



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANA GLÓRIA PEREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES PRÉ-PÚBERES
UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO**

MOSSORÓ

2022

ANA GLÓRIA PEREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES PRÉ-PÚBERES
UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

P436c Pereira, Ana Glória.
Criopreservação de tecido testicular de cães
pré-púberes utilizando diferentes métodos de
Vitrificação / Ana Glória Pereira. - 2022.
52 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2022.

1. biotecnologia. 2. canídeos. 3.
criopreservação. 4. histomorfologia. I. Silva,
Alexandre Rodrigues, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ANA GLÓRIA PEREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES PRÉ-PÚBERES
UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Defendida em: 11 / 11 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Alexsandra Fernandes Pereira, Prof. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Andréia Maria da Silva, Prof. Dra. (IFRN)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, José Pereira, pelos breves e incríveis anos que pude viver ao seu lado, que sempre foi, é e será o motivo pelo qual eu busco ser melhor. À Deus e aos meus guias espirituais, por estarem sempre comigo, emanando luz e vibrando para que eu seguisse a minha vocação de Médica Veterinária, a qual fui designada muito antes.

Às minhas mães: Maria Aparecida, que me gerou, me ensinou a ser forte e sempre colocou os meus estudos acima de tudo; Maria Valdeneide, que me acolheu em seu coração; e Maria Izabel, que é minha mãe dessa e de outras vidas. À minha irmã Ana Clara e aos meus irmãos do coração Weine e Mikaelly, que me deram de presente Helena e Eniew. À Sara, por todas as conversas, abraços, histórias de vida e sorrisos que compartilhamos. Agradeço aos meus avós, Dona Vilanir, o grande amor da minha vida, bem como José Pereira Sobrinho, Dona Luiza e João Ferreira, que olham por mim do plano espiritual.

Aos meus amigos da graduação: Jane, Érica, Jêiffer, Kamilla, Vinícius, Alex e Tayná. Obrigada por terem compartilhado comigo os cinco anos mais intensos da nossa vida, tudo valeu a pena. À Leandro, por todo apoio e amor, por sonhar os meus sonhos, enxugar as minhas lágrimas e me lembrar o quanto eu sou capaz. À Amélia, minha filha de quatro patas, que esteve comigo todos os dias, em todas as noites em claro, em todas as vezes que me vi sozinha, obrigada por ter me mostrado o que é um amor puro e verdadeiro.

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Rodrigues, por me incentivar a ir além, apoiar os meus planos e ser um exemplo de profissional para mim; o seu amor pelo que faz me incentiva a dar o meu melhor em busca dos meus objetivos. À toda equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, onde cultivei o meu amor pela pesquisa e encontrei o meu lugar no mundo, criei laços para vida toda com pessoas incríveis e de um potencial extraordinário, amo cada um de vocês.

Ao Prof. Moacir F. Oliveira, por sempre estar disponível a me ajudar, fornecendo suporte durante toda a execução deste trabalho. Agradeço à toda equipe do Laboratório de Morfofisiologia Animal, pessoas muito especiais para mim, com que tive a oportunidade de trocar experiências e enriquecer o meu trabalho.

A todos os animais, por me ensinarem que o mundo pode ser melhor se as pessoas souberem os respeitar.

O amor é o laço de luz eterna que une todos os mundos e todos os seres da imensidade; sem ele, a própria criação infinita não teria razão de ser, porque Deus é a sua expressão suprema.

Espírito Emmanuel

RESUMO

Entre os canídeos, há muitas espécies ameaçadas de extinção, sendo sugestiva a formação de bancos de germoplasma para auxiliar na conservação de seu valioso material genético. Neste sentido, o cão doméstico tem servido como um importante modelo experimental para o aperfeiçoamento de biotecnologias reprodutivas. Em casos de animais pré-púberes ou naqueles que morreram subitamente, uma das principais opções disponíveis para a preservação do material genético masculino é a criopreservação do tecido gonadal. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes métodos de vitrificação sobre a conservação do tecido testicular de cães pré-púberes. Foram utilizados cinco cães machos com idade entre 3 e 6 meses, dos quais foram coletadas cirurgicamente as gônadas. Os testículos foram fragmentados, separando-se um fragmento para controle a fresco. Os demais fragmentos foram criopreservados por diferentes métodos de vitrificação: em superfície sólida (VSS), imersão em agulhas (VIA), em criotubos e com Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). As amostras a fresco ou vitrificadas foram processadas e coradas em Hematoxilina-Eosina para análise morfológica dos túbulos seminíferos. Para análise da viabilidade, as células do tecido testicular foram marcadas com as sondas fluorescentes iodeto de propídio e Hoechst, e analisadas em microscopia de epifluorescência. Para a avaliação do potencial proliferativo, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído e corados em uma solução de nitrato de prata, sendo contadas as regiões organizadoras de nucléolos (RONs). Após reaquecimento, verificou-se que todos os métodos de vitrificação foram eficientes na preservação da integridade da membrana basal. No tocante à distinção celular, houve uma redução significativa no grupo vitrificado, quando comparado ao fresco. No entanto, as amostras submetidas à vitrificação em criotubos apresentaram resultados superiores de distinção celular ($2,10 \pm 0,04$) e visualização nuclear ($2,11 \pm 0,04$) quando comparados aos métodos de VSS ($1,77 \pm 0,04$ e $1,76 \pm 0,05$) e VIA ($1,75 \pm 0,04$ e $1,90 \pm 0,03$), diferindo da vitrificação em OTC apenas na distinção celular ($1,99 \pm 0,05$). Em relação à viabilidade, todas as amostras submetidas ao procedimento de vitrificação sofreram uma redução da viabilidade, quando comparadas ao grupo fresco ($83 \pm 3,27\%$). As amostras criopreservadas por VSS ($51,8 \pm 3,80\%$), VIA ($52,3 \pm 4,13\%$) e vitrificação em criotubos ($41,8 \pm 5,42\%$) apresentaram viabilidade superior às vitrificadas em OTC ($35,5 \pm 7,47\%$). A quantificação de RONs das espermatogônias mostrou que os grupos submetidos a VSS ($3,79 \pm 0,04$), criotubos ($3,78 \pm 0,04$) e OTC ($3,87 \pm 0,04$) foram semelhantes ao grupo fresco ($3,77 \pm 0,03$), enquanto na VIA ($3,97 \pm 0,05$) o número foi superior ($P < 0,05$). Em relação às células de Sertoli, a quantificação das RONs nos grupos vitrificados em criotubos ($3,51 \pm 0,05$) e em OTC ($3,41 \pm 0,04$) foi semelhante ao grupo fresco ($3,45 \pm 0,03$); no entanto, houve um aumento significativo do número de RONs das amostras submetidas a VSS ($3,62 \pm 0,04$) e VIA ($3,88 \pm 0,05$). Dessa forma, sugere-se o uso da vitrificação em criotubos para a preservação da morfologia, viabilidade e potencial proliferativo celular no tecido testicular de cães pré-púberes. Além disso, o OTC também pode ser utilizado, possibilitando a manutenção das características morfológicas e capacidade de multiplicação das células germinativas.

