

HISTOMORFOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA NO ESTUDO DE FRAGMENTOS TESTICULARES DE CÃES DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) CRIOPRESERVADOS

INARAÃ DIAS DA LUZ¹; IZANI BONEL ACOSTA²; CAROLINA VIEGAS PINTO³;
FERNANDA RODRIGUES MENDONÇA⁴; ANTÔNIO SÉRGIO VARELA JÚNIOR⁵;
CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – inadiasmedvet@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – carolinaviegas18@gmail.com

⁴ Universidade Federal e Pelotas – nandarm.vet@gmail.com

⁵ Universidade Federal do Rio Grande – varelajras@gmail.com

⁶ Universidade Federal e Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A íntima relação entre humanos e cães motiva o desenvolvimento de métodos inovadores para conservar características importantes nas diferentes raças (MESADRI, 2017). A criopreservação do tecido testicular desponta como uma alternativa promissora para apoiar a reprodução canina, especialmente quando métodos tradicionais de coleta de sêmen são inviáveis.

Essa técnica permite o armazenamento de fragmentos contendo inúmeras células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo espermatozoides indiferenciados que ao serem cultivados asseguram uma produção contínua e ilimitada de espermatozoides (SILVA et al., 2019).

O processo de criopreservação testicular envolve dissecação e fracionamento do tecido e sua exposição a métodos de congelação lento ou vitrificação, utilizando crioprotetores para reduzir os danos celulares. Ressalta-se que os protocolos de congelação são espécie específicos, sendo que para a espécie canina ainda não estão totalmente elucidados, demonstrando a importância de estudos relacionados para otimização dos protocolos eficazes que salvaguardem a viabilidade do tecido após descongelamento.

O uso de avaliações histológicas auxiliam no dimensionamento das alterações causadas aos tecidos após a preservação. As abordagens mais utilizadas são a histomorfometria e histomorfologia.

A histomorfometria é uma observação quantitativa essencial para a compreensão das mudanças sofridas pelos tecidos em resposta a diferentes condições fisiológicas ou patológicas (DEMPSTER et al., 2013), já a histomorfologia envolve a observação, identificação e descrição de alterações estruturais nos tecidos biológicos classificados por meio do sistema de escore (JUNQUEIRA et al., 2017).

Sendo assim, esse trabalho tem por objetivo comparar diferentes métodos de criopreservação, vitrificação em superfície sólida (VSS) e congelação lento automatizado - curva 3 (CLA) através de avaliações histológicas afim de determinar a que melhor se adequa a espécie canina.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados testículos de 15 cães púberes, sem raça definida obtidos após orquiectomia bilateral de rotina. Os cães aptos foram selecionados através de exame físico e hemograma completo.

Os complexos testículo-epidídimo foram colocados em tubos plásticos contendo 30ml de PBS, mantidos refrigerados a 4°C e processados em até 24 horas. Após realizou-se a dissecção dos tecidos adjacentes e da túnica albugínea seguido da divisão testicular em plano sagital e confecção de 15 fragmentos de 5x5x5cm da porção mediastínica por animal.

Para a VSS os fragmentos foram alocados em tubos contendo 2mL das soluções de equilíbrio onde permaneceram submersos por 10 minutos e de vitrificação por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após colocados em uma superfície de metal de 10x10x10cm e a mesma colocada em contato com o nitrogênio promovendo a vitrificação, sendo transferidos imediatamente para os criotubos e armazenados em botijões criogênicos.

Para o CLA os fragmentos testiculares foram alocados em frascos criogênicos de 2mL contendo 0,5mL do meio de congelamento. Após os frascos foram posicionados na Congeladora Automática de Sêmen e Embriões CRYOGEN HSE® para dar início ao processo. Utilizou-se a curva 3 de congelamento segundo o protocolo previsto para embriões da espécie bovina, conforme descrito na tabela 1. Após 15 dias as amostras foram aquecidas em banho maria por 1 minuto a 37°C.

Tabela1. Curva de congelamento realizado na congeladora automática de sêmen e embriões CRYOGEN HSE®

	T° de estab. Positive	Taxa de rampa positiva	T° de estab. negativa inicial	Seeding	Tempo de estab. negativa inicial	Taxa de cong. rampa 1	Inicio de cong. rampa 2	Inicio cong. rampa 2	T° de estab. negativa final	Tempo de estab. negativa final
Curva 3	10°C	Queda livre	-6°C	2 minutos	10 minutos	- 0,50°C/min.	-32°C	- 0,50°C/min.	-32°C	5 min.

