

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)

Inaraã Dias da Luz

Pelotas, 2025

Inaraã Dias da Luz

Criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Reprodução e Patologia Animal).

Orientadora: Carine Dahl Corcini

Coorientador: Antônio Sergio Varela Junior

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

L979c Luz, Inaraã Dias da

Criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)

[recurso eletrônico] / Inaraã Dias da Luz ; Carine Dahl Corcini, Antonio Sérgio Varela Junior, orientadores. — Pelotas, 2025.
73 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Cães domésticos. 2. Congelamento lento. 3. Criopreservação. 4. Tecido testicular. 5. Vitrificação. I. Corcini, Carine Dahl, orient. II. Varela Junior, Antonio Sérgio, orient. III. Título.

CDD 636.70891018

Inaraã Dias da Luz

Criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2025

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini (Orientador)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Luciana Bicca Dode (1º titular)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Mauro Pereira Soares (2º titular)
Doutor em Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal/Patologia Clínica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Marina Zanin (3º titular)
Doutora em Fisiologia Animal Comparada pela Universidade Federal do Rio Grande

Dr^a. Luísa Grecco Correa (suplente)
Doutora em Ciências / Patologia e Reprodução animal pela Fundação Universidade Federal de Pelotas

Dedico essa tese de doutorado a todo caminho que percorri até aqui. Não foi fácil entrar no universo acadêmico. Desde a graduação foram incontáveis as vezes que achei que não conseguiria, mas hoje estou aqui. Depois de um longo processo poderei dizer que sou doutora, em uma realidade onde menos de 2% da população global possui tal titulação, e não poderia me sentir mais orgulhosa por isso. O caminho nem sempre é fácil, mas ele é necessário para dar valor quando chegamos ao seu fim e agora sei que independente das dificuldades, sou capaz de coisas grandiosas. Dedico essa tese a todos os momentos de dificuldade superados nessa jornada intensa e repleta conhecimento.

Agradecimentos

A jornada do doutorado foi desafiadora e enriquecedora, e não teria sido possível sem as bençãos de Deus e meus guias espirituais, aos quais agradeço por cada momento em que a fé se fez presente e não permitiu que eu esmorecesse.

Agradeço aos meus orientadores Carine Corcini Dahl e Antonio Sergio Varela Júnior pela oportunidade e orientação.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação, que desenvolveram com suas sugestões, críticas e apoio intelectual, tornando essa caminhada mais produtiva e inspiradora.

Agradeço à minha família, pelo amor incondicional, pela paciência nos momentos difíceis e pelo suporte emocional essencial para que eu pudesse seguir em frente, especialmente à minha mãe Guaraciara Dias a qual tenho como exemplo de vida a ser seguido. Mãe e melhor amiga, nunca mediu esforços para me auxiliar, por todas as idas e vindas na estrada, noites de estudo e por vezes de muito choro quando pensei que não era capaz de concluir essa etapa, obrigada por nunca desistir de mim e me amar todas as minhas facetas.

In memória a minha Vó Iloina Aguirre. “A mulher forte ama, acolhe, perdoa, deixa ir, deixa voltar, insiste, persiste mais um tanto, nunca desiste, vive de tentar com a vida; pois pra mulher forte a morte não existe”. Haredita Angel.

Aos meus amigos, que ficaram ao meu lado sempre, oferecendo palavras de encorajamento e momentos de descontração, meu sincero obrigado.

Não posso deixar de mencionar a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, órgão que fomentou minha pesquisa. A FURG, UFPel, Secretaria da causa Animal do Município de Rio Grande, os castramáveis dos Municípios de Rio Grande e Pelotas que fornecem recursos e oportunidades essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, desenvolveram para a realização deste trabalho. Cada gesto de apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

“Pesquisar é acordar para o mundo.” (Marcelo Lamy)

Resumo

DA LUZ, Inaraã Dias. **Criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*)**. 2025. 73f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

A criopreservação de tecido testicular de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) é uma técnica promissora em fase experimental. Este estudo comparou as técnicas de congelamento lento automatizado (CLA) e vitrificação em superfície sólida (VSS) para determinar qual se adequa melhor ao tecido testicular, com base em análises de histomorfologia, histomorfometria e metabolismo tecidual. Foram utilizados testículos de 15 cães púberes, fragmentados em amostras de 5×5×5 mm e distribuídos nos grupos: controle (GC), VSS e CLA. Os fragmentos do GC não foram submetidos ao processo de congelamento, os demais foram criopreservados em nitrogênio líquido por 15 dias, descongelados em banho-maria a 37°C por 1 minuto, analisados através de colorações fluorescentes para avaliação de espécies reativas de oxigênio (ROS), lipoperoxidação lipídica (LPO), potencial de membrana mitocondrial (JC-1), análises histomorfológicas e histomorfométricas. Os resultados mostraram que o grupo VSS apresentou maior potencial de membrana mitocondrial ($0,6444 \pm 0,0551$) e menor produção de ROS ($0,5629 \pm 0,0456$) ($P < 0,05$). O GC teve a maior média de LPO ($77,157 \pm 0,7701$) ($P < 0,05$). O CLA destacou-se na diferenciação entre espermatogônias e células de Sertoli ($2,2667 \pm 0,1076$) e na condensação nuclear ($2,4000 \pm 0,0917$) ($P < 0,05$). Também apresentou maior diâmetro ($119,58 \pm 4,4550$) e retração da membrana basal dos túbulos seminíferos ($48,213 \pm 2,3611$) ($P < 0,05$). Conclui-se que a VSS demonstrou resultados promissores, sendo considerada a melhor técnica de criopreservação do tecido testicular de cães domésticos.

Palavras-chave: cães domésticos; congelamento lento; criopreservação; tecido testicular; vitrificação.

Abstract

DA LUZ, Inaraã Dias. **Cryopreservation of testicular tissue from domestic dogs (*Canis lupus familiaris*)**. 2025. 73f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

The cryopreservation of testicular tissue in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) is a promising technique still in the experimental phase. This study compared two techniques automated slow freezing (ASF) and solid surface vitrification (SSV) to determine which is more suitable for testicular tissue, based on histomorphological, histomorphometric, and tissue metabolism analyses. Testicles from 15 pubertal dogs were used, fragmented into 5×5×5 mm samples, and divided into three groups: control (CG), SSV, and ASF. The GC fragments were not subjected to the freezing process, the others were cryopreserved in liquid nitrogen for 15 days, thawed in a water bath at 37°C for 1 minute, analyzed through fluorescent staining to evaluate reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), mitochondrial membrane potential (JC-1), histomorphological and histomorphometric analyzes. The results showed that the SSV group had higher mitochondrial membrane potential (0.6444 ± 0.0551) and lower ROS production (0.5629 ± 0.0456) ($P < 0.05$). The CG had the highest average LPO (77.157 ± 0.7701) ($P < 0.05$). The ASF group excelled in the differentiation between spermatogonia and Sertoli cells (2.2667 ± 0.1076) and nuclear condensation (2.4000 ± 0.0917) ($P < 0.05$). It also showed greater diameter (119.58 ± 4.4550) and retraction of the seminiferous tubule basement membrane (48.213 ± 2.3611) ($P < 0.05$). In conclusion, SSV demonstrated the most promising results and is considered the best technique for cryopreservation of testicular tissue in domestic dogs.

Keywords: domestic dogs; slow freezing; cryopreservation; testicular tissue; vitrification.

Lista de Figuras

Artigo 2

- 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..... 36
- 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..... 39
- 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)..... 39

Artigo 3

- Figura 1 Photographs A, B, C, D. Control, HE. (A) Dog. Control. Seminiferous tubules showing normal appearance (*). HE. 100X. (B) Dog. Control. Seminiferous tubules showing sperm in the lumen (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X. (C) Dog. Control. Seminiferous tubules showing normal appearance (*). Detail of the tubule attached to the basal lamina (arrow) and a portion of the seminiferous tubule detached from the basal lamina (arrowhead) HE.

	100X. (D) Dog. Control. Seminiferous tubules showing sperm (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X.....	55
Figura 2	Photographs E, F, G, H. Vittrification, HE. (E) Dog. Vittrification. Seminiferous tubules presenting sperm (arrow) HE 400X. (F) Dog. Vittrification. Seminiferous tubules presenting sperm (arrow). Spermatogonia (between arrows). Sertoli cells. HE 400X. (G) Dog. Vittrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade I retraction, where the seminiferous tubules can be observed detached from the basal lamina in some points (arrow). HE 100X. (H) Dog. Vittrification. Seminiferous tubule (*) presenting sperm in the tubular lumen and classified as grade I retraction. Basal lamina detached in some points (arrow). HE 200X.....	56
Figura 3	Photographs I, J, K, L. Vittrification, HE. (I) Dog. Vittrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade II retraction, where a greater quantity of seminiferous tubules detached from the basal lamina can be observed (arrow). The tubular epithelium is rarefied and fragmented. HE 100X. (J) Dog. Vittrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade II retraction, where detachment of the basal lamina can be observed (arrow) and also the presence of detachment of the germinal epithelium (arrowhead). HE 200X. (K) Dog. Vittrification. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction, where large areas of seminiferous tubules detached from the basal lamina can be observed (arrow). The tubular epithelium is quite rarefied and fragmented. HE 100X. (L) Dog. Vittrification. Seminiferous tubules (*) showing grade III retraction, where tubules (+) with nuclear pyknosis, loss of cellularity and cellular remains interspersed with apparently normal seminiferous tubules (*) can be observed. Large areas of seminiferous tubules are detached from the basal lamina (arrow). The tubular epithelium is quite rarefied and fragmented. HE 100X.....	57
Figura 4	Photographs M, N, O, P. Slow freezing, HE. (M) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubule showing decreased cellularity of the spermatogonial layer, with clear spaces between cells. Few	

spermatozoa (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X. (N) Dog. Slow freezing. Retracted seminiferous tubule (*), completely detached from the basal lamina and without spermatozoa in the lumen. HE 400X. (O) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) showing grade I retraction and large quantity of cytoplasmic vacuoles (arrow). HE 100X. (P) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) showing grade I retraction and desquamation of the germinal epithelium (arrowhead), with hypocellularity, nuclear pyknosis and cellular debris observed. Presence of calcium salt deposition in a necrotic seminiferous tubule indicated by the letter N. HE 200X..... 58

Figura 5 Photographs Q, R, S, T. Slow freezing, HE. (Q) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade II retraction, where a large quantity of tubules detached from the basal lamina (arrow) can be observed. The seminiferous tubules present loss of germinal epithelium (arrowhead), with epithelial necrosis and cellular rarefaction, and areas without epithelial lining can be observed (+). HE 100X. (R) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade II retraction, where total retraction of the seminiferous epithelium is observed, with hypocellularity, pyknotic cells and large spaces without cellular lining (arrowhead). HE 200X. (S) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction, where a large quantity of tubules detached from the basal lamina (arrow) can be observed. Several seminiferous tubules present a scarce quantity of cells while some still maintain partially preserved architecture. HE 100X. (T) Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction where few cells remain in the generative layer, with pyknosis, cellular remains and epithelial rarefaction. HE 200X..... 59

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1	Classificação da integridade dos compartimentos celulares de testículos de cães (adaptado de Lima et al. 2017).....	40
----------	---	----

Artigo 3

Tabela 1	Classification of the integrity of cellular compartments of dog testes (adapted from Lima et al. 2017).....	53
Tabela 2	Results related to the analyses of ROS, JC-1, and LPO of canine testicular tissue expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean.....	54
Tabela 3	Data regarding the evaluations of scores of canine testicular tissue scores expressed as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean...	54
Tabela 4	Data related to the histomorphometric evaluations of canine testicular tissue expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean.....	60

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACP	Agente crioprotetor
ATP	Adenosina trifosfato
CLA / ASF	Congelamento lento automatizado
cm	Centímetros
DMEM	Meio essencial mínimo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
GC / CG	Grupo controle
HE	Hematoxilina-eosina
JC-1	Potencial de membrana mitocondrial
LPO	Lipoperoxidação lipídica
MDA	Malonaldeído
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
N ₂	Nitrogênio líquido
Nm	Nanômetros
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PH	Potencial hidrogeniônico
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SFB / FBS	Soro fetal bovino
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
VSS / SSV	Vitrificação em superfície sólida
4-HNE	4-Hidroxinonenal

Lista de Símbolos

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
+	Adição
/	Divisão
×	Vezez

Sumário

1 Introdução.....	16
2 Objetivos.....	18
2.1 Gerais.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 Artigos.....	19
3.1 Artigo 1.....	19
3.2 Artigo 2.....	33
3.3 Artigo 3.....	47
4 Considerações finais.....	63
Referências.....	64

1 Introdução

A criopreservação de tecido testicular é uma técnica emergente e de grande relevância para a preservação da fertilidade, principalmente em espécies que têm dificuldades de reprodução natural ou em situações que exigem preservação genética. Embora os avanços na preservação de tecido ovariano sejam mais consolidados, a preservação de fragmentos testiculares ainda enfrenta desafios técnicos significativos, como a preservação da integridade celular e a capacidade de recuperação do tecido após descongelamento (HOLT et al., 2014).

Em cães, a criopreservação do tecido testicular pode ter aplicações tanto em estudos de reprodução quanto em programas de conservação genética, especialmente para raças com dificuldades reprodutivas (PIZZONI et al., 2020). Além disso, pode ser útil em casos de tratamentos clínicos que comprometam a fertilidade, como a quimioterapia. O sucesso dessa técnica depende de vários fatores, incluindo a seleção dos métodos de criopreservação, o controle da temperatura durante o processo e a avaliação da viabilidade do tecido após o descongelamento.

Atualmente, a criopreservação de tecido testicular em cães ainda está em fase experimental, e mais pesquisas são necessárias para otimizar os protocolos e aumentar a eficiência dessa técnica. No entanto, o progresso contínuo nesse campo pode abrir novas possibilidades para a medicina veterinária e para a preservação da biodiversidade canina.

A domesticação dos cães no decorrer dos anos acarretou em intervenções no processo reprodutivo afim de selecionar características específicas. Com essa seleção e cruzamentos sucessivos, surgiram diversas raças (MESADRI, 2017). Exemplares que se destacam dentro dos padrões raciais têm alto valor genético e econômico, e a criopreservação de tecido testicular oferece uma solução para preservar a fertilidade de animais submetidos à orquiectomia bilateral. Além disso, essa técnica é crucial para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, com o cão doméstico sendo um modelo experimental útil.

Entre os métodos de criopreservação mais utilizados estão o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento, considerado o método tradicional, envolve

um resfriamento gradual para minimizar os danos intracelulares causados pela formação de cristais de gelo (FAHY et al., 1984 apud ANJOS et al., 2024). Por outro lado, a vitrificação promove o resfriamento ultrarrápido, eliminando a formação de cristais e garantindo maior preservação estrutural em algumas condições (BANKER et al., 2017). No entanto, ainda há controvérsias sobre qual método apresenta melhores resultados em diferentes contextos, especialmente em tecidos de cães.

Ainda são poucos os estudos aplicados ao tecido testicular de cães, com Carvalho (2016) sendo o autor do primeiro trabalho publicado sobre o tema. Contudo, relatos sobre a preservação da viabilidade do tecido testicular após criopreservação, bem como evidências da capacidade fértil dos espermatozoides obtidos já foram explicitados.

Diversos são os relatos sobre criopreservação de tecido testicular em camundongos, macacos e hamsters (SCHLATT et al., 2002; JAHNUKAINEN et al., 2007; TRAVERS et al., 2011b), suínos (ABRISHAMI et al., 2010b) e gatos (MOTA et al., 2012a). Contudo, a validação do protocolo para uma espécie não é necessariamente aplicada a outra.

Ademais, as peculiaridades estruturais do tecido testicular devem ser consideradas na escolha do melhor protocolo de congelamento. Espermatogônias, células de Leydig e de Sertoli compõem essa estrutura, juntamente com os túbulos seminíferos. Essas células apresentam um citoplasma rico, o que as torna mais vulneráveis ao processo de congelamento e descongelamento, resultando em uma resposta à criopreservação bastante variada (CAVALCANTI et al., 2014).

Entender como as células testiculares reagem à criopreservação é fundamental para desenvolver estratégias eficazes na preservação da fertilidade. Hughes et al. (2013) enfatizam a necessidade de levar em consideração as respostas específicas dessas células durante a criopreservação, visando aprimorar essas técnicas.

Para otimizar os protocolos de preservação, justifica-se a comparação entre os métodos de vitrificação em superfície sólida (VSS) e congelamento lento automatizado (CLA), com o objetivo de identificar a abordagem mais eficaz para cães púberes.