Palavras-chave: biotecnologia; canídeos; criopreservação; histomorfologia.

ABSTRACT

Among the canids, there are many species threatened with extinction, being suggestive the formation of germplasm banks to help in the conservation of their valuable genetic material. In this sense, the domestic dog has served as an important experimental model for the improvement of reproductive biotechnologies. In cases of prepubescent animals or those that died suddenly, one of the main options available for the preservation of male genetic material is the cryopreservation of gonadal tissue. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of different vitrification methods on the conservation of testicular tissue in prepubertal dogs. Five male dogs aged between 3 and 6 months were used, from which the gonads were surgically collected. The testes were fragmented, separating a fragment for fresh control. The remaining fragments were cryopreserved by different vitrification methods: on solid surface (VSS), immersion in needles (VIA), in cryotubes and with Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). Fresh or vitrified samples were processed and stained in Hematoxylin-Eosin for morphological analysis of the seminiferous tubules. For viability analysis, testicular tissue cells were labeled with the fluorescent probes propidium iodide and Hoechst and analyzed by epifluorescence microscopy. To assess the proliferative potential, the fragments were fixed in paraformaldehyde and stained in a silver nitrate solution, and the nucleolar organizer regions (NORs) were counted. After rewarming, it was found that all vitrification methods were efficient in preserving the integrity of the basement membrane. Regarding cell distinction, there was a significant reduction in the vitrified group when compared to the fresh one. However, samples submitted to vitrification in cryotubes showed superior results for cell distinction (2.10 ± 0.04) and nuclear visualization (2.11 ± 0.04) when compared to VSS methods (1.77 ± 0.04 , 0.04 and 1.76 ± 0.05) and VIA (1.75 ± 0.04 and 1.90 ± 0.03), differing from OTC vitrification only in cellular distinction (1.99 ± 0.05). Regarding viability, all samples submitted to the vitrification procedure suffered a reduction in viability when compared to the fresh group ($83 \pm 3.27\%$). The samples cryopreserved by VSS ($51.8 \pm 3.80\%$), VIA ($52.3 \pm 4.13\%$) and vitrified in cryotubes ($41.8 \pm 5.42\%$) showed higher viability than those vitrified in OTC ($35.5 \pm 7.47\%$). The quantification of NORs of spermatogonia showed that the groups submitted to VSS (3.79 ± 0.04), cryotubes (3.78 ± 0.04) and OTC (3.87 ± 0.04) were similar to the fresh group (3.77 ± 0.03), while in VIA (3.97 ± 0.05) the number was higher ($P < 0.05$). Regarding Sertoli cells, the quantification of NORs in the vitrified groups in cryovials (3.51 ± 0.05) and in OTC (3.41 ± 0.04) was similar to the fresh group (3.45 ± 0.03); however, there was a significant increase in the number of NORs of samples submitted to VSS (3.62 ± 0.04) and VIA (3.88 ± 0.05). Thus, we suggest the use of vitrification in cryotubes for the preservation of morphology, viability and cell proliferative potential in the testicular tissue of prepubertal dogs. In addition, OTC can also be used, allowing the maintenance of morphological characteristics and the ability to multiply germ cells.

Keywords: biotechnology; canids; cryopreservation; histomorphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação morfológica do tecido testicular de cães pré púberes (n=5). A- Fresco (400x), B- Superfície Sólida (400x), C- Imersão em Agulhas (400x), D- Criotubos (x400), E- Ovarian Tissue Cryosystem (400x).

Figura 2. Avaliação da viabilidade de células do tecido testicular fresco vs criopreservado de cães pré-púberes (n=5). ^{ABC}Diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 3. Imagem representativa do potencial proliferativo avaliado pela quantificação das regiões organizadoras de nucléolos em células testiculares de cães pré púberes (n = 5). A- Fresco (1000x), B- Superfície Sólida (1000x), C- Imersão em Agulhas (1000x), D- Criotubos (1000x), E- Ovarian Tissue Cryosystem (1000x).

