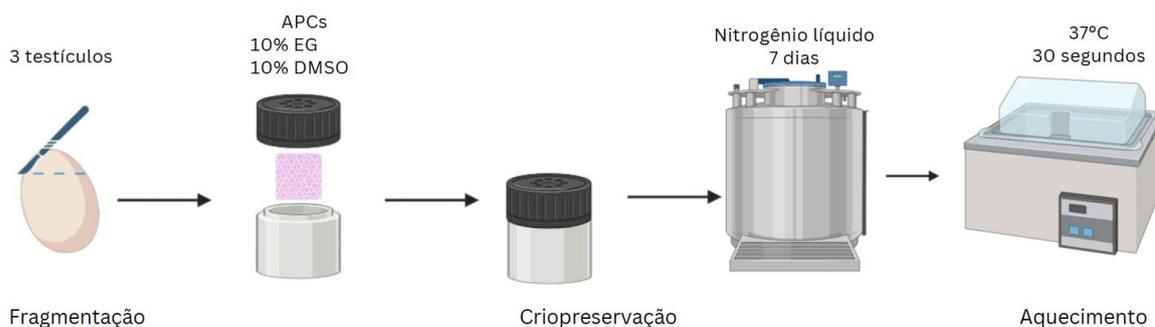
Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.2 Protocolo de Vitrificação (VIT)

Os fragmentos foram expostos à duas soluções de vitrificação (SV1 e SV2) dentro de um dispositivo próprio de aço inox. Foram expostos por 4 minutos a SV1, composta por Meio Essencial Mínimo (MEM-HEPES) suplementado com 10 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose (SAC), 10% de etilenoglicol (EG), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 150 µM/ml de ácido alfa lipóico (ALA). Em seguida, exposto a SV2 por 1 minuto a temperatura ambiente, mantendo a mesma composição da SV1, exceto pela maior concentração dos agentes crioprotetores, que foi de 20% de EG e DMSO. Após a etapa de exposição, o dispositivo foi fechado, mergulhado e armazenado em nitrogênio líquido por 7 dias. Para o processo de aquecimento, o dispositivo foi retirado do nitrogênio líquido à temperatura ambiente por 1 minuto, seguido por imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Posteriormente, os fragmentos foram lavados três vezes em soluções contendo MEM-HEPES e 10 mg/mL de BSA e concentrações decrescentes de SAC (0,5M, 0,25M e 0M), por 5 minutos em cada solução (SILVA et al., 2022).

Figura 7 – Fragmentação, criopreservação e aquecimento das amostras

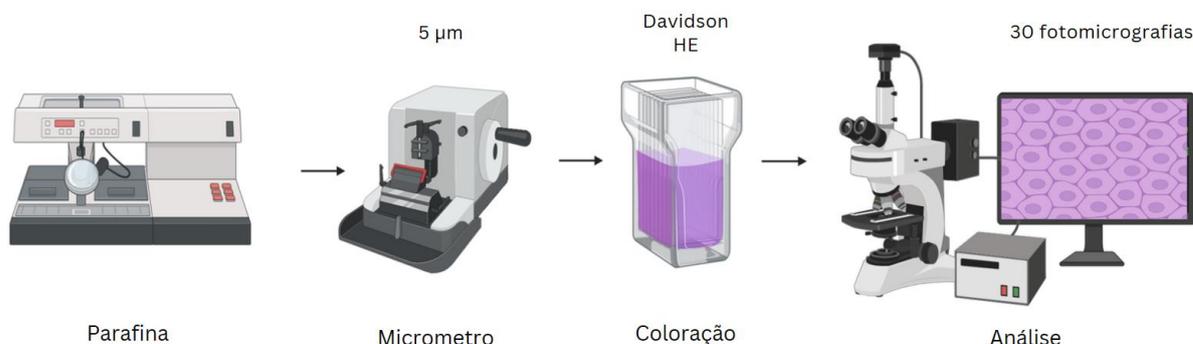


Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.3 Análise morfológica

Os fragmentos de testículo para análise morfológica foram fixados em solução de Davidson (22,2% de formaldeído, 33,4% de etanol, 11% de ácido acético glacial e 33,4% de água destilada) em temperatura ambiente por 12h. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, clarificado em xileno e embebido em parafina. Em seguida foram seccionados com 5 μm de espessura e corado com hematoxilina-eosina (HE) (YGNÁCIO,2023). Com o auxílio de um microscópio óptico com câmera acoplada e software Image J, foram capturadas um total de 30 fotomicrografias de túbulos seminíferos em aumento de 40 vezes.

Figura 8 – Processamento histológico



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Fase II: Geração de escores

Para assegurar a qualidade da abordagem metodológica, foram estipulados princípios fundamentais para a sua aplicabilidade, destacando-se a simplicidade e a possibilidade de reprodução em outros modelos de avaliação, conforme descrito por Trevisan (2018). Os parâmetros morfológicos foram criteriosamente selecionados mediante uma análise prévia dos túbulos seminíferos. Foram então, categorizados em alterações no epitélio seminífero, alterações estas que abrangem características como a membrana basal, organização das células epiteliais, como espaços entre as células, retração do epitélio, bem como aspectos celulares como núcleos picnóticos e perda das células epiteliais.

