

Criopreservação de tecido testicular canino: da fragmentação ao processamento de amostras

A profunda conexão entre humanos e cães motiva o desenvolvimento de métodos inovadores para conservar atributos valiosos nas diversas raças. Entre essas técnicas, a criopreservação do tecido testicular desponta como uma alternativa promissora para apoiar a reprodução canina, especialmente quando métodos tradicionais de coleta de sêmen são inviáveis. Esta estratégia permite não só a geração ilimitada de gametas masculinos, mas também a formação de bancos de germoplasma, fundamentais tanto para animais de relevante valor genético quanto para a preservação de espécies ameaçadas de extinção. Este estudo centra-se na aprimoração da criopreservação de tecido testicular em cães, um passo essencial para assegurar a fertilidade e a diversidade genética desses animais. O processo envolve uma dissecação minuciosa dos testículos, seguida pelo fracionamento do tecido e sua exposição a métodos de congelamento lento ou vitrificação, utilizando crioprotetores para reduzir os danos celulares. Especificamente, a vitrificação em superfície sólida (VSS) é ressaltada pela sua eficiência e menor custo. Após a criopreservação, o tecido é cuidadosamente reaquecido, observando-se rigorosamente o controle de tempo e temperatura para evitar danos às células. A análise da viabilidade, integridade e funcionalidade metabólica dos tecidos é realizada através de técnicas avançadas, como a microscopia confocal a laser e avaliações histomorfológicas. Contribuindo significativamente para o avanço nesta área de pesquisa, este estudo fornece dados cruciais para o embasamento de futuros trabalhos e para a aplicação prática dessas descobertas em contextos clínicos, abrindo novas perspectivas para a reprodução canina e a conservação de espécies ameaçadas.

Palavras-chave: Criopreservação; Tecido Testicular; Cães; Microscopia Confocal; Histomorfologia.

Cryopreservation of canine testicular tissue: from fragmentation to sample processing

The deep bond between humans and dogs drives the pursuit of innovative methods to preserve valuable traits across different breeds. Among these techniques, testicular tissue cryopreservation emerges as a promising alternative to support canine reproduction, especially when traditional semen collection methods are impractical. This strategy not only enables the unlimited generation of male gametes but also facilitates the establishment of germplasm banks, which are crucial for both animals of significant genetic value and the conservation of endangered species. This study focuses on refining the cryopreservation of testicular tissue in dogs, a critical step in ensuring the fertility and genetic diversity of these animals. The process involves meticulous dissection of the testicles, followed by tissue segmentation and exposure to slow freezing or vitrification methods, using cryoprotectants to minimize cellular damage. Specifically, solid surface vitrification (SSV) is highlighted for its efficiency and lower cost. After cryopreservation, the tissue is carefully reheated, with strict control over time and temperature to prevent cellular damage. The analysis of viability, integrity, and metabolic functionality of the tissues is conducted using advanced techniques, such as laser confocal microscopy and histomorphological evaluations. Contributing significantly to advancements in this research area, this study provides crucial data for grounding future work and the practical application of these findings in clinical contexts, opening new perspectives for canine reproduction and the conservation of endangered species.

Keywords: Cryopreservation; Testicular Tissue; Dogs; Confocal Microscopy; Histomorphology.

Topic: **Biologia Estrutural**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Received: **03/11/2023**

Approved: **15/12/2023**

Inaraã Dias da Luz 
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3134508687951044>
<https://orcid.org/0000-0001-7880-7208>
inadiasmedvet@gmail.com

Antônio Sérgio Varela Júnior 
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8041711996066835>
<https://orcid.org/0000-0003-4901-5118>
varelajras@gmail.com

Carolina Viegas Pinto 
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7590663664338376>
<https://orcid.org/0000-0003-3357-0571>
carolinaviegas18@gmail.com

Fernanda Rodrigues Mendonça 
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7538503892376309>
<https://orcid.org/0000-0002-6395-4448>
nandarm.vet@gmail.com

Carine Dahl Corcini 
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7340307576119827>
<https://orcid.org/0000-0001-5683-7801>
corcinicd@gmail.com



DOI: 10.6008/CBPC2236-9600.2024.001.0001

Referencing this:

LUZ, I. D.; VARELA JÚNIOR, A. S.; PINTO, C. V.; MENDONÇA, F. R.; CORCINI, C. D.. Criopreservação de tecido testicular canino: da fragmentação ao processamento de amostras. *Scire Salutis*, v.14, n.1, p.1-12, 2024. DOI: <http://DOI.org/10.6008/CBPC2236-9600.2024.001.0001>

INTRODUÇÃO

Os cães têm um papel indispensável na vida humana, muitas vezes vistos como membros essenciais da família. A trajetória cultural e psicológica dos seres humanos é intrincadamente vinculada à companhia dos cães, uma relação amplamente reconhecida por seus benefícios tanto para a saúde física quanto mental (KITAGAWA et al., 2004). Essa profunda conexão entre humanos e seus companheiros caninos têm estimulado esforços direcionados aos aspectos reprodutivos dos cães, com o intuito de preservar e realçar características valorizadas nas diferentes raças. Consequentemente, isso desencadeou uma busca contínua por técnicas avançadas de melhoramento genético (MESADRI, 2017).

A criopreservação de fragmentos de tecido testicular tem se estabelecido firmemente como uma técnica inovadora e promissora na área de reprodução assistida. Essa abordagem não só possibilita a geração ilimitada de gametas masculinos, mas também facilita a formação de bancos de germoplasma. Este avanço é particularmente significativo nos últimos anos, onde o interesse pela criopreservação testicular tem sido impulsionado pelos êxitos obtidos em pesquisas que incluem a produção de gametas in vitro e o transplante espermatozôico, destacando-se pela sua contribuição valiosa ao campo (HONARAMOOZ, 2012).

Conforme mencionado por Santos (2018), a preservação de tecido testicular oferece teoricamente uma alternativa prática quando outras técnicas não são viáveis, como a criopreservação de espermatozôio ejaculado. Tal técnica tem sido aplicada em uma variedade de espécies, sendo especialmente útil em animais de alto valor zootécnico como: bovinos (BARBOSA et al., 2011), suínos (ABRISHAMI et al., 2010) e ovinos (PUKAZHENTHI et al., 2015), onde é fundamental preservar linhagens genéticas valiosas para programas de melhoramento genético. Ademais, a criopreservação de tecido testicular é utilizada em espécies ameaçadas com a extinção para ajudar na conservação da diversidade genética e na preservação das populações em cativeiro.

Em humanos sua aplicação tem o intuito de preservar a fertilidade em indivíduos que enfrentam tratamentos médicos que podem afetar sua capacidade reprodutiva (CURABA et al., 2011). Em suma, a criopreservação de tecido testicular é uma ferramenta versátil e valiosa podendo ser aplicada em uma ampla gama de espécies para os mais diversos fins, ressaltando a importância de pesquisas relacionadas a essa temática.

O presente artigo tem como objetivo descrever a metodologia utilizada no processo de fragmentação do tecido testicular, bem como nos métodos de congelamento e descongelamento, até a avaliação dos tecidos resultantes. Serão abordados os procedimentos específicos adotados em cada etapa do processo, visando fornecer uma compreensão abrangente das técnicas empregadas. O artigo visa contribuir para o avanço do conhecimento nesta área, fornecendo informações que possam ser aplicadas em pesquisas futuras e na prática clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Transporte de amostras e confecção de fragmentos de tecido testicular

Os complexos testículos-epidídimos caninos foram acondicionados em tubos plásticos (50 ml) contendo 30 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e refrigerados em temperatura aproximada de 4 °C sendo processados no máximo em 24 horas.

Os testículos foram cuidadosamente dissecados para a remoção da túnica albugínea e do parênquima testicular subjacente, seccionados ao meio em plano sagital para a confecção dos fragmentos testiculares (Figura 1). Realizou-se de 2 a 3 lavagens dos testículos em solução PBS para remover sujidades e vestígios de sangue.

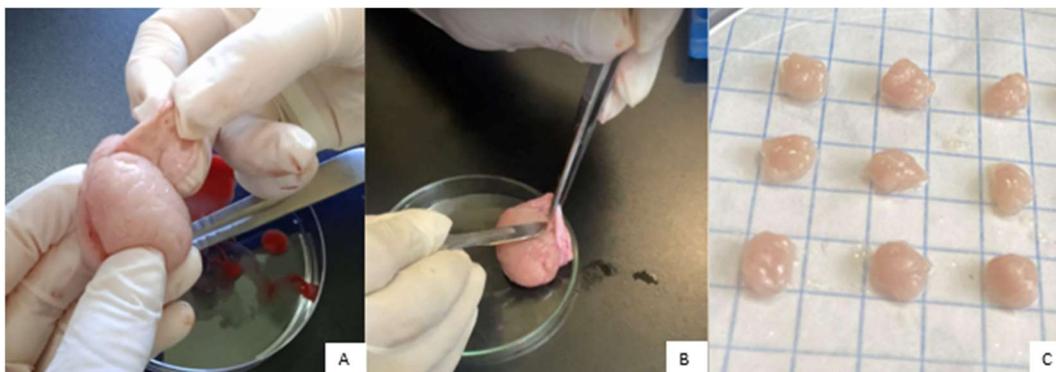


Figura 1: Dissecção e fragmentação do tecido testicular de cães domésticos. (a) identificação das estruturas testiculares; (b) dissecção e remoção da túnica albugínea e do parênquima testicular; (c) fragmentos testiculares.

Para a fragmentação, os testículos foram seccionados com o auxílio de um modelo de grade, utilizando bisturi e pinças de dissecção à temperatura ambiente. Preconizou-se criopreservar os fragmentos da porção mediastínica dos testículos.

Meios

Como meio de transporte foi utilizado PBS. Para a vitrificação em superfície sólida (VSS) utilizou-se uma solução de equilíbrio composta por meio essencial mínimo (DMEM) acrescido de 0,25 M de sacarose, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1,4 M de dimetilsufóxido (DMSO) e 1,4 M de etilenoglicol.

O meio de vitrificação tem em sua composição 2,8 M de cada um dos agentes crioprotetores DMSO e etilenoglicol, 0,50 M de sacarose, DMEM e 10% de SFB .

O meio de congelamento lento automatizado (CLA) tem em sua composição 10% de SFB, DMEM, 1,4 M de DMSO e 1,4 M de etilenoglicol.

Métodos de criopreservação

A vitrificação e o congelamento lento são as técnicas de criopreservação mais amplamente difundidas, ambas tendo suas vantagens e limitações, sendo empregados dependendo das características do tecido a ser preservado. A vista disso, estudos recentes têm abordado adaptações dessas técnicas, buscando opções que acarretem menos crioinjúrias teciduais.

Congelamento lento

No método de congelamento lento ou convencional, o tecido é gradualmente resfriado a uma taxa controlada antes de ser armazenado em nitrogênio líquido. Isso é realizado utilizando baixas concentrações de agentes crioprotetores (ACPs) e um equipamento com temperatura ajustável dentro de um freezer -80 °C.

Para a congelação lenta, coloca-se os fragmentos em criotubos contendo ACPs e posteriormente no equipamento de congelação até atingir a temperatura de -80 °C, as amostras devem então ser armazenadas em nitrogênio líquido até o posterior aquecimento.

Congelamento lento automatizado (CLA)

Para realizar o processo de congelamento, os fragmentos testiculares passam por três lavagens em PBS para eliminar possíveis impurezas. Em seguida, colocados em frascos criogênicos de 2 mL contendo 0,5 mL do meio de congelamento.

Após preparados, os frascos contendo o meio e o fragmento são alocados em racks do congelador para iniciar o processo, seguindo o protocolo escolhido. Após o congelamento adequado, os frascos são transferidos para botijões de nitrogênio líquido para armazenamento a longo prazo até o momento do descongelamento.

Vitrificação

No processo de vitrificação, são utilizadas altas concentrações de crioprotetores, e o resfriamento ocorre de forma extremamente rápida. Nessa técnica, dispense-se de menos tempo e gastos na execução uma vez que não necessita de equipamentos específicos para sua aplicação.

Vitrificação em superfície sólida (VSS)

Os fragmentos testiculares são alocados em poços de placa de cultivo celular contendo 2mL das soluções de equilíbrio (durante 10 minutos em temperatura ambiente) e de vitrificação (durante 5 minutos em temperatura ambiente).

Após os fragmentos são transferidos para uma superfície de metal (confeccionada com papel alumínio no tamanho de 10x10x10 cm) e a mesma colocada em contato com o nitrogênio promovendo a vitrificação dos fragmentos, sendo transferidos imediatamente para os criotubos que serão armazenados em botijões criogênicos.

Aquecimento

Após o período de criopreservação do tecido testicular, os fragmentos são submetidos ao procedimento de banho-maria, onde os criotubos contendo as amostras são retirados dos botijões com nitrogênio e expostos a uma temperatura de 37 °C durante 1 minuto.

Microscopia confocal de varredura a laser

Fragmentos de tecido testicular são avaliados por meio de sondas fluorescentes para lipoperoxidação lipídica, espécies reativas ao oxigênio e potencial de membrana mitocondrial. Parâmetros relacionados à intensidade de fluorescência, como energia do laser, detecção de sinal e tamanho do orifício, devem ser mantidos em valores constantes para todas as medições. Os fragmentos serão observados com ampliação objetiva de 630× sob imersão em óleo, e cada fragmento analisado terá três regiões de interesse selecionadas aleatoriamente.

O laser de 405 nm foi empregado para excitar a sonda Hoechst 33342, com a faixa de emissão utilizada entre 420-480 nm. Para a sonda JC-1, dois lasers diferentes foram utilizados: o laser de 488 nm, com intervalo de emissão de 505-555 nm para mitocôndrias altamente funcionais e de 565-615 nm para mitocôndrias com baixa atividade mitocondrial. O mesmo laser de 405 nm, em outros contextos, foi empregado para quantificar a emissão da sonda H2DCFDA no intervalo de 500-570 nm. O laser de 552 nm foi utilizado para excitar o iodeto de propídio, cuja detecção ocorreu no intervalo de 590-660 nm. No caso do Bodipy C11, o laser de 488 nm foi utilizado para a excitação, com a fluorescência sendo quantificada nos intervalos de 500-550 nm para lipídios peroxidados e de 551-620 nm para lipídios não peroxidados.

Lipoperoxidação Lipídica (LPO)

Os fragmentos são alocados em microtubos contendo 4 µL da sonda Bodipy C11 juntamente com 996 µL de BPS, mantidos afastados da incidência luminosa por 30 minutos e incubados a 37 °C. Após o tempo de coloração, os fragmentos são realocados em microtubos contendo 20 µL de Hoechst e 980 µL de PBS e incubados por 5 minutos a 37 °C, protegidos da luminosidade.