Figura 4. Avaliações da capacidade proliferativa com o número de Regiões Organizadoras de Nucléolos (média $\pm$ erro padrão) em espermatogônias (A), células de Leydig (B) e células de Sertoli (C) no tecido testicular de cães pré púberes (n=5) exposto a diferentes métodos de vitrificação (Superfície Sólida, Imersão em Agulhas, Criotubos e OTC). ^{ABC}Diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação da integridade dos parâmetros morfológicos do tecido testicular de cães pré púberes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação morfológica em escores (3, normal a 1, degenerado) de tecido testicular de cães pré-púberes (n=5) fresco vs criopreservado utilizando diferentes métodos de vitrificação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPs	Agentes Crioprotetores
AG	Agulhas
ANOVA	Análise de Variância
CBKC	Confederação Brasileira de Cinofilia
CT	Criotubos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Eosina
EG	Etilenoglicol
FCI	Federação Cinológica Internacional
GLI	Glicerol
H	Hematoxilina
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OTC	Ovarian Tissue Cryosystem
RONs	Regiões Organizadoras de Nucléolos
SFB	Soro Fetal Bovino
SV	Solução de Vitrificação
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay
VIA	Vitrificação por Imersão em Agulhas
VSS	Vitrificação em Superfície Sólida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 A IMPORTÂNCIA DOS CÃES	16
3. MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DO CÃO	17
3.1 Estrutura testicular	17
3.2 Descenso testicular	19
3.3 Espermatogênese	19
4 CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR	20
4.1 Métodos de Vitrificação	22
4.2 Fatores que interferem na criopreservação do tecido testicular	24
4.2.1 Idade do Animal	24
4.2.2 Crioprotetores	25
4.2.3 Tamanho dos Fragmentos	26
4.2.4 Aquecimento	26
4.3 Análise do tecido testicular vitrificado	27
5 OBJETIVOS	30
6 MATERIAL E MÉTODOS	31
7 RESULTADOS	35
8 DISCUSSÃO	40
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Os cães são partes importantes na sociedade, graças aos seus sentidos aguçados e aptidões raciais, auxiliam o ser humano em diversas atividades e, por vezes, são considerados membros das famílias humanas (Lopes et al., 2012). O mercado de cães está em constante ascensão. De acordo com o IBGE e o Instituto Pet (2020), houve aumento de 30% no número de pets em lares brasileiros durante o isolamento social. Dentre esses animais, 75% são cães.

Com a domesticação dos cães, o homem passou a intervir na sua reprodução, selecionando indivíduos com características desejáveis e, por meio dessa seleção e cruzamentos sucessivos, deu origem à diversas raças (Mesadri, 2017). As exposições de cães visam avaliar os exemplares de cada raça, dentro dos critérios do padrão estabelecido. Diante disso, os animais que se destacam dentro do padrão racial possuem alto valor genético e econômico.

Várias biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, fertilização in vitro e injeção intracitoplasmática de espermatozoides vêm sendo aplicadas na reprodução canina. (Oliveira et al., 2003). No entanto, em animais pré-púberes que venham a morrer subitamente, ou tenham que ser submetidos a tratamentos gonadotóxicos, não é possível a obtenção de espermatozoides, sendo a criopreservação de tecido gonadal única forma de preservar a sua fertilidade (Pukazhenthil et al., 2015).

O tecido testicular pré-púbere contém espermatogônias, células primárias que darão origem aos espermatozoides por meio do processo de espermatogênese com o início da puberdade. Esse tecido pode ser criopreservado e cultivado, no intuito de se estimular a espermatogênese para a obtenção de espermatozoides. A criopreservação permite o restabelecimento da função reprodutiva e endócrina após o aquecimento do tecido (Gosden, 2002), e possibilita salvar o material genético proveniente de animais em qualquer estágio reprodutivo, ou que tenham morrido subitamente, tornando-se uma importante ferramenta para a conservação de espécies de alto valor genético (Thuwanut *et al.*, 2013).

A conservação do tecido testicular pode ser realizada por diversos métodos de criopreservação, como por exemplo a vitrificação. No entanto, existem poucos estudos acerca da aplicação dessa técnica no tecido testicular canino, sendo que o primeiro trabalho data de

2016 (Carvalho). Dentre os métodos de vitrificação já descritos para a criopreservação de tecido testicular canino tanto de adulto (Carvalho, 2016), quanto de indivíduo pré-púbere (Teixeira et al., 2021), destaca-se a vitrificação em superfície sólida (VSS). Neste método, os fragmentos do tecido são expostos a uma solução de vitrificação (SV) com crioprotetores, colocados sob uma superfície metálica em contato com o nitrogênio líquido, onde são imediatamente vitrificados, em seguida são acondicionados em criotubos e armazenados em botijões com nitrogênio líquido (Teixeira *et al.*, 2021).

A vitrificação por imersão em agulhas (VIA) é um método recente para a conservação de tecido testicular, mas que já foi testado em cães domésticos (Picazo *et al.*, 2022) e selvagens, como o lobo cinzento (Andrae *et al.*, 2021). Os fragmentos do tecido são transpassados por uma agulha, que é, então, imersa em uma SV e, em seguida, colocada no nitrogênio líquido. As agulhas contendo os fragmentos vitrificados são armazenadas em criotubos (Picazo *et al.*, 2022).

Dentre os métodos ainda não testados para o cão, pode-se citar a vitrificação em criotubos, na qual, após os fragmentos serem retirados da SV, são enxutos e colocados em criotubos, que serão fechados e armazenados em nitrogênio líquido (Lima *et. al.*, 2018a). Essa técnica se mostrou eficaz na criopreservação de tecido testicular de gatos pré púberes, mantendo as características histomorfológicas, bem como a viabilidade e o potencial proliferativo das células germinativas (Lima *et. al.*, 2018a).

Outra alternativa seria o uso do Ovarian Tissue Cryosystem (OTC), um dispositivo fechado, feito por aço inoxidável, que pode suportar temperaturas mais baixas que -196°C, como a do nitrogênio líquido. Também é resistente a temperaturas superiores a 200 °C, o que permite a sua esterilização e reutilização. É bastante utilizado na vitrificação de tecido ovariano, tendo sido eficiente na preservação da densidade folicular e morfologia dos folículos pré-antrais de cadelas (Brandão *et al.*, 2021). Seu uso na criopreservação de tecido testicular canino ainda não foi testado.

Neste sentido, a vitrificação do tecido testicular se apresenta como uma boa alternativa para o estabelecimento de protocolos de conservação do germoplasma de canídeos ameaçados. No intuito de se aprimorar os protocolos para a conservação do tecido testicular em cães, justifica-se a tentativa de comparar diferentes métodos de vitrificação, a fim de se determinar a metodologia mais eficiente para os indivíduos pré-púberes desta espécie.