Para a confecção das lâminas realizou-se o processamento utilizado na histologia clássica que consiste 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação histomorfológica, observou-se que a separação da membrana basal não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). Ao analisar a retração da membrana basal, os grupos VSS e CLA não mostraram diferenças entre si, enquanto o grupo controle (GC) foi o único com uma diferença estatisticamente significativa, exibindo uma média inferior ($1,4333\pm0,0604^B$) em relação aos outros grupos.

A retração de membrana basal do GC apresentou menor valor conforme esperado, uma vez que não passou por nenhum processo de congelamento. Os resultados associados aos grupos CLA e VSS indicam uma maior retração, sabe-se que essa variável está associada com o comprometimento estrutural dos túbulos seminíferos e consequentemente a diminuição na polarização mitocondrial, resultando em menor produção de energia, reduzida capacidade de resposta a estressores celulares e impactos negativos na preservação da morfologia celular (BROWN et al., 2018).

O grupo CLA demonstrou uma diferença estatística ($2,2667 \pm 0,1076^A$) em comparação com os outros grupos, que não apresentaram divergências significativas entre si, no que diz respeito à diferenciação entre espermatogônias e células de Sertoli. As espermatogônias localizam-se na base dos túbulos seminíferos, células germinativas que se dividem por mitose e meiose para formar espermatozoides, contrastando, as células de Sertoli, que se estendem ao longo dos túbulos seminíferos, desempenham funções de suporte crucial, incluindo a nutrição das células germinativas, a manutenção da barreira hemato-testicular e a regulação do ambiente interno do túbulo (SILVA et al., 2019).

O grupo CLA apresentou resultados promissores, permitindo a melhor visualização e identificação dessas células. A interação entre essas células é essencial para a espermatogênese e manutenção da fertilidade, ademais, alterações na morfologia das mesmas relaciona-se com a diminuição da saúde reprodutiva do tecido.

Quanto à visualização e condensação nuclear, o grupo CLA registrou os valores médios mais altos, enquanto os demais grupos não divergiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Sabe-se que a condensação nuclear e o remodelamento da cromatina são fundamentais para garantir a integridade do DNA e a funcionalidade das células germinativas (GOU et al., 2022), sendo assim, associa-se ao melhor resultado obtido nessas variáveis comparado aos demais grupos.

Sobre os achados referentes a histomorfometria, o grupo CLA obteve uma média superior ($119,58 \pm 4,4550^B$) aos demais grupos o diâmetro dos túbulos seminíferos. Essa variável é um indicador importante da saúde reprodutiva podendo variar dependendo de fatores como a idade, estado reprodutivo e saúde geral do animal (JOHNSTON et al., 2020), contudo apesar da significativa diferença estatística encontram-se dentro do intervalo de 150 a 250 micrômetros (média em torno de 200 micrômetros) considerado fisiológico em cães adultos e saudáveis (VEERAMACHANEN & SAWYER, 2019).

Em relação a retração de membrana basal dos túbulos seminíferos, todos os grupos diferiram entre si estatisticamente sendo que o grupo CLA ($48,213 \pm 2,3611^A$) demonstrou a maior média. Esse achado sugere que o grupo CLA apresentou uma preservação tecidual inferior aos demais grupos após o processo de congelação e descongelação, a retração geralmente está associada à degeneração testicular, inflamação ou exposição a agentes tóxicos, levando a espermatogênese prejudicada e a arquitetura testicular alterada (FOSTER, 2021).

4. CONCLUSÕES

Após a análise dos dados histológicos explicitados anteriormente, conclui-se que o grupo congelamento lento automatizado apesar de apresentar maior média associada a variável retração de membrana, demonstrou melhores resultados no que se refere a diferenciação celular, visualização e condensação nuclear sugerindo maior eficácia na preservação de tecido testicular de cães domésticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

DEMPSTER, D.W.; COMPSTON, J.E.; DREZNER, M.K.; GLORIEUX, F.H.; KANIS, J.A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P.J.; OTT, S.M.; RECKER, R.R.; PARFITT, A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 28, ed. 1, p.2-17, 2013.

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

JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V., & OLSON, P. N. S. "Canine and Feline Theriogenology". Saunders, ed.2, 2020.

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

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

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. F.; SILVA, A.R. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.43, n.2, p.229-234, 2019.

VEERAMACHANENI, D. N. R., & SAWYER, H. R. "Histopathological alterations in canine testicular tissue: Basement membrane retraction and its implications." *Veterinary Pathology*, v.56, ed.4, p.589-599, 2019.