Após a definição dos parâmetros, procedeu-se à escolha da descrição das características e suas respectivas escalas, conforme delineado por Johsen (1970), Consentino (1985), Faes e Goossens (2017) e Ygnácio (2023). Assim, foram pontuados em escalas de 0 a 3, onde a morfologia intacta (com a membrana com estrutura intacta, sem desorganização, epitélio aderido à membrana, poucos espaços entre as células, poucos núcleos picnóticos e pouca perda celular) recebeu uma pontuação de 0, enquanto a pior (com membrana basal completamente retraída, epitélio totalmente desorganizado, muitos espaços entre as células, epitélio completamente retraído, muitos núcleos picnóticos e muita perda celular) recebeu uma pontuação de 3.

Para uma melhor análise, pranchas histológicas com imagens dos túbulos seminíferos foram montadas e apresentadas aos avaliadores (figura 9, 10 e 11).

Figura 9 - Membrana basal e Organização do epitélio

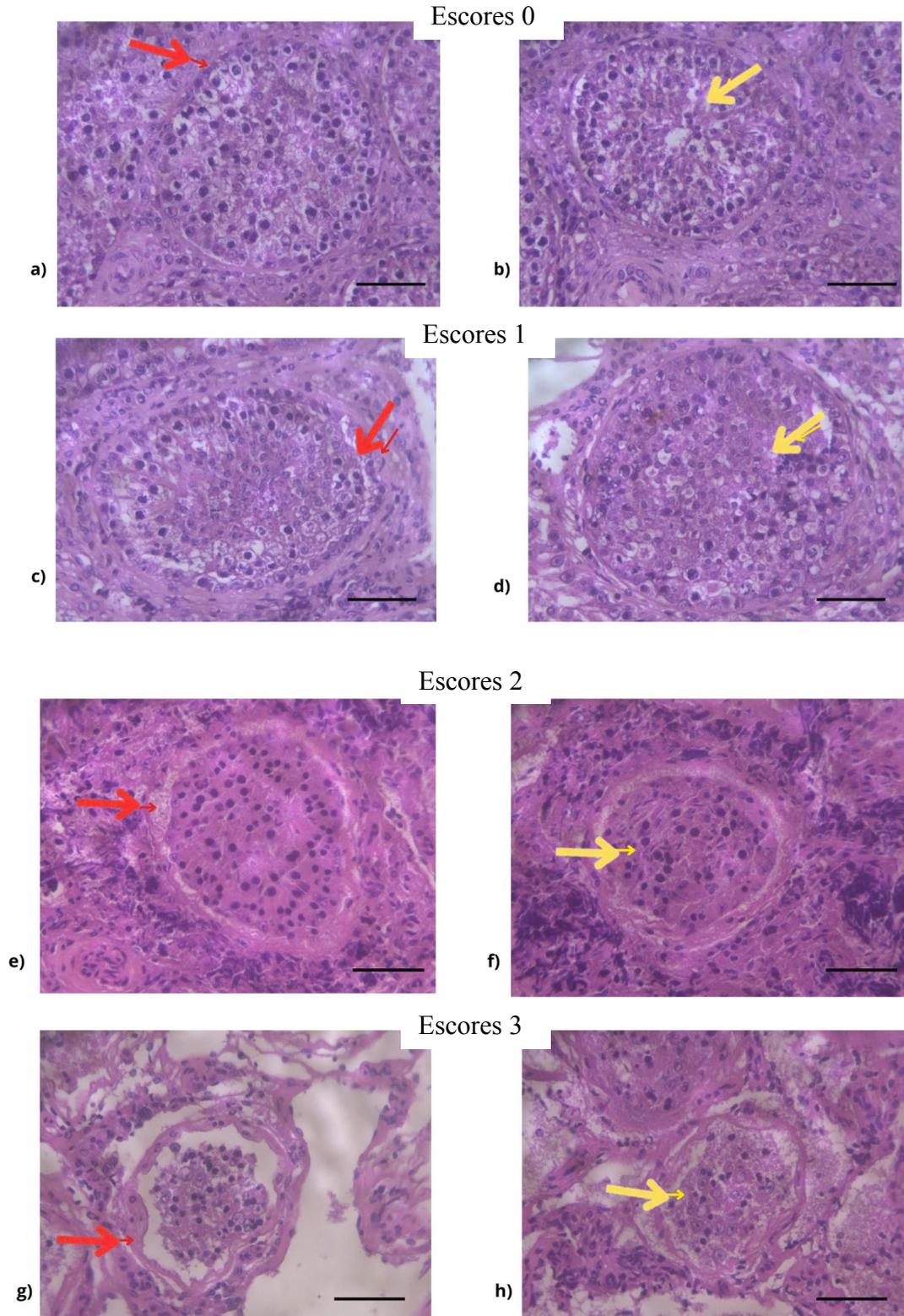


Figura 9. Imagens a, c, e, g, demonstram a membrana basal (setas vermelhas), classificadas nos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. As imagens b, d, f e h, demonstram a organização do epitélio seminífero (setas amarelas) classificadas nos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 10 – Alterações nas células epiteliais