2. A IMPORTÂNCIA DO CÃES

Os cães e os lobos apresentam uma grande semelhança morfológica e fisiológica. Em virtude disso, são considerados parentes (Lopes *et al.*, 2012). Após a mapeação do DNA das duas espécies, notou-se que há apenas 0,2% de diferenciação entre eles. (Leonard *et al.*, 2002), sendo motivo para a reclassificação taxonômica em 1997, proposta pelo Smithsonian Institute e pela American Society of Mammalogists, alterando o nome científico do cão de *Canis familiaris* para *Canis lupus familiaris*, ou seja, o cão doméstico é classificado como sub-espécie dos lobos cinzentos (Wilson & Reeder, 2005). Esta proximidade biológica reforça a teoria de que os cães domésticos sejam descendentes dos lobos, e que isso se deu através da ação do homem, a partir da seleção, treinamento e domesticação dos lobos, que após sequências de acasalamentos, geraram os cães (Serpel, 1995).

A partir da inserção do cão no convívio humano, este animal passou a ser treinado para aproveitar suas aptidões na execução de atividades que pudessem auxiliar o homem. Em virtude disso, há uma grande variedade de raças, que foram melhoradas ao longo dos anos para exercer sua função dentro da sociedade humana. Cada uma delas foi obtida por meio do controle e manipulação genética por seleção de indivíduos e cruzamentos programados para obter destaque em características que se desejava enaltecer (Wilsson & Sundgren, 1997). Apesar da domesticação e da realização de cruzamentos seletivos os cães mantiveram habilidades sensoriais, como o olfato e audição aguçados. O comportamento do animal é uma característica herdada, que se reflete em habilidades, de acordo com a função de cada raça. Os cães foram condicionados a auxiliar o homem, exercendo funções de caça, pastoreio de rebanhos e proteção de territórios (Luz e Silva, 2019).

Já se tem conhecimento que a relação homem-animal, principalmente com os cães, é benéfica para a saúde física e mental do ser humano e do cão. A presença do animal em casa proporciona relaxamento, atuando como uma forma de zooterapia, que tem sido de grande importância para a recuperação de pacientes com limitações físicas, bem como auxilia na terapia com crianças atípicas (Kitagawa & Coutinho, 2004).

O mercado de cães está em constante ascensão, com isso a criação de cães ganhou importância econômica e uma atenção especial para a saúde desses animais, bem como a genética e os padrões raciais, que são avaliados nas exposições (Mesadri, 2017). As

exposições de cães de raça servem como estímulo desse mercado na medida em que são eventos competitivos e que visam avaliar os exemplares de cada raça, dentro dos critérios do padrão estabelecido. Ocorrem em diferentes lugares do mundo, no Brasil são organizadas por associações filiadas à Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC), filiada à Federação Cinológica Internacional (FCI), considerada a maior organização cinófila do mundo (Luz e Silva, 2019).

Com a valorização desse mercado, a reprodução de cães ganhou destaque. O estudo da fisiologia reprodutiva, bem como a aplicação de biotecnologias como a criopreservação de sêmen e a inseminação artificial contribuem para o melhoramento genético das raças. No entanto, em animais pré púberes não é possível a obtenção de espermatozoides e não há estudos que viabilizem a utilização do tecido testicular canino para a preservação da fertilidade desses indivíduos.

3. MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DO CÃO

3.1 Estrutura Testicular

Os testículos são órgãos duplos, elipsoides, divididos pelo septo mediano, localizados no escroto, exercem funções de gametogênese e produção de hormônios masculinos (Sanches *et al.*, 2017). Estão situados no abdômen durante a fase embrionária e migram para o escroto entre o oitavo e décimo dia após nascimento (Domingos e Salomão, 2011). Após esse período localizam-se entre a região inguinal e o ânus (Popesko, 1997).

Nos mamíferos os testículos são localizados fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Essa localização testicular é importante na maioria das espécies de devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal para a manutenção das funções testiculares (Junqueira e Carneiro, 2013).

Os testículos estão envoltos por algumas camadas de tecidos, a primeira delas, denominada de escroto, é constituída por tecido cutâneo dividido em dois compartimentos de musculatura lisa, que auxilia na termorregulação testicular (Budras *et al.*, 1994). A regulação da temperatura se dá pela ação do plexo pampiniforme, do escroto, da túnica dartos e do músculo cremáster (Wanke e Gobello, 2006). A segunda camada de tecido é a túnica dartos, que é uma camada muscular aderida à pele do escroto, responsável por ajudar regular a

temperatura dos testículos por expansão ou contração da pele do escroto (Budras et al., 1994). As próximas duas camadas são chamadas de túnicas vaginais, essas duas camadas são separadas pela cavidade visceral. A primeira é túnica parietal e a segunda é a túnica visceral (Domingos e Salomão, 2011). Por fim, o revestimento dos testículos se dá por uma firme cápsula de fibras colágenas chamada de túnica albugínea, que está intimamente ligada ao parênquima testicular (Carvalho, 2016).

No parênquima tem-se o mediastino testicular, que é bem desenvolvido e emite septos de tecido conjuntivo que dividem o testículo em lóbulos (Gonçalves, 2015). Nestes lóbulos estão os túbulos seminíferos, nos quais os espermatozoides são produzidos através da espermatogênese (Stanbenfeld e Edqvist, 1996). Os túbulos são compostos por células germinativas ou espermatogênicas (espermatogônia, espermatócitos e espermatídes) entremeadas pelas células de Sertoli (Dadoune e Demoulin, 1993).

O espaço entre os túbulos seminíferos contém tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos, (Dadoune e Demoulin, 1993). O tipo celular mais presente no interstício é a célula de Leydig, que está envolvida na secreção de andrógenos, como a testosterona, assim como outros esteroides, incluindo o estrógeno (O'donnel et al, 2001).

No tecido testicular de animais pré púberes, uma vez que a espermatogênese ainda não é ativa, há apenas três tipos celulares: espermatogônias, células de Sertoli e de Leydig. O epitélio germinativo é pouco desenvolvido e há pouco ou nenhum lúmen no interior dos túbulos seminíferos (Teixeira et al., 2021).

De cada lóbulo saem ductos que se unem no mediastino testicular formando a rete testis, que sai do testículo como ductos eferentes e depois se juntam formando o ducto epididimário que, após sair do epidídimo, se torna o ducto deferente (Budras et al., 1994).