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar o tecido testicular de cães domésticos, submetidos a preservação com o uso de diferentes métodos de criopreservação

2.2 Específicos

- 2.2.1 Avaliar a viabilidade do tecido testicular após o processo de criopreservação;
- 2.2.2 Determinar o efeito da técnica de vitrificação em superfície sólida (VSS) sobre o tecido testicular de cães por meio de análises de histomorfologia, histomorfometria e microscopia confocal de varredura à laser;
- 2.2.3 Determinar o efeito da técnica de congelamento lento automatizado (CLA) – curva 3 sobre o tecido testicular de cães por meio de análises de histomorfologia, histomorfometria e microscopia confocal de varredura à laser;
- 2.2.4 Comparar os achados relacionados as técnicas de vitrificação em superfície sólida (VSS) e congelamento lento automatizado (CLA) sugerindo qual melhor se adequa ao tecido testicular de cães domésticos.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Principais técnicas de criopreservação de tecido testicular de cães domésticos

I.D. LUZ; I. B. ACOSTA; F.R. MENDONÇA; A. S. VARELA JUNIOR; C. D. CORCINI

Submetido à revista URI Vivências

PRINCIPAIS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES DOMÉSTICOS

RESUMO: A criopreservação de tecidos é uma estratégia eficaz para preservar gametas, utilizando espermatogônias ou tecido testicular, mantendo o potencial reprodutivo de diversas espécies. Embora existam poucos estudos sobre a técnica em cães, o cão doméstico é um modelo experimental relevante para canídeos ameaçados. Objetivo: Verificar as principais técnicas que envolvem a conservação de material genético de cães através da criopreservação de tecido testicular. Metodologia: A pesquisa utilizou os descritores: criopreservação de tecido testicular, tamanho dos fragmentos, crioprotetores, congelamento lento e vitrificação. As buscas foram feitas em bases como Web of Science, Google Scholar, BTD, Medline e PubMed. Conclusão: A vitrificação foi a técnica mais promissora. O desafio é desenvolver protocolos que preservem o potencial espermatogênico do tecido, considerando a escassez de estudos sobre a técnica em cães.

PALAVRAS CHAVE: Criopreservação, Preservação de tecido testicular; Cães, Preservação do sêmen.

ABSTRACT: CRYOPRESERVATION OF CANINE SEMEN. Tissue cryopreservation is an effective strategy for preserving gametes by using spermatogonia or testicular tissue itself, thereby maintaining the reproductive potential of various species. Although there are few studies on this technique in dogs, the domestic dog is considered a relevant experimental model for endangered canid species. Objective: To identify the main techniques involved in the preservation of canine genetic material through testicular tissue cryopreservation. Methodology: The research was based on the following descriptors: testicular tissue cryopreservation, fragment size, cryoprotectants, slow freezing, and vitrification. Searches were conducted in databases such as Web of Science, Google Scholar, BTD (CAPES Theses and Dissertations Database), Medline, and PubMed. Conclusion: Vitrification proved to be the most promising technique. The main challenge is to develop cryopreservation protocols capable of maintaining the tissue's spermatogenic potential, considering the limited number of studies on this technique in dogs.

KEYWORDS: Cryopreservation, Preservation of testicular tissue; Dogs, Semen Preservation

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido testicular é uma técnica que pode facilitar a preservação do potencial reprodutivo de diferentes espécies animais (OLIVEIRA, 2015). Com o decorrer dos anos, o interesse pela criopreservação de tecido testicular tem se expandido devido ao sucesso de pesquisas paralelas por meio de transplante espermato gênico ou produção *in vitro* de espermatozoides e embriões (HONARAMOOZ, 2012).

O tecido testicular contém espermato gônias, células primárias que originam os espermatozoides através da espermatogênese, sendo caracterizada por processos de divisão e diferenciação celular. Tal tecido pode ser criopreservado e a espermatogênese pode ser completada *in vitro* após seu descongelamento (YOKONISHI et al., 2014). Com a descoberta da possibilidade de células espermato gênicas se diferenciarem e se multiplicarem *in vitro* e do desenvolvimento de técnicas reprodutivas como a microinseminação para fertilizar oócitos maduros com o intuito de obter descendentes saudáveis, estudos têm sido realizados para determinar os melhores métodos de criopreservar germoplasmas (LIMA et al., 2018a).

A criopreservação de fragmentos testiculares surge como uma ferramenta promissora para a reprodução assistida quando as técnicas convencionais não são aplicáveis, permitindo o armazenamento de fragmentos contendo grande número de células germinativas em vários estágios de desenvolvimento, incluindo células espermáticas indiferenciadas, que ao serem cultivadas, acabam por garantir uma produção ilimitada de espermatozoides (SILVA et al., 2019). Via de regra, quando animais são castrados ou morrem, o potencial reprodutivo presente nos testículos dos mesmos acaba sendo descartado, destarte resgatar tal material pode representar um recurso valioso à bancos de genes (SILVA et al., 2019).

O uso de agentes crioprotetores (ACP's) em protocolos de criopreservação testicular é um passo importante para a manutenção da viabilidade celular após o descongelamento do tecido, porque previnem danos causados durante o processo de descongelamento. Vários ACP's foram testados em protocolos de preservação de tecidos; entretanto, não foi relatada uma associação ideal ou um agente crioprotetor que possa ser usado para manter a qualidade e a viabilidade das células testiculares (UNNI et al., 2012).

A técnica também pode ser aplicada à preservação de material genético de animais sexualmente imaturos de alto valor zootécnico ou espécies ameaçadas com a extinção, além da restauração da fertilidade em pré-púberes submetidos a tratamento oncológico gonadotóxico (SANTOS, 2018). Criopreservar tecidos é uma estratégia eficiente para fornecer ferramentas de preservação de gametas, embora até o presente momento hajam poucos relatos na literatura envolvendo membros da família *Canidae*, sendo o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) um bom modelo experimental para canídeos em estado de vulnerabilidade (SANTOS, 2018).

Nesse sentido, com o presente estudo objetivou-se verificar as principais técnicas que envolvem a possibilidade de conservar material genético de cães através da criopreservação de tecido testicular. Como metodologia foi realizada coleta de dados embasada em artigos científicos pesquisados nas plataformas digitais: *Web of Science*, *Google Scholar*, Banco de Teses e Dissertações da Capes (BTD), Medline e Pubmed, foram utilizados os seguintes descritores para a pesquisa:

2. PRESERVAÇÃO DO TECIDO TESTICULAR

A pesquisa há muito se concentra na criopreservação do esperma da ejaculação. No entanto, esses métodos tornam-se ineficientes em espécies animais que morrem inesperadamente ou são castradas por razões médicas (COCCHIA et al., 2010). Embora existam avanços com a utilização de fragmentos testiculares para obtenção de células germinativas viáveis e funcionais, o estabelecimento de protocolos que possam ser utilizados na rotina clínica ainda não são uma realidade (LIMA et al., 2018b).

A preservação testicular pode ser realizada por meio da suspensão celular, por fragmentos de tecido ou a preservação da gônada inteira (MILAZZO et al., 2008), não obstante a suspensão celular é um método laborioso e prejudicial para a proliferação e diferenciação das células espermáticas, sendo preferível o uso de fragmentos para a execução da técnica. Sobre a possibilidade de criopreservar as gônadas inteiras, mesmo sendo viável por permitir a interação entre as células, ainda não apresenta relatos (MILAZZO et al., 2008).

Os testículos são órgãos reprodutivos nos quais os espermatozoides são produzidos e armazenados, local onde também ocorre a produção dos hormônios andrógenos. As gônadas reprodutivas masculinas são morfologicamente divididas em região tubular, onde estão inseridos os túbulos seminíferos e as células-tronco espermatogoniais, e região intertubular responsável por proteger os túbulos seminíferos além de corresponder a região de produção dos hormônios masculinos (JOHNSTON et al., 2001).

Na espermatogênese, células germinativas passam por divisão, diferenciação e meiose (O'DONNEL et al., 2001), após sofrem diversas alterações a nível funcional. O produto final desse processo é o espermatozoide, célula altamente diferenciada em estrutura e função, na qual, após sucessivos processos mitóticos, meióticos e pós-meióticos, forma-se uma célula capaz de transferir material genético do macho para a fêmea (O'DONNEL et al., 2001).

Enquanto as fases de mitose e meiose são cruciais para o desenvolvimento dos gametas masculinos, durante a fase pós-meiótica as espermátides passam pelo processo de metamorfose, incluindo remodelação da membrana plasmática, perda de grandes quantidades de citoplasma, formação da cauda ou aparelho flagelar, acrossoma, desenvolvimento do esperma e condensação da cromatina, que dá ao esperma uma capacidade de fertilização. Todo esse processo é cíclico e altamente coordenado e organizado de acordo com a variação celular (BRINSKO, 1999).

2.1 Criopreservação de tecido testicular

Em termos de preservação do sêmen, a técnica mais escolhida é a criopreservação, que utiliza diluentes para proteger e preservar o espermatozoide, que por sua vez é submetido a baixas temperaturas (FERREIRA, 2021).

Dentre as diversas biotecnologias reprodutivas, tem se destacado a criopreservação de esperma, visando sua utilização em inseminação artificial, fertilização e armazenamento *in vitro* por tempo indeterminado de material de alto valor genético, além de permitir o prolongamento artificial da vida reprodutiva de gametas masculinos reduzindo a incidência de doenças

transmitidas pelo acasalamento (ACIPRESTE, 2006). Corrobora Oliveira (2015) e explica que a criopreservação de gametas masculinos é uma alternativa para preservar o potencial reprodutivo dos animais e contribui para a formação de bancos de germoplasma.

De acordo com Quintanilha (1994) a criopreservação de sêmen canino está se tornando cada vez mais popular, pois permite o transporte de material genético dentro e fora do país. O interesse é diverso: clínico, econômico e zootécnico. O objetivo da conservação do sêmen é alcançar taxas de prenhez semelhantes após a inseminação artificial com a inseminação natural e também obter uma melhor utilização do ejaculado.

A criopreservação de tecido testicular surgiu como uma alternativa para preservação da fertilidade, principalmente em animais pré-púberes (GOOSSENS et al., 2008), permitindo a viabilidade indefinida do material genético presente nos testículos destes animais. Existem várias aplicações para o uso de tecido testicular criopreservado em protocolos experimentais e clínicos em medicina/ciência reprodutiva, mas poucos são os trabalhos publicados sobre o assunto em cães, os trabalhos pioneiros sobre o assunto datam apenas de 2016 (CARVALHO, 2016). A criopreservação de fragmentos de tecido é uma tecnologia que permite a recuperação de esperma existente de material de doador adulto além de oferecer a possibilidade da produção de esperma a partir de amostras criopreservadas de tecido testicular imaturo (OLIVEIRA, 2015).

2.2 Tamanho dos fragmentos testiculares

A ação dos agentes crioprotetores nos fragmentos testiculares pode estar diretamente relacionada ao tamanho dos mesmos durante o processo de criopreservação (HONARAMOOZ, 2012). Estudos com objetivo de avaliar especificamente tal influência no sucesso da criopreservação em cães até o presente momento não foram realizados, em contrapartida, em felinos domésticos tais já foram conduzidos. Recentemente, foi demonstrado por Macente e colaboradores (2017) que fragmentos com 3 mm³ de tamanho apresentam maiores danos pós-descongelamento quando comparados àqueles com 5 mm³ (MACENTE et al., 2017).

O tamanho do fragmento usualmente varia entre 0,3 mm³ (THUWANUT et al., 2013) a 3 mm³ (SILVA et al., 2017). Carvalho (2016) ao criopreservar tecido testicular canino utilizou fragmentos de 3 a 5 mm³, já Santos e colaboradores fizeram uso de fragmentos de 4mm³ em sua pesquisa, isto posto, estudos diferem tanto em relação as espécies quanto aos protocolos de criopreservação utilizados (SANTOS et al., 2018)

Corroborando com Santos, grande parte dos estudos recentes sobre preservação em cães tem feito o uso do intervalo de 3 a 5 mm³. Tal achado pode ser justificado pelo fato de que fragmentos com tais dimensões permitem uma melhor penetração dos agentes crioprotetores (ANTONIO et al., 1998).

2.3 Crioprotetores

Massip (1987) explica que para proteger o esperma durante o congelamento e descongelamento, crioprotetores devem ser adicionados ao meio. A interação dessas substâncias com a membrana celular garante sua estabilização e evita danos aos espermatozoides, pois possuem ponto de congelamento bem menor que a água, o que evita o acúmulo e a formação de cristais de gelo intracelulares.

Para que as células possam ser armazenadas em nitrogênio (N₂) líquido a -196 °C, possíveis danos durante o processo de criopreservação precisam ser evitados. Para isso são utilizadas substâncias crioprotetoras que podem penetrar ou não a célula, através da membrana plasmática, evitando a formação de cristais de gelo dentro da mesma (CABODEVILA e TERUEL, 2001).

Segundo Holt (2000) *apud* Cipreste (2006) vários métodos têm sido descritos para melhorar a eficácia de diluentes e crioprotetores usados na refrigeração e criopreservação de esperma canino. As razões pelas quais um meio diluído ou crioprotetor confere mais ou menos proteção a um determinado esperma masculino se deve ao fato de que existem diferenças na composição das membranas entre espécies, raças e até mesmo indivíduos da mesma espécie.

Nesse sentido, de acordo com Martins (2018), apesar do efeito benéfico dos crioprotetores, a sobrevivência de 100% das células não é garantida porque dependendo da concentração utilizada no meio de diluição, eles têm um efeito tóxico sobre elas como estresse osmótico, danos a membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias além de estresse oxidativo e fragmentação de DNA (CRISTER et al., 1996). Alguns exemplos de crioprotetores são: glicerina, propilenoglicol, propanodiol, dimetilsulfóxido, sendo que os mais utilizados em cães são o etilenoglicol e a dimetilformamida.

Fator importante a ser destacado consiste no tempo entre a recuperação das células e sua posterior reintrodução, o que implica na criopreservação dessas células para mantê-las viáveis. Este método de criopreservação de tecido gonadal pode ser realizado por criopreservação, pelo método convencional de congelamento lento ou pelo método de vitrificação (ABRISHAMI et al., 2010b, POELS et al., 2012, *apud* SANTOS, 2018).

O uso de diferentes crioprotetores e suas respectivas combinações podem minimizar e controlar os processos nocivos que ocorrem nas células espermáticas durante o congelamento e descongelamento e, conseqüentemente, permitir melhores taxas de prenhez (PAPA et al., 2003). Apesar do tecido testicular possuir diversas proteínas como glutatona peroxidase, redutase e S-transferase, superóxido desmutase (BAUCHÉ et al., 1994; GU e HECHT, 1996) envolvidas em mecanismos antioxidantes, o uso da criopreservação é parte integrante do processo de preservação do mesmo.

O desafio, porém, é promover um protocolo de criopreservação do tecido testicular capaz de manter o potencial tecidual para a plena espermatogênese. São muitos os benefícios desta técnica, que vão desde a preservação da fertilidade de animais pré-púberes submetidos a terapias gonadotóxicas, à sua associação com técnicas de transplante, xenotransplante ou cultura, até algumas aplicações na preservação da biodiversidade de espécies ameaçadas de extinção.

Santos (2018) e Silva, et al. (2019) verificaram em seus respectivos trabalhos que a associação de ACP's acarretam em melhores resultados após descongelamento. A associação dos crioprotetores etilenoglicol (EG) e dimetilsulfóxido (DMSO) tem se destacado na criopreservação por meio de vitrificação de tecido testicular em cães púberes e pré púberes, uma vez que resultou na melhor preservação da estrutura histológica do tecido testicular (TEIXEIRA et al., 2021).

2.4 Técnica de congelamento lento

O congelamento convencional, habitualmente conhecido como congelamento lento, tem sido utilizado mais frequentemente em estudos do que a vitrificação, embora ambos os métodos estejam sendo testados (WYNS et al., 2013). Outra técnica que também tem sido utilizada em alguns experimentos é o congelamento rápido (BUARPUNG et al, 2013). O congelamento lento caracteriza-se pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e pela redução gradativa da temperatura controlada por um freezer programável (TRAVERS et al., 2011a).

Pukazhenth et al. (2015), Andrae et al. (2021) e Picazzo et al. (2022) descreveram o processo de congelamento para fragmentos testiculares. O mesmo consiste em duas etapas principais: primeiramente os frascos criogênicos contendo os fragmentos e o meio de congelamento são alocados em um freezer programado para redução gradual da temperatura até -80°C, o mesmo possui uma curva de resfriamento de aproximadamente -1°C por minuto. Por conseguinte, os criotubos são imersos em nitrogênio líquido (N₂) a -196°C e armazenados até o momento do processamento das amostras.

No congelamento lento, a água do meio extracelular é cristalizada em consequência baixa gradual da temperatura, aumentando a concentração de solutos fora da célula e induzindo a água do meio intracelular (LEIBO, 1977). Carvalho (2016) explica que ao escolher um protocolo de congelamento apropriado, a heterogeneidade do tecido testicular deve ser considerada, uma vez que as células espermatogênicas, de Sertoli e de Leydig, possuem citoplasma rico e, conseqüentemente, são mais suscetíveis aos processos de congelamento e descongelamento.

Essas células possuem grande quantidade de água em seu interior, o que aumenta o risco de formação de cristais intracitoplasmáticos que causam a destruição das organelas. No entanto, outras alterações também podem ocorrer, nomeadamente desidratação celular excessiva causada por choque osmótico após a formação de cristais de gelo extracelulares e ruptura do citoesqueleto após exposição a baixas temperaturas (CARVALHO, 2016)

2.5 Técnica de vitrificação

A vitrificação envolve o resfriamento ultrarrápido da solução e a subsequente formação de um estado vítreo dentro e fora da célula (SANTOS et al., 2010). Gouk e colaboradores (2011) levantaram a hipótese de que a criopreservação por vitrificação pode ser um método melhor do

que o método tradicional de criopreservação para conservar o tecido testicular imaturo de camundongos.

Entre os resultados, os autores constataram que o método de vitrificação foi superior ao congelamento pelo método convencional e preservou a arquitetura e integridade celular ao evitar a formação de cristais de gelo extracelulares. Eles também concluem que a vitrificação do tecido testicular é uma estratégia eficiente na preservação de células-tronco espermatogênicas, necessitando de menos tempo e menor custo agregado.

No entanto, de acordo com Lima *et al.* (2018b), a vitrificação pode causar danos estruturais ao tecido testicular; portanto, os crioprotetores são utilizados para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação nos tecidos, uma vez que evitar tais criolesões durante as etapas de preservação são os maiores desafios enfrentados na aplicação dessas biotécnicas reprodutivas (BUARPUNG *et al.*, 2013).

A vitrificação é uma técnica amplamente disseminada na criopreservação de tecido gonadal feminino, mas apesar das múltiplas formas de vitrificação tecidual (CARVALHO *et al.*, 2011), nas pesquisas de criopreservação testicular, a técnica descrita foi a de vitrificação por superfície sólida (ABRISHAMI *et al.*, 2010b). Caracterizada pela exposição de fragmentos de tecido a uma solução de equilíbrio com concentrações reduzidas de ACP's por 5 a 10 minutos, sendo a concentração inicial composta por 50% do volume total de ACP. Os fragmentos são então expostos a uma solução de vitrificação contendo 100% dos agentes durante 5 a 10 minutos.

A concentração final é elevada, superior a 30% (NOHALEZ *et al.*, 2015), após a exposição do tecido testicular à solução de vitrificação, os fragmentos são colocados em uma superfície metálica mantida acima do nitrogênio líquido em uma caixa isolada, o que permite que o tecido seja resfriado de forma ultrarrápida promovendo assim a vitrificação. Após o resfriamento, esses fragmentos são colocados em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido (LIMA *et al.*, 2018a).

2.6 Desafios da criopreservação do tecido testicular

Um dos grandes desafios na criopreservação do tecido testicular está relacionado composição testicular, as espermatogônias, os túbulos seminíferos e as células de Sertoli presentes no parênquima tornam o parênquima testicular extremamente heterogêneo, consequentemente suscetível aos processos de congelamento e descongelamento. Isso ocorre porque o citoplasma dessas células contém uma quantidade elevada de água, tornando-as mais suscetíveis às crioinjúrias, tornando um desafio promover protocolos de criopreservação que mantenham a fertilidade através da realização da espermatogênese (MOTA *et al.*, 2012b).

É de extrema importância que os métodos utilizados nas avaliações de viabilidade forneçam informações precisas sobre a preservação estrutural e funcional das amostras criopreservadas, tornando-se assim uma ferramenta eficaz para medir a qualidade da amostra preservada, bem como os possíveis danos causados pela criopreservação (LIMA, *et al.*, 2018a).

No entanto, os resultados da fertilização com sêmen criopreservado são diversos, o que se deve principalmente à perda da qualidade espermática após o congelamento e descongelamento (SCHAFFER-SOMI e AURICH, 2006, apud MARTINS, 2018).

2.7 Desafios e perspectivas da criopreservação de tecido testicular

Considerando o grande potencial dos fragmentos testiculares, distintas são as possibilidades para a utilização dos mesmos em protocolos experimentais e clínicos na ciência e medicina reprodutiva. Mas para a criação de bancos de germoplasmas objetivando asseverar tal material e sequencialmente reestabelecer a espermatogênese, se faz necessário refinar os protocolos de congelamento e cultivo de células espermáticas.

Ao se estipular um protocolo eficaz de criopreservação de tecido, onde o mesmo apresente uma espermatogênese ativa, se torna possível a recuperação de espermatozoides ou espermátides alongadas que podem ser utilizadas de formas distintas, tais como inseminação artificial e fertilização de oócitos por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Com esse acontecimento, se torna possível a recuperação de espermatozoides de doadores adultos, além de abrir portas para a produção de células espermáticas de tecido imaturo preservado.

Devido as particularidades relacionadas à fisiologia reprodutiva e composição celular entre as espécies, bem como em relação à indivíduos da mesma espécie - como por exemplo a maturidade sexual, onde indivíduos maduros são mais vulneráveis às crioinjrias devido a diversidade celular-, não é possível a obtenção de um protocolo universal. Estudos que avaliem as distintas técnicas além de concentrações e associações de agentes crioprotetores se fazem necessárias para determinar o melhor protocolo a ser seguido na espécie canina em questão.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste estudo foi revisar as principais técnicas relacionadas à preservação de material genético canino por meio da criopreservação de tecido testicular. Verificou-se que, atualmente, as abordagens mais utilizadas são o congelamento convencional e a vitrificação, sendo esta última apontada como a mais promissora para a preservação de fragmentos testiculares. O principal desafio, no entanto, é estabelecer um protocolo eficaz de criopreservação que assegure a manutenção do potencial tecidual para a espermatogênese completa. Apesar da escassez de literatura específica sobre a técnica em cães, o estudo oferece uma contribuição relevante ao reunir e analisar os dados disponíveis, servindo como base para pesquisas futuras na área.

4. REFERÊNCIAS

ABRISHAMI, M. et al. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. **Theriogenology**, v.73, n.1, p.86-96, 2010b.

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.

ANTONIO, H. et al. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas as ciências biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, v.1, 1998.

BAUCHÉ, F.; FOUCHARD, M.H.; JÉGOU, B. Antioxidant system in rat testicular cells. **FEBS Letters**, v.349, n.3, p.392-396, 1994.

BUARPUNG, S. et al. Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.79, n.1, p.149-158, 2013.

BRINSKO, S. P. Fisiologia Reprodutiva do Macho. In.: CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária. 2ª ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2014. p. 401.

CABODEVILA, J.; TERUEL, M. Criopreservación de embriones bovinos. In: PALMA, G. A.; BREM, G. Biotecnología de La Reprodución. 1ª ed. **Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária**, 2001. p.149-167.

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.

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.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v.18, n.1, p.1-8, 2010.

EDDY, E. M. The Spermatozoon. In.: KNOBIL & NEILL'S. Physiology of Reproduction. 3ª ed. **San Diego: Elsevier**, 2006. p. 3-54.

GOOSSENS, E. et al. Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. **Fertility and Sterility**, v.89, n.3, p.725-727, 2008.

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.

GU, W.; HECHT, N.B. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. **Journal of Andrology**. v.17, ed.3, p.256-262, 1996.

CRITSER, E. S. et al. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm motility: exposure to 7,5 % glycerol por 15 min causa queda acentuada. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 2, p. 335-341, 1996.

HONARAMOOZ, A. Cryopreservation of testicular tissue. In: Current Frontiers in Cryobiology. 2^a ed. **California**, 2012. p. 209-28.

JOHNSTON, S.D. et al. Canine and feline theriogenology. 1^a ed. **Philadelphia**: Saunders, 2001. p.592.

LEIBO, S. P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. **Ciba Foundation Symposium**, v.18-20, n.52, p.69-96, 1977.

LIMA, D.B.C. et al. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p.1-7, 2018.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P. D.; AQUINO-CORTEZ, A.; LEIVA-REVILLA, J.; SILVA, L. D. M. D. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, v.110, p.110-115, 2018a.

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. **PLoS One**, v.13, n.11, 2018b.

LIMA, D. B. C. Influência da vitrificação sobre a estrutura, metabolismo e composição celular do tecido testicular de gatos domésticos pré púberes. 101f, 2019. **Tese (Doutorado em Reprodução e Sanidade Animal)** - Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Fortaleza, Fortaleza.

LUPPI, M. M. C. P. Avaliação andrológica de cães de raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular. 109f, 2006. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

MACENTE, B. I.; TONIOLO, G. H.; APPARICIO, M.; MANSANO, C.; THOMÉ, H. E.; CANELLA, C. L.; TOZATO, M.; GUTIERREZ, R. R. Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissues. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.2, p.242-247, 2017.

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. **Human Reproduction**, v.23, n.1, p.17-28, 2008.

MOTA PC, EHMCKE J, WESERNSTROER B, GASSEI K, RAMALHO-SANTOS J, 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, 2012b.

NAGASHIMA, J. B.; SONGSASEN, N. Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. **Animals**, v.11, n.3, p.1-23, 2021.

NOHALEZ, A. et al. Effects of two combinations of cryoprotectants on the *in vitro* developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. **Theriogenology**, v.84, p.545-552, 2015.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

OLIVEIRA, E. C. S. Criopreservação de tecido testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.109-110, 2015.

OLIVEIRA, S. C. E. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. 60f, 2003. **Dissertação (Mestrado em Reprodução)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Belo Horizonte.

PAPA, R. T. C.; SANTOS, F. O.; MACEDO, L. P.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JR., J. A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

PICAZO, C. M.; CASTAÑO, C.; BÓVEDA, P.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; VELÁZQUEZ, R.; PEQUEÑO, B.; ESTESO, M. C.; GADEA, J.; VILLASVERDE-MORCILLO, S.; CERDEIRA, J., & SANTIAGO-MORENO, J. 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.

PUKAZHENTHI, B.S.; NAGASHIMA, J.; TRAVIS, A.J.; COSTA, G.M.; ESCOBAR, E. N.; FRANÇA, L. R.; et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **PloS One**, v.10, n.1, e.15, 2015.

QUINTANILHA, A. M. P. N. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: NELSON, R. W. & COUTO, C. G. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. 1ª ed. **Rio de Janeiro: Roca**, 1994. p. 526-529.

SANTOS, J. F.P. Criopreservação de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*). 50f, 2018. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós - Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Garanhuns.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Animal Reproduction Science**, v.102, n.1-2, p.1-13, 2007.

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: **Proceedings of the 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington DC**, 2017, 114p.

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.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v.12, supl. 1, p.27-35, 2018.

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.

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, 2011a.

UNNI, S. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v.97, n.1, p.200-208, 2012.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v.3, n.15, p.22-26, 1998.

WYNS, C. et al. Vitrication du tissu testiculaire: évolution or révolution? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.41, n.9, p.558-561, 2013.

YOKONISHI, T. et al. Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues. **Nature Communications**, v.5, p.1-6, 2014.

ZIMMERMANN, M.; SANTOS, T. E.; FIDELIS, A. A. G.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Dimetilformamida e água de coco na criopreservação de sêmen canino. **Bioscience Journal**, v.23, n.1, p.96-100, 2007.

3.2 Artigo 2

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

LUZ, I. D.; VARELA JÚNIOR, A. S.; PINTO, C. V.; MENDONÇA, F. R.; CORCINI, C.

Aceito para publicação na revista Scire Salutis.

RESUMO

A relação próxima entre humanos e cães tem impulsionado a busca por maneiras de preservar características desejáveis em diferentes raças, incluindo a criopreservação do tecido testicular como uma técnica promissora para auxiliar na reprodução quando técnicas convencionais de coleta seminal não são viáveis. Essa abordagem possibilita a produção ilimitada de gametas masculinos e a criação de bancos de germoplasma, com aplicações cada vez mais importantes em animais de alto valor zootécnico e espécies ameaçadas com a extinção. O estudo atual foca na metodologia para criopreservar tecido testicular de cães domésticos, fundamental para manter a fertilidade e a diversidade genética. Após a dissecação cuidadosa dos testículos, o tecido é fragmentado e submetido a congelamento lento ou vitrificação, ambos utilizando crioprotetores para minimizar os danos celulares. A vitrificação em superfície sólida (VSS) se destaca por sua eficiência e custo reduzido. Após o processo de criopreservação, os tecidos são gradualmente aquecidos com tempo e temperatura controladas afim de evitar danos celulares. Diversas análises, incluindo microscopia confocal a laser e avaliação histomorfológica, são empregadas para verificar a viabilidade e a integridade dos tecidos bem como sua capacidade metabólica após a criopreservação. Esse estudo contribui para o avanço do conhecimento nessa área, fornecendo informações essenciais para pesquisas futuras e aplicações clínicas.

Palavras chave: criopreservação; tecido testicular; cães; microscopia confocal; histomorfologia.

ABSTRACT

The close bond between humans and dogs has spurred efforts to preserve desirable traits in different breeds, including the cryopreservation of testicular tissue as a promising technique to assist in reproduction when conventional seminal collection methods are not feasible. This approach enables the unlimited production of male gametes and the establishment of germplasm banks, with increasingly significant applications in high-value livestock and endangered species conservation. The current study focuses on the methodology for cryopreserving testicular tissue from domestic dogs, essential for maintaining fertility and genetic diversity. Following careful dissection of the testes, the tissue is fragmented and subjected to either slow freezing or vitrification, both utilizing cryoprotectants to minimize cellular damage. Solid-surface vitrification (SSV) stands out for its efficiency and cost-effectiveness. After the cryopreservation process, tissues are gradually warmed with controlled time and temperature to prevent cellular damage. Various analyses, including laser scanning confocal microscopy and histomorphological evaluation, are employed to assess tissue viability, integrity, and metabolic capacity post-cryopreservation. This study contributes to advancing knowledge in this field, providing essential information for future research and clinical applications.

Keyword: cryopreservation; testicular tissue; dogs; confocal microscopy; histomorphology.

INTRODUÇÃO

Os cães desempenham um papel fundamental na vida humana, frequentemente considerados parte integrante da família. A evolução cultural e psicológica dos seres humanos está profundamente entrelaçada com a presença desses animais, reconhecida como uma integração benéfica para a saúde física e mental (KITAGAWA & COUTINHO, 2004). A estreita conexão entre humanos e cães tem levado a intervenções voltadas para aspectos reprodutivos desses animais, visando perpetuar características desejáveis em diferentes raças. Isso tem resultado em uma busca contínua por métodos que ajudem no aprimoramento genético (MESADRI, 2017).

Criopreservar fragmentos de tecido testicular têm se consolidado como uma técnica futura para a reprodução assistida uma vez que permite a produção ilimitada de gametas masculinos e a consequente criação de bancos de germoplasmas. Inclusive nos últimos anos, o interesse pela criopreservação de tecido testicular tem crescido devido ao sucesso de pesquisas paralelas com produção *in vitro* ou por meio de transplante espermatozôico (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., 2010a) 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.

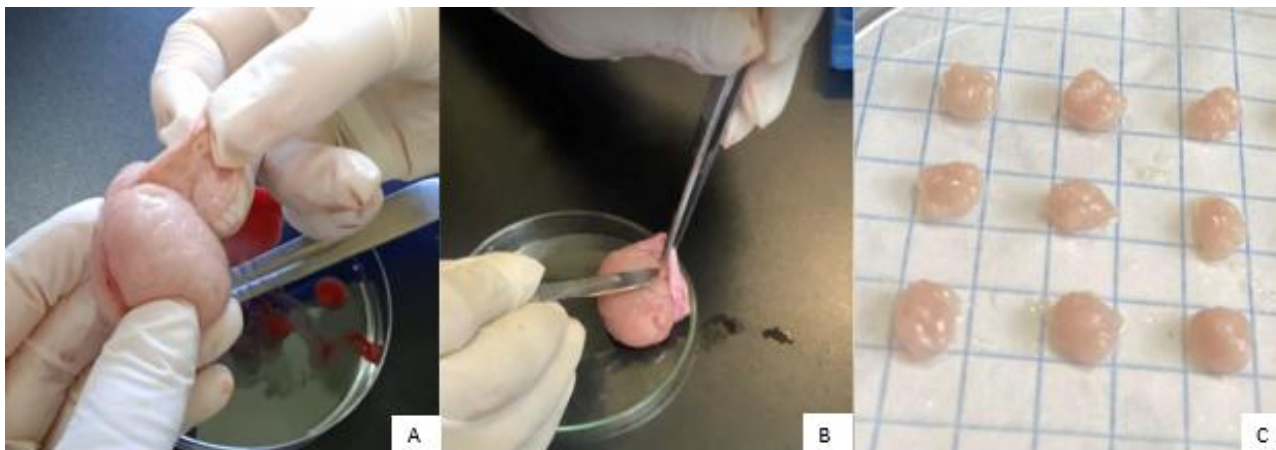
MATERIAIS E MÉTODOS

Transporte de amostras e confecção de fragmentos de tecido testicular

Os complexos testículos-epidídimos caninos foram acondicionados em tubos plásticos (50ml) 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 dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,4 M de etilenoglicol (EG).

O meio de vitrificação tem em sua composição 2,8 M de cada um dos agentes crioprotetores DMSO e EG, 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, 1,4M de DMSO e 1,4M de EG

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 em 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 (ACP's) e um equipamento com temperatura ajustável dentro de um freezer -80°C.

Para a congelação lenta, coloca-se os fragmentos em criotubos contendo ACP's 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 10x10x10cm) 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 630x sob imersão em óleo, e cada fragmento analisado terá três regiões de interesse selecionadas aleatoriamente.

O laser de 405nm foi empregado para excitar a sonda Hoechst 33342, com a faixa de emissão utilizada entre 420-480nm. Para a sonda JC-1, dois lasers diferentes foram utilizados: o laser de 488nm, com intervalo de emissão de 505-555nm para mitocôndrias altamente funcionais e de 565-615nm para mitocôndrias com baixa atividade mitocondrial. O mesmo laser de 405nm, em outros contextos, foi empregado para quantificar a

emissão da sonda H2DCFDA no intervalo de 500-570nm. O laser de 552nm foi utilizado para excitar o iodeto de propídio, cuja detecção ocorreu no intervalo de 590-660nm. No caso do Bodipy C11, o laser de 488nm foi utilizado para a excitação, com a fluorescência sendo quantificada nos intervalos de 500-550nm para lipídios peroxidados e de 551-620nm para lipídios não peroxidados.

Lipoperoxidação Lipídica (LPO)

Os fragmentos são alocados em eppendorff's 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 eppendorff's contendo 20 µL de Hoechst 33342 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 eppendorff's 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 eppendorff's 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 eppendorff's contendo 20 µL de Hoechst 33342 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.

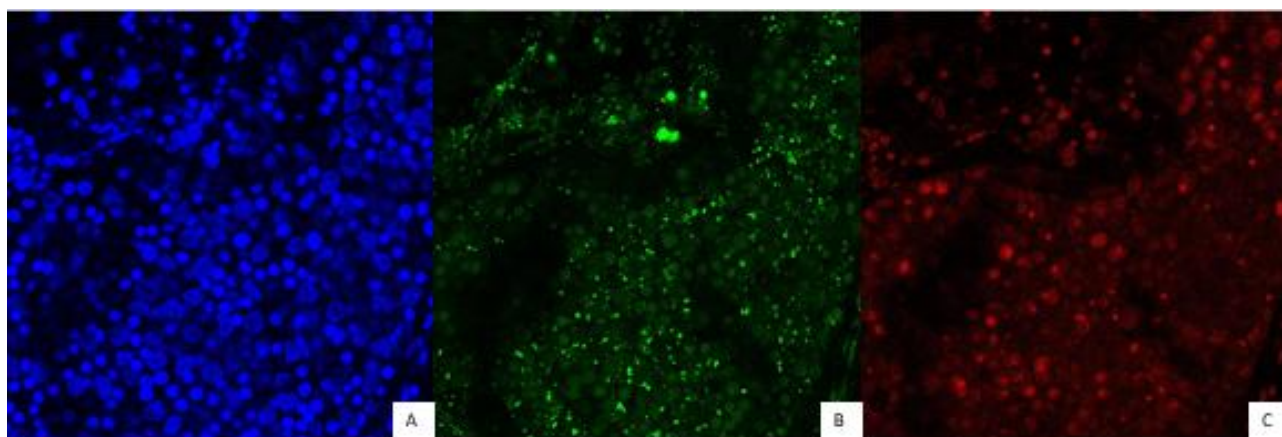
Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)

Os fragmentos são alocados em eppendorff's 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 eppendorff contendo 40 µL de iodeto de propídio e 20 µL de Hoechst 33342 em 940 µL 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.

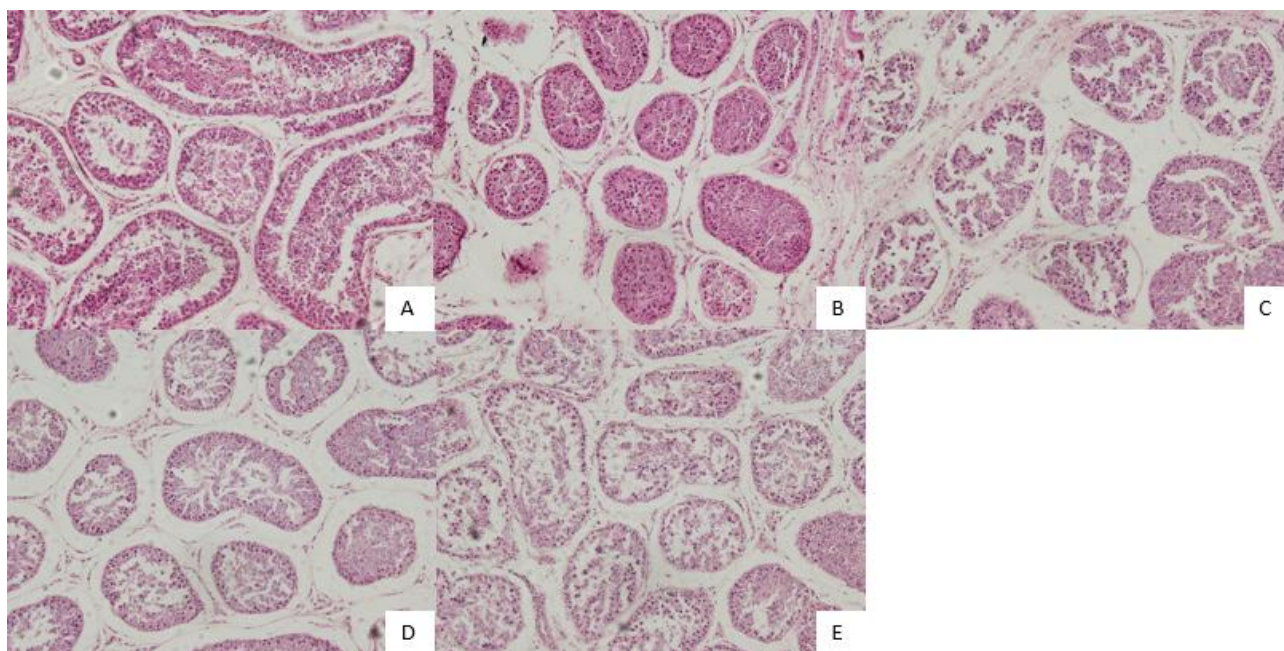
Figura 2. Imagens de fluorescência obtidas através da avaliação de túbulos seminíferos de cães domésticos em microscopia confocal de varredura a laser referente ao estudo de espécies reativas ao oxigênio. (a) identificação da sonda Hoestcht 33342; (b) identificação da sonda H2DCFDA; (c) identificação 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 (5µm), 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.,2017b) onde foram avaliados cinco parâmetros: separação celular da membrana basal, retração da membrana basal, distinção espermatogônias/Sertoli, visualização nuclear e condensação nuclear (Tabela 1).

Tabela 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 e colaboradores (2022), os complexos testículos-epidídimos caninos devem ser acondicionados em tubos plásticos (50ml) 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 ACP's 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 e LUCCI, 2010). A inclusão de crioprotetores no processo de congelação 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 congelação.

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 (EG) 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, 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 & HIATT, 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 ACP's objetivando diminuir a toxicidade causada pelos mesmos. Durante essa etapa, ocorre a formação de grande quantidade de cristais de gelo intracelulares, o que pode acarretar em 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., 2011a), 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 24h (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, Gouk e colaboradores (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 da mesma. 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 em 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 (0,50M, 0,25M e 0M). 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 BIBLIOGRÁFICAS

- ABRISHAMI, M. et al. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. **Theriogenology**, v.73, n.1, p.86-96, 2010a. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.08.004.
- BARBOSA, A.P.M. et al. Cryopreservation of bovine spermatogenic cells using different protective molecules. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.230, p.293-296, 2011. <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000200014>.
- CARVALHO, MARIA DA CONCEICAO. Criopreservação de Tecido Testicular de Cães Avaliação Histológica e Ultraestrutural. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Recife, 2016.
- CURABA, M. et al. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertility and Sterility*, v.95, n.6, p.9-12, 2011b. Available from: . Accessed: Feb. 23, 2016. doi: 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**. 3ª Edição. 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:10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.

HONARAMOOZ, A. Cryopreservation of testicular tissue. In: Current Frontiers in Cryobiology. 2ª ed. **California**, 2012. p. 209-28. doi: 10.5772/32338.Z

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

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., AQUINO-CORTEZ, 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, 2017a. doi: 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: 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: 10.1177/41.3.8429207.

MESADRI, S.B. **Critério para desempenho de cães em competições de estrutura e beleza**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

MOTA, P.C.; EHMCKE, J.; WESERNSTROER, B.; GASSEL, K.; RAMALHO-SANTOS, J.; 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, 2012b. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.042

PICAZO, C. M.; CASTAÑO, C.; BÓVEDA, P.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; VELÁZQUEZ, R.; PEQUEÑO, B.; ESTESO, M. C.; GADEA, J.; VILLASVERDE-MORCILLO, S.; CERDEIRA, J., & SANTIAGO-MORENO, J. 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:10.1016/j.theriogenology.2022.07.020

POTHANA, L. et al. 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: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.028.

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.1- 15, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0123957.

SANTOS, J. F.P. Criopreservação de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*). 50f, 2018. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós - Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Garanhuns.

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.doi: 91875323

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: **Proceedings of the 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington DC**, p.114, 2017.

TEIXEIRA, Diego Oliveira, et al. 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://dx.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: 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, 2011a. doi: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: 10.1093/humrep/den27

3.3 Artigo 3

CRYOPRESERVATION OF TESTICULAR TISSUE FROM PUBERTAL DOGS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) COMPARING SLOW FREEZING AND SOLID SURFACE VITRIFICATION METHODS

Inaraã Dias da Luz; Antonio Sergio Varela Junior; Gustavo Desire Antunes Gastal;
Mauro Pereira Soares; Lisiane Ferreira Lessa; Carolina Viegas Pinto; Fernanda
Rodrigues Mendonça; Izani Bonel Acosta ; Carine Dahl Corcini

Será submetido à revista CryoLetters

CRYOPRESERVATION OF TESTICULAR TISSUE FROM PUBERTAL DOGS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) COMPARING SLOW FREEZING AND SOLID SURFACE VITRIFICATION METHODS

Inaraã Dias da LUZ¹; Antonio Sergio VARELA JUNIOR²; Gustavo Desire Antunes GASTAL³; Mauro Pereira SOARES⁴; Lisiane Ferreira LESSA⁵; Carolina Viegas PINTO¹; Fernanda Rodrigues MENDONÇA¹; Izani Bonel ACOSTA¹ and Carine Dahl CORCINI^{1*}

¹Federal University of Pelotas - Pelotas/RS - inadiasmedvet@gmail.com; carolinaviegas18@gmail.com; nandarm.vet@gmail.com; izanibonel@hotmail.com; corcined@gmail.com

²Federal University of Rio Grande - Rio Grande/RS - varelajras@gmail.com

³National Institute of Investigacion Agropecuaria INIA/Estacion Experimental La Estanzuela - Uruguay/UY - ggastal@inia.org.uy

⁴Regional Diagnostic Laboratory/Federal University of Pelotas – Pelotas/RS - gmpsoares@gmail.com

⁵Rio Grande City Hall/Municipal Secretariat for Animal Causes – lisiane.lessa@riogrande.rs.gov.br

* Correspondence address: Carine Dahl Corcini, Federal University of Pelotas, Pelotas/RS, University Campus s/n – Post Office Box 354 – Zip Code 96010-900.

Abstract

BACKGROUND: Cryobiology is essential for preserving tissues and restoring reproductive function, but its application in the canine species is not fully understood. **OBJECTIVE:** To compare solid surface vitrification (SSV) versus slow freezing (ASF) for canine testicular tissue. **MATERIALS AND METHODS:** Testes from 15 dogs (15 fragments/5×5×5mm/animal) were distributed into 3 groups: control (CG), SSV, and SF. The fragments were cryopreserved, stored in nitrogen for 15 days, thawed, and analyzed using fluorescent probes for reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), and mitochondrial membrane potential (JC-1), as well as cell separation and basal membrane retraction; distinction between spermatogonia and Sertoli cells, nuclear visualization and condensation, diameter, and basal membrane retraction of seminiferous tubules. **RESULTS:** SSV better preserved mitochondrial membrane potential (0.64 ± 0.05 vs. 0.43 ± 0.02) and generated less ROS (0.56 ± 0.04 vs. 0.96 ± 0.06) than ASF. The CG had the highest LPO index (77.15 ± 0.77 vs. 70.34 ± 2.42 vs. 69.34 ± 2.15), with less basal membrane retraction (77.15 ± 0.77). ASF had a higher average (2.26 ± 0.10 vs. 1.30 ± 0.99) in the differentiation between spermatogonia and Sertoli cells, visualization (2.73 ± 0.08 vs. 1.26 ± 0.10), and nuclear condensation (2.40 ± 0.09 vs. 1.30 ± 0.09) when compared to the SSV group. It also had a higher average in diameter (119.58 ± 4.45 vs. 150.82 ± 5.19) and basal membrane retraction of seminiferous tubules (48.21 ± 2.36 vs. 32.64 ± 2.16). **CONCLUSION:** SSV showed better efficacy than SF for the preservation of domestic dog testicular tissue.

Keywords: cryopreservation; domestic dogs; slow freezing; testicular tissue; vitrification.

INTRODUCTION

Cryobiology is the study of the preservation of biological materials or systems at temperatures below those

normally experienced, applied to microorganisms, plants, cells, tissues, gametes, and embryos of all animal species (1). In this context, tissue cryopreservation emerges as a highly

effective strategy for preserving gametes, representing a promising solution for assisted reproduction. This method allows for the restoration of reproductive and endocrine function after tissue thawing, significantly contributing to advances in reproductive medicine (2).

This technique enables the storage of tissue fragments containing a large number of germ cells at various developmental stages, including undifferentiated spermatozoa, which can be cultured to ensure unlimited sperm production (3). Additionally, it is crucial to consider the reproductive potential present in animal testes, which is often wasted when animals die or are castrated. Thus, the possibility of rescuing this material represents an invaluable resource for gene banks (4; 3).

The act of cryopreserving tissues has already been used in different species. In domestic animals, such as dogs and cats, the main goal is the preservation of genetic material for assisted reproduction or biomedical studies. In livestock, it has been particularly useful for preserving important genetic lineages for breeding programs, with studies conducted in cattle (5), swine (6), and sheep (7). In endangered animals, such as big cats, primates, and other species of conservation interest, testicular tissue cryopreservation plays a key role in maintaining genetic diversity (8), as it directly aids assisted reproduction programs, providing new possibilities for reproductive management and the recovery of declining populations.

In humans, it has been applied primarily to preserve fertility in individuals undergoing cancer treatments, genetic or autoimmune conditions affecting fertility, or in prepubertal children who do not yet produce mature sperm (9). Preclinical studies have shown that it is possible to mature spermatogonia *in vitro* from cryopreserved tissue, but large-scale application in humans remains experimental (10).

Cryopreservation can be performed using different methods, with the main ones being slow freezing and vitrification

(9). Although vitrification is a widely used technique, slow freezing is the most commonly applied, with both having been tested in different mammalian species (11). There are few studies on the use of vitrification for cryopreserving canine testicular tissue, with the first study conducted by Carvalho in 2016. Among the vitrification methods described for canine testicular tissue cryopreservation—whether from adult (12) or prepubertal individuals (13)—solid surface vitrification (SSV) stands out as a promising technique.

However, although slow freezing and vitrification share similar steps, they can produce different outcomes in sample preservation (1), mainly due to differences in applied temperatures, processing times, and concentrations of cryoprotectants used. In slow freezing, low concentrations of cryoprotectants are used, and cooling occurs in a controlled manner, gradually reducing the temperature (14). Vitrification, on the other hand, is characterized by the use of high concentrations of cryoprotectants, combined with extremely rapid and abrupt cooling, transforming the sample into a glass-like state (13).

