



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Faculdade de Ciências da Saúde – FACS

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS
ESPERMATOGÊNICAS CONSERVADAS POR
RESFRIAMENTO A 5° C E POR CRIOPRESERVAÇÃO
EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.**

Ana Paula Martins Barbosa / RA: 2026941-2

Brasília – 2006

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Faculdade de Ciências da Saúde – FACS

Programa de Iniciação Científica - PIC

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS
ESPERMATOGÊNICAS CONSERVADAS POR
RESFRIAMENTO A 5° C E POR CRIOPRESERVAÇÃO EM
NITROGÊNIO LÍQUIDO.**

Ana Paula Martins Barbosa / RA: 2026941-2

Bolsista do 4° PIC

Orientação: Prof.º Ms. Carlos Frederico Martins (UniCEUB)

Brasília – 2° sem./2006

Sumário

1. Introdução.....	01
2. Material e Métodos.....	07
2.1. Coleta e processamento do material biológico.....	07
2.2. Isolamento das células espermatozóides primordiais.....	08
2.3. Conservação das células espermatozóides primordiais por resfriamento à 5 °C.....	08
2.4. Conservação das células espermatozóides primordiais por criopreservação.....	08
2.5. Avaliação da viabilidade das células espermatozóides primordiais.....	09
2.6. Análise estatística.....	10
3. Resultados.....	10
4. Discussão.....	13
5. Conclusões.....	15
6. Referências Bibliográficas.....	16

1. INTRODUÇÃO

A espermatogênese é uma diferenciação celular complexa a qual começa na puberdade e continua durante a vida reprodutiva masculina (KRISTER & KERR, 1994 *apud* ASLAM & FISHEL, 1999). É um processo complexo, altamente organizado e sincronizado, por meio do qual espermatogônias, espermátocitos meióticos, e espermátides haplóides se desenvolvem em alta associação com as células somáticas de Sertoli. Ocorre na periferia dos túbulos seminíferos de mamíferos. A diferenciação da célula-tronco espermatogênica progenitora em espermatozóide é um processo de desenvolvimento celular especializado e um mecanismo único de transmissão genética de geração para geração (KIERSZENBAUM, 2000 *apud* MARH *et al.*, 2003).

Quando as células germinativas primordiais vão em direção ao cume gonadal, elas proliferam e iniciam a meiose. No testículo fetal, as células germinativas cessam a proliferação e diferenciação até a puberdade, quando uma espermatogênese ininterrupta se estabelece (MARH *et al.*, 2003).

Dentro dos túbulos existem tanto as células germinativas, que são as células-tronco espermatogoniais, espermátocitos I e II, espermátides redondas e alongadas dentre outras; e células somáticas, conhecidas como células de Sertoli, que mantêm as espermatogênicas, nutrindo-as, protegendo-as, participando da fagocitose, da contração e da secreção humoral de ABP e inibina. As células-tronco se dividem, produzindo espermátocitos. Essas células-tronco espermatogoniais são capazes de regenerar o processo completo de espermatogênese (NAGANO *et al.*, 1998). Embutidas nas células de Sertoli, o espermátocito primário entra em divisão (1ª meiose), dando origem aos espermátocitos secundários. Estes sofrem a 2ª meiose, originando as espermátides redondas, as quais são originalmente haplóides.

Após esse estágio, sem nenhum tipo de divisão celular, as células espermáticas redondas começam a alongar e perder seu citoplasma até se transformarem em um espermatozóide típico. Esse estágio é chamado de espermiogênese (LEVRAN *et al.*, 2000). Este é um processo metamórfico acompanhado por uma alteração bioquímica nuclear e transformação da granulação acrossomal (SOFIKITIS *et al.*, 1998).

Alguns homens podem apresentar infertilidade pelo bloqueio espermatogênico, que é caracterizado pela interrupção de um complexo processo de diferenciação das células germinativas que leva até a formação do espermatozóide. Este bloqueio pode resultar tanto em oligospermia (poucos espermatozoides liberados) ou azoospermia (ausência total de espermatozoides). Vários fatores alteram a etiologia da interrupção espermatogênica. Varicocele é um dos fatores mais comuns na causa de azoospermia não-obstruída. Outros fatores como infecções e distúrbios hormonais podem ser observados em casos de interrupção incompleta. Algumas causas pré-testiculares podem ser devido a uma disfunção renal ou hepática, exposição á substâncias tóxicas (álcool, alguns antibióticos) e distúrbios nutricionais (carência de zinco, vitamina A). Nos casos de interrupção completa, a interrupção se dá usualmente durante o primeiro espermatócito e tem uma origem genética devido a anormalidades cromossômicas, tanto em células somáticas quanto em células germinativas (MARTIN du PAN *apud* KAHRAMAN *et al.*, 1998).

Na interrupção espermatogênica, a inabilidade de células espermatogênicas se desenvolverem em gametas masculinos no interior das gônadas, foi reportada em 4-30 % das biopsias testiculares de pacientes com oligospermia ou azoospermia severa (ANGELOPOULOS *et al.*, 1997). A interrupção espermatogênica pode acontecer em qualquer estágio de formação de células germinativas; a interrupção do espermatócito primário é o mais proeminente, seguido pela interrupção de espermátides e menos comum a interrupção espermatogonial.

Em humanos, a interrupção espermatogênicas era considerada uma condição sem esperança para casais que desejavam ter filhos. Porém o sucesso documentado da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (PALERMO *et al.*, 1992) apontou para o uso desta técnica na injeção de espermátides em ovócitos (ANGELOPOULOS *et al.*, 1997).

Nestes tipos de afecções, quando homens não apresentam espermatozoides em seu ejaculado, as células espermatogênicas imaturas, especialmente as espermátides podem apresentar papel fundamental na correção da infertilidade, quando utilizadas pela reprodução assistida. Desta forma as espermátides são as células imaturas de eleição para serem utilizadas pela reprodução assistida porque

já apresentam um núcleo contendo uma completa disposição cromossômica, semelhante aos espermatozoides (YAMANAKA *et al.*, 1997).

Vários métodos podem ser utilizados para o isolamento de espermátides, no entanto, o mais comum é o método mecânico, como o utilizado neste estudo, em que um pequeno fragmento do tecido testicular é macerado com tesouras (FISHEL *et al.*, 1995). Entretanto, uma alta produção de células intactas (98%) foi obtida com a digestão enzimática do tecido testicular pela colagenase, tripsina e DNASE I. Embora este método forneça grandes quantidades de células viáveis, segundo ASLAM *et al.* (1998), em material testicular humano foi relatado que somente a digestão enzimática não é suficiente. Isto se explica pela possível ocorrência de uma resistência enzimática não identificada e provocar incorreta liberação das células germinativas dos túbulos seminíferos. De acordo com ASLAM *et al.* (1998), o melhor método para obtenção de células espermatogênicas primordiais, com alta taxa de viabilidade é o uso da dissociação mecânica, associada com as enzimas tripsina e DNASE I.

Os métodos de isolamento de células espermatogênicas por dissociação mecânica, assim como digestão química são métodos de escolha de obtenção de espermátides para uso imediato nos programas de reprodução assistida humana e animal. No entanto, para SALZBRUNN *et al.* (1996), não fornecem populações purificadas para serem congeladas e utilizadas quando necessário na ICSI.

Portanto, é importante a identificação do método que permita a separação de diferentes populações homogêneas de células contidas em uma suspensão celular do testículo para uso na ICSI. Um dos métodos úteis é baseado nas propriedades físicas individuais das células, tais como: tamanho celular, forma e granulosidade da superfície (TOPPARI *et al.*, 1985). Também, as populações celulares podem ser identificadas e separadas por mensuração da luz refletida pelos ângulos das células através do método de FACS (*fluorescent activated cell sorter*). Ainda, existem outros métodos como marcadores celulares (antígenos de superfície). No entanto, as células separadas pelos marcadores não permanecem disponíveis para a microinjeção (ASLAM *et al.*, 1998).

Recentemente, espermátides humanas redondas e alongadas obtidas a partir de biopsias testiculares tem alcançado a fertilização (FISHEL *et al.*, 1997) e gestações (ANGELOPOULOS *et al.*, 1997; ANTINORI *et al.*, 1997). Ela tem sido amplamente usada em associação com procedimentos microcirúrgicos para tratar casais que sofrem com azoospermia (GIANAROLI *et al.*, 1999). E o seu sucesso como prática clínica (PALERMO *et al.*, 1992) (NAGY *et al.*, 1998) tornou possível aliviar quase todos os tipos de infertilidade de um modo mais eficiente, mais consistente e mais confiável do que usar a convencional fertilização *in vitro* (FIV) (NAGY *et al.*, 1998). A microinjeção de espermátides obtidas a partir de biópsias testiculares de pacientes resultou em descendentes saudáveis e normais (FISHEL *et al.*, 1997). Essa técnica proveu valiosas informações em vários aspectos biológicos e moleculares de fertilização em mamíferos que nunca poderiam ser alcançados pela fertilização *in vitro* (MIKI *et al.*, 2004).

A introdução da ICSI foi capaz de melhorar as taxas de fertilização e gravidez em casais com espermatozóides epididimais retirados por microcirurgia (UBALDI *et al.*, 1999), assim como tratar com sucesso a maioria dos casos com azoospermia obstrutiva na qual a aspiração espermática epididimal através de microcirurgia (MESA) não pode ser utilizada, usando espermatozóides recuperados dos testículos (SCHOYSMAN *et al.*, 1993 *apud* UBALDI *et al.*, 1999).

Com o avanço de técnicas recentes, células espermáticas imaturas até certos estágios, também têm sido usadas para a construção de zigotos diplóides (MIKI *et al.*, 2004). Descendentes normais têm sido obtidos usando espermátides. Isso indica que o genoma da espermátide é geneticamente e epigeneticamente competente para suportar todo o desenvolvimento, como um espermatozóide maduro (MIKI *et al.*, 2004).

Previamente, estudos mostraram que a fertilização e entrega de descendentes saudáveis pode acontecer após transferir núcleo de espermátides redondas para ovócitos de ratos ou coelhos através de métodos microcirúrgicos (KIMURA & YANAGIMACHI, 1995; SOFIKITIS *et al.*, 1998).

Outros estudos demonstram que a fertilização pode ser alcançada após a microinjeção de espermátides humanas em ovócitos de hamster. Os resultados

também demonstram que quanto maior a maturidade da espermátide injetada, maior a incidência de fertilização (ASLAM & FISHEL, 1999).

Com espermátide redonda, pode ser alcançada uma fertilização normal se a segunda divisão meiótica das células espermáticas tiver sido completada. O núcleo das espermátides redondas tem sido usado para a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (SOFIKITIS *et al.*, 1994 *apud* KAHRAMAN *et al.*, 1998).

É importante observar que a imaturidade citoplasmática das células germinativas masculinas usadas para a reprodução assistida pode resultar em falha na fertilização, mas também pode causar desenvolvimento anormal de embriões depois de fertilizações aparentemente normais (TESARIK *et al.*, 1998 *apud* UBALDI *et al.*, 1999).

No entanto, para que as células espermáticas estejam disponíveis em momento oportuno para sua utilização na reprodução assistida, elas devem estar previamente armazenadas por resfriamento ou congelamento. Desta forma, o homem tem suas células espermatogênicas retiradas uma única vez, evitando com isso que a cada tentativa de fecundação ele tenha a necessidade de recuperar as células espermatogênicas dos testículos.

A criopreservação de várias suspensões celulares é extensamente praticada na ciência e na medicina, e o congelamento rápido, usando tanto dimetil sulfoxido (DMSO) ou glicerol como crioprotetor, fornece resultados satisfatórios para muitas finalidades. A criopreservação de tecidos é tecnicamente mais trabalhosa porque muitos tipos celulares estão presentes, e o crioprotetor deve penetrar maior distâncias nos tecidos (HOVATTA, 2001)

Tem sido demonstrado que populações homogêneas de espermátides redondas e alongadas podem ser separadas por biopsia testicular em homens azoospermicos (ASLAM *et al.*, 1998) e essas espermátides podem ser cultivadas *in vitro* e criopreservadas com sucesso (ASLAM & FISHEL, 1999).

Na teoria, suspensão testicular humana criopreservada pode ser injetada em ratos imunodeficientes, e os espermátides e espermatozóides resultantes usados para a ICSI em casos de doenças com alto risco de reincidência. Porém, crescimento de espermatozóides humanos em roedores levantaria muitas preocupações que não são apenas éticas, mas também biológicas, por exemplo, o

risco de infecção. Apesar de tudo, um modelo animal semelhante pode ser usado para testar as suspensões celulares, considerando seu potencial maligno. Se o roedor desenvolver doenças, então a suspensão não pode ser injetada no homem (HOVATTA, 2001).

Estudos recentes reportaram o sucesso da criopreservação de espermátides redondas de ratos (OGURA *et al.*, 1996 *apud* ASLAM & FISHEL, 1998). Cerca de 75 – 85 % das células testiculares estavam vivas após o descongelamento. Na microinjeção de espermátide redonda congelada, aproximadamente 90 % dos ovócitos foram fertilizados (ASLAM & FISHEL, 1998).

Os resultados provam que células espermatogênicas humanas podem ser criopreservadas com sucesso, mas a criopreservação de células espermatogênicas isoladas alcançam melhores resultados do que a criopreservação de toda a extração testicular (ASLAM & FISHEL, 1998).

Criopreservação de tecido testicular seria especialmente importante para meninos na pré-puberdade que ainda não são capazes de produzir espermatozóides, mas isso pode também ser valioso para garotos mais velhos e adultos jovens que alcançaram a produção de espermatozóides e a partir daí evitar a necessidade de reprodução assistida mais tarde (HOVATTA, 2001).

Porem a criopreservação diminui significativamente à incidência de fertilização quando cada estágio de células espermatogênicas fresca injetadas é comparada com o estagio da criopreservação (ASLAM & FISHEL, 1998).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade das células espermatogênicas após diferentes períodos de armazenamento à 5°C, prevendo a possível utilização destas células em momento oportuno pela reprodução assistida. Visou, além disso, comparar a eficiência de três diferentes crioprotetores na criopreservação das células espermatogênicas primordiais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e processamento do material biológico.

Foram utilizados 22 testículos de touros abatidos em frigoríficos da região. Logo após o abate, os testículos de cada animal (somente um animal por manipulação) foram retirados junto com a bolsa escrotal, fixados na sua base para impedir saída do escroto e transportados até o laboratório. No laboratório os testículos ainda dentro do escroto receberam uma aspensão de álcool 70% e, em seguida retirados do escroto e colocados em um recipiente dentro de um fluxo laminar. No fluxo laminar os testículos ainda protegidos pela túnica vaginal receberam uma aspensão de álcool 70%. Após estes cuidados, a túnica vaginal foi aberta com bisturi estéril, o parênquima testicular exposto e vários fragmentos de aproximadamente 10 mm² foram retirados com pinça e tesoura estéril para isolamento celular (Figura 1).



Figura 1: Maceração mecânica de testículo de bovino.

2.2. Isolamento das células espermáticas primordiais.

Os fragmentos testiculares foram colocados em uma placa de petri média com 10 ml de meio *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) e macerados com tesoura e pinça estéril para liberação das células espermáticas. Toda a suspensão de células foi filtrada (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. Este procedimento foi realizado através de modificação da metodologia descrita por BLANCHARD *et al.*, (1991). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo as células espermáticas ressuspendido em 10 ml de DMEM para o estudo de conservação por resfriamento ou com o meio crioprotetor específico para a criopreservação.

2.3. Conservação das células espermáticas primordiais por resfriamento à 5°C.

A suspensão de células espermáticas primordiais foi mantida resfriada a 5 °C em meio DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%), piruvato de sódio (0,5mM), glicose (1%) e antibióticos para conservação da viabilidade das células espermáticas primordiais. A viabilidade das células germinativas primordiais foi verificada em diferentes períodos (0h, 24h, 48h, 72h e 96h) através da utilização do corante Trypan Blue.

2.4. Conservação das células espermáticas primordiais por criopreservação.

Nesta etapa foram comparadas três soluções de crioproteção: 1-DMSO, DMEM, soro fetal bovino (10 %) e sacarose 250 mM ; 2- Propanediol 1,5 M, DMEM, soro fetal bovino (10 %) e sacarose 250 mM; 3- DMSO e Propanediol - nas mesmas proporções - DMEM, soro fetal bovino (10%) e sacarose 250 mM.

A suspensão celular isolada foi distribuída nos três diferentes meios, incubada a 5°C por 2 horas, colocadas a – 20°C por 24 horas e depois mergulhadas e armazenadas no nitrogênio líquido (Figura 2).



Figura 2: Galão de nitrogênio líquido onde foram criopreservadas as amostras.

2.5. Avaliação da viabilidade das células espermáticas primordiais.

A viabilidade das células espermáticas primordiais conservadas por resfriamento e por criopreservação foi determinada através da utilização do corante de exclusão de vivos e mortos, *Trypan blue* (TALBOT & CHACON, 1981). Este teste foi realizado nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento a 5°C, bem como após o descongelamento das amostras criopreservadas. O *Trypan blue* cora as células mortas de azul, mas não penetra a membrana das células vivas, que permanecem não coradas (PHILIPS, 1973). Para a coloração, 20 µl da solução de *Trypan blue* 0,2 % foram adicionados a 20 µl da amostra de células espermáticas primordiais, e a solução incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este tempo, todas as células vivas e mortas foram contadas em câmara de Neubauer sob microscópio de luz clara, e a viabilidade calculada de acordo com o volume total da amostra.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizado utilizando o software One Way Anova para identificar diferenças estatísticas entre as médias e o teste t para comparação grupo a grupo.

3. RESULTADOS

Diferentes tipos de células espermatogênicas foram isoladas e identificadas após o processo de dissolução mecânica (figura 3).

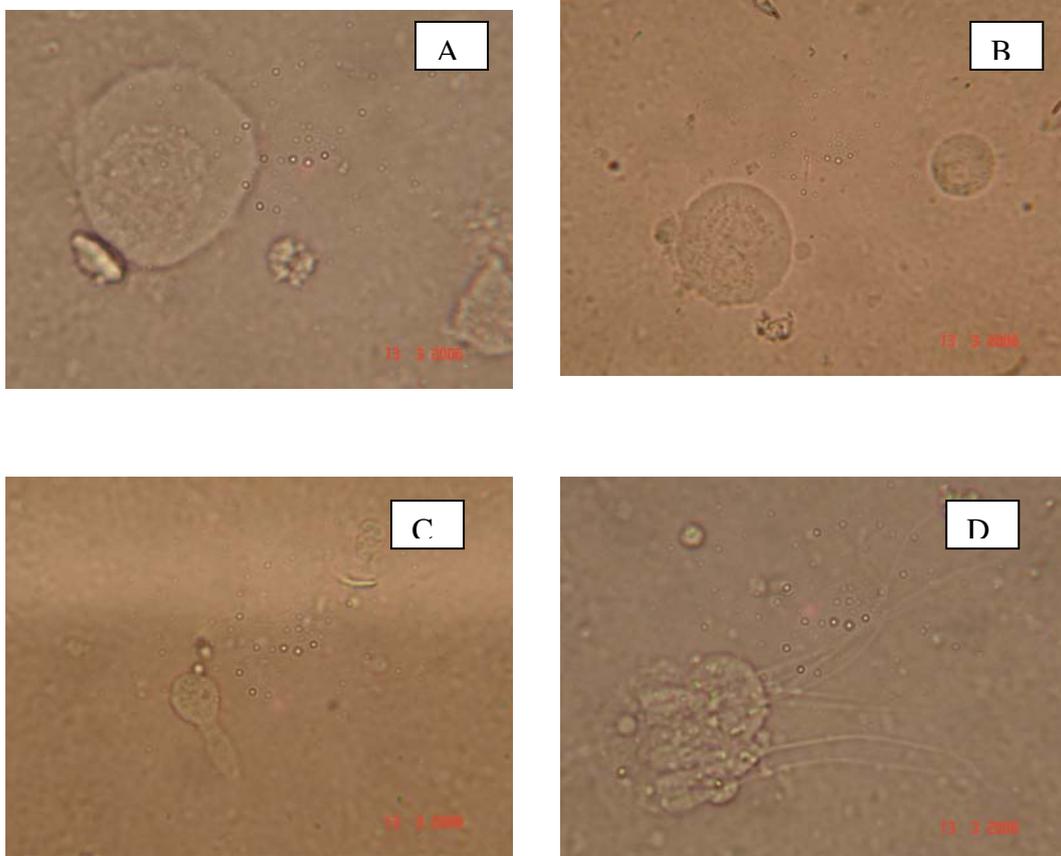


Figura 3: Células isoladas por maceração testicular: A - espermatogonia; B - espermatócito e espermatíde redonda; C - espermatíde alongada; D - espermatozóides ligados ao tecido testicular.

As amostras armazenadas por resfriamento a 5°C tiveram sua viabilidade calculada em função do tempo de armazenamento, sendo os resultados representados na figura 4.

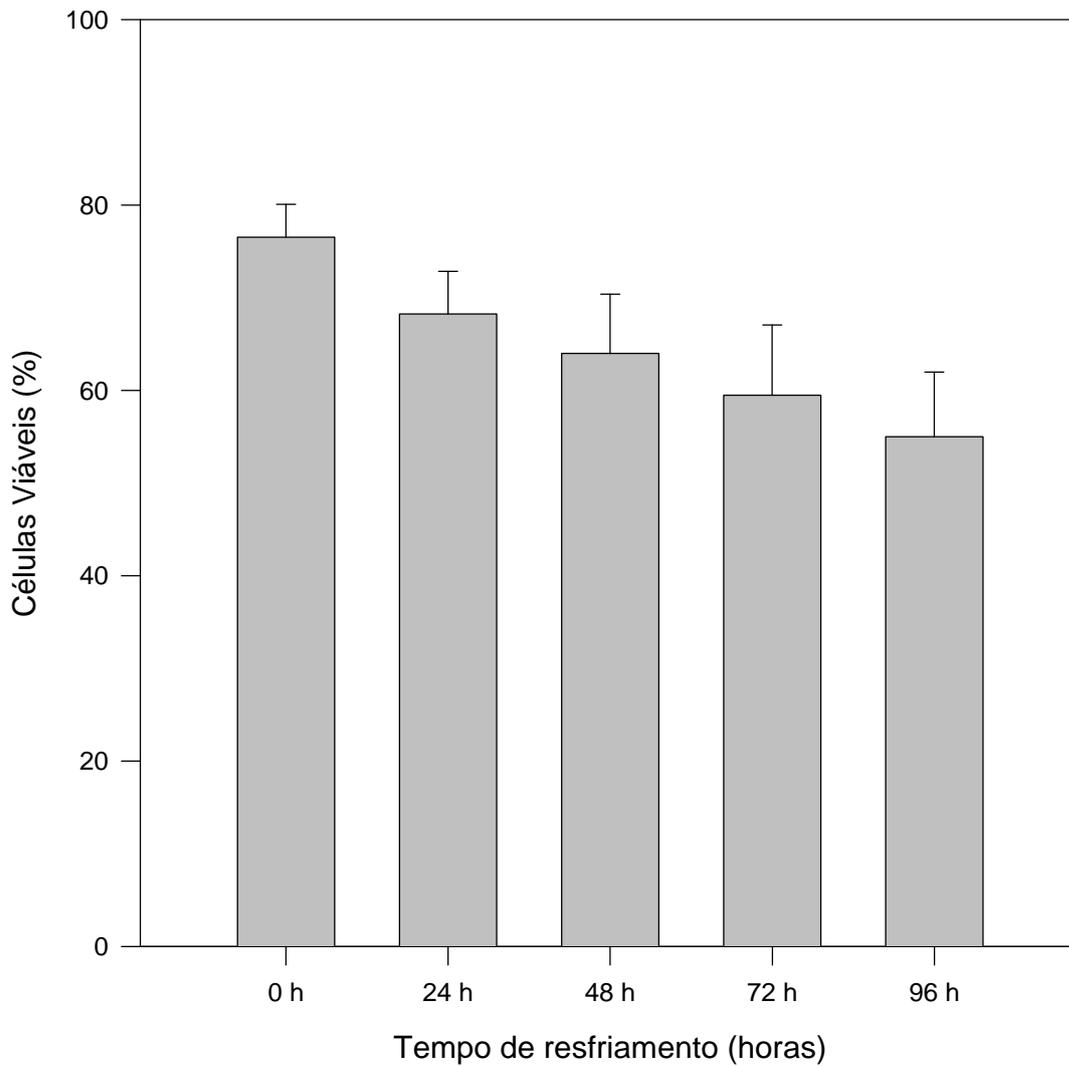


Figura 4: Valores das médias (desvio padrão) da viabilidade das células espermatogênicas em função do tempo de armazenamento

As células destinadas à conservação por resfriamento apresentaram viabilidade inicial de 76,538±3,526 % e de 55,000±6,964 % após 4 dias de armazenamento. Durante todo período de armazenamento (0 h a 96 h) houve uma perda na viabilidade de 21,538±3,438%, considerando uma diminuição diária média de 5,3845±1,167%.

Comparando a viabilidade das células espermatogênicas primordiais, nos diferentes tempos de armazenamento foi possível observar que houve diferenças estatísticas entre os tempos de armazenamento (tabela 1).

Tabela 1: Comparações das médias da viabilidade celular de acordo com o tempo de resfriamento

Comparações	Dif. das Médias	t	P	Significância
0 h vs. 96 h	21,538	9,150	5,515E-013	Sim
0 h vs. 72 h	17,077	7,255	0,00000000918	Sim
24 h vs. 96 h	13,231	5,621	0,000000522	Sim
0 h vs. 48 h	12,538	5,327	0,00000158	Sim
48 h vs. 96 h	9,000	3,824	0,000315	Sim
24 h vs. 72 h	8,769	3,726	0,000433	Sim
0 h vs. 24 h	8,308	3,529	0,000806	Sim
48 h vs. 72 h	4,538	1,928	0,0586	Não
72 h vs. 96 h	4,462	1,895	0,0629	Não
24 h vs. 48 h	4,231	1,797	0,0773	Não

Além de conservar as amostras com resfriamento a 5 °C, elas também foram conservadas por criopreservação em nitrogênio líquido e a viabilidade foi analisada de acordo com o tratamento utilizado.

Na criopreservação em nitrogênio líquido das células espermatogênicas bovinas foi observado viabilidade celular de $53,77 \pm 7,17\%$; $55,55 \pm 7,82$ e $58,11 \pm 11,016$ (figura 5), respectivamente para os crioprotetores DMSO, Propanediol e DMSO com Propanediol. Apesar de haver uma melhor viabilidade celular numérica para o tratamento com DMSO e Propanediol, não foram observadas diferenças significativas ($P = 0.586$) entre os crioprotetores utilizados.

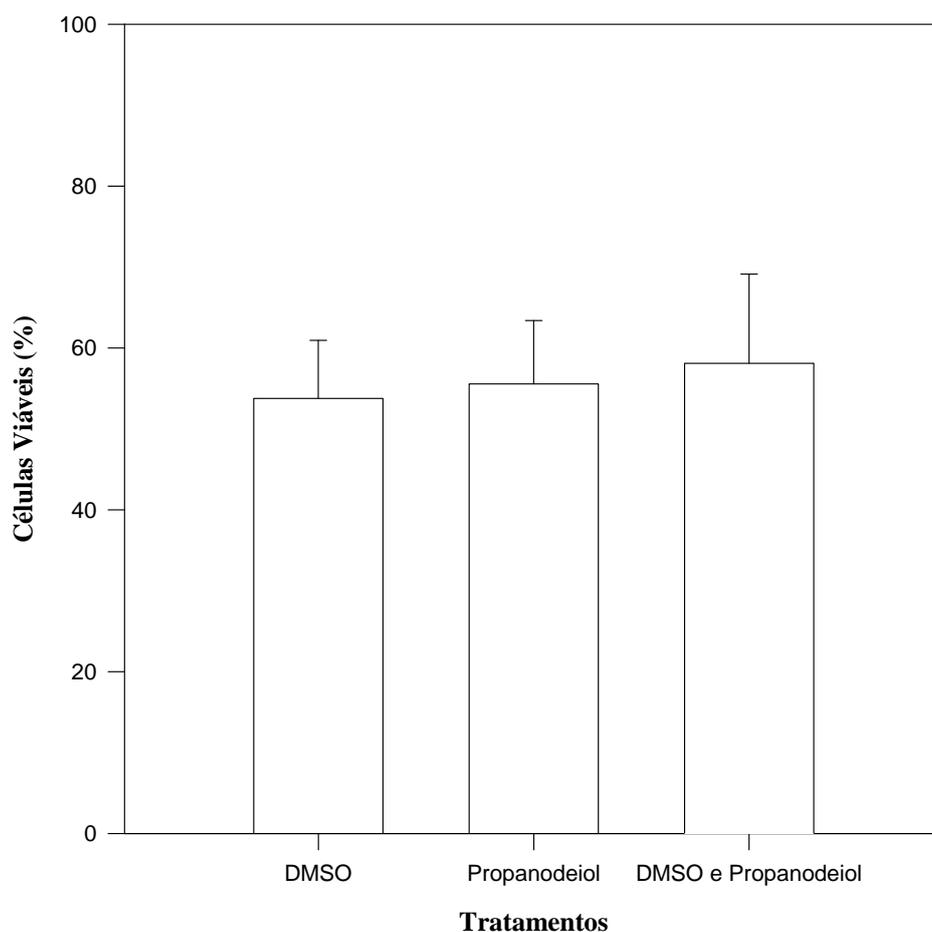


Figura 5: Valores das médias e desvio-padrão da viabilidade das células espermatogênicas de acordo com os tratamentos de criopreservação

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que é possível obter suspensões de células espermatogênicas bovinas de tecido testicular através do processo de dissociação mecânica. As células espermatogênicas isoladas por este método mantiveram a viabilidade de forma satisfatória ($76,538 \pm 3,526$ %), sendo semelhante aos resultados de MEISTRICH (1972), que obteve 80% de células espermatogênicas viáveis.

Vários métodos podem ser utilizados para o isolamento de células espermato gênicas, no entanto, o mais comum é o método mecânico (FISHEL *et al.*, 1995), como o utilizado neste estudo, em que um fragmento do tecido testicular é macerado por tesouras.

De acordo com ASLAM *et al.*, (1998), o melhor método para obtenção de células espermato gênicas, com alta taxa de viabilidade é o uso da dissociação mecânica, associada 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 (SALZBRUNN *et al.*, 1996). Enquanto que neste presente estudo, o tempo para a obtenção das células espermato gênicas foi em média 20 minutos.

Além disso, no presente estudo foi priorizado o uso da dissociação mecânica devido ao baixo custo, boa resposta na obtenção de células viáveis e praticidade do processo.

Observando a viabilidade das células nos diferentes tempos de armazenamento é possível afirmar que os melhores períodos para a possível utilização das espermátides na reprodução assistida se encontra entre 0 e 48 horas de armazenando a 5°C , uma vez que até esse período a viabilidade se encontrava entre 70%, sendo grande a chance de se capturar e utilizar uma célula viável.

Em relação a criopreservação, neste estudo em média 53% das células sobreviveram aos procedimentos de congelamento e descongelamento, sendo estes resultados parecidos com os de HOVATTA (2001), onde a viabilidade celular encontrada estava entre 52-58 %.

Segundo AVARBOCK *et al.*, (1996) a melhor taxa de sobrevivência celular foi a obtida usando propanediol-sacarose e um lento congelamento programado. Suas taxas de sobrevivência para células testiculares de ratos e humanos foram 65% e 60% respectivamente. Quando o DMSO foi usado, a taxa de sobrevivência para as células de ratos foi de 32%.

Entretanto, outros autores, como IZADYAR *et al.*, (2002), demonstram que para diferentes tipos de espermato gônias, a criopreservação com o uso de DMSO é mais eficiente. OGAWA *et al.*, (1999) criopreservou células testiculares de hamster e mostrou que 43% dessas células continuavam viáveis após o descongelamento.

Em bovinos não há nenhum estudo com a criopreservação de células espermatogênicas, porém no presente estudo todos os crioprotetores se comportaram de forma semelhante, sempre conservando mais de 53% da viabilidade das células espermatogênicas bovinas após o descongelamento. Comparando todos os tratamentos de criopreservação realizados nesse experimento com os descritos na literatura, independente da espécie, é possível observar que não houve uma diferença discrepante entre os métodos.

Desta forma, o estudo, conservação e aplicação das células espermatogoniais são de extremo valor quando para reprodução animal e para correção da infertilidade humana, sempre associado às biotecnias de reprodução assistida.

5. CONCLUSÕES

Células espermatogênicas primordiais podem ser isoladas adequadamente por dissociação mecânica e preservadas por resfriamento aumentando sua viabilidade para uso em momento adequado pela reprodução assistida. Esse método de conservação parece ideal quando as células devem ser utilizadas de imediato.

A criopreservação é um excelente método de preservação celular, pois as células-tronco espermatogoniais se mantêm integras e com excelente viabilidade. Isso permite a criopreservação de uma linhagem genética masculina para no futuro, restabelecer o potencial reprodutivo de um indivíduo.

Nos bovinos, as células espermatogênicas podem ser criopreservadas, mantendo a viabilidade acima de 53%, utilizando os crioprotetores DMSO, Propanediol e a associação de DMSO e Propanediol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOPOULOS, T., KREY, L., McCULLOUGH, A., ADLER, A. & GRIFO, J. A. A simple and objective approach to identifying human round spermatids. *Human Reproduction*. Vol. 12. nº 10. p. 2208-2216, 1997.
- ANTINORI, S., VERSACI, C., DANI, G., ANTONORI, M. & SELMAN, H. A. successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatids into human oocytes. *Human Reproduction*. Vol. 12. nº 03. p. 554-556, 1997.
- AVARBOCK, M. R., BRINSTER, J. B., & BRINSTER, R. L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med*. Vol. 02. p. 693-696, 1996.
- ASLAM, I., ROBINS, A., DOWELL, K. & FISHEL, S. Isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azoospermic men. *Human Reproduction*. Vol. 13. nº 03. p. 639-645, 1998.
- ASLAM, I. & FISHEL, S. Short-term in-vitro culture and cryopreservation of spermatogenic cells used for human in-vitro conception. *Human Reproduction*. Vol. 13. nº 03. p. 634-638, 1998.
- ASLAM, I. & FISHEL, S. Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in-vitro cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. *Human Reproduction*. Vol. 14. nº 06. p. 1528-1533, 1999.
- BLANCHARD, Y., LAVAUULT, M.T., QUERNEE, D., LE LANNOU, D., LOBEL, B. & LESCOAT, D. Preparation of spermatogenic cell populations at specific stages of differentiation in the human. *Mol. Reprod. Dev*. Vol. 30, p. 275-282, 1991.
- FISHEL, S. GREEN, S. & BISHOP, M. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*. Vol. 345. p.1641-1642, 1995.
- FISHEL, S., GREEN, S. & HUNTER, A. et al. Human fertilization with round and elongated spermatids. *Human Reproduction*. Vol. 12. nº. 02. p. 336-340, 1997.

- GIANAROLI, L., MAGLI, M.C. & SELMAN, H.A. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical opening in the treatment of azoospermic men. *Human Reproduction*. Vol. 14, p. 1034-1038, 1999.
- HOVATTA, O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Human Reproduction*. Vol. 07. n° 04. p. 378-383, 2001.
- IZADYAR, F., RIJSENBILT-MATTHIJS, J. J., OUDEN, K. D., CREEMERS, L. B., WOELDERS, H. & de ROOIJ, D. G. Development of a cryopreservation protocol for Type A spermatogonia. *Journal of Andrology*. Vol. 23. n° 04. p. 537-545, 2002.
- KAHRAMAN, S.; POLAT, G.; SÖZEN, E.; ÖZÜN, O. D.; DIRICAN, K. & ÖZBIÇER, T. Multiple pregnancies obtained by testicular spermatid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. Vol. 13. n°. 01. p. 104-110, 1998.
- KIMURA, Y. & YANAGIMACHI, R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*. Vol. 121. p. 2397-2405, 1995.
- LEVRAN, D., NAHUM, H., FARHI, J. & WEISSMAN, A. Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest. *Fertility and Sterility*. Vol. 74, n° 03, p. 443-449, 2000.
- MARH, J., TRES, L. L., YAMAZAKI, Y., YANAGIMACHI, R. & KIERSZENBAUM, A.L. Mouse round spermatids developed in-vitro from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in-vivo developed mature oocytes. *Biology of Reproduction*. Vol. 69. p. 169-176, 2003.
- MEISTRICH, L. M. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.*, Vol. 80, p.299-312, 1972.
- MIKI, H., LEE, J., INOUE, K., OGONUKI, N., NOGUCHI, Y., MOCHIDA, K., KOHDA, T., NAGASHIMA, H., ISHINO, F. & OGURA, A. Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 50. n°. 01. p. 131-137, 2004.

- NAGANO, M., AVARBOCK, M. R., LEONIDA, E. B., BRINSTER, C. J. & BRINSTER, R. L. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue and Cell*. p. 389-397, 1998.
- NAGY, Z.P., JORIS, H., VERHEYEN, G., TOURNAYE, H., DEVROEY, P. & VAN STEIRTEGHEM, A. Correlation between motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. Vol. 13. n° 04. p. 890-895, 1998.
- OGAWA, T., DOBRINSKI, L., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testis. *Bio. Reprod.* Vol. 60. n° 02. p. 515-521, 1999.
- PALERMO, G., JORIS, H., DEVROEY, P. & VAN STEIRTEGHEM, A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into a oocyte. *Lancet*. Vol. 340. p. 17-18, 1992.
- PHILLIPS, H.J. 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, p.406-408, 1973.
- SALZBRUNN, A., BENSON, D. M. & HOLSTEIN, A.F. . A new concept for the extraction testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Human Reproduction*. Vol.11. p. 752-755, 1996.
- SOFIKITIS, N., YAMAMOTO, Y. & MIYAGAWA, I., et al. Ooplasmic injection of elongating spermatids for the treatment of non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*. Vol. 13. n° 03. p. 709-714, 1998.
- TALBOT, P. & CHACON, R. S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.*, Vol. 215. p. 201-208, 1981.
- TOPPARI, J., EEROLA, E. & PARVINEN, M. Flow cytometric DNA analysis of defined stages of rat seminiferous epithelial cycle during in vitro differentiation. *J. Androl*. Vol.6. p.325-333, 1985.

UBALDI, F., NAGY, Z.P., RIENZI, L., TESARIK, J., ANNIBALLO, R., FRANCO, G., MENCHINI-FABRIS, F. & GRECO, E. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Human Reproduction*. Vol. 14. n° 11. p. 2796-2800, 1999.

YANAMAKA, K., SOFIKITIS, N., & MIYAGAWA, I. Ooplasmic round spermatid nuclear injection procedures as an experimental treatment for non-obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* Vol. 14. p. 55-62, 1997.