Após a descida dos testículos da cavidade abdominal para o escroto, fica evidente o cordão espermático, que é composto pela veia testicular, artéria testicular, músculo cremaster, ducto deferente e nervos (Brito, 2000).

O epidídimo é uma estrutura extra testicular, responsável por fornecer o ambiente necessário para maturação dos espermatozoides que, embora sejam produzidos nos testículos não estão completamente formados e viáveis para que ocorra a fecundação (Nascimento e

Santos, 1997). Os epidídimos ligam os testículos aos ductos deferentes e são formados por: cabeça, corpo e cauda.

3.2 Descenso Testicular

Na maioria dos mamíferos, incluindo o cão, os testículos estão localizados inicialmente no pólo caudal dos rins. Durante a primeira fase do processo de migração do testículo para o interior do escroto, denominado descenso testicular, há a retração do gubernáculo no canal inguinal em direção ao escroto, e simultaneamente os testículos são conduzidos para esse canal. Na segunda fase, os testículos passam pelo canal inguinal e descem para a posição escrotal (Baumans *et al.*, 1985).

Durante a fase embrionária os testículos dos cães se localizam na cavidade abdominal, próximo aos rins, e passam a se fixar na bolsa escrotal entre 10 e 40 dias após o nascimento. Esse processo de migração se dá por meio da tração do gubernáculo, que puxa o testículo para a bolsa conforme o crescimento do animal e é guiado por hormônios (andrógenos fetais). O gubernáculo regride e o cordão espermático se alonga, permitindo, assim, que os testículos passem pelo anel inguinal e migrem até o escroto, onde permanecem (Schiabel, 2018).

Na fase de descida inguinal, a produção hormonal de andrógenos gonadais pelo eixo hipotálamo-hipofisário parece ser o fator determinante. O processo de descida testicular começa cinco dias após o nascimento e deve completar-se até os seis meses de idade, quando, na maioria dos cães, o anel inguinal se fecha. Entretanto os testículos podem ser palpáveis no interior do escroto já aos 10 a 42 dias de idade (Nascimento *et al.*, 2011).

3.3 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo no qual as células germinativas entram em divisão, diferenciação, e meiose para dar origem a espermátides haploides (O'donnel *et al.*, 2001). Esse processo é desencadeado nos túbulos seminíferos a partir do início da puberdade do macho (Gonsalves & Figueiredo, 2008). Segundo Allen (1992), a espermatogênese inicia-se aos 6 meses de idade na espécie canina, embora ejaculados contendo espermatozoides só sejam verificados a partir dos 10 – 12 meses de idade.

Durante a espermatogênese, ocorrem divisões mitóticas das espermatogônias tipo A, dando origem a outras espermatogônias, que ainda não estão envolvidas no processo de produção dos espermatozoides, mas que são importantes para manter uma população de células tronco, as quais serão responsáveis pela produção contínua de espermatozoides durante a vida adulta do animal. Posteriormente, as espermatogônias tipo A tornam-se espermatogônias tipo B, que se dividem por mitose para produzir espermátócitos primários. Os espermátócitos primários atuam como um conjunto de células que se dividem por meiose e, por fim, produzem os espermatozoides (Cunningham, 2011).

A maturação espermática é o processo pelo qual o espermatozoide sofre diversas modificações funcionais, tais como o desenvolvimento potencial da motilidade progressiva, mudança nos padrões metabólicos e estruturais das organelas do flagelo, modificações na cromatina nuclear e membrana plasmática, movimentação e perda da gota citoplasmática (Hafez, 2004). Na espécie canina, a espermatogênese apresenta duração aproximada de 62 dias, enquanto a maturação espermática perdura por 12 dias nos mamíferos em geral (Gloria *et al.*, 2020), totalizando aproximadamente 74 dias para a completa formação de espermatozoides potencialmente aptos à fecundação.

4. CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR

A criopreservação de tecido testicular tem sido utilizada como uma alternativa para preservação da fertilidade, principalmente em animais pré-púberes (Goossens *et al.*, 2008), permitindo a viabilidade do material genético desses animais por tempo indeterminado. A conservação desse tecido em nitrogênio líquido possibilita que posteriormente esse material possa ser utilizado em programas de reprodução artificial (Poels *et al.*, 2012).

Os dois métodos mais utilizados na criopreservação de tecido testicular são a congelamento lento e a vitrificação (Abrishami *et al.*, 2010; Curaba *et al.*, 2011). A congelamento lento tem sido mais utilizada que a vitrificação, embora, ambos os métodos já tenham sido testados em diferentes espécies mamíferas (Wyns *et al.*, 2013). Além disso, uma outra alternativa para este propósito seria também a congelamento rápida do tecido testicular (Gouk *et al.*, 2011; Buarbung *et al.*, 2013).

A técnica de congelação lenta se baseia na redução gradual de temperatura, bem como a utilização de baixas concentrações de Agentes Crioprotetores (ACPs), diminuindo os efeitos de toxicidade dessas substâncias nas células do tecido testicular. No entanto, a capacidade de prevenir a formação de cristais de gelo nestas concentrações é limitada (Massip *et al.*, 1995; Dobrinsky, 1996). Para a utilização deste método, é necessário o uso de um equipamento com temperatura ajustável (Travers *et al.*, 2011), ou container específico, como o Mrfroster®, dentro de um freezer -80°C (Pukazhenthil *et al.*, 2015). A congelação lenta é considerada uma técnica demorada, podendo levar mais de 24h (Pothana *et al.*, 2015). Para a criopreservação de tecido testicular por congelação lenta, os fragmentos são incubados em um meio de congelação, contendo os ACPs, em seguida são colocados no equipamento de congelação até atingir a temperatura de -80°C, as amostras são então armazenadas em nitrogênio líquido até o posterior aquecimento (Schlatter *et al.*, 2002). Este método permite que o tecido sofra menos com os efeitos deletérios dos crioprotetores. No entanto, a possibilidade de formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação por congelação lenta é alta, o que pode impedir o uso do tecido após o aquecimento, devido a perda de viabilidade (Wyns *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2021), comparando o uso da congelação lenta vs vitrificação na criopreservação de tecido testicular de catetos (*Pecari tajacu*), relataram que as amostras criopreservadas por congelação lenta apresentaram maior incidência de retração da membrana basal, o que pode estar relacionado ao maior estresse osmótico e à formação de cristais de gelo nesse método.