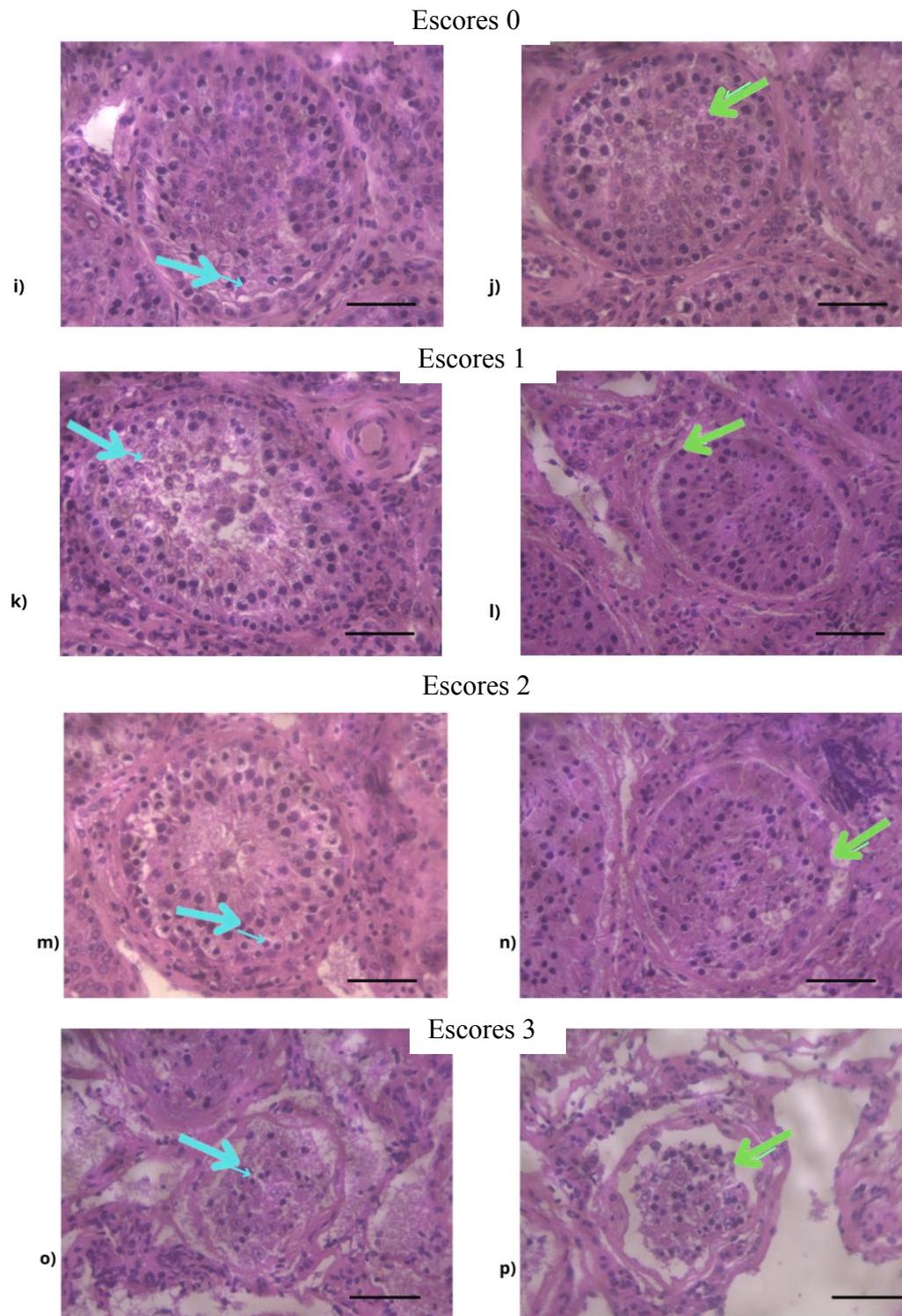


Figura 10. As imagens i, k, m, o demonstram espaços entre as células (setas azuis), classificados nos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. As imagens j, l, n, p demonstram a retração do epitélio seminífero (setas verdes), associada aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 11 – Núcleos picnóticos e perdas celulares

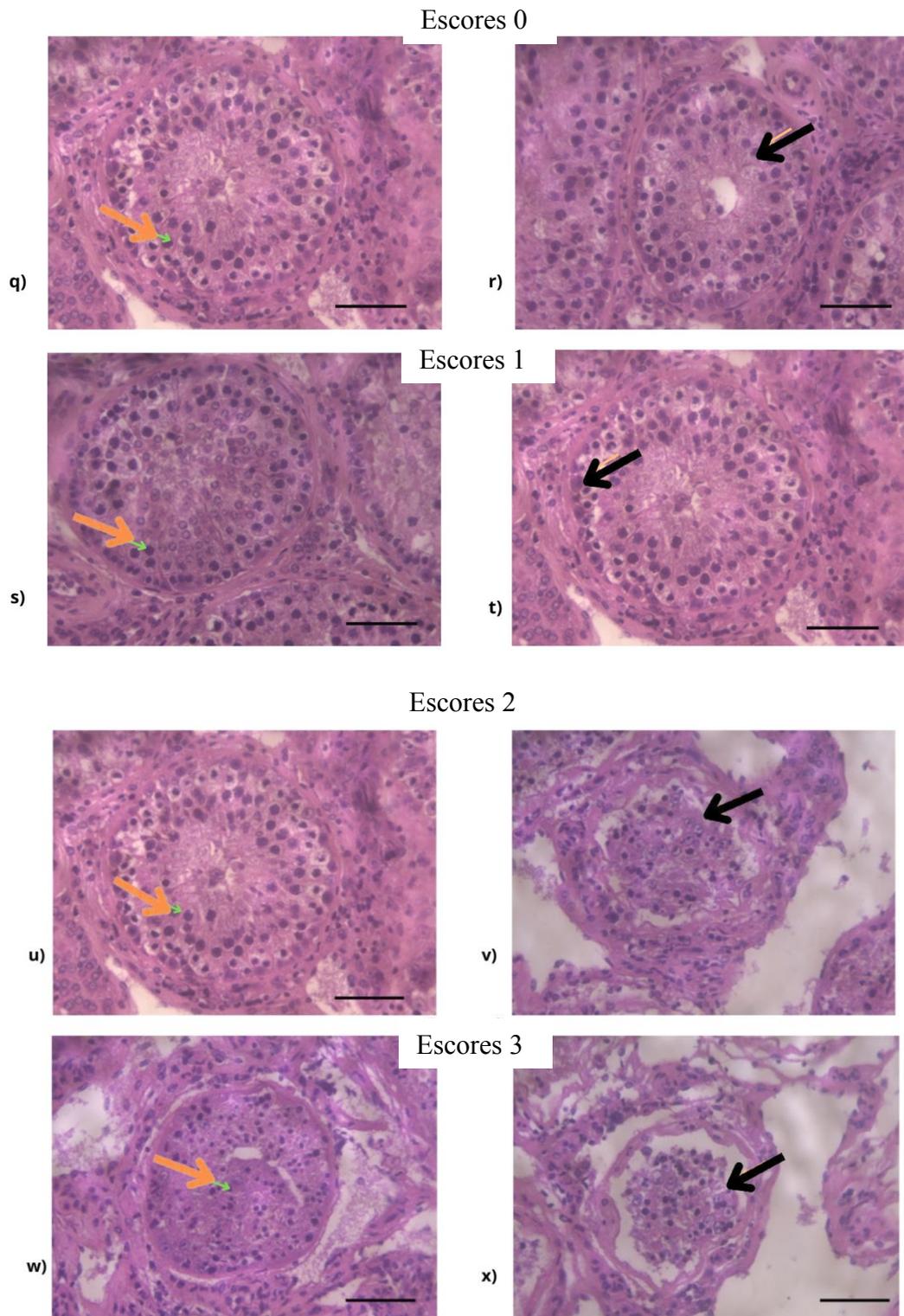


Figura 11. As imagens q, s, u, w demonstram os núcleos picnóticos (setas laranjas) vinculados aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente. As imagens r, t, v, x destacam as perdas celulares (setas pretas) associadas aos escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

3.3 Fase III: Verificações e avaliações

3.3.1 Fase de teste

Nesta etapa, quatro observadores, uma avaliadora experiente em histologia e três avaliadores sem experiência, uma estudante de mestrado, um estudante de doutorado e uma estudante de graduação, avaliaram um conjunto de micrografias composta por imagens dos túbulos seminíferos dos tratamentos controle e vitrificados (Anexo I), a fim de observar as características morfológicas das mesmas. Com base nas dificuldades e comentários dos observadores, as descrições de cada escores foram ajustadas, para ser compreensível para observadores inexperientes.

3.3.2 Treinamento

Para evitar conflitos entre cada avaliação individual e alcançar a padronização para todos os avaliadores, experiente ou não, foi realizado um treinamento, ministrado pela avaliadora experiente. O treinamento foi realizado em 2 encontros. No primeiro momento foram treinados quanto à estrutura da membrana basal, organização do epitélio, espaços (Gaps) entre as células epiteliais, retração do epitélio seminífero, núcleos picnóticos e perda das células epiteliais. Aproximadamente 30 fotomicrografias aleatórias foram apresentadas aos avaliadores, e pontuadas com uma escala de 0 a 3, sem qualquer explicação das características histológicas. No segundo momento, os avaliadores receberam treinamento prévio para a avaliação, que foi utilizada pelos observadores para validar o treinamento.

3.3.3 Avaliação

Após o treinamento, 30 fotomicrografias foram catalogadas, renomeadas e colocadas em um arquivo com códigos aleatórios (sem identificação de tratamento ou animal) e disponibilizadas para os avaliadores (avaliação cega). Foram realizadas avaliações cegas pelos 4 examinadores, sendo estes: uma professora experiente em histologia, uma estudante de mestrado, um estudante de doutorado e uma estudante de graduação, que realizaram as avaliações em 2 momentos distintos. Após a primeira avaliação, as imagens foram novamente catalogadas, renomeadas com códigos diferentes dos códigos iniciais e colocadas em um novo arquivo que foi disponibilizado aos avaliadores. Uma nova avaliação foi realizada em intervalo de uma semana após a primeira, e uma nova avaliação cega dos mesmos túbulos seminíferos foi realizada. Essa abordagem foi adotada em conformidade com os princípios de validação e reprodutibilidade.

4.0 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os parâmetros, descrições e pontuações (escores) definidos para a normalização da avaliação histológica dos túbulos seminíferos. As modificações foram implementadas com base no *feedback* dos avaliadores para assegurar uma abordagem mais precisa e padronizada na análise morfológica do tecido.

Tabela 1- Padronização de Avaliação Histológica

Alterações no epitélio seminífero		
Membrana basal	Membrana intacta com células mióides organizadas	0
	Leve alteração na membrana e leve desorganização das células mióides	1
	Retração da membrana e desorganização das células mióides	2
	Perda da arquitetura da membrana e total desorganização das células mióides	3
Organização do epitélio	Sem desorganização	0
	Células levemente desorganização	1
	Células moderadamente	2
	Células do epitélio totalmente desorganizadas	3
Espaços entre as células epiteliais	Até 10% de gaps entre as células	0
	Até 40% de gaps entre as células	1
	Entre 40 a 80% de gaps entre as células	2
	Mais de 80% de gaps entre as células	3
Retração do epitélio seminífero	Epitélio totalmente aderido à membrana basal	0
	Epitélio com ligeira retração	1
	Epitélio principalmente retraído	2
	Epitélio completamente retraído	3

Aspectos celulares		Escores
Núcleos picnóticos	Até 10% das células com núcleos picnóticos	0
	Menos de 40% das células com núcleos picnóticos	1
	Entre 40 a 80% das células com núcleos picnóticos	2
	Mais de 80% das células com núcleos picnóticos	3
Perda das células epiteliais	Até 10% das células perdidas	0
	Até 40% das células perdidas	1
	Entre 40 a 80% das células perdidas	2
	Mais de 80% das células perdidas	3

Fonte: Elaborado pela autora seguindo os critérios de Johsen (1970), Consentino (1985), Faes e Goossens (2017) e Ygnácio (2023).

Após a realização das análises, Os valores dos escores foram atribuídos através de uma avaliação cega, qualitativa, realizada por quatro avaliadores, após cuidadosa observação dos parâmetros morfológicos estabelecidos na tabela 1, utilizando imagens obtidas dos preparados histológicos. Foram examinadas as características da membrana basal, epitélio seminífero, gaps, retração, picnose e perda celular e as médias dos escores das características morfológicas dos túbulos seminíferos de testículos bovinos frescos e criopreservados foram cuidadosamente calculadas e compilados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Médias dos escores de cada avaliador por características morfológicas no tecido testicular fresco

Avaliador	1		2		3		4	
Momento De Avaliação	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º

Membrana	0,6	0,7	0,4	0,1	0,2	0,6	0,9	0,9
Epitélio	0,5	0,7	0,9	0,2	0,6	0,5	1,0	0,9
Gaps	1,1	1,7	1,1	0,9	1,4	1,3	1,3	1,3
Retração	0,4	0,6	0,5	0,3	0	0,1	0,5	0,5
Picnose	0,3	0,2	1,4	1,2	1,5	0,6	1,1	1,1
Perda	0,3	0,2	0,6	0,1	0,3	0,2	0,8	0,8

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 3 – Médias dos escores de cada avaliador por características morfológicas no tecido testicular vitrificado

Avaliador	1		2		3		4	
Momento De Avaliação	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Membrana	1,7	1,4	0,8	1,0	1,8	1,8	1,2	1,2
Epitélio	1,9	1,2	1,5	1,4	1,9	1,9	1,5	1,5
Gaps	0,8	1,4	0,7	0,9	1,5	1,6	1	1
Retração	1,9	1,8	1,1	1,3	1,5	1,4	1,1	1,1

Picnose	1,0	1,1	1,6	1,5	1,4	1,5	1,2	1,3
Perda	0,7	0,4	0,8	1,0	0,7	0,7	1,2	1,1

Fonte: Elaborado pela autora.

5.0 DISCUSSÃO

Dentro do escopo desse estudo, foi adotado um desenho para adaptação e validação de características morfológicas relevantes para análise qualitativa das alterações do tecido testicular bovino após criopreservação. Assim, ao considerar os resultados apresentados, é evidente que após uma padronização e treinamento adequado é possível observar uma notável confiabilidade nos valores de escores para os diferentes e variados parâmetros da morfologia testicular. Além disso, observou-se uma forte correlação entre a nova metodologia de avaliação e as classificações previamente estabelecidas por Johsen (1970), Consentino (1985), Faes e Goossens (2017) e Ygnácio (2023). Essa constatação reforça a confiabilidade e facilidade de aplicação destas tabelas de escores na avaliação da morfologia testicular tanto para pesquisadores experientes quanto para os inexperientes, mediante treinamento.

Em comparação com estudos prévios, esse estudo corrobora com as classificações descritas por Ygnácio (2023) e Faes & Gossman (2017) envolvendo fragmentos de tecidos testiculares bovinos criopreservados. Assim, foi-se adotada uma abordagem rigorosa para avaliar esses tecidos, utilizando características específicas como alterações na membrana basal dos túbulos, organização do epitélio seminífero, espaços entre as células epiteliais, retração do epitélio seminífero, presença de núcleos picnóticos e a perda de células epiteliais.

Os resultados apresentados na Tabela 2, que descreve a média dos escores obtidos para cada parâmetro avaliado no grupo controle, indicam que houveram diferenças relacionadas à variação quanto membrana basal, observadas entre os avaliadores 1, 2 e 3, sugerindo que a interpretação e a avaliação desses parâmetros podem variar substancialmente entre diferentes observadores, o que pode indicar a necessidade de treinamentos mais rigorosos para estas características, quanto a escolha de protocolos para a criopreservação do tecido testicular de mamíferos.

Na Tabela 3, que resume as médias dos escores para o tecido testicular bovino criopreservado, observa-se uma variação nos resultados, especificamente nos parâmetros do epitélio seminífero e espaços entre as células, apenas nas avaliações do avaliador 1. Essa variação pode ser atribuída à possível inexperiência desse avaliador sugerindo que, na análise do tecido criopreservado, há uma dificuldade na interpretação destas características por parte desse avaliador em particular, ou que as alterações constatadas devem ser melhor avaliadas.

Possíveis variações assim podem ocorrer devido a experiência e nível de treinamento dos avaliadores e até mesmo interpretações subjetivas das características podem ocorrer entre os diferentes observadores. As diferenças específicas apresentadas nas características de membrana, perda celular e picnose entre os avaliadores ressalta a necessidade de discussões mais aprofundadas sobre os critérios de avaliação e a possibilidade de treinamento adicional para adotar a avaliação por escore do tecido testicular. Estas características parecem apresentar uma maior complexidade e refinamento morfológico, dado a quantidade de estruturas a serem observadas e que podem ser alteradas durante o processo de criopreservação. Essa análise crítica de avaliações qualitativas fortalece a confiabilidade nos resultados e nas conclusões derivadas dessas avaliações histológicas, contribuindo assim para avanços mais sólidos na escolha de um protocolo de criopreservação adequado para preservação de células germinativas dos tecidos testiculares bovinos.

Dentre as limitações das avaliações qualitativas encontra-se a necessidade de uma abordagem mais abrangente incluindo diversos aspectos além da análise morfológica do epitélio seminífero, membrana basal e células germinativas e de suporte. Primeiramente, destaca-se a importância da manutenção do tecido conjuntivo intersticial e da sua interação com a estrutura tubular, além de conter a vascularização dos túbulos seminíferos, que irão garantir o suprimento sanguíneo adequado nos casos de transplante do tecido testicular e assegurar a oxigenação e nutrientes para o tecido reimplantado. Em segundo lugar, é no interstício, onde as células de Leydig residem e desempenham papel fundamental na produção de testosterona e estimulação para uma possível retomada da espermatogênese neste tecido.

Avaliar o tecido testicular com outras colorações, além da coloração clássica como HE, poderiam facilitar a análise das estruturas. Entre os exemplos estão a coloração ácido peryódico-Schiff (PAS) para avaliar a estrutura da membrana basal, o tricoma de Masson para avaliar as fibras do tecido conjuntivo intersticial e sua interação com a membrana basal e células de Leydig. Outro ponto importante é a identificação e caracterização mais específica da viabilidade das células germinativas, que são os grupos celulares mais importantes no que diz respeito a preservação do germoplasma tanto de animais em extinção ou de alto valor genético assim como de seres humanos.

Até o presente momento, esse estudo se destaca como a primeira abordagem dedicada a padronizar e validar análises histológicas específicas para testículos submetidos à criopreservação. Contemplando as características morfológicas como membrana basal, células germinativas e de Sertoli. A metodologia adotada para a padronização dessas características e quantificação das análises baseia-se nos parâmetros descritos pela literatura, visando

estabelecer um protocolo robusto e confiável. A implementação desse método proporciona não apenas uma avaliação mais consistente da morfologia testicular, mas também abre portas para futuras investigações comparativas e avanços no entendimento dos efeitos da criopreservação nesse contexto específico.

6.0 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo estabeleceu uma padronização das principais características morfológicas dos túbulos seminíferos em tecido testicular submetido ao processo de criopreservação. Essa padronização revela-se benéfica tanto para pesquisadores experientes quanto para os inexperientes ao avaliar a morfologia testicular. Destacam-se características essenciais para a análise da qualidade do tecido, como a preservação da membrana basal, que, ao ser mantida, assegura a qualidade do tecido e a função principal do órgão que é a viabilidade das células germinativas espermatogoniais que têm o potencial de se desenvolver em espermatozoides, seja no tecido reimplantado ou por meio de cultivo *in vitro*.

Para proporcionar uma abordagem mais clara e coesa das características histológicas dos túbulos seminíferos e garantir uma padronização confiável e de fácil compreensão, desenvolvemos uma tabela de escores neste estudo. Essa tabela propõe uma padronização das principais características morfológicas dos túbulos seminíferos de testículos bovinos após o processo de criopreservação e avaliação segura da qualidade do tecido testicular após estresse térmico. Realizamos testes e treinamentos entre os avaliadores, utilizando a tabela de padronização para assegurar a consistência dos resultados.

A adoção de análises padronizadas da morfologia testicular representa uma ferramenta crucial, contribuindo para maior objetividade e redução da variabilidade nos resultados de estudos morfológicos. Essa abordagem sistemática não apenas promove uma base mais sólida para a interpretação dos dados, mas também fomenta a confiabilidade e comparabilidade entre diferentes investigações nesse campo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AMELKINA, O.; SILVA, A. M. da; SILVA, A. R.; COMIZZOLI, P. Transcriptome dynamics in developing testes of domestic cats and impact of age on tissue resilience to cryopreservation. **BMC Genomics**, v. 22, p. 847, 2021.
- ANDRAE, C. S.; OLIVEIRA, E. C. S.; FERRAZ, M. A. M. M.; NAGASHIMA, J. B. Cryopreservation of grey wolf (*Canis lupus*) testicular tissue. **Cryobiology**, v. 100, p. 173–179, 2021.
- ARKOUN, B. et al. Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of in vitro spermatogenesis?. **Cell and tissue research**, v. 364, p. 661-674, 2016.
- BAERT, Y.; VAN SAEN, D.; HAENTJENS, P.; IN'T VELD, P.; TOURNAYE, H.; GOOSSENS, E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking?. **Human Reproduction**, v. 28, n. 7, p. 1816–1826, 2013.
- BAGCHI, A.; WOODS, E. J.; CRITSER, J. K. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert review of medical devices**, v. 5, n. 3, p. 359-370, 2008.
- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v. 5, n. 3, p. 119-126, 2009.
- BOLTON, R. L. et al. Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. **Reproduction and Fertility**, v. 3, n. 3, p. R121-R146, 2022.
- CARVALHO, M.C. et al. Criopreservação de tecido testicular de cães: avaliação histológica e ultraestrutural. 2016. Dissertação (Mestrado).
- CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- CEBALLOS, G.; EHRLICH, Paul R. The misunderstood sixth mass extinction. **Science**, v. 360, n. 6393, p. 1080-1081, 2018.
- CHICAIZA-CABEZAS, N.; GARCIA-HERREROS, M.; APONTE, P. M. Germplasm cryopreservation in bulls: Effects of gonadal tissue type, cryoprotectant agent, and freezing-thawing rates on sperm quality parameters. **Cryobiology**, 2023.
- COMIZZOLI, P.; HOLT, William V. Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2019.

COOPERBERG, M. R. et al. Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and sterility**, v. 84, n. 3, p. 672-677, 2005.

COSENTINO, M. J. et al. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. **The Journal of urology**, v. 133, n. 5, p. 906-911, 1985.

CRISÓSTOMO, L.; ALVES, M. G.; GORGA, A.; SOUSA, M.; RIERA, M. F.; GALARDO, M. N.; MERONI, S. B.; OLIVEIRA, P. F. Molecular Mechanisms and Signaling Pathways Involved in the Nutritional Support of Spermatogenesis by Sertoli Cells. Em: ALVES, Marco G.; OLIVEIRA, Pedro F. (org.). **Sertoli Cells: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, 2018. (Methods in Molecular Biology). p. 129–155.

DA SILVA, A. M. et al. Combination of intracellular cryoprotectants preserves the structure and the cells proliferative capacity potential of adult collared peccary testicular tissue subjected to solid surface vitrification. **Cryobiology**, v. 91, p. 53-60, 2019.

DEL VENTO, F. et al. Significant benefits of nanoparticles containing a necrosis inhibitor on mice testicular tissue autografts outcomes. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 5833, 2019.

DELESSARD, M. et al. Exposure to chemotherapy during childhood or adulthood and consequences on spermatogenesis and male fertility. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1454, 2020.

DUMONT, L.; CHALMEL, F.; OBLETTE, A.; BERBY, B.; RIVES, A.; DUCHESNE, V.; RONDANINO, C.; RIVES, N. Evaluation of apoptotic- and autophagic-related protein expressions before and after IVM of fresh, slow- frozen and vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 17, 2017

EHMCKE, J. et al. Spermatogonia: origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 7-12, 2005.

EISENBERG, M. L. et al. Male infertility. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 49, 2023.

FAES, K.; GOOSSENS, E. Short-term storage of human testicular tissue: effect of storage temperature and tissue size. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 35, n. 2, p. 180-188, 2017.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte**, v. 35, n. 1, p. 3-15, 2011.

FAYOMI, A. P.; PETERS, K.; SUKHWANI, M.; VALLI-PULASKI, H.; SHETTY, G.; MEISTRICH, M. L.; HOUSER, L.; ROBERTSON, N.; ROBERTS, V.; RAMSEY, C.; HANNA, C.; HENNEBOLD, J. D.; DOBRINSKI, I.; ORWIG, K. E. Autologous Grafting of Cryopreserved Prepubertal Rhesus Testis Produces Sperm and Offspring. **Science (New York, N.Y.)**, v. 363, n. 6433, p. 1314–1319, 2019.

GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008.

- HAYES, F. J. et al. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 1, p. 53-58, 2001.
- HESS, R. A.; DE FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Molecular mechanisms in spermatogenesis**, p. 1-15, 2009.
- ITO, Y. et al. A method for utilizing automated machine learning for histopathological classification of testis based on Johnsen scores. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 9962, 2021.
- IUCN. Red List of Threatened Species (Online). IUCN, 2021.
- JAN, S. Z. et al. Molecular control of rodent spermatogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1838-1850, 2012.
- JANG, T. H. et al. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative medicine research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.
- JEZEK, D. et al. Effects of various cryopreservation media and freezing–thawing on the morphology of rat testicular biopsies. **Andrologia**, v. 33, n. 6, p. 368-378, 2001.
- JOHNSEN, S. G. Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.
- JØRGENSEN, A.; YOUNG, J.; NIELSEN, J. E.; JOENSEN, U. N.; TOFT, B. G.; RAJPERTDE MEYTS, E.; LOVELAND, K. L. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 10, p. 2604–2614, 2014.
- KALSI, J. et al. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. **BJU international**, v. 107, n. 7, p. 1124-1128, 2011.
- KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; MEN, N. T.; NOGUCHI, J. Embryo production by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from Meishan neonatal testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 2, p. 158–166, 2019.
- KARLSSON, J. O. M; TONER, Mehmet. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, v. 17, n. 3, p. 243-256, 1996.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.G. Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2016.
- LAMBERTINI, M. et al. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. **BMC medicine**, v. 14, p. 1-16, 2016.
- 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, n. 1, p. 21919, 2016.

LI, H.; BIAN, Y.-L.; SCHREURS, N.; ZHANG, X.-G.; RAZA, S. H. A.; FANG, Q.; WANG, L.-Q.; HU, J.-H. Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 5, p. 1211–1218, 2018.

LIMA, D. B. C. et al. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 235-241, 2017.

LIMA, D. B. C.; DA SILVA, L. D. M.; COMIZZOLI, P. Influence of warming and reanimation conditions on seminiferous tubule morphology, mitochondrial activity, and cell composition of vitrified testicular tissues in the domestic cat model. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 2018a.

LIMA, D. B. C. et al. Long-term preservation of testicular tissue integrity and viability using vitrification in the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1865, 2020.

LÜPOLD, S. Ejaculate quality and constraints in relation to sperm competition levels among eutherian mammals. **Evolution**, v. 67, n. 10, p. 3052-3060, 2013.

MACENTE, B. I. et al. Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissues. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 242-247, 2017.

MANETTI, G. J.; HONIG, S. C. Update on male hormonal contraception: is the vasectomy in jeopardy?. **International journal of impotence research**, v. 22, n. 3, p. 159-170, 2010.

MCLACHLAN, R. I. et al. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. **Human reproduction**, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2007.

MECKLENBURG, J. M.; HERMANN, B. P. Mechanisms Regulating Spermatogonial Differentiation. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 58, p. 253–287, 2016.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human reproduction update**, v. 7, n. 6, p. 535-543, 2001.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, 2011.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, p. 275-278, 2011.

MITCHELL, R. T.; WILLIAMS, S. A. A fertile future: fertility preservation special series. **Reproduction and Fertility**, v. 3, n. 1, p. C1-C3, 2022.

O'DONNELL, L; SMITH, L. B.; REBOURCET, Diane. Sertoli cells as key drivers of testis function. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2022. p. 2-9.

OATLEY, J.; GRISWOLD, M. (org.). **The Biology of Mammalian Spermatogonia**. New York: Springer-Verlag, 2017. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Estimativas da prevalência de infertilidade. **OMS**, 2023.

PATRA, T.; PATHAK, D.; GUPTA, M. K. Comparison of two culture methods during in vitro spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: Organ culture vs. hanging drop culture. **Cryobiology**, v. 100, p. 142–150, 2021.

PATRA, T.; PATHAK, D.; GUPTA, M. K. Comparison of two culture methods during in vitro spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: Organ culture vs. hanging drop culture. **Cryobiology**, v. 100, p. 142-150, 2021.

PERRARD, M.-H.; SERENI, N.; SCHLUTH-BOLARD, C.; BLONDET, A.; D'ESTAING, S. G.; PLOTTON, I.; MOREL-JOURNEL, N.; LEJEUNE, H.; DAVID, L.; DURAND, P. Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 89, 1–10, 2016.

PUKAZHENTHI, B. S. et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123957, 2015.

RALL W.F. MAZUR P. J. MCGRATH, J. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. **Biophysical Journal**. v.41, n.1, p. 1-12, 1983.

RAPOSO, T. M.M; TRINDADE, A. B.; ALVES, A. E. Criopreservação de tecidos gonadais para conservação da fertilidade em canídeos e felídeos: realidade ou promessa?. **Investigação**, v. 15. n. 9, p. 14-20, 2016.

SATO, T. et al. In vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0130171, 2015.

SAULNIER, J. et al. Improving freezing protocols and organotypic culture: a histological study on rat prepubertal testicular tissue. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 49, n. 1, p. 203-218, 2021.

SETCHELL, B.; BREED, W. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the male reproductive tract. Em: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**: Elsevier, 2006.

SHARMA, S.; KLAVERKAMP, R.-S.; WISTUBA, J.; SCHLATT, S. Limited spermatogenic differentiation of testicular tissue from prepubertal marmosets (*Callithrix jacchus*) in an in vitro organ culture system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 539, p. 111488, 2022.

SILBER, S. Fundamentals of Male Infertility. [S. l.]: **Springer International Publishing**, 2018.

SILVA, A. M. da; PEREIRA, A. F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Cryopreservation and Culture of Testicular Tissues: An Essential Tool for Biodiversity Preservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 3, p. 235–243, 2020.

SILVA, Andréia M. et al. Cryopreservation of testicular tissue from adult red-rumped agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Animals**, v. 12, n. 6, p. 738, 2022.

TANG, S. et al. Dissociation, enrichment, and the in vitro formation of gonocyte colonies from cryopreserved neonatal bovine testicular tissues. **Theriogenology**, v. 210, p. 143-153, 2023.

TREVISAN, M. S. Avaliação histológica na osteoartrite de joelho de ratos: validação e reprodutibilidade de uma nova classificação. **Universidade Federal de São Carlos**, 2018.

VERNET, N.; DENNEFELD, C.; KLOPFENSTEIN, M.; RUIZ, A.; BOK, D.; GHYSELINCK, N. B.; MARK, M. Retinoid X receptor beta (RXRB) expression in Sertoli cells controls cholesterol homeostasis and spermiation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 136, n. 5, p. 619–626, 2008.

YGNACIO, R. Testicular cryopreservation of prepubertal and adult Morada Nova rams: slow freezing versus vitrification. **Cryobiology**, p. 56-81 . 2023

YOKONISHI, T.; OGAWA, T. Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis. **Reproductive medicine and biology**, v. 15, p. 21-28, 2016.

WU, J.; HU, T.; GUO, B.; YUE, Z.; YANG, Z.; ZHANG, X. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment. **CryoLetters**, v. 32, n. 5, p. 402-409, 2011.

Anexo I

FASE DE TESTE

Padronização da Avaliação Histológica (PAH)

TABELA DE ESCORES: IMAGEM ()	0	1	2	3
Alterações no epitélio seminífero				
Membrana Basal				
Organização do epitélio				
Vacúolos (Gaps) entre as células epiteliais				
Retração do epitélio seminífero				
Aspectos celulares				
Núcleos picnóticos				
Perda das células epiteliais				
Total				