The goal of using low temperatures in tissue preservation is to maintain the structure and metabolism of living cells and tissues. However, this process can result in damage and even sample inviability (15). In slow freezing, the main damage occurs due to the formation of intra- and extracellular ice crystals, as well as effects related to changes in the liquid phase concentration (16).

In contrast, the vitrification process has major drawbacks, including toxicity from high concentrations of cryoprotectants, which can cause osmotic injury, in addition to the high cost of these agents. However, it is important to consider that both techniques use cryoprotectants, and their effects vary depending on the sample type, volume, viscosity, and cooling/warming rates applied (17).

Therefore, this study aims to compare a vitrification method (SSV) versus a slow

freezing (SF) method in terms of canine testicular tissue quality parameters.

MATERIALS AND METHODS

Collection, handling, and testicular fragmentation

Testes from 15 pubertal dogs (2 to 8 years old), mixed-breed, were obtained after routine bilateral orchiectomy during a sterilization campaign. To identify dogs suitable for the cryopreservation process, two evaluative parameters were used: physical examination (body temperature, heart and respiratory rates, intestinal movements, mucous membranes, and capillary refill time) and complete blood count (erythrogram, leukogram, and platelets). Animals with results within physiological standards for the canine species were included in the study.

The testis-epididymis complexes were placed in 50 ml plastic tubes containing 30 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and kept refrigerated at approximately 4°C (18), being processed within 24 hours. Testicular manipulation was performed at 20°C in PBS, starting with the dissection of the tunica albuginea and underlying testicular tissue (2 to 3 washes in PBS to remove blood residues and other impurities (19)). The testes were then divided in half along a sagittal plane.

For fragmentation, each testicular pair was sectioned in a grid pattern using a scalpel and dissection forceps at room temperature, resulting in 15 fragments per animal, each measuring 5x5x5 mm (12). Cryopreservation of fragments from the mediastinal portion of the testes was recommended due to the distribution of seminiferous tubules (20). After processing, the fragments were divided into 3 treatments: (a) Control (GC); (b) Solid surface vitrification (SSV); (c) Automated slow freezing (ASF) – Curve 3 (CRYOGEN HSE® (Neovet Indústria, Comércio e Serviços Ltda.®, Uberaba/MG, Brazil)).

Samples corresponding to the GC group were immediately subjected to a fluorescent probe staining protocol to assess reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), and mitochondrial membrane potential (JC-1) using laser scanning

confocal microscopy. For histological analysis, slides of testicular fragments were prepared to evaluate histomorphological parameters by optical microscopy and histomorphometric parameters by phase contrast microscopy

Cryopreservation medium

PBS was used as the transport and maintenance medium for the fragments. For solid surface vitrification (SSV), an equilibrium solution was prepared with minimum essential medium (DMEM; 51445C, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany), supplemented with 0.25M sucrose, 10% fetal bovine serum (FBS; F6178, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany), 1.4M dimethyl sulfoxide (DMSO; D8418, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany), and 1.4M ethylene glycol (EG). The vitrification medium was composed of 2.8M of each cryoprotectant, DMSO and EG, in addition to 0.50M sucrose, DMEM, and 10% FBS (19).

For the automated slow freezing (ASF) method, the composition included 10% FBS, DMEM, 1.4M DMSO, and 1.4M EG (18).

Solid surface vitrification (SSV)

The fragments were placed in wells of a cell culture plate containing 2mL of the equilibrium solution, where they remained submerged for 10 minutes, and in the vitrification solution for 5 minutes, at room temperature.

Afterward, the fragments were placed on a metal surface (made with aluminum foil measuring 10×10×10cm) and the surface was placed in contact with liquid nitrogen to promote vitrification (13), being immediately transferred to cryotubes and stored in cryogenic tanks.

Automated slow freezing (ASF)

The testicular fragments were placed in 2mL cryogenic vials containing 0.5mL of the freezing medium. After preparation, the vials containing the fragments and the medium were positioned in racks in the Automated Semen and Embryo Freezer CRYOGEN HSE® (Neovet Industry, Commerce and

Services Ltd.®, Uberaba / MG, Brazil). To start the process, curve 3 of freezing was used, following the protocol designed for bovine embryos, briefly described here: (i) positive stabilization phase at 22°C, followed by a free fall in temperature to -6°C; (ii) seeding after 10 minutes; (iii) initial negative stabilization of 2 minutes, ensuring gradual control of the thermal transition. Freezing begins with a cooling ramp of -0.50°C per minute until reaching -32°C, in the second phase of freezing the cooling rate remains at -0.50°C per minute until reaching -32°C again. Finally, the temperature is maintained at this condition for 5 minutes in the final negative stabilization, ensuring thermal uniformity. It was decided not to perform manual seeding, thus avoiding the possibility of human error. This step refers to the process of initiating the formation of ice crystals in a controlled manner in a sample before complete freezing. Subsequently, the vials were transferred to liquid nitrogen tanks for storage until thawing.

Thawing and tissue analysis

The samples were thawed in a water bath for 1 minute at 37°C (3), after being stored in nitrogen tanks for 15 days.

Afterward, they were subjected to 3 different protocols of staining with fluorescent probes for subsequent evaluation of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), and mitochondrial membrane potential (JC-1).

In the protocol for ROS evaluation, the fragments were placed in Eppendorf tubes containing 20µL of the H2DCFDA probe (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) and 980µL of PBS for 30 minutes, kept away from light and incubated at 37°C. After the incubation period, the fragments were transferred to another Eppendorf tube containing 40µL of propidium iodide (PI; P4170, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) and 20µL of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) in 940µL of PBS for 5 minutes at 37°C, protected from light (21).

For LPO evaluation, fragments were placed in Eppendorf tubes containing 4µL of the Bodipy C11 probe (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) along with 996µL of PBS, kept away from light for 30 minutes, and incubated at 37°C. After the staining time, the fragments were relocated to Eppendorf tubes containing 20µL of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) and 980µL of PBS and incubated for 5 minutes at 37°C, protected from light (22).

To evaluate JC-1, the fragments were placed in Eppendorf tubes containing 4µL of the JC-1 probe (Molecular Probes®, Invitrogen, Ltd., Paisley UK) along with 996µL of PBS, kept away from light for 30 minutes, and incubated at 37°C. After the staining time, they were then relocated to Eppendorf tubes containing 20µL of Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) and 980µL of PBS, keeping them in the dark for 5 minutes at 37°C for incubation (23). The determination of membrane potential was determined by the following formula: mean fluorescence intensity of red (high mitochondrial membrane polarization) / mean fluorescence intensity of green + mean fluorescence intensity of red (high mitochondrial membrane depolarization). After each protocol, the fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature, then transferred to PBS solution for 1 hour also at room temperature and protected from light. The samples were kept refrigerated and protected from light until the time of image acquisition using the microscope.

Subsequently, the samples were prepared for histological analyses, and thus, slides of the testicular fragments were made. The processing performed was the one used in classical histology and consisted of: dehydration, clearing, paraffin impregnation, blocking, microtomy (5µm), deparaffinization, and staining with hematoxylin-eosin (HE) to be analyzed by optical and phase contrast microscopy (24).

Confocal laser scanning microscopy

In the evaluation of the images the SP5 Leica® microscope (Leica Microsystems®, Wetzlar, Germany) was used, where the parameters related to fluorescence intensity, such as laser energy, signal detection, and pinhole size, were kept constant in all measurements. The fragments were examined with a 630x oil immersion objective, and in each fragment, three regions of interest were randomly selected.

To excite the Hoechst 33342 probe, a 405nm laser was used, with an emission range between 420-480nm. For the JC-1 probe, two different lasers were used: a 488nm laser, with an emission range of 505-555nm for mitochondria with high mitochondrial activity, and another 552nm laser with an emission range of 565-615nm for mitochondria with low mitochondrial activity. The same 488nm laser, in another context, was used to quantify the emission of the H2DCFDA probe in the range of 500-570nm. The 552nm laser was used to excite propidium iodide, with detection occurring in the range of 590-660nm. In the case of Bodipy C11, the 488nm laser was used for excitation, with fluorescence quantified in the ranges of 500-550nm for peroxidized lipids and 551-620nm for non-peroxidized lipids.

Histomorphology of testicular tissue

After the preparation of the histological slides, they were evaluated through visual analysis and photographed using a Nikon Eclipse E200® optical microscope (Nikon®, Tokyo, Japan) at different magnifications (100×, 200×, and 400×).

A scoring classification adapted (25), as described in Table 1 (Tab. 1), was performed, where the samples were classified according to the degree of tubule retraction and detachment of the basal lamina into: (A) grade I when the injury is minimal, i.e., focal detachments occur; (B) grade II when larger detachments and loss of germinal epithelium of the tubules occur, (C) and grade III when extensive areas of detachment are present,

(D) with loss of germinal epithelium and cellular rarefaction of the tubules.

Histomorphometry of testicular tissue

Five images of randomly chosen fields from each histological slide corresponding to the different treatments were captured using the Cellsens® image acquisition and analysis software (Olympus®, Tokyo, Japan). An Olympus DP72® phase contrast microscope (Olympus®, Tokyo, Japan) with a resolution of 1360x1024 pixels at 10× magnification was used. After image capture, the ImageJ® program (National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used to perform the analyses related to the morphometry of the seminiferous tubules. Measurements of the diameter of 20 seminiferous tubules and 20 points of basal membrane retraction were taken in each previously captured image.

Statistical Analysis

The results were presented as mean $\pm$ standard error of the mean. All analyses were performed using the Statistix 10.0 program (Miller Landing Rd Tallahassee, FL 32312). The parameters of lipid peroxidation, reactive oxygen species, and mitochondrial membrane potential, parametric data, one-way ANOVA, and Tukey HSD test for mean comparison. The parameters of cell separation and basal membrane retraction, differentiation between spermatogonia and Sertoli cells, nuclear visualization, and condensation presented as non-parametric, were analyzed using Kruskal-Wallis ANOVA and Dunn's test. For the parameters of diameter and basal membrane retraction of seminiferous tubules, parametric data, one-way ANOVA and LSD test for mean

Table 1. Classification of the integrity of cellular compartments of dog testes (adapted from Lima et al. 2017).

Parameters	Characteristic's	Score
Integrity of the epithelial lining of the seminiferous tubules		
Cell separation from the basement membrane	No separation	1
	Separation <75%	2
	Separation >75%	3
Basement membrane retraction	No retraction	1
	Minor retraction	2
	Severe retraction	3
Integrity of spermatogonial nuclear		
Spermatogonial/Sertoli distinction	Easy to distinguish	1
	Difficult to distinguish	2
	Impossible to distinguish	3
Nuclear visualization	Easy to view	1
	Difficult to view	2
	Impossible to view	3
Nuclear condensation	No pyknotic nuclei	1
	Pyknosis <40%	2
	Pyknosis >40%	3

comparison were performed. A significance level of 5% was used.

RESULTS

Confocal laser scanning microscopy

The SSV treatment showed higher ($P < 0.05$) mitochondrial membrane potential and lower ($P < 0.05$) ROS compared to the other groups. Interestingly, the CG showed higher ($P < 0.05$) LPO compared to the other groups (Tab. 2).

Histomorphology of testicular tissue

The data related to the histological evaluations of testicular tissue scores are shown in Table 3 (Tab. 3). The scores were similar ($P > 0.05$) between the groups. However, basement membrane retraction was lower ($P < 0.05$) in the CG compared to the other groups. The ASF group presented higher scores ($P < 0.05$) for differentiation between spermatogonia and Sertoli cells, nuclear visualization and condensation compared to the other groups.

The histological characteristics of the testicular tissue in the CG, SSV and ASF groups are illustrated in Figures 1, 2, 3, 4 and 5. In Figure 1, images A-D represent the

Table 2. Results related to the analyses of ROS, JC-1, and LPO of canine testicular tissue expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean.

		Experimental groups		
Parameters		CG	SSV	ASF
Mitochondrial potential (JC-1)	membrane	44.17 $\pm$ 2.15% ^B	64.44 $\pm$ 05.51% ^A	43.20 $\pm$ 2.00% ^B
Reactive oxygen species (ROS)		1.00 $\pm$ 0.06 ^A	0.56 $\pm$ 0.04 ^B	0.96 $\pm$ 0.06 ^A
Lipid peroxidation (LPO)		77.15 $\pm$ 0.77 ^A	70.34 $\pm$ 2.42 ^B	69.34 $\pm$ 2.15 ^B

Different superscript uppercase letters in the same row indicate a statistical difference between treatments ($P < 0.05$).

control group with normal-looking seminiferous tubules, basal lamina adhered to the tubule and the presence of sperm in the tubular lumen. Figure 2 shows fragments from the SSV group, where images E-F show preserved spermatogonia and easy visualization of sperm in the lumen of the seminiferous tubules. Images G-H show fragments classified as grade I, where the seminiferous tubules are detached from the basal lamina in some points, with sperm in the tubular lumen. Figure 3 shows fragments from the SSV group, images I-J show fragments with grade II, where we see a greater number of seminiferous tubules detached from the basal lamina, and the tubular epithelium appears rarefied and

fragmented compared to fragments from group I, with detachment of the basal lamina and germinal epithelium. In the K-L images, fragments classified as grade III presented large areas of seminiferous tubules detached from the basal lamina and the tubular epithelium was quite rarefied and fragmented, with nuclear pyknosis, loss of cellularity and cellular remains. These alterations were interspersed with areas containing apparently normal seminiferous tubules.

Figure 4 shows fragments from the ASF group, M-N showing seminiferous tubules with decreased cellularity of the spermatogonial layer, spaces between the cells and rare sperm found in the lumen of the

Table 3. Data regarding the evaluations of scores of canine testicular tissue scores expressed as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean

		Experimental groups		
Parameters (scores 1-3)		CG	SSV	ASF
Cell separation from the basal membrane		1.63 $\pm$ 0.08 ^A	2.13 $\pm$ 0.16 ^A	2.13 $\pm$ 0.20 ^A
Basal membrane retraction		1.43 $\pm$ 0.06 ^B	2.06 $\pm$ 0.12 ^A	2.03 $\pm$ 0.15 ^A
Distinction between spermatogonia / Sertoli		1.03 $\pm$ 0.01 ^B	1.30 $\pm$ 0.09 ^B	2.26 $\pm$ 0.10 ^A
Nuclear visualization		1.10 $\pm$ 0.05 ^B	1.26 $\pm$ 0.10 ^B	2.73 $\pm$ 0.08 ^A
Nuclear condensation		1.30 $\pm$ 0.10 ^B	1.30 $\pm$ 0.09 ^B	2.40 $\pm$ 0.09 ^A

Different superscript capital letters on the same line mean that there was a statistical difference between treatments ($P < 0.05$).

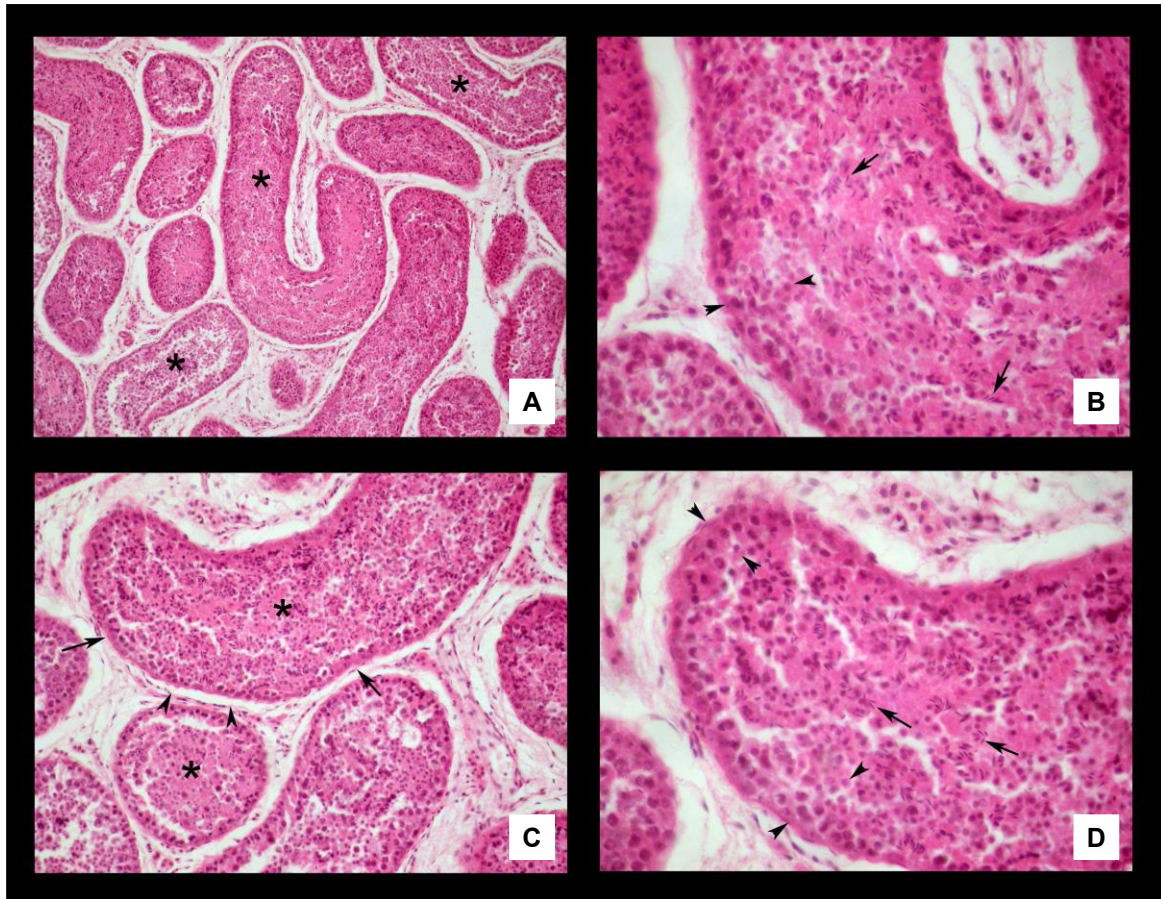


Figure 1. Photographs A, B, C, D. **Control, HE.** (A) Dog. Control. Seminiferous tubules showing normal appearance (*). HE. 100X. (B) Dog. Control. Seminiferous tubules showing sperm in the lumen (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X. (C) Dog. Control. Seminiferous tubules showing normal appearance (*). Detail of the tubule attached to the basal lamina (arrow) and a portion of the seminiferous tubule detached from the basal lamina (arrowhead) HE. 100X. (D) Dog. Control. Seminiferous tubules showing sperm (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X.

tubules. In O-P, fragments with greater retraction and a large number of intracytoplasmic vacuoles, with desquamation of the germinal epithelium, hypocellularity, nuclear pyknosis, cellular remains and, in some tubules, the deposition of calcium salts indicating the process of necrosis of these completely necrotic tubules. Figure 5 shows the fragments of the ASF group. In the Q-R images, the fragments presented a large number of tubules detached from the basal lamina, with loss of the germinal epithelium, epithelial necrosis and cell rarefaction, observing pyknotic cells, necrosis and areas without epithelial lining in the germinal layer, with large spaces without cell lining. In the S-T images, a large number

of tubules detached from the basal lamina, with extensive areas without germinal cells, presence of pyknosis, necrosis, cell debris and hypocellularity.

Histomorphometry of testicular tissue

The fragments of the ASF group showed a smaller ($P < 0.05$) diameter of the seminiferous tubule and greater ($P < 0.05$) basal membrane retraction of the seminiferous tubule compared to the other groups, as shown in Table 4 (Tab. 4).

DISCUSSION

The SSV treatment stood out for showing better results for mitochondrial

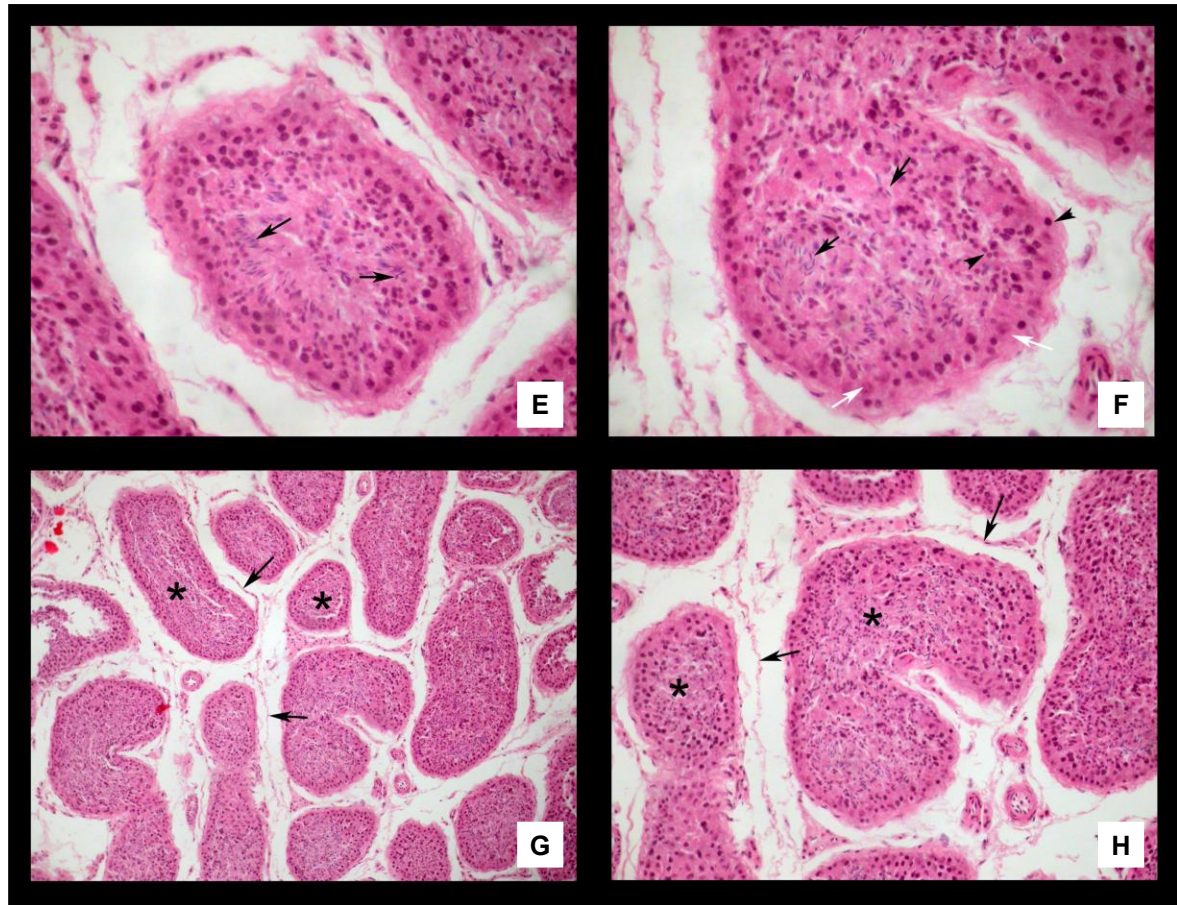


Figure 2. Photographs **E, F, G, H. Vitrification, HE.** **(E)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubules presenting sperm (arrow) HE 400X. **(F)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubules presenting sperm (arrow). Spermatogonia (between arrows). Sertoli cells. HE 400X. **(G)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade I retraction, where the seminiferous tubules can be observed detached from the basal lamina in some points (arrow). HE 100X. **(H)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubule (*) presenting sperm in the tubular lumen and classified as grade I retraction. Basal lamina detached in some points (arrow). HE 200X.

membrane potential compared to the CG and ASF groups. This result suggests that SSV may maintain a greater presence of viable, metabolically active cells with efficient mitochondria in ATP production and highly polarized. This finding is in line with a study indicating that spermatozoa with high mitochondrial membrane potential remain viable and with progressive motility for prolonged periods, even in substrate-free media, suggesting that endogenous metabolism is sufficient for their maintenance (26).

In the same sense, the fragments subjected to SSV showed lower levels of ROS compared to the other groups. It is

known that the cryopreservation process can induce oxidative stress in testicular tissue due to the generation of reactive oxygen species, causing cellular damage and thus affecting tissue viability (27). It is worth noting that ROS play complex roles in canine (mammalian) testicular tissue, which has antioxidant defense mechanisms, such as enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and non-enzymatic molecules (vitamin E, vitamin C, glutathione) that neutralize excess ROS and protect testicular cells (28). Although at controlled levels they are necessary for normal cellular processes, including spermatogenesis (29), high levels can lead to

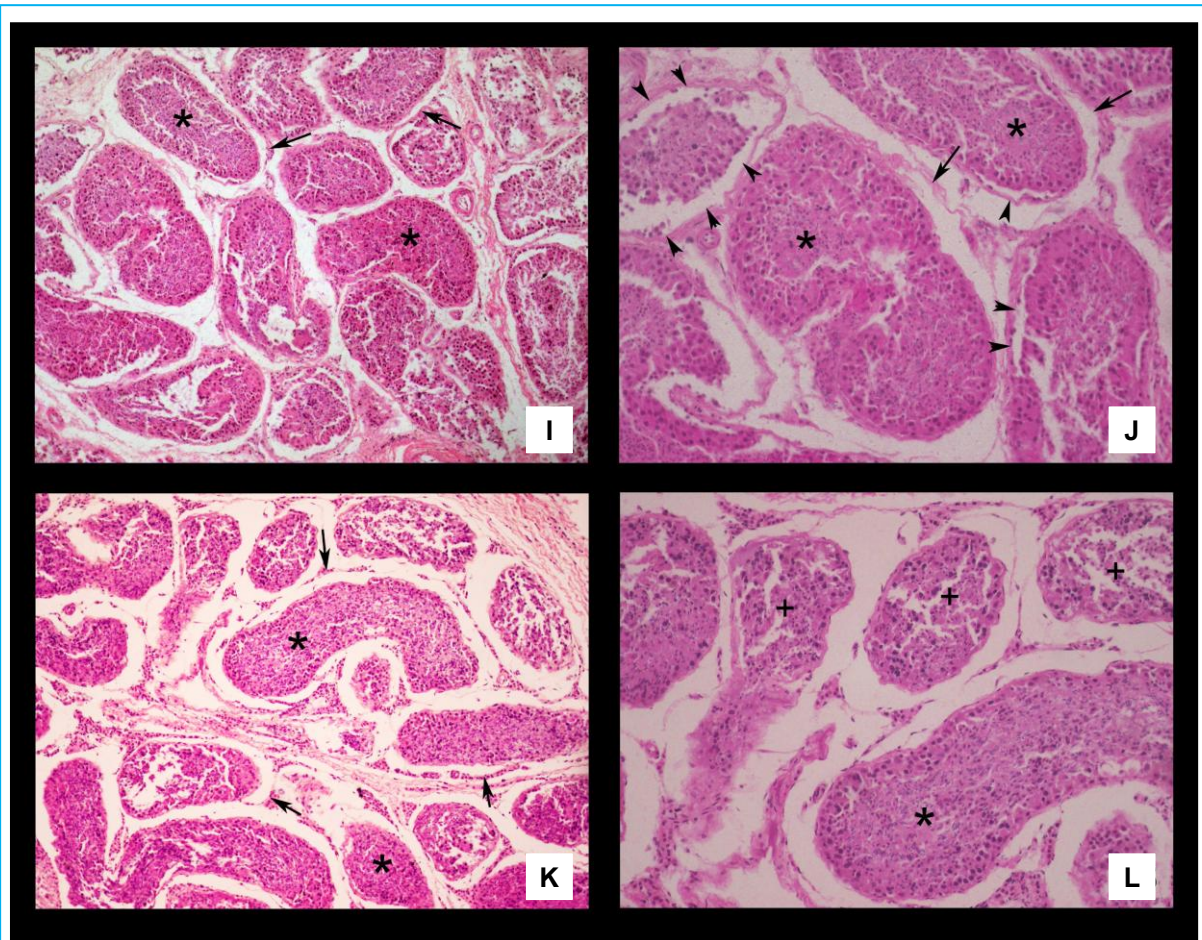


Figure 3. Photographs I, J, K, L. **Vitrification, HE.** **(I)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade II retraction, where a greater quantity of seminiferous tubules detached from the basal lamina can be observed (arrow). The tubular epithelium is rarefied and fragmented. HE 100X. **(J)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubule (*) presenting grade II retraction, where detachment of the basal lamina can be observed (arrow) and also the presence of detachment of the germinal epithelium (arrowhead). HE 200X. **(K)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction, where large areas of seminiferous tubules detached from the basal lamina can be observed (arrow). The tubular epithelium is quite rarefied and fragmented. HE 100X. **(L)** Dog. Vitrification. Seminiferous tubules (*) showing grade III retraction, where tubules (+) with nuclear pyknosis, loss of cellularity and cellular remains interspersed with apparently normal seminiferous tubules (*) can be observed. Large areas of seminiferous tubules are detached from the basal lamina (arrow). The tubular epithelium is quite rarefied and fragmented. HE 100X.

oxidative stress, causing damage to testicular cells, including germ cells, Sertoli cells, and Leydig cells due to changes such as DNA fragmentation, apoptosis, lipid peroxidation, and protein denaturation (30; 31). Therefore, this reduction in ROS levels in the SSV group indicates that this treatment generated less stress to the cells, resulting in lower production or accumulation of intracellular ROS.

Germ cells are particularly vulnerable to oxidative stress due to the high concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in

their membranes. To avoid oxidation of PUFA, the DMEM medium composed of various exogenous antioxidant substances helps to efficiently cryopreserve canine testicular tissue by controlling the production of reactive oxygen species. As a result, the fragments of the CG group showed higher lipid peroxidation compared to the SSV and ASF groups. DMEM, not used in the CG, promoted in the fragments subjected to SSV and ASF an effective stagnation of oxidative stress, thus avoiding the increase in lipid peroxidation and consequently improving

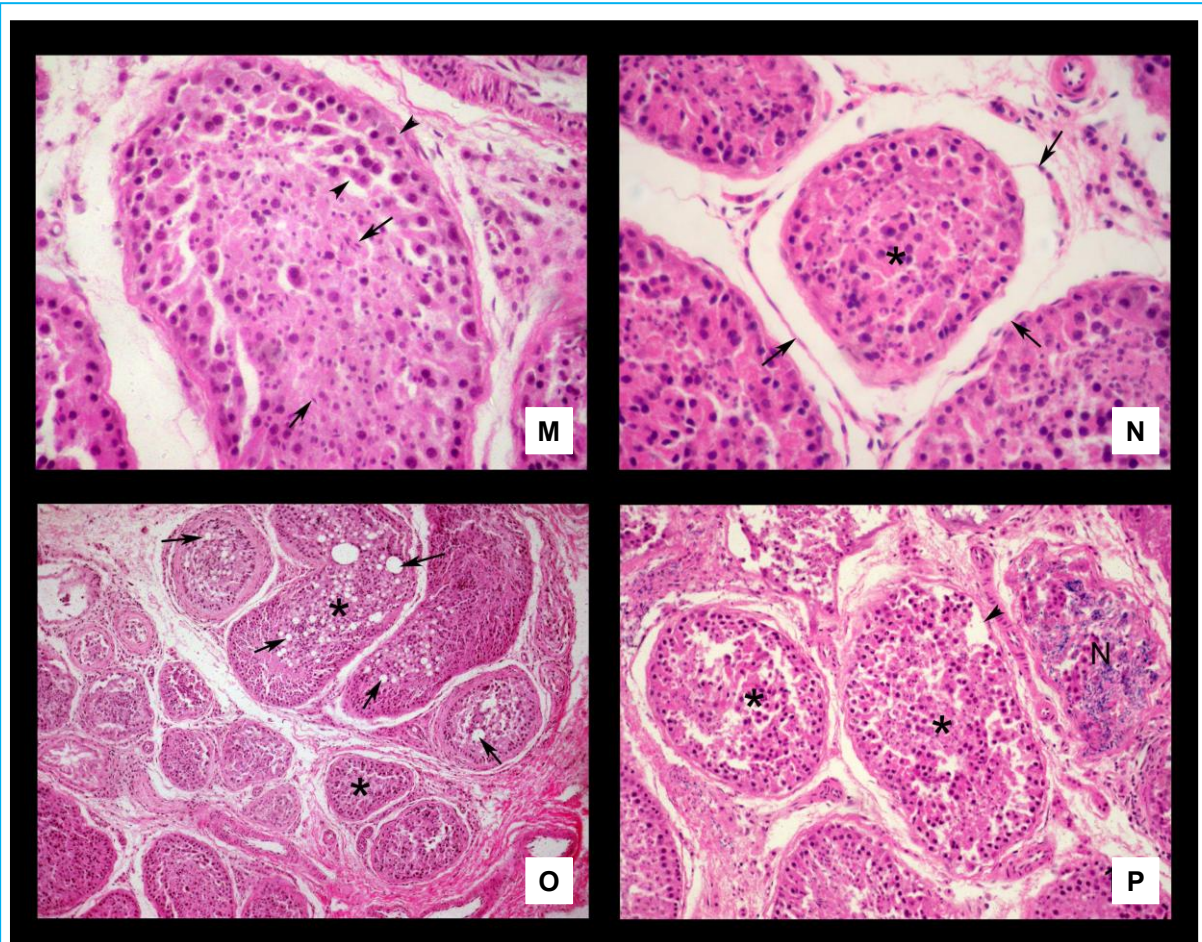


Figure 4. Photographs **M, N, O, P.** **Slow freezing, HE. (M)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubule showing decreased cellularity of the spermatogonial layer, with clear spaces between cells. Few spermatozoa (arrow). Spermatogonia (between arrows). HE 400X. **(N)** Dog. Slow freezing. Retracted seminiferous tubule (*), completely detached from the basal lamina and without spermatozoa in the lumen. HE 400X. **(O)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) showing grade I retraction and large quantity of cytoplasmic vacuoles (arrow). HE 100X. **(P)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) showing grade I retraction and desquamation of the germinal epithelium (arrowhead), with hypocellularity, nuclear pyknosis and cellular debris observed. Presence of calcium salt deposition in a necrotic seminiferous tubule indicated by the letter N. HE 200X.

tissue preservation. Lipids, fundamental components of cell membranes, are extremely prone to oxidation by free radicals, and when oxidized, they can form reactive compounds such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE), highly reactive, which end up triggering a cascade of oxidation reactions and permanent injuries to the integrity and fluidity of the membrane, in the functionality of proteins, resulting in dysfunction or loss of functional capacity (32).

The basal membrane retraction in the CG was associated with a lower value compared to the SSV and ASF groups, as

expected; ASF and SSV showed similarities in the analyzed variable. It is known that tissue cryopreservation results in basal membrane retraction, compromising the structural integrity of seminiferous tubules. This phenomenon is linked to the reduction of mitochondrial polarization, resulting in lower energy generation, lower capacity to respond to cellular stressors, and negative impacts on the maintenance of cellular morphology (33).

Spermatogonia and Sertoli cells are two distinct cell types present in seminiferous tubules, each performing crucial functions in spermatogenesis (34). The SSV was similar

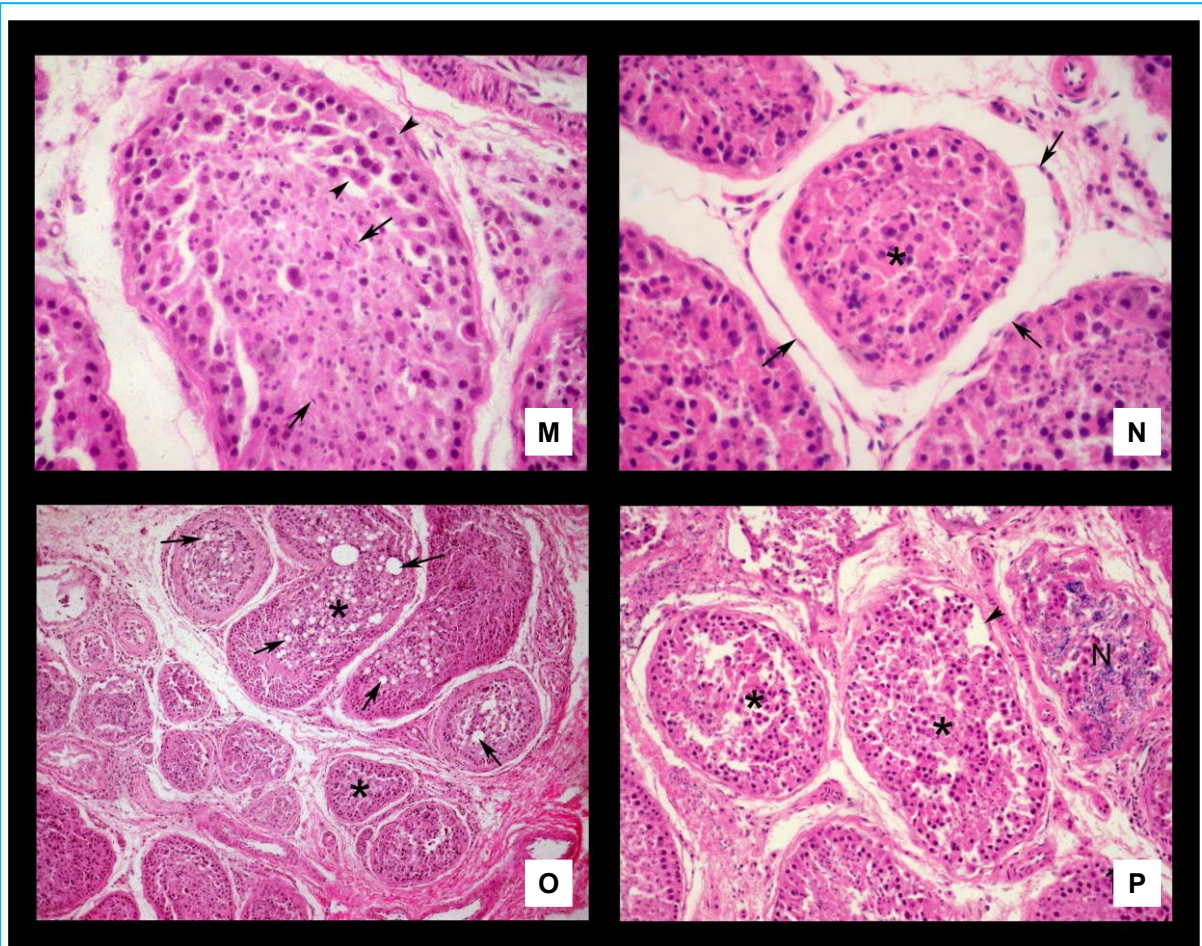


Figure 5. Photographs Q, R, S, T. **Slow freezing, HE. (Q)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade II retraction, where a large quantity of tubules detached from the basal lamina (arrow) can be observed. The seminiferous tubules present loss of germinal epithelium (arrowhead), with epithelial necrosis and cellular rarefaction, and areas without epithelial lining can be observed (+). HE 100X. **(R)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade II retraction, where total retraction of the seminiferous epithelium is observed, with hypocellularity, pyknotic cells and large spaces without cellular lining (arrowhead). HE 200X. **(S)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction, where a large quantity of tubules detached from the basal lamina (arrow) can be observed. Several seminiferous tubules present a scarce quantity of cells while some still maintain partially preserved architecture. HE 100X. **(T)** Dog. Slow freezing. Seminiferous tubules (*) presenting grade III retraction where few cells remain in the germinal layer, with pyknosis, cellular remains and epithelial rarefaction. HE 200X.

to the CG for the differentiation between spermatogonia and Sertoli cells; while the ASF group showed a higher classification for cell differentiation. However, even with better visualization and identification of these cells, the seminiferous tubules of the ASF group showed a significant reduction in the cellularity of the spermatogonial layer, with clear visualization of spaces between cells and rare spermatozoa in the tubular lumen. Changes in the morphology of these cells are directly linked to the deterioration of the reproductive health of the tissue (35).

Nuclear visualization and condensation are crucial elements in the evaluation of reproductive health and in understanding spermatogenesis processes. Fragments subjected to ASF showed higher nuclear condensation, indicating the existence of pyknotic cells with irreversible condensation of nuclear chromatin, suggesting apoptosis or cellular degeneration, leading to changes in sperm viability and the effectiveness of the spermatogenesis process (36).

The fragments subjected to ASF showed a larger diameter of seminiferous tubules

Table 4. Data related to the histomorphometric evaluations of canine testicular tissue expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean.

Parameters	Experimental groups		
	CG	SSV	ASF
Diameter of seminiferous tubule	145.72 $\pm$ 3.66 ^A	150.82 $\pm$ 5.19 ^A	119.58 $\pm$ 4.45 ^B
Basal membrane retraction of seminiferous tubule	22.82 $\pm$ 0.64 ^C	32.64 $\pm$ 2.16 ^B	48.21 $\pm$ 2.36 ^A

Different superscript uppercase letters in the same row indicate a statistical difference between treatments ($P < 0.05$).

compared to the SSV and CG groups. The diameter of the tubules is a relevant measure of reproductive health, which can be influenced by factors such as age, reproductive status, and the general health of the animal (37). Therefore, the ASF method showed worse results for the preservation of the normal diameter (150 to 250 micrometers) of seminiferous tubules, considered physiological in healthy adult dogs (38).

The SSV and ASF methods showed changes related to the retraction of the membrane of seminiferous tubules compared to the CG. This result was expected, as the CG did not undergo the critical process of preservation by vitrification or slow freezing. However, the ASF showed greater retraction, suggesting inferior tissue preservation after the freezing and thawing process. It is worth noting that the retraction of the membrane of seminiferous tubules in dogs is often associated with testicular degeneration, inflammation, or exposure to toxic agents, leading to impaired spermatogenesis and altered testicular architecture (38).

CONCLUSIONS

Canine testicular tissue cryopreservation directly impacts fundamental parameters such as cell viability, seminiferous tubule integrity, mitochondrial function, and oxidative stress

levels. Notably, fragments subjected to the SSV technique demonstrated significantly superior results: they exhibited higher mitochondrial membrane potential (JC-1), reduced oxidative stress (ROS) and lipid peroxidation (LPO), as well as lower rates of pyknotic and apoptotic cells. Nuclear morphology was also better preserved, with adequate condensation and visualization, indicating maintained cellular integrity. Additionally, the preservation of seminiferous tubule diameter and reduced tubular membrane retraction were observed, in contrast to the ASF group. These findings reinforce the efficacy and potential of SSV as a highly promising method for canine testicular tissue preservation, offering better conditions for maintaining cellular structure and function after cryopreservation.

Acknowledgements: The authors thank the Federal Universities of Rio Grande (FURG) and Pelotas (UFPel), CEME-SUL/FURG, the Comparative Animal Reproduction Study Group (RAC), the Municipal Governments of Pelotas/RS and Rio Grande/RS along with their respective dog and cat sterilization units, as well as the funding agencies CAPES, CNPq, and FAPRGS that funded this research.

REFERENCES

1. Abtahi NS, Ghezelayagh Z, Nemati I, Eivazkhani F, Farzaneh P, Shahverdi A,

- Goudarzi GR, Pedram A, Amirchahmaghi E, Valojerdi MR, Silber S & Fathi R (2023) *CryoLetters* **44**, 185-196. 10.54680/fr23410110112.
2. Schlatt S, Kim SS & Gosden R (2002) *Reprod* **124**, 339–346.
3. Silva AM, Pereira AF & Silva AR (2019) *Rev Bras Reprod Anim* **43**, 229-234, 2019.
4. Pukazhenth B, Comizzoli P, Travis AJ & Wildt DE (2006) *Reprod Fert Dev* **18**, 77-90. 10.1071/rd05117.
5. Barbosa APM (2011) *Arch Zootec* **60**, 293-296. <http://doi.org/10.4321/S0004-05922011000200014>.
6. Abrishami M (2010) *Theriogenology* **73**, 86-96. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.08.004.
7. Pukazhenth BS (2015) *Plos One* **10**, 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0123957.
8. Santos RP & Silva RA (2022) *Rev Bras Reprod Anim* **46**, 413-430.
9. Curaba M, Verleysen M, Amorim CA, Dolmans MM, Van Langendonck A, Hovatta O, Wyns C & Donnez J (2011) *Fertil Steril* **95**, 1229-1234. 10.1016/j.fertnstert.2010.04.062.
10. Mitchell RT, Saunders PTK, Sharpe RM, Kelnar CJH & Wallace WHB (2009). *Endocr Dev* **24**, 247-256. 10.1159/000207612.
11. Wyns C, Abu-Ghannam G & Poels J (2013) *Gynecol Obstet Fertil* **41**, 558-561. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2013.07.005>
12. Carvalho MC (2016) Criopreservação de Tecido Testicular de Cães Avaliação Histológica e Ultraestrutural. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
13. Teixeira DO, Oliveira ES, Fernandes JS, Palomino GJQ, Tabosa BEA, Barbosa HTS, Pinheiro BQ & Silva LDM (2021) *Res Soc Dev* **10**, 1-10. 10.33448/rsd-v10i16.23864.
14. Nunes VRR, Gregianini JTF, Gregianin HA, Fantin BS, Loureiro B & Satrapa RA (2024) *Semina: Ciênc Agrár* **45**, 537-554. 10.5433/1679-0359.2024v45n2p537
15. Baust JMCW, Snyder KK, Baust JG & Van Buskirk RG (2016) *BioProcess J* **15**, 30-41. 10.12665/J151.Baust
16. Gholami D, Ghaffari SM, Shahverdi A, Sharafi M, Riazi G, Fathi R, Esmaeili V & Hezavehei M (2018) *J Cel Biochem* **119**, 9483–9497. 10.1002/jcb.27265.
17. Mahmoudifar N & Doran PM (2015) in Cartilage Tissue Engineering, (ed) Doran P, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, pp53-64.
18. Picazo CM, Castaño C, Bóveda P, Toledano-Díaz A, Velázquez R, Pequeño B, Estes MC, Gadea J, Villaverde-Morcillo S, Cerdeira J & Santiago-Moreno J (2022) *Theriogenology* **190**, 65–72. 10.1016/j.theriogenology.2022.07.020.
19. Lima DBC, Silva TFPD, Aquino-Cortez A, Leiva-Revilla J & Silva LDMD (2018) *Theriogenology* **110**, 110-115. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.037.
20. Junqueira LC & Carneiro J (2017) in *Histologia Básica: Texto e Atlas*, 13^a (ed) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp568.
21. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Pasquinelli G, Caprara G, Valente S, Seracchioli R & Paradisi R (2016) *J Ovarian Res* **24**, 50. 10.1186/s13048-016-0261-8.
22. Chambers EL, Gosden RG, Yap C & Picton HM (2010) *Hum Reprod* **25**, 2559–2568. 10.1093/humrep/deq192
23. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr & Chen LB (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3671-3675. 10.1073/pnas.88.9.3671.
24. Baert Y, Goossens E, van Saen D, Ning L, in't Veld P & Tournaye H (2012)

- Fertil Steril* **97**, 1152-1157. 10.1016/j.fertnstert.2012.02.010.
25. Lima D, Silva T, Morais GB, Aquino-Cortez A, Evangelista J, Xavier Júnior F, Viana DA & Silva L (2017) *Reprod Domest Anim* **52**, 235-241. 10.1111/rda.12833.
 26. Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L & De Paz P (2008) *Reprod Domest Anim* **43**, 37-51. 10.1111/j.1439-0531.2008.01141.x.
 27. Agarwal A, Ahmad G & Sharma R (2017) *Fertil Steril* **107**, 355-361.
 28. Zhang L & Li J (2013) *Theriogenology* **80**, 161-167. 10.3390/ani12182343.
 29. Martín G, Sabido O, Durán M & Ribas M (2004) *Andrologia* **36**, 366-372. 10.1111/j.1439-0272.2004.00622.x.
 30. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM & Aggarwal BB (2010) *Free Radic Biol Med* **49**, 1603-1616. 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
 31. Parks JR & Radominska-Pandya A (2021) in Lipid peroxidation and its role in disease. In: KIM, S. (Ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York: Springer, pp179-196.
 32. Grotto D, Valentini J, Boeira S, Paniz C, Santa Maria L, Vicentini J, Moro A, Charão M & Garcia SC (2009) *Quim Nova* **31**, 275-279. 10.1590/S0100-40422008000200016.
 33. Brown SG & Publicover SJ (2018) *Biol Reprod* v. 98, n. 3, p. 342-355, 2018.
 34. Silva CA & Pereira MR (2022) *Rev Biol Reprod* **15**, 45-58.
 35. Kumar D & Singh P (2021) *Biopreserv Biobank* **19**, 237-251. 10.1089/bio.2020.0131.
 36. Johnston SD, Root Kustritz MV & Olson PNS (2020) in *Canine and Feline Theriogenology* (ed 2) Saunders, pp608.
 37. Morais DB, Barbosa LP, Melo BES, Matta SLP, Neves MM, Balarini MK & Rodrigues MV (2012) *Arq Bras Med Vet Zootec* **64**, 810-816.
 38. Foster RA (2021) *Pathology of Domestic Animals* (ed 6), Jubb, Kennedy & Palmer's, Elsevier, St. Louis, v 3, pp 465-50

4 Considerações Finais

A criopreservação de tecidos consolida-se como uma estratégia eficaz e promissora para a conservação de gametas, especialmente no contexto das biotecnologias aplicadas à reprodução assistida. As técnicas utilizadas nesse processo exercem papel fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade de materiais biológicos complexos, como o tecido testicular.

Neste estudo, os dados obtidos demonstraram de forma consistente a superioridade da vitrificação em superfície sólida (VSS) em relação ao congelamento lento automatizado (CLA). Os fragmentos preservados por VSS apresentaram maior potencial de membrana mitocondrial (JC-1), menores níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduzida lipoperoxidação lipídica (LPO), indicando melhor integridade celular e menor estresse oxidativo.

Adicionalmente, observou-se, nos fragmentos submetidos à VSS, menor frequência de células picnóticas e apoptóticas, adequada condensação cromatínica e melhor preservação da morfologia nuclear. Houve também manutenção mais eficiente do diâmetro dos túbulos seminíferos e menor retração da membrana basal, evidenciando preservação estrutural superior.

Esses resultados reforçam a VSS como uma abordagem altamente eficaz para a criopreservação de tecido testicular de cães domésticos, com relevante potencial de aplicação em programas de reprodução assistida e conservação de material genético, sobretudo em espécies de interesse zootécnico ou ameaçadas de extinção.

Referências

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

ABRISHAMI, M.; FARJAD, F.; NADERI, M. M.; et al. Cryopreservation of testicular tissue in pigs: an approach for fertility preservation. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 52, p. 131-137, 2010b.

ABTAHI, N. S., et al. Cryobiology and fertility preservation: a perspective on past, current and future studies. **CryoLetters**, v.44, ed.4, p.185-196, 2023. doi: 10.54680/fr23410110112

AGARWAL, A.; AHMAD, G.; SHARMA, R. Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence and flow cytometry. **Fertility and Sterility**, v.107, ed.2, p.355-361, 2017.

ALCÂNTARA, L. M.; TONIOLLI, R. A espermatogênese. **Ciência Animal**, v.33, n.4, p.101-121, 2023.

ALLEN, W. EDWARD, et al. Fertility and obstetrics in the dog. **Ferdinand Enke Verlag**, 1994.

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.

ANJOS, D. C., et al. Comparação entre vitrificação e congelamento lento sobre o desenvolvimento in vitro de embriões bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.45, ed. 2, p. 123-132, 2024.

ANTONIO, H. et al. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas as ciências biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, v.1, 1998.

APONTE, P.M.; ROOIJ, D.G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls. **Theriogenology**, v.64, n.6, p.1440-1455, 2005.

BAERT, Y.; GOOSSENS, E.; SAEN, D. V.; NING, L.; VELD, P. & TOURNAYE, H. Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. **Fertility and Sterility**, v.97, ed.5, p.1152-1157, 2012.

- BANKER, M.; KOTDAWALA, A., P.; GUPTA, R. The impact of vitrification in artificial reproductive technology programmes. **European Medical Journal**, v.2, ed.4, p. 82-89, 2017. doi: 10.33590/emj/10312686
- BARBOSA, A. P. M. Cryopreservation of bovine spermatogenic cells using different protective molecules. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.230, p.293-296, 2011. doi: <http://doi.org/10.4321/S0004-05922011000200014>
- BAUCHÉ, F.; FOUCHARD, M.H.; JÉGOU, B. Antioxidant system in rat testicular cells. **FEBS Letters**, v.349, n.3, p.392-396, 1994.
- BAUST, J. M. C. W., SNYDER, K. K., BAUST, J. G., VAN BUSKIRK, R. G. **BioProcessing Journal**, v.15, ed.1, p.30-41, 2016.
- BRINSKO, S. P. Fisiologia Reprodutiva do Macho. In: CUNNINGHAM, J. G. Tratado de Fisiologia Veterinária. 2ª ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2014. p. 401.
- BROWN, S G.; PUBLICOVER, S. J. Spermatogenesis: The Role of Ion Channels and Transporters. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 3, p. 342-355, 2018.
- BUARPUNG, S. et al. Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.79, n.1, p.149-158, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.022>
- CABODEVILA, J.; TERUEL, M. Criopreservación de embriones bovinos. In: PALMA, G. A.; BREM, G. Biotecnología de La Reproducción. 1ª ed. **Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária**, 2001. p.149-167.
- 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, MARIA DA CONCEIÇÃO. Criopreservação de tecido testicular de cães: avaliação histológica e ultraestrutural. 2016. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical)** – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Recife, 2016.
- CAVALCANTI, A. S.; PEREIRA, S. A.; et al. Testicular cell populations in cryopreservation: Spermatogonia, Leydig and Sertoli cells responses. **Reproductive Biology**, v. 14, n. 2, p. 135-141, 2014.
- CHAMBERS, E. L.; GOSDEN, R.G.; YAP, C.; PICTON, H.M. In situ identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. **Human Reproduction**, v.25, p. 2559–2568, 2010. doi:10.1093/humrep/ deq192
- COCCHIA, N.; CIANI, F.; EL-RASS, R.; RUSSO, M.; BORZACCHIELLO, G.; ESPOSITO, V.; MONTAGNARO, S.; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.

Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. **Zygote**, v.18, n.1, p.1-8, 2010.

CUNNINGHAM, James. **Tratado de fisiologia veterinária**. Elsevier Health Sciences, 2011.

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

CURABA, M. et al. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. **Fertility and Sterility**, v.95, n.4, p.1229-1234, 2011.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of the testis. Reproduction in mammals and man. Paris, **Ellipses**, 1993.

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.

DOMINGOS, T.C.S. SALOMÃO, M.C. Meios de diagnóstico das principais afecções testiculares em cães: revisão de literatura. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.393-399, 2011.

DYCE, K. M.; SACK, W. O. & WENSING, C. J. G. Tratado de anatomia veterinária. – 5ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2019.

EDDY, E. M. The Spermatozoon. In.: KNOBIL & NEILL'S. **Physiology of Reproduction**, ed.3, p. 3-54, 2006.

FABBRI, R.; MACCIOCCA, M.; VICENTI, R.; PASQUINELLI, G.; CAPRARA, G.; VALENTE, S.; SERACCHIOLI, R.; PARADISI, R. Long-term storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. **Journal of Ovarian Research**, v.9, n. 50, 2016. doi:10.1186/s13048-016-0261-8

FAHY, G. M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, ed.4, p. 407–426, 1984. FERREIRA, D. S., & SILVA, A. R. Maturação, capacitação, reação acrossômica e movimentação espermática: uma revisão. **Ciência Animal**, v.33, ed.3, p.82-97, 2023.

FOSTER, R. A. "Male Reproductive System." In Jubb, Kennedy & Palmer's **Pathology of Domestic Animals**. Elsevier, v.3, ed.6, 2021.

FRANÇA, L.R.; SILVA, V. A. Jr.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during post development of the testis in the pig. **Biological Reproduction**, v.63, n.6, p.1629-1636, 2000.

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

GHOLAMI, D., GHAFFARI, S. M., SHAHVERDI, A., SHARAFI, M., RIAZI, G., FATHI, R., et al. **J Cell Biochem**, v.119, ed.11, p.9483-9497, 2018.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2.ed. São Paulo: **Roca**, 2008, 395p.

GOOSSENS, E. et al. Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. **Fertility and Sterility**, v.89, n.3, p.725-727, 2008.

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:10.1016/j.fertnstert.2011.03.035.

GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo - malondialdeído. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

GU, W.; HECHT, N.B. Developmentalexpressionofglutathione peroxidase, catalase, andmanganesesuperoxide dismutase mRNAsduringspermatogenesis in the mouse. **Journal of Andrology**. v.17, ed.3, p.256–262, 1996.

HOLT, W. V.; et al. Reproductive biology and cryopreservation of gametes and tissues in domestic animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 8-15, 2014. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.10.016.

HONARAMOOZ, A. Cryopreservation of testicular tissue. In: Current Frontiers in Cryobiology. 2ª ed. **California**, 2012. p. 209-28. doi: 10.5772/32338.Z

HUGHES, C. L.; WILLIAMS, R.; MURRAY, R. Impact of cryopreservation on testicular tissue: Response of Sertoli and Leydig cells. **Cryobiology**, v. 68, p. 1-8, 2013.

JAHNUKAINEN, K.; HAGLUND, L.; LINDH, C.; et al. Cryopreservation of testicular tissue in mice and monkeys. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 5, p. 1078-1084, 2007. JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V., & OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. **Philadelphia: Saunders**, ed. 2, 2020.

JOHNSTON, S.D. et al. Canine and feline theriogenology. 1ª ed. **Philadelphia: Saunders**, ed. 1, p. 592, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica – 11ª ed. - Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica I – 12ª ed. - Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas. 13ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2017.

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

KONIG, H. E., & LIEBICH, H. G. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. (1ªed). Porto Alegre: **ARTMED**, 2004.

KUMAR, D. & SINGH, P. Cryopreservation of Spermatozoa: An Overview of Associated Cellular Damage and Potential Ameliorative Approaches. **Biopreservation and Biobanking**, v.19, n.3, p. 237-251, 2021. doi: 10.1089/bio.2020.0131

LEIBO, S. P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. **Ciba Foundation Symposium**, v.18-20, n.52, p.69-96, 1977.

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. Influência da vitrificação sobre a estrutura, metabolismo e composição celular do tecido testicular de gatos domésticos pré púberes. 101f, 2019. **Tese (Doutorado em Reprodução e Sanidade Animal)** - Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Fortaleza, Fortaleza.

LIMA, D. B. C., SILVA, T. F. P., MORAIS, G. B., AQUINO-CORTEZ, 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, 2017a. doi: 10.1111/rda.12833.

LIMA, D. B. C.; SILVA, L. D. M. Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. **Ciência Rural**, v.47, n.11, 2017b. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170135>

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, 2018a. doi: 10.1371/journal.pone.0207317.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P. D.; AQUINO-CORTEZ, A.; LEIVA-REVILLA, J.; SILVA, L. D. M. D. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, v.110, p.110-115, 2018b.

LIMA, DAVID BARUC CRUVINEL, et al. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, v.110, p.110-115, 2018.

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

LUPPI, M. M. C. P. Avaliação andrológica de cães de raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular. 109f, 2006. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

MACENTE, B. I.; TONIOLLO, G. H.; APPARICIO, M.; MANSANO, C.; THOMÉ, H. E.; CANELLA, C. L.; TOZATO, M.; GUTIERREZ, R. R. Evaluation of different fragment sizes and cryoprotectants for cryopreservation of feline testicular tissues. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.2, p.242-247, 2017.

MAHMOUDIFAR, N. & DORAN, P. M. in Cartilage Tissue Engineering, (ed) Doran P, Methods in Molecular Biology, v.1340, p.53-64, **Humana Press**, New York, NY, 2015.

MARTÍN, G.; SABIDO, O.; DURÁN, M.; RIBAS, M. Cryopreservation of human spermatozoa: Effects on chromatin structure and DNA integrity. **Andrologia**, v.36, ed.6, p.366-372, 2004. doi:10.1111/j.1439-0272.2004.00622.x

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; TIZADO, E. J.; GARDE, J. J.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Statistical Series: Opportunities and Challenges of Flow Cytometry and CASA for Sperm Assessment-Past, Present and Future. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43 (S2), p. 37-51, 2008. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01141.x

MESADRI, S.B. Critério para desempenho de cães em competições de estrutura e beleza. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia)** – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

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. **Human Reproduction**, v.23, n.1, p.17-28, 2008.

MITCHELL, R. T., SAUNDERS, P. T., SHARPE, R. M., KELNAR, C. J., & WALLACE, W. H. Male fertility preservation: Practice and advances in testicular tissue cryopreservation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.24, ed.5, p. 247-256, 2013.

MORAIS, D. B.; BARBOSA, L. P.; MELO, B. E. S.; MATTA, S. L. P.; NEVES, M. M.; BALARINI, M. K.; RODRIGUES, M. V. Microscopia e morfometria de componentes tubulares de testículos de coelhos suplementados com geleia real. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 810-816, 2012.

MOTA, P. F.; SILVA, M. J.; PEREIRA, M.; et al. Cryopreservation of testicular tissue in cats: a potential approach for preserving fertility in endangered species. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1844-1850, 2012a.

MOTA, P.C.; EHMCKE, J.; WESERNSTROER, B.; GASSEI, K.; RAMALHO-SANTOS, J.; 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, 2012b. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.07.042

MOTHÉ, G.; SILVA, J.; BATISTA, J.; CUNHA, M.; NASCIMENTO, J.; BASTOS, G.; MOREIRA, L.; PEREIRA, R.; LINHARES, R.; JÚNIOR, A. Desenvolvimento anatômico dos testículos de cães e as implicações clínicas do criptorquidismo. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 13, n. 6, 2024. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i6.46024>

NAGASHIMA, J. B.; SONGSASEN, N. Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. **Animals**, v.11, n.3, p.1-23, 2021.

NOHALEZ, A. et al. Effects of two combinations of cryoprotectants on the *in vitro* developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. **Theriogenology**, v.84, p.545-552, 2015.

NUNES, V. R. R.; GREGIANINI, J. T. F.; GREGIANIN, H. A.; FANTIN, B. S.; LOUREIRO, B.; SATRAPA, R. A. Comparison between vitrification and slow freezing on the post-thaw development of bovine embryos produced in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 45, n. 2, p. 537-554, 2024. doi: 10.5433/1679-0359.2024v45n2p537

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

OLIVEIRA, E. C. S. Criopreservação de tecido testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.109-110, 2015.

OLIVEIRA, S. C. E. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. 60f, 2003. **Dissertação (Mestrado em Reprodução)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Belo Horizonte.

PAPA, R. T. C.; SANTOS, F. O.; MACEDO, L. P.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JR., J. A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

PARKS, J. R. & RADOMINSKA-PANDYA, A. Lipid peroxidation and its role in disease. In: KIM, S. (Ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 1305. **New York: Springer**, 2021. p. 179-196.

PICAZO, C. M.; CASTAÑO, C.; BÓVEDA, P.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; VELÁZQUEZ, R.; PEQUEÑO, B.; ESTESO, M. C.; GADEA, J.; VILLAVARDE-MORCILLO, S.; CERDEIRA, J., & SANTIAGO-MORENO, J. 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:10.1016/j.theriogenology.2022.07.020

PIZZONI, A.; et al. Cryopreservation of testicular tissue in canines: Recent advances and future directions. **Journal of Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 1-7, 2020.

POTHANA, L. et al. 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: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.028.

PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reprod. Fert. Dev.**, v.18, p.77-90, 2006.

PUKAZHENTHI, B.S.; NAGASHIMA, J.; TRAVIS, A.J.; COSTA, G.M.; ESCOBAR, E. N.; FRANÇA, L. R.; et al. 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: 10.1371/journal.pone.0123957.

QUINTANILHA, A. M. P. N. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: NELSON, R. W. & COUTO, C. G. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. 1ª ed. **Rio de Janeiro: Roca**, 1994. p. 526-529.

REUTER, S., GUPTA, S. C., CHATURVEDI, M. M., & AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical **Biology and Medicine**, v.49, ed.11, p.1603-1616, 2010. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

SANTOS, J. F.P. Criopreservação de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*). 50f, 2018. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós - Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Garanhuns.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Animal Reproduction Science**, v.102, n.1-2, p.1-13, 2007.

SCHLATT, S.; KIM S. S.; GOSDEN R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. **Reproduction**, v.124, p.339-346, 2002.

SEWERT, 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. doi: 91875323

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: **Proceedings of the 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington DC**, p.114, 2017.

SILVA, C. A.; PEREIRA, M. R. Fisiologia Reprodutiva: Espermatogênese e Funções das Células de Sertoli. **Revista de Biologia Reprodutiva**, v. 15, n. 2, p. 45-58, 2022.

SILVA, E. I. C. (2018). Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutor dos Animais Domésticos. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco**. Disponível em: <https://philpapers.org/archive/DASAEF-2.pdf>

SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro da. Puberdade e estacionalidade reprodutiva dos animais. **ResearchGate**, 2024.

SINGH, B. Tratado de Anatomia Veterinária. Rio de Janeiro: **Grupo GEN**, 2019.

SMILEY, S. T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; LIN, M.; CHEN, A.; SMITH, T. W.; STEELE, G.; CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **PNAS**, v.88, p. 3671–3675, 1991. doi:10.1073/ pnas.88.9.3671

TEIXEIRA, D. O., et al. 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://dx.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: 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, 2011a. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.04.025

TRAVERS, P. R.; BRAGG, C.; SUTTON, C.; et al. Cryopreservation of testicular tissue in mice and application in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 3, p. 237-243, 2011b.

UNNI, S. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v.97, n.1, p.200-208, 2012.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v.3, n.15, p.22-26, 1998.

WU, X.; YANG, C.; LI, Y. Preservation of testicular tissue viability after cryopreservation and its potential for fertility restoration. **Journal of Reproductive Biology**, v. 12, n. 3, p. 150-159, 2005.

WYNS, C. et al. Vitrication du tissu testiculaire: évolution or révolution? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.41, n.9, p.558-561, 2013.

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: 10.1093/humrep/den272.

YOKONISHI, T. et al. Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues. **Nature Communications**, v.5, p.1-6, 2014.

ZHANG, L., & LI, J. Antioxidant Enzyme Activities in Testicular Tissues of Dogs with Different Fertility Potentials. **Theriogenology**, v.80, ed.2, p.161-167, 2013.

ZIMMERMANN, M.; SANTOS, T. E.; FIDELIS, A. A. G.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Dimetilformamida e água de coco na criopreservação de sêmen canino. **Bioscience Journal**, v.23, n.1, p.96-100, 2007.