Na congelação rápida, os fragmentos também são expostos à solução contendo os ACPs, mas por um período superior a 30 minutos. Os fragmentos são mantidos em vapor de nitrogênio a 4-5 cm acima do líquido por cerca de 10 minutos, após esse período são acondicionados em criotubos e imersos em nitrogênio líquido (Thuwanut *et al.*, 2013). Essa técnica já foi utilizada por Thuwanut *et al.* (2013) na criopreservação de tecido testicular de gato da selva (*Felis chaus*), leão (*Panthera leo*), pantera (*Panthera pardus*), cervo-de-timor (*Rusa timorenses*), muntíaco-de-fea (*Muntiacus feae*) e serow de Sumatra (*Capricornis sumatraensis*), comparando os métodos de congelação lenta e rápida, onde as amostras criopreservadas por congelação rápida apresentaram maior índice de apoptose celular. Evitar a criopreservação antecipada é o maior desafio enfrentado na utilização desta técnica (Buarpong *et al.*, 2013).

A vitrificação é uma técnica promissora, pois impede a formação de cristais de gelo pelo uso de altas concentrações de ACPs, além de uma velocidade de resfriamento ultrarrápida, o que pode minimizar os danos celulares à medida que proporciona viscosidade à solução de vitrificação (Carvalho, 2011; Baert *et al.*, 2013). Esta técnica tem como vantagens o baixo custo, fácil execução e possibilidade de utilização em campo, sendo uma alternativa para a preservação do material genético de espécies que venham a morrer subitamente. A vitrificação já foi evidenciada como uma forma natural de crioproteção em algumas plantas árticas (Hirsh, 1987).

O uso de qualquer técnica de criopreservação apresenta o risco de causar danos celulares, resultando na diminuição da viabilidade (Carvalho *et al.*, 2011). Além disso, apesar dos avanços na reprodução artificial com essas técnicas, ainda falta a padronização de protocolos que sejam eficientes para a criopreservação testicular em diferentes espécies. Portanto, estudos são necessários para permitir a aplicação prática da criopreservação testicular na reprodução artificial de animais domésticos e selvagens usando diferentes métodos de criopreservação para avaliar a criosensibilidade do tecido testicular e determinar quais protocolos de criopreservação são eficazes em diferentes espécies.

4.1 Métodos de vitrificação

O uso da técnica de vitrificação foi descrito pela primeira vez na década de 40 por Luyet e Geheio na preservação de sêmen de sapo (Luyet e Geheio, 1940). Desde aquela época, vários pesquisadores vêm relatando diferentes protocolos com a utilização da vitrificação de células e tecidos em inúmeras espécies (Carvalho *et al.*, 2011).

Diferentes técnicas de vitrificação já foram testadas em tecidos, mas a maioria foi realizada em tecido ovariano (Arav & Patrizio, 2019). O método mais utilizado na vitrificação de tecido testicular é a vitrificação em superfície sólida, no qual os fragmentos do tecido são imersos numa solução de vitrificação, em seguida são retirados e colocados sobre uma superfície metálica em contato com o nitrogênio líquido, sendo então imediatamente vitrificados, as amostras são transferidas para criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (Silva *et al.*, 2019). Essa técnica já foi testada na criopreservação de tecido testicular de cães adultos (Carvalho, 2016) e pré púberes (Teixeira *et al.*, 2021), onde foram testadas diversas

associações de crioprotetores (DMSO/EG, EG/GLI e DMSO/GLI) na preservação da morfologia dos túbulos seminíferos, sendo a associação de DMSO/EG a que melhor preservou a integridade testicular pós criopreservação. Teixeira *et al.* (2021) também relatou que o testículo de cães pré-púberes é constituído de células ainda indiferenciadas, o que promove um padrão mais homogêneo quando comparado com a heterogeneidade da arquitetura testicular de um animal púbere.

Lima *et al.* (2018b) descreveram um método de vitrificação de tecido testicular de gatos domésticos por imersão em agulhas, em que os fragmentos testiculares foram inseridos em uma agulha de 30 G e imersos em uma solução de equilíbrio contendo ACPs em baixas concentrações (2,8M) por 10 minutos em temperatura ambiente (~ 22 °C). Em seguida, os fragmentos foram expostos a uma solução de vitrificação contendo uma concentração maior de ACPs (5,6M) por 5 minutos em temperatura ambiente. Depois foram mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido e armazenados em criotubos por pelo menos uma semana. Apesar de ser um método recente, a vitrificação por imersão em agulhas já foi testada na criopreservação de tecido testicular de cães domésticos adultos (Picazo *et al.*, 2022), onde a análise histológica revelou que esse tipo de vitrificação afetou a integridade estrutural dos túbulos, com incidência de vacuolização e necrose celular registradas em todos os tipos de células germinativas. Em um estudo comparando a congelção lenta vs vitrificação por imersão em agulhas na criopreservação de tecido testicular de lobos (Andrae *et al.*, 2021), verificou-se que a vitrificação por imersão em agulhas foi inferior na preservação da morfologia dos túbulos, apresentando um maior grau de descolamento da membrana basal.

No método de vitrificação em criotubos, os fragmentos de tecido são imersos em uma solução de vitrificação contendo ACPs por alguns minutos, em seguida são retirados dessa solução, enxutos e acondicionados em criotubos e depois armazenados em nitrogênio líquido (Silva *et al.*, 2021). Isso permite pouca manipulação mecânica do tecido e pode contribuir para diminuir o dano tecidual durante o processo de vitrificação. No entanto, esta técnica foi pouco relatada em estudos envolvendo a criopreservação de tecido testicular, sendo relatada pela primeira vez apenas em 2018 durante a criopreservação de tecido testicular de gatos pré púberes (Lima *et al.*, 2018a), onde obtiveram resultados satisfatórios com o uso dessa técnica na preservação da morfologia dos túbulos seminíferos e viabilidade celular após o aquecimento. Já foi feita a comparação da vitrificação em criotubos com a vitrificação em superfície sólida e congelção lenta na criopreservação de tecido testicular de catetos (Pecari

tajacu), onde Silva et al. (2021) obtiveram resultados que evidenciam a vantagem da vitrificação em criotubos sobre as demais técnicas, devido a sua fácil execução e a possibilidade do seu uso em campo.

Um método bastante utilizado na vitrificação de tecido ovariano é o uso do Ovarian Tissue Cryosystem (OTC), um dispositivo fechado, feito por aço inoxidável, que pode suportar temperaturas mais baixas que -196°C, como a do nitrogênio líquido. Também é resistente a temperaturas superiores a 200 °C, o que permite a sua esterilização e reutilização. Com a utilização desse dispositivo é possível evitar a formação de cristais de gelo hexagonais (Carvalho et al., 2013). Todos os métodos de vitrificação anteriormente citados utilizam criotubos plásticos para o armazenamento das amostras, com o uso do OTC há uma maior condutividade da temperatura do nitrogênio líquido para o tecido, maximizando as taxas de resfriamento. Como tentativa de aumentar essa taxa, técnicas como a vitrificação de superfície sólida têm sido aplicadas na criopreservação de tecido testicular (Teixeira *et al.*, 2021; Andrae *et al.*, 2021; Carvalho, 2016). No entanto, a utilização de um sistema aberto expõe as amostras ao vapor de nitrogênio, podendo permitir a exposição a patógenos resistentes a temperaturas criogênicas (Grout e Morris, 2009). Dessa forma, o OTC poderia ser uma alternativa promissora para a criopreservação de tecido testicular. Contudo, seu uso para esta finalidade ainda não foi estabelecido, sendo necessários estudos que evidenciem a aplicabilidade dessa técnica no tecido gonadal masculino.

4.2 Fatores que interferem na criopreservação do tecido testicular

4.2.1 Idade do Animal

O tecido testicular criopreservado pode ser utilizado em biotécnicas como o xenotransplante, que consiste na transferência de tecido entre diferentes espécies de animais e tem como objetivo promover nos receptores respostas que promovam a recuperação da atividade gametogênica (Conera, 2014). A capacidade do tecido enxertado de formar pequenos vasos tem sido relatada como essencial para a sobrevivência desse enxerto. A baixa atividade espermatogênica do tecido testicular pré púbere tem sido evidenciada como um fator que contribui para o sucesso da sobrevivência desse tecido no xenotransplante. O crescimento dos túbulos seminíferos no período pré púbere é dependente da capacidade de

divisão das células de Sertoli e espermatogônias. Já o tecido testicular adulto tem como característica um maior número de células diferenciadas e perda da capacidade de divisão das células de Sertoli, dificultando sua utilização na técnica de xenotransplante.

Já em relação a criopreservação, Unni et al. (2012), durante a criopreservação de tecido testicular de ratos, relataram que o tecido de animais pré púberes sofreu duas vezes mais crioinjúrias que o de animais adultos. Segundo Carvalho (2016) as espermatogônias, células de Sertoli e Leydig possuem citoplasma rico e, conseqüentemente, mais vulnerável ao processo de vitrificação e aquecimento. Essas células são mais abundantes no tecido pré púbere.

4.2.2 Crioprotetores

A preservação e armazenamento a longo prazo de amostras biológicas fora do organismo vivo é realizada por meio da criopreservação (Carvalho, 2016). O metabolismo celular diminui drasticamente em condições de baixas temperaturas, o que interrompe as reações metabólicas que mantêm as atividades celulares (Khalifeh *et al.*, 1997). Para melhorar a sobrevivência celular durante a criopreservação e o aquecimento, é necessário evitar lesões criogênicas provocadas pela formação de cristais de gelo intracelular. A adição de agentes crioprotetores (ACPs) e o controle das taxas de congelação e descongelação visam diminuir os danos durante a criopreservação (Nikiforov *et al.*, 2018).

Existem duas classes de ACPs utilizados em protocolos de criopreservação em virtude do seu peso molecular e mecanismo de ação (Silva *et al.*, 2019b). Os internos ou penetrantes, como o glicerol (GLI: 92,10 g/mol), etilenoglicol (EG: 62,07 g/mol), Dimetilsulfóxido (DMSO 78g/mol), e propanodiol (76,9 g/mol). E os externos ou não penetrantes, como os açúcares (sacarose, trealose, dextrano, lactose e d-manitol) e compostos de alto peso molecular (polietileno glicol e hidroxietil amido) (Lee *et al.*, 2014). Estudos evidenciaram que as lipoproteínas de baixa densidade são as responsáveis pela resistência contra o choque térmico, promovendo resultados positivos sobre a qualidade espermática (Silva *et al.*, 2000).

Nos métodos de vitrificação são utilizadas altas concentrações de ACPs para obter uma criopreservação bem-sucedida. No entanto, as células são muito sensíveis à toxicidade dos ACPs. Sabe-se que a associação de crioprotetores permite reduzir os efeitos tóxicos desses agentes sobre as células do tecido testicular (Silva *et al.*, 2021). No entanto, ainda se

faz necessário estudos mais aprofundados em relação as concentrações de crioprotetores seguras para a vitrificação de tecido testicular em diversas espécies. O uso da técnica de vitrificação por imersão em agulhas apresentou bons resultados na criopreservação de tecido ovarino humano sob baixas concentrações de ACPs, apresentando-se como uma técnica promissora na criopreservação de tecido gonadal (Wang *et al.*, 2008).

4.2.3 Tamanho dos Fragmentos

O tamanho e a espessura dos fragmentos podem influenciar na viabilidade do tecido após a criopreservação (Honaramooz, 2012). Estudos (Milazzo *et al.*, 2008, Gouk *et al.* 2011) evidenciam que o tamanho do fragmento está relacionado com a espécie e com os protocolos de criopreservação utilizados. Assim, o tamanho e a espessura do fragmento podem influenciar na manutenção da qualidade pós-criopreservação e esse resultado está intimamente relacionado com a espécie doadora do testículo, bem como os protocolos de criopreservação utilizados. (Comizzolli *et al.*, 2012; Portela *et al.*, 2019).

Carvalho (2016), após criopreservar fragmentos de testículos de cães púberes com dimensões de 3 mm³ e 5 mm³ utilizando duas técnicas diferentes: congelamento lento e vitrificação em superfície sólida, não avaliou se as dimensões dos fragmentos influenciaram nos resultados.

4.2.4 Aquecimento

Os processos de aquecimento e remoção de ACPs em testículos vitrificados são etapas fundamentais para manutenção da qualidade pós-criopreservação (Bagchi *et al.*, 2008). Pecg (2007) descreve que é necessária a remoção dos ACPs durante o aquecimento, para se evitar alterações osmóticas que provocam danos celulares devido à hidratação demasiada.

O método de aquecimento do tecido testicular criopreservado mais utilizado é feito em banho-maria a 37°C por cerca de 30 segundos a 1 minuto e, logo após essa etapa, há a incubação em soluções de concentração decrescentes dos mesmos crioprotetores utilizados na vitrificação (Carvalho, 2016).

Danos celulares tais como: citotoxicidade causada pelos ACPs ou recristalização podem ocorrer durante o aquecimento devido à limitação de transferência de calor característico do testículo de cada espécie (Rall *et al.*, 1983; Karlsson e Toner, 1996).

Portanto, são necessários estudos que possam estabelecer protocolos de aquecimento e remoção de ACPs eficientes que assegurem a viabilidade celular após a criopreservação.

Silva et al. (2019a) relataram bons resultados com um protocolo de aquecimento testicular de catetos em que as amostras foram aquecidas a 37 °C por 1 minuto e os criproterores foram removidos através de 3 lavagens por 5 min com o mesmo meio utilizado na vitrificação, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e adicionando concentrações decrescentes de sacarose (0,50M, 0,25M e 0M). Outros pesquisadores obtiveram bons resultados com protocolos de aquecimento semelhantes (Jahnukainen et al., 2007; Milazzo et al., 2008).

4.3 Análise do tecido testicular vitrificado

Para se obter sucesso na criopreservação de uma amostra vascularizada, como o tecido testicular, é imprescindível que a maioria das células permaneçam viáveis após o aquecimento, bem como exerçam sua função normal de forma a garantir a viabilidade de todo o material criopreservado (Carvalho, 2016). Dessa forma, ao se avaliar a eficiência de um método de criopreservação de tecido testicular, é necessário realizar testes que avaliem a capacidade das células de se proliferarem e diferenciarem, bem como a estrutura morfológica das células individuais e da arquitetura dos túbulos seminíferos. Também pode-se avaliar a atividade do DNA, o índice de apoptose celular, dentre outras análises que podem inferir se as células criopreservadas têm a capacidade de retomar a espermatogênese após o aquecimento (Teixeira, 2021). A maioria das análises feitas no tecido testicular contam com o uso de avaliações histológicas, técnicas morfométricas quantitativas, técnicas imuno-histoquímicas, extração de espermatozoide testicular, cultivo in vitro ou transplante de fragmento testicular visando a retomada da espermatogênese e reestabelecimento da função testicular. (Lima et al., 2018b).

Para a análise das características morfológicas do tecido fresco e criopreservado, as amostras devem ser preparadas de modo a preservar sua estrutura original o máximo possível. A coloração utilizando os corantes de hematoxilina (H) e eosina (E) é a mais utilizada para a coloração de tecidos de origem animal. Esta coloração permite uma visão de todo o tecido, possibilitando uma identificação geral de todos os elementos teciduais. Nessa coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados na cor rosa (Junqueira e Carneiro, 1999). A coloração com HE permite a avaliação da morfologia do tecido testicular,

parâmetros como a integridade de membrana, arquitetura dos túbulos seminíferos, visualização dos tipos celulares, presença de vacuolização no citoplasma e organização estrutural podem ser avaliados com o uso dessa coloração. Por meio dessa avaliação, é possível analisar os danos causados pelos métodos de criopreservação, que possam comprometer a morfologia do tecido (Lima *et al.*, 2018a). Para tanto, as amostras frescas e criopreservadas devem ser coradas em HE e comparadas entre si.

A manutenção da integridade da membrana plasmática celular após a criopreservação é importante, pois ela é responsável pelo transporte seletivo de moléculas. A avaliação da integridade funcional dessa membrana pode ser sinônimo de avaliação da viabilidade celular (Graham e Mocé, 2005). Durante a criopreservação a membrana plasmática sofre desestabilização e há uma transição dos lipídios da fase fluida para gel, podendo haver a formação de cristais de gelo e consequente rompimento da membrana, com perda de componentes intracelulares e morte celular (Passos, 2007). Para se avaliar a integridade funcional da membrana, pode-se utilizar sondas anfipáticas, que penetram a membrana intacta, corando as células viáveis, tornando-as fluorescentes (Varner, 2008).

No processo de vitrificação, o tecido testicular pode sofrer injúrias, provocadas pela mudança brusca de temperatura. Alguns testes podem ser empregados para avaliar o grau de apoptose celular, bem como a integridade do DNA. O terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL) é um teste comercial, indicado para detecção e quantificação de apoptose ao nível celular, baseado na marcação de quebras de cadeias de DNA, que são avaliadas por microscopia de fluorescência (Silva, 2019).

A coloração das proteínas argirofílicas, presentes nos cromossomos no estágio de interfase, relacionadas às regiões organizadoras de nucléolo (RONs), pode ser obtida pela técnica denominada de AgNOR, usada em preparações citológicas ou histológicas para a obtenção da taxa de proliferação celular (Crocker *et al.*, 1989; Lindner, 1993) onde, em células normais, as RONs são usualmente organizadas de forma clara em número igual ou maior a um, restritas ao nucléolo, e, em células neoplásicas, as NORs se desagregam do nucléolo e tendem a se dispersar pelo núcleo (Ofner e Schmid, 1996). As RONs são regiões do DNA, localizados nos nucléolos. Assim a denominação AgNOR significa áreas de RONs coradas pela prata, que ao microscópio óptico pode se observar como áreas enegrecidