

## USO DO CONGELAMENTO LENTO AUTOMATIZADO (CLA) COMO MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE FRAGMENTOS TESTICULARES DE CÃES DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*)

LARISSA NEY BASSINI<sup>1</sup>; THAINÃ MORALES ACOSTA<sup>2</sup>; IZANI BONEL ACOSTA<sup>3</sup>; INARAÃ DIAS DA LUZ<sup>4</sup>; CAROLINA VIEGAS PINTO<sup>5</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [larissanbassini@gmail.com](mailto:larissanbassini@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [acostathaina22@gmail.com](mailto:acostathaina22@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [izanibonel@hotmail.com](mailto:izanibonel@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - [inadiasmedvet@gmail.com](mailto:inadiasmedvet@gmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - [carolinaviegas18@gmail.com](mailto:carolinaviegas18@gmail.com)

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas - [corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Existe uma conexão muito profunda entre seres humanos e cães, podendo ser vistos como membros da família, sendo capazes de auxiliar pessoas com deficiências visuais (SINGLETON et al., 2023). Os cães também atuam como “catalisadores sociais”, estimulando a comunicação e o contato entre pessoas que não se conhecem (KOTRSCHAL et al., 2018).

Essa relação tem incentivado avanços direcionados à reprodução de cães, com o propósito de preservar e realçar características presentes nas raças. Com isso, surgiram buscas por técnicas avançadas de melhoramento genético (MESADRI, et al., 2017). Nos últimos anos, o interesse pela criopreservação de tecido testicular tem se expandido devido ao sucesso de pesquisas paralelas com produção in vitro ou por transplantes de espermatogênese (HONARAMOOZ et al., 2012).

A criopreservação de tecidos é estratégia eficiente para contribuir com ferramentas de preservação de gametas, surgindo com uma ferramenta promissora para a reprodução assistida, permitindo o armazenamento de fragmentos contendo grande número de células germinativas em vários estágios de desenvolvimento. Um aspecto relevante é o potencial reprodutivo presente nos testículos de animais que são perdidos quando morrem ou são castrados. Resgatar esse material pode ser um recurso valioso para bancos de genes (SILVA et al., 2015).

O congelamento lento é um dos métodos mais comumente utilizados na criopreservação de tecido testicular, é baseada na redução gradual da temperatura assim como baixas concentrações de agentes crioprotetores, acarretando na diminuição da toxicidade celular (ABRISHAMI et al., 2010).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do uso do método de congelamento lento automatizado (CLA) como meio de criopreservação de fragmentos testiculares de cães domésticos (*canis lupus familiaris*).

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados testículos de 15 cães, obtidos após orquiectomia bilateral durante uma campanha de esterilização. Os complexos testículo-epidídimo foram colocados em falcons de 50 mL contendo 30 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e mantidos a 4°C. Realizou-se a dissecação da túnica albugínea e do tecido testicular subjacente, foram feitas lavagens para remoção de possíveis

impurezas. Para a fragmentação, cada par testicular foi seccionado com auxílio de um bisturi e pinças de dissecação, resultando em fragmentos de 5x5x5mm. Os fragmentos foram classificados em 2 grupos: Grupo controle (GC) e congelamento lento automatizado (CLA). As amostras correspondentes ao GC foram imediatamente submetidas ao protocolo de coloração com sondas fluorescentes para avaliação de microscopia confocal de varredura a laser. Já no CLA foi utilizado um meio de preservação com 10% de soro fetal bovino (SFB), Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), 1,4M de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,4M etilenoglicol (EG). Os fragmentos foram colocados em frascos criogênicos de 2 mL contendo 0,5mL do meio, foram alocados na *CRYOGEN HSE*<sup>®</sup>, onde utilizou-se o protocolo de congelamento de embriões previsto no congelador automático com curva referente a espécie bovina, depois de congelados foram armazenados em nitrogênio líquido e descongelados após 15 dias a 37°C por 1 minuto.

**Tabela 1. Curva de congelamento realizado na congeladora automática de sêmen e embriões CRYOGEN HSE<sup>®</sup>**

Nº da curva	Tº EP	Taxa RP	Tº ENI	Seeding	Tempo ENI	Taxa CR1	Início CR2	Início CR2	Tº ENF	Tempo ENF
Curva 3	10º	Queda livre	-6º	2 min	10 min	-0,5º	-32º	-0,5º	-32º	5 min

Tº EP: Temperatura de estabilidade positiva; Taxa RP: taxa de rampa positiva; Tº ENI: temperatura de estabilidade negativa inicial em °C; Tempo ENI: Tempo de estabilidade negativa inicial; Taxa CR1: taxa congelamento rampa 1 em °C/min; ICR2: início congelamento rampa 2 em °C; ICR2: início congelamento rampa 2 em °C/min; Tº ENF: temperatura de estabilidade negativa final em °C; Tempo ENF: tempo de estabilidade negativa final.

As amostras foram avaliadas quanto: espécies reativas de oxigênio (ROS), lipoperoxidação lipídica (LPO) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1), todos os processos de incubação foram realizados longe de incidência luminosa.

Para ROS, os fragmentos foram colocados em tubos, contendo 20µL da sonda H2DCFDA e 980µL de PBS, incubados a 37°C por 30 minutos. Depois do período de incubação, os fragmentos foram transferidos para um tubo com 40µL de iodeto de propídio e 20µL de Hoechst 33342 em 940µL de PBS, incubados por 5 minutos a 37°C. Para LPO, os fragmentos foram colocados em tubos contendo 4µL de sonda Bodipy C11 e 996µL de PBS, por 30 minutos e incubados a 37°C. Depois do tempo de coloração, os fragmentos foram colocados em novos tubos contendo 20µL de Hoechst 33342 e 980µL de PBS e incubados por 5 minutos a 37°C. Para avaliar JC-1 os fragmentos foram colocados em tubos contendo 4µL da sonda JC-1, juntamente com 996µL de PBS, por 30 minutos e incubados a 37°C. Após o tempo de coloração, os fragmentos foram colocados em novos tubos contendo 20µL de Hoechst 33342 e 980µL de PBS, incubados por 5 minutos a 37°C.

Após o preparo com sondas específicas, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 15 minutos e depois em solução PBS por 1 hora.

Para análise histológica, as amostras foram dispostas em cassetes e para processar utilizou-se o método geralmente aplicado na histologia clássica (JUNQUEIRA et al., 2017), constituído em: desidratação, diafanização, impregnação com parafina, blocagem microtomia (5µm), desparafinização e coloração com hematoxilina-eosina (HE) para serem analisadas por microscopia óptica e de contraste.

Utilizou-se o microscópio *SP5 Leica*<sup>®</sup> para análise de microscopia confocal de varredura a laser, onde os parâmetros relativos à intensidade de fluorescência foram mantidos constantes em todas as medições. Os fragmentos foram analisados em uma objetiva de 630 vezes em imersão de óleo, analisando-se 3 regiões de interesse selecionadas aleatoriamente.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos, foram realizadas análises estatísticas utilizando o software Statistix. Para as análises referentes a microscopia confocal de varredura, JC-1 e H2DCFDA foram analisados através do Teste de comparações entre pares Tukey HSD. Para Bodipy C11, foram analisados através da análise de variância Kruskal Wallis.

Ao analisar as amostras em microscopia confocal de varredura a laser, o grupo controle e o CLA não obtiveram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), tanto no ROS quanto no JC-1. Para análise de LPO o grupo controle apresentou maior média.

**Tabela 2. Dados das avaliações de pontuação de escores do tecido testicular canino expresso através da média  $\pm$  o desvio padrão da média.**

Parâmetros	GC	CLA
JC-1	0, 4417 $\pm$ 0, 0215 <sup>A</sup>	0, 4320 $\pm$ 0, 0200 <sup>A</sup>
ROS	1, 0043 $\pm$ 0, 0604 <sup>A</sup>	0, 9629 $\pm$ 0, 0627 <sup>A</sup>
LPO	77, 157 $\pm$ 0, 7701 <sup>A</sup>	69, 342 $\pm$ 2, 1546 <sup>B</sup>

\*As letras maiúsculas sobrescritas que se diferem na mesma linha significam que houve uma diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 4.CONCLUSÕES

Esses resultados sugerem que o tratamento com congelamento lento automatizado pode ter impactos específicos na morfologia do tecido testicular canino, em comparação a estudos realizados com outros tratamentos avaliados durante o desenvolvimento do projeto. No entanto, mais estudos podem ser necessários para compreender completamente os efeitos e suas implicações clínicas.

### 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

HONARAMOOZ, Ali. Cryopreservation of testicular tissue. In: **Current Frontiers in Cryobiology, California**, v.2, p. 209-28, 2012.

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

KOTRSCHAL, Kurt. How wolves turned into dogs and how dogs are valuable in

meeting human social needs. **People and Animals: The International Journal of Research and Practice**, v. 1, n. 1, p. 6, 2018.

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

SILVA, Andréia Maria da. Et al. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.229-234, 2015.

SINGLETON, Joanne K. Benefits of being teamed with a service dog for individuals living with visible and invisible disabilities. **Healthcare**. MDPI, 2023. p. 2987.