Após os fragmentos são fixados 1000 µL de paraformaldeído a 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, transferidos para microtubos contendo 1000 µL de PBS durante 1 hora em temperatura ambiente, envoltos por papel alumínio.

Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1)

Os fragmentos são alocados em microtubos contendo 4 µL da sonda JC-1 juntamente com 996 µL de BPS, mantidos afastados da incidência luminosa por 30 minutos e incubados a 37 °C. Após o tempo de coloração, são então realocados em microtubos contendo 20 µL de Hoechst e 980 µL de PBS, mantendo os mesmos no escuro durante 5 minutos a 37 °C para incubação.

Em seguida, são fixados em paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente durante 15 minutos, transferidos para solução de PBS por 1 hora a temperatura ambiente, protegido da luminosidade.

Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)

Os fragmentos são alocados em microtubos contendo 20 µL da sonda H2DCFDA e 980 µL/mL de PBS 30 minutos, mantidos fora do alcance da luz e incubados a 37°C. Após o período de incubação, os fragmentos

são transferidos para outro microtubo contendo 40 μ L de iodeto de propídio e 20 μ L de Hoechst em 940 μ L de PBS durante 5 minutos a 37 °C protegidos da luminosidade.

Posteriormente fixados em paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente durante 15 minutos, sendo transferidos logo após para solução de PBS durante 1 hora em temperatura ambiente protegidos da luminosidade. Todas as amostras devem ser mantidas refrigeradas e protegidas da luz até o momento da confecção das imagens no microscópio. Após a avaliação das amostras, as imagens obtidas (Figura 2) foram avaliadas no software ImageJ[®] resultando em valores associados a emissão das fluorescências.

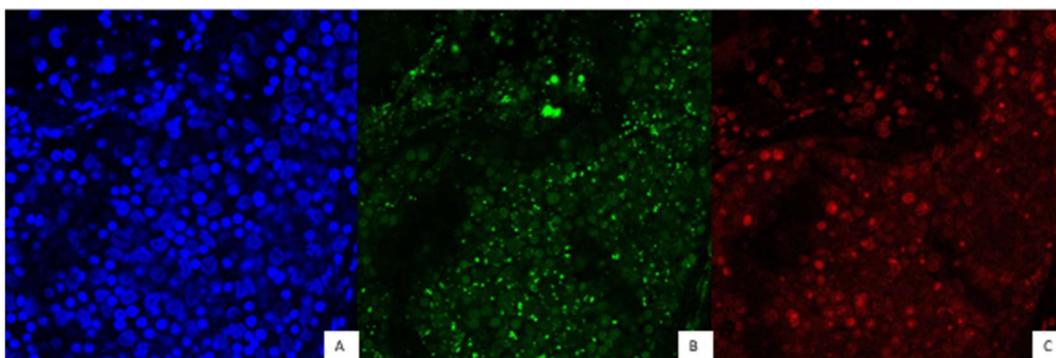


Figura 2: Imagens de fluorescência obtidas através da avaliação de túbulos seminíferos de cães domésticos em microscopia confocal de varredura a laser referente ao estudo de espécies reativas ao oxigênio. (a) identificação da sonda Hoestcht 33342; (b) identificação da sonda H2DCFDA; (c) identificação da sonda iodeto de propídio.

Histomorfologia tecidual

Para a análise histomorfológica do tecido confecciona-se lâminas dos fragmentos testiculares, o processamento realizado para histologia clássica consiste em: desidratação, diafanização, impregnação com parafina, blocagem, microtomia (5 μ m), desparafinização e coloração com hematoxilina-eosina (HE) para serem analisadas por microscopia óptica (Figura 3).

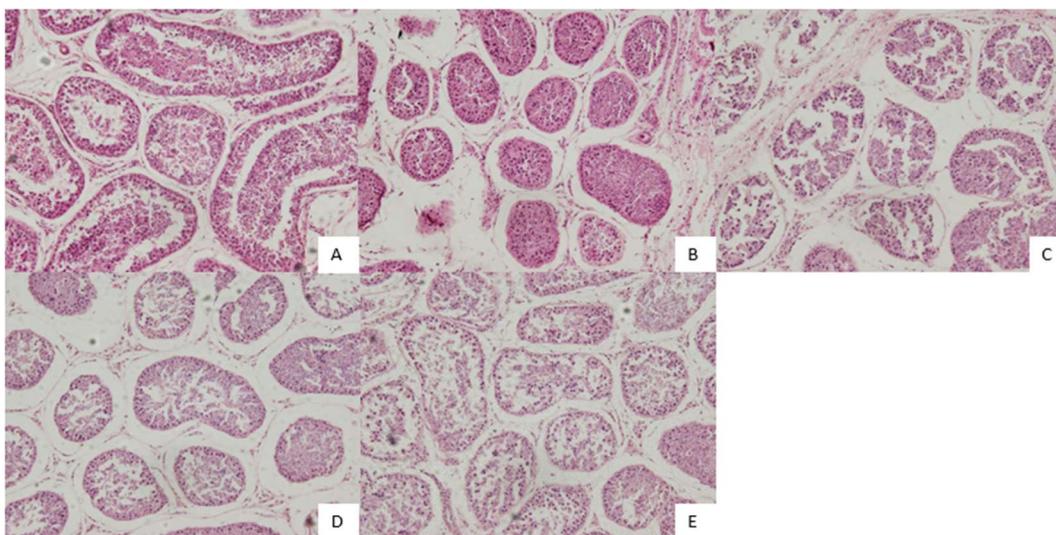


Figura 3: Fotomicrografias da avaliação histomorfológica do tecido testicular de cães domésticos. (a) grupo controle (HE, x10); (b) grupo VSS (HE, x10); (c) grupo CLA curva 1 (HE, x10); (d) grupo CLA curva 3 (HE, x10); grupo CLA curva 6 (HE, x10).

Para avaliação histomorfológica preconiza-se a classificação de escores adaptada (LIMA et al.,2017) onde foram avaliados cinco parâmetros: separação celular da membrana basal, retração da membrana basal,

distinção espermatogônias/Sertoli, visualização nuclear e condensação nuclear (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação da integridade dos compartimentos celulares de testículos de cães (adaptado de Lima et al. 2017).

Parâmetros	Características	Escore
Integridade do revestimento epitelial dos túbulos seminíferos		
Separação celular da membrana basal	Sem separação	1
	Separação <75%	2
	Separação >75%	3
Retração da membrana basal	Sem retração	1
	Pequena retração	2
	Retração exacerbada	3
Integridade dos núcleos das espermatogônias		
Distinção espermatogônias / Sertoli	Fácil distinção	1
	Difícil distinção	2
	Impossível distinção	3
Visualização nuclear	Fácil visualização	1
	Difícil visualização	2
	Impossível visualização	3
Condensação nuclear	Sem núcleos picnóticos	1
	Picnose <40%	2
	Picnose >40%	3

DISCUSSÃO TEÓRICA

Segundo Picazo et al. (2022), os complexos testículos-epidídimos caninos devem ser acondicionados em tubos plásticos (50 ml) contendo 30 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e refrigerados em temperatura aproximada de 4 °C sendo manipuladas em tempo médio de 2-3 horas. A temperatura e o tempo são fatores críticos no processamento de amostras uma vez que influenciam diretamente na preservação integridade do material biológico, metabolismo celular e em possíveis contaminações microbiológicas alterando as características da amostra.

Outro fator importante a ser destacado é a escolha dos componentes dos meios de preservação, geralmente são compostos por uma solução rica em nutrientes, fatores de crescimento, hormônios e proteínas, o que é ideal para manter a viabilidade dos tecidos. Além disso, o meio possui propriedades tamponantes e estabilizadoras que ajudam a manter o pH e a osmolaridade adequados. Também são adicionados ACPs e açúcares para proteger as células durante o processo de criopreservação.

Sabe-se que, durante esse processo alterações de membrana celular são responsáveis por parte da perda na qualidade das células espermáticas após descongelação (KIM et al., 2021) e com o intuito de amenizar tais efeitos deletérios, faz-se necessária a diminuição da quantidade de água no interior da célula (DALCIN et al., 2010). A inclusão de crioprotetores no processo de congelamento é crucial para garantir a preservação da qualidade celular após a descongelação. Existem duas categorias principais de crioprotetores: os intracelulares e os extracelulares, cada um com funções específicas para proteger as células durante o processo de congelamento.

Os intracelulares têm a capacidade de penetrar nas células removendo a água intracelular, ao se ligarem às moléculas de água aumentam a viscosidade do líquido intracelular, reduzindo a formação de cristais de gelo durante a criopreservação (LENZ et al., 2018). Glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol são exemplos dessa categoria. Já os extracelulares atuam fora das células, aumentando a osmolaridade do

meio extracelular, o que facilita a saída de água das células, diminuindo assim a formação de cristais de gelo no interior das mesmas (SIEWERT et al., 2018). Como exemplo podemos citar: sacarose, trealose e polietilenoglicol.

Com a associação adequada de crioprotetores intracelulares e extracelulares é possível minimizar os danos celulares durante o processo de congelação e descongelação, garantindo a integridade e a viabilidade das células após o procedimento. Esses agentes desempenham um papel fundamental em várias aplicações, incluindo a criopreservação de células espermáticas e outros tipos celulares e teciduais.

Ademais, estudo realizado por Honaramooz (2012) evidenciou que a ação dos agentes crioprotetores durante o processo de criopreservação está diretamente relacionada ao tamanho dos fragmentos testiculares. O tamanho normalmente varia de 0,3 mm³ (THUWANUT et al., 2013) a 3 mm³ (SILVA et al., 2017).

Em estudo realizado por Carvalho (2016) sobre criopreservação de tecido testicular canino, foram usados fragmentos de 3 a 5 mm³, enquanto Santos e colaboradores optaram por fragmentos de 4 mm³ em sua pesquisa. Assim, os estudos diferem tanto em relação às espécies quanto aos protocolos de criopreservação empregados (SANTOS et al., 2018).

Em consonância com Santos et al. (2018), a maioria dos estudos recentes sobre preservação em cães tem adotado o intervalo de 3 a 5 mm³. Essa observação pode ser atribuída ao fato de que fragmentos com essas dimensões favorecem uma melhor penetração dos agentes crioprotetores (ANTONIO et al., 1998).

A região testicular utilizada para a confecção dos fragmentos também deve ser considerada, uma vez que é na porção mediastínica do testículo que as células reprodutoras masculinas são produzidas. Essas células estão organizadas em alças, formando os túbulos retos que conectam os túbulos seminíferos a canais em forma de rede (*"Rete testis"*). Essa rede, revestida por um epitélio simples pavimentoso ou cúbico, constitui a rede testicular no mediastino testicular (GARTNER et al., 2007) e sua integridade assegura a preservação das células germinativa e consequente funcionalidade reprodutiva do tecido.

Sobre as técnicas de criopreservação, a vitrificação e o congelamento lento são as mais amplamente difundidas, sendo ambos os métodos testados em mamíferos de diferentes espécies (WYNS et al., 2013).

No congelamento lento ou convencional, o tecido é gradualmente resfriado a uma taxa controlada antes de ser armazenado em nitrogênio líquido. Isso é realizado utilizando baixas concentrações de ACPs objetivando diminuir a toxicidade causada por eles. Durante essa etapa, ocorre a formação de grande quantidade de cristais de gelo intracelulares, o que pode acarretar perda da funcionalidade do tecido após aquecimento (WYNS et al., 2013).

Para a utilização deste método, é necessário o uso de um equipamento com temperatura ajustável (TRAVERS et al., 2011), ou container específico, dentro de um freezer -80 °C (PUKAZHENTHI et al., 2015). A congelação lenta é considerada uma técnica demorada, podendo levar mais de 24 h (POTHANA et al., 2015).

Como variação dessa técnica, o CLA apresenta vantagens uma vez que o processo é simplificado e automático, reduzindo tempo necessário além do fator "erro humano" durante todas as etapas do

congelamento lento. Projetada para oferecer controle preciso de temperatura, monitoramento e alarmes, a congeladora portátil automática também possui capacidade para armazenar múltiplas amostras, além de disponibilizar programas de congelamento personalizados para diferentes tipos de material biológico. Essa tecnologia proporciona maior eficiência e segurança nos procedimentos de preservação de material genético.

Em contrapartida, no processo de vitrificação, são utilizadas altas concentrações de crioprotetores, e o resfriamento ocorre de forma extremamente rápida, resultando na formação de um estado vítreo tanto dentro quanto fora da célula (SANTOS et al., 2018). No entanto, conforme destacado por Lima et al. (2018), esse método pode potencialmente causar danos estruturais ao tecido testicular. Assim, os crioprotetores são empregados para mitigar os efeitos adversos da criopreservação nos tecidos.

Contrastando com os achados de Lima et al. (2011) explicitaram em sua pesquisa que o método de vitrificação é superior ao congelamento lento na preservação de tecido testicular imaturo de camundongos. Eles observaram que a vitrificação manteve a estrutura e a integridade celular dos fragmentos testiculares. Além disso, essa técnica foi considerada mais eficiente devido à sua rapidez e menor custo.

A técnica de VSS está se tornando cada vez mais prevalente em diversas áreas, como medicina reprodutiva, pesquisa biomédica e conservação de tecidos biológicos. Comparada às técnicas tradicionais de congelamento, como o congelamento lento, a VSS oferece numerosas vantagens, especialmente na preservação de tecidos delicados.

Entre os inúmeros métodos de criopreservação descritos para tecido testicular canino, a VSS se destaca tanto em animais adultos (CARVALHO, 2016) quanto de animais pré púberes (TEIXEIRA et al., 2021). Contudo, apesar das numerosas vantagens apresentadas pela VSS, como preservação da viabilidade dos tecidos e a alta taxa de recuperação celular, ainda existem desafios a serem superados na implementação dela. Destaca-se a necessidade de estabelecer protocolos de criopreservação padronizados e a otimização de soluções de vitrificação para os diferentes tipos de tecidos.

Outro aspecto relevante a ser ressaltado é o processo de aquecimento dos tecidos, este deve ser realizado de forma controlada afim de evitar danos celulares decorrentes de mudanças abruptas de temperatura. O método de aquecimento mais utilizado para tecido testicular é o banho-maria, assim, os criotubos contendo as amostras devem ser retirados dos botijões com nitrogênio e submetidos a 37 °C durante 1 minuto (CARVALHO, 2016). Após o aquecimento, a remoção dos agentes crioprotetores objetivando evitar alterações osmóticas que acarretam danos celulares deve ser realizada. Para isso, os fragmentos devem ser submetidos a lavagens com soluções compostas pelos agentes crioprotetores utilizados no processo de congelamento em decrescentes concentrações (CARVALHO, 2016).

Silva e colaboradores (2019) observaram resultados promissores ao empregar um protocolo de aquecimento para amostras testiculares de catetos. O protocolo consistiu em aquecer as amostras a 37 °C por 1 minuto, seguido pela remoção dos crioprotetores em três lavagens de 5 minutos cada, utilizando o mesmo meio de vitrificação suplementado com 10% de SFB e concentrações decrescentes de sacarose (0,50 M, 0,25 M e 0 M). Essa abordagem demonstrou eficácia na preservação da viabilidade do tecido testicular de

catetos após a criopreservação.

Com a conclusão das etapas de transporte, fragmentação, criopreservação e aquecimento diversas são as avaliações teciduais possíveis. A análise histomorfológica do tecido através da coloração de HE é a mais comumente empregada, sendo amplamente utilizada em laboratórios de patologia e pesquisa avaliando de forma aleatória túbulos seminíferos de diferentes campos da lâmina histológica.

Outra coloração que pode ser realizada é a de AgNOR (Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions) utilizada para identificar regiões organizadoras nucleolares (NORs) em células. A coloração pela prata das regiões NORs é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucleico ribossômico, avaliando a proliferação em células normais ou neoplásicas.

Ao utilizar tal coloração em tecido testicular visa-se identificar as NORs em células saudáveis da linhagem espermatogênica e obtenção da taxa de proliferação celular inferindo sobre a preservação da capacidade metabólica do tecido criopreservado (LINDNER, 1993). Nessa coloração os tecidos são submetidos a uma série de reações químicas para revelar as NORs, primeiramente realiza-se um tratamento com solução de prata (Ag) que se liga as proteínas associadas ao RNA ribossômico presente nas NORs, seguidamente para contrastar o tecido circundante deve-se submeter as amostras a coloração geralmente hematoxilina ou Giemsa.

A microscopia confocal de varredura a laser é uma técnica avançada de imagem amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo medicina, biologia, neurociência, ciências dos materiais, entre outras. Ela oferece várias vantagens em relação à microscopia convencional, incluindo a capacidade de gerar imagens de alta resolução e profundidade óptica aumentada.

Nesta técnica, um feixe de laser é usado para iluminar uma pequena área da amostra em um plano focal específico. A fluorescência gerada nesta área é então detectada por um fotomultiplicador e uma imagem tridimensional de alta resolução é construída através do movimento controlado do feixe de laser pela amostra, ponto a ponto.

Para o preparo dos fragmentos, é essencial seguir um protocolo adequado, dependendo da análise a ser realizada. No contexto de avaliação da viabilidade tecidual antes e depois dos processos de criopreservação, as amostras são coradas com sondas fluorescentes, o que permite a visualização e análise das características celulares e estruturais dos tecidos em um nível microscópico.

Apesar da microscopia confocal de varredura a laser ser uma ferramenta poderosa para a visualização e análise de tecidos, ainda há uma escassez de estudos que explorem sua aplicabilidade nesta área específica. Portanto, é necessário realizar mais pesquisas para entender completamente o potencial dessa técnica na avaliação dos tecidos testiculares e sua aplicação em estudos relacionados à reprodução e à criopreservação de células germinativas.

CONCLUSÕES

Em suma, o processamento adequado de complexos testículos-epidídimos caninos para criopreservação envolve uma série de etapas críticas, desde o acondicionamento dos fragmentos até a

escolha dos crioprotetores e métodos de preservação. A temperatura e o tempo desempenham papéis fundamentais na preservação da integridade do material biológico, enquanto a seleção adequada dos crioprotetores e o tamanho dos fragmentos são aspectos essenciais para garantir a viabilidade celular durante o processo de criopreservação.

Além disso, a escolha dos métodos de criopreservação, como o congelamento lento ou a vitrificação, requer considerações, levando em conta a eficiência e os possíveis danos estruturais aos tecidos. Após o processo de criopreservação, técnicas de avaliação tecidual, como análise histomorfológica e microscopia confocal de varredura a laser, são de grande importância para verificar a viabilidade e a integridade dos tecidos.

Embora a microscopia confocal de varredura a laser ofereça vantagens significativas na visualização e análise de tecidos, há uma necessidade contínua de mais pesquisas para explorar sua aplicabilidade específica na avaliação de tecidos testiculares. Assim, a otimização dos protocolos de criopreservação e a aplicação adequada das técnicas de avaliação tecidual são essenciais para avançar no campo da preservação de tecidos testiculares. Com esforços contínuos de pesquisa, podemos melhorar nossa compreensão e capacidade de preservar com sucesso a viabilidade e funcionalidade dos fragmentos testiculares, contribuindo para aplicações clínicas e de pesquisa nesta área.

REFERÊNCIAS

ABRISHAMI, M.. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. **Theriogenology**, v.73, n.1, p.86-96, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.004>

BARBOSA, A. P. M.. Cryopreservation of bovine spermatogenic cells using different protective molecules. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.230, p.293-296, 2011. <http://doi.org/10.4321/S0004-05922011000200014>

CARVALHO, M. C.. **Criopreservação de tecido testicular de cães avaliação histológica e ultraestrutural**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

CURABA, M.. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification?. **Fertility and Sterility**, v.95, n.6, p.9-12, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.014>

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L.. **Tratado de histologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GOUK, S. S.; LOH, Y. F. J.; KUMAR, S. D.; WATSON, P. F.; KULESHOVA, L. L.. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation **Fertility and Sterility**. **Reproductive Biology**, v.95, n.7, p.2399-2403, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.03.035>

HONARAMOOZ, A.. Cryopreservation of testicular tissue. In: KATKOV, I. I.. **Current Frontiers in Cryobiology**. 2 ed. San Diego: CELLTRONIX, 2012. p.209-228. DOI: <http://doi.org/10.5772/32338>

KIM, E.; ALMUBARAK, A.; TALHA, N.; YU, I. J.; JEON, Y.. The Use of κ -carrageenan in egg yolk free extender improves the efficiency of canine semen cryopreservation. **Animals**, v.12, p.88, 2021. DOI: <http://doi.org/10.3390/ani12010088>

KITAGAWA, B. Y.; COUTINHO, S. D.. Benefícios advindos da interação homem-cão. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde.**, v.22, n.2, p.123-128, 2004.

LENZ, D. R.; LIMA, M. C. C.; PRADO, T. F.; VICTORIO, A. M.; PAULA, F. G.; MEIRINHOS, M. L. G.; ARNHOLD, E.. Avaliação de diferentes crioprotetores em tempos de descongelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.42, n.1, p.36-41, 2018.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P.; MORAIS, G. B.; CORTEZ, A. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; XAVIER JUNIOR, 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, n.2, p.235-241, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1111/rda.12833>

LIMA, D. B. C.; SILVA, L. D. M. D.; 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. **PLoSOne**, v.13, n.11, e0207317, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0207317>

LINDNER, L. E.. Improvements in the Silverstaining Technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). **J. Histochem. Cytochem.**, v.41, p.439-445, 1993. DOI: <http://doi.org/10.1177/41.3.8429207>

MESADRI, S. B.. **Critério para desempenho de cães em competições de estrutura e beleza**. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

MOTA, P. C.; EHMCKE, J.; WESERNSTROER, B.; GASSEI, K.; SANTOS, J. R.; SCHLATT, S.. Effects of different storage protocols on a cat testis tissue potential for xenografting and recovery of spermatogenesis. **Theriogenology**, v.77, p.299-310, 2012. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.042>

PICAZO, C. M.; CASTAÑO, C.; BÓVEDA, P.; DÍAZ, A. T.; VELÁZQUEZ, R.; PEQUEÑO, B.; ESTESO, M. C.; GADEA, J.; MORCILLO, S. V.; CERDEIRA, J.; MORENO, J. S.. Cryopreservation of testicular tissue from the dog (*Canis familiaris*) and wild boar (*Sus scrofa*) by slow freezing and vitrification: Differences in cryoresistance according to cell type. **Theriogenology**, v.190, p.65-72, 2022. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.07.020>

POTHANA, L.. Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. **Theriogenology**, v.83, n.4, p.625-633, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.028>

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

SANTOS, J. F. P.. **Criopreservação de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns. 2018.

SIEWERT, A.; SALVADOR, R. A.; TIL, D.; LAMIM, T.; AMARAL, V. L. L.. Evaluation of the extracts and plants isolated substances addition with antioxidant potential for cryopreservation of human semen. **Revista de Saúde e Biologia**, v.13, n.2, p.10-19, 2018.

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. F.; SILVA, A. R.. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.229-234, 2019.

SILVA, A. R.; SILVA, A. M.; PRAXEDES, E. C. G.; MAIA, K. M.; MOREIRA, S. S. M.; SOUZA, C. M.; BEZERRA, L. G.; COMIZZOLI, P.. Vitrification of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) testicular tissue using different cryoprotectants. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, 50. **Proceedings**. Washington DC: 2017.

TEIXEIRA, D. O.. Avaliação histológica dos testículos de cães pré-púberes submetidos à vitrificação com diferentes associações de crioprotetores. **Research, Society and Development**, v.10, n.16, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23864>

THUWANUT, P.; SRISUWATANASAGUL, S.; WONGBANDUE, G.; TANPRADIT, N.; THONGPAKDEE, A.; TONGTHAINAN, D.; MANEE-IN, S.; CHATDARONG, K.. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. **Cryobiology**, v.67, n.2, p.244-247, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.07.002>

TRAVERS, A.; MILAZZO, J. P.; PERDRIX, A.; METTON, C.; BIRONNEAU, A.; MACÉ, B.; RIVES, N.. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. **Theriogenology**, v.76, n.6, p.981-990, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.025>

WYNS, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; WESE, F. X.; DONNEZ, J.; CURABA, M.. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. **Hum Reprod**, v.23, p.2402-2414, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1093/humrep/den272>

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.