

CRIOPRESERVAÇÃO DE FRAGMENTOS DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES DOMÉSTICOS – DADOS PRELIMINARES

INARAÃ DIAS DA LUZ¹; IZANI BONEL ACOSTA²; FERNANDA RODRIGUES MENDONÇA³; EDENARA ANASTÁCIO DA SILVA⁴; CAROLINA VIEGAS PINTO⁵; CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – inadiasmedvet@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os cães assumiram um papel de grande importância na sociedade com o avançar dos anos, ressalta-se que humanos e cães se tornaram emocionalmente próximos e esses animais de companhia costumam ser castrados antes da puberdade. A castração precoce pode levar ao arrependimento do tutor, portanto, o congelamento de tecido gonadal após tais procedimentos pode ser uma alternativa nesses casos (Abrishami *et al.*, 2010).

Ademais, a criação de um banco criogênico possui extrema relevância para animais de alto valor zootécnico, visando o melhoramento genético de raças (Cerdeira *et al.*, 2020), bem como seu transporte e utilização independente das barreiras geográficas (Mahiddine & Kim, 2021). Dessa forma, a preservação do tecido gonadal torna-se ideal, permitindo o cultivo *in vitro* de células espermáticas viáveis a partir de amostras congeladas e descongeladas armazenadas no banco criogênico.

O congelamento lento e a vitrificação são os métodos mais comumente utilizados na criopreservação de tecido testicular (Abrishami *et al.*, 2010). A primeira técnica baseia-se na redução gradual da temperatura assim como baixas concentrações de agentes crioprotetores, acarretando na diminuição da toxicidade celular, não obstante, a vitrificação faz uso de altas concentrações de crioprotetores e rápida diminuição da temperatura (Abrishami *et al.*, 2010).

A aplicabilidade de ambas as técnicas de criopreservação pode acarretar em danos celulares resultando em queda da viabilidade celular (Carvalho *et al.*, 2011). Isto posto, o presente trabalho tem por objetivo identificar a técnica de criopreservação que melhor se adequa para a espécie canina.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados testículos de cães púberes obtidos através de uma parceria com a Unidade Móvel de Castração do Município de Rio Grande -RS, após orquiectomia bilateral de rotina. Os os complexos testículos-epidídimos acondicionados em tubos contendo 30 ml de PBS (tampão fosfato-salino), foram transportados até o laboratório com temperatura aproximada de 4 °C.

Depois os testículos foram dissecados (remoção da túnica albugínea e parênquima testicular) e seccionados ao meio em plano sagital para a confecção dos fragmentos. Após 3 lavagens PBS, os tecidos foram divididos em fragmentos obtidos da porção mediastínica (Gartner & Hiatt, 2007) medindo 5x5x5mm – altura aproximada de 1mm (Carvalho, 2016).

Os fragmentos foram classificados em três grupos: controle (GC), vitrificação em superfície sólida (GVSS) e congelamento lento automatizado (GCLA).

2.1 Grupo controle

Os fragmentos foram imediatamente preparados para avaliação histológica.

2.2 Grupo vitrificação em superfície sólida (GVSS)

Os fragmentos foram alocados em poços de placa de cultivo celular contendo 0,5mL das soluções de equilíbrio (DMEM acrescido 0,25M de sacarose, 10% de SFB, 1,4M de DMSO e 1,4M de etilenoglicol) durante 10 minutos e de vitrificação (2,8M de DMSO, 2,8M de etilenoglicol, 0,50M de sacarose, DMEM e 10% de SFB) durante 5 minutos. Posteriormente alocados em superfície de alumínio e a mesma exposta ao contato com o nitrogênio promovendo a vitrificação, sendo transferidos imediatamente para os criotubos e armazenados em botijões criogênicos (Teixeira *et al.*, 2021).

Para o aquecimento, os criotubos foram retirados dos cilindros e mantidos à temperatura ambiente (~22°C) por 1 minuto. Em seguida submetidos ao banho-maria a 37°C por cerca de 30 segundos a 1 minuto (Carvalho, 2016).

2.3 Grupo congelamento lento automatizado (GCLA)

Os fragmentos foram acondicionados em criotubos contendo 0,5ml do meio de congelamento (10% de SFB, DMEM, 1,4M de DMSO e 1,4M de etilenoglicol). Utilizou-se o protocolo de congelamento de embriões previsto no congelador automático com curva referente a espécie bovina.

Quadro 1. Caracterização da curva de congelamento lento automatizada

	Tº de Estab. Negativ a Inicial	Seeding	Tempo de Estab. Negativa Inicial	Taxa de Cong. Rampa1	Início Cong. Rampa2	Início Cong. Rampa2	Tº de Estab. Negativa Final	Tempo de Estab. Negativa Final
Curva 1	-6°C	10 min.	2 min.	-0,50°C/min.	-32°C	-0,50°C/min.	-32°C	5 min.

Para a descongelação, criotubos foram retirados dos cilindros e submetidos a uma temperatura de 37°C por 1 minuto (Chatdarong *et al.*, 2015).

Para análise histomorfológica, os fragmentos frescos e descongelados foram fixados em paraformoldeído 4% e transferidos para álcool 70°. Após desidratados em processadora automática (Sakura®), através da imersão das amostras em soluções de concentração crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), finalizando com solução de xilol. As amostras foram embebidas em parafina histológica (64° Synth®) e seccionadas (3-5µm) e após montagem das lâminas, as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Uma análise semi-quantitativa não computadorizada para integridade e alterações estruturais foram avaliadas em microscopia de luz. Cinco áreas de cada secção foram escolhidas aleatoriamente e classificadas de acordo com escores de pontuação adaptado de Lima *et al.* (2017): Integridade do revestimento epitelial dos túbulos seminíferos – (i) separação celular da membrana basal - sendo 1, sem separação, 2 com separação <75% e escore 3 quando a separação for >75%; (ii) Retração de membrana basal, sendo 1 equivalente a sem retração, 2 com pequena retração e 3 com retração exacerbada; Integridade dos núcleos das espermatogônias - (iii) Distinção de espermatogônias e células de Sertoli, classificado com escore 1 quando fácil distinção, 2 quando distinção difícil e 3 quando impossível; (iv) Visualização nuclear, classificada como 0 quando fácil visualização, escore 2 quando difícil visualização e 3 quando visualização impossível; (v) Condensação nuclear, classificada como 1 na ausência de núcleos picnóticos, 2 quando picnose <40% e escore 3 quando picnose >40%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a classificação adaptada de Lima *et al.* (2017), o GCLA apresentou melhores resultados em comparação ao GV uma vez que obteve melhor distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, melhor visualização nuclear além de picnose <40% ao que se refere a condensação nuclear (tabela 2). Segundo Baert *et al.* (2012) apesar da vitrificação ser a técnica mais eficiente no que se refere a evitar a cristalização por seu congelamento ultrarrápido, as altas concentrações de crioprotetores se tornam bastante prejudiciais à manutenção das características morfológicas e funcionais do tecido testicular, corroborando com os achados descritos por Andrae e colaboradores em 2021.

Em relação aos demais quesitos avaliados, ambos os grupos obtiveram uma pontuação 3. Sobre o item separação da membrana basal tal escore indica uma separação >75% além de uma retração exacerbada da membrana basal conforme descrito na tabela 2. De acordo com Graham & Mocé (2005), a manutenção da integridade da membrana é de grande importância uma vez que a mesma é responsável pela seletividade no transporte de moléculas, assim integridade funcional da membrana relaciona-se diretamente com a viabilidade celular.

Tabela 1 – Classificação de integridade dos compartimentos celulares de fragmentos testiculares

Parâmetros	GC	GV	GCLA
Separação da membrana basal	Escore 1	Escore 3	Escore 3
Retração da membrana basal	Escore 1	Escore 3	Escore 3
Distinção espermatogônias/Sertoli	Escore 1	Escore 3	Escore 1
Visualização nuclear	Escore 1	Escore 3	Escore 1
Condensação nuclear	Escore 2	Escore 3	Escore 2

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o grupo congelamento lento automatizado obteve melhores resultados no processo de criopreservação de fragmentos gonodais caninos. Contudo, apesar dos avanços obtidos, ainda se faz necessário mais estudos para determinação de protocolos padronizados permitindo assim a aplicação prática da criopreservação testicular na reprodução artificial dos animais domésticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRISHAMI, M.; ANZAR, M.; YANG, Y.; HONARAMOOZ, A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. **Theriogenology**. v.73, p. 86-96, 2010.

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.

BAERT, Y. et al. Orthotopic graft of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple but effective cryopreservation protocol. **Fertility and Sterility**, v.97, n.5, p.1152-1157, 2012.

CARVALHO, A.A. et al. Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian females in cryobanking. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CARVALHO, M. D. C. Criopreservação de Tecido Testicular de Cães Avaliação Histológica e Ultraestrutural. 70p, 2016. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife.

CERDEIRA, J.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M.J.; PÉREZ-GUITIÉRREZ, J.F.; HIJON, M.; CASTAÑO, C.; SANTIAGO-MORENO, J. Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. **Cryobiology**. v. 95, p.164-170, 2020.

CHATDARONG, K.; THUWANUT, P.; MORRELL, J.M. The development of cat testicular sperm cryopreservation protocols: effects of tissue fragments or sperm cell suspension. **Theriogenology**, v.85, p.200-206, 2016.

GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T.F.P.; MORAIS, G.B.; AQUINO-CORTEZ, A.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; XAVIER, F.A.F.; VIANA, D.A.; SILVA, L.D.M. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, ed. 2; p. 235-241, 2017.

MAHIDDINE, F.Y.; KIM, M. Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. **Animals**. v.11, n.7, p.1930, 2021.

MILAZZO, J.P.; VAUDREUIL, L.; CAULIEZ, B.; GRUEL, E.; MASSÉ, L.; MOUSSET-SIMÉON, N.; MACÉ, B.; RIVES, N. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. **Hum Reprod**. v.23; n.1; p.17-28, 2008.

SILVA, A. M., BEZERRA, L. G. B., PRAXEDES, E. C. G., MOREIRA, S. S. J., SOUZA, C. M. P., OLIVEIRA, M. F., PEREIRA, A. F., COMIZZOLI, P. & SILVA, A.R. 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.

TEIXEIRA, D. O.; OLIVEIRA, E. S.; FERNANDES, J. S.; PALOMINO, G. J. Q.; TABOSA, B. E. A.; BARBOSA, H. T. S.; PINHEIRO, B. Q.; SILVA, L. D. M. Avaliação histológica dos testículos de cães pré-púberes submetidos à vitrificação com diferentes associações de crioprotetores. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, e348101623864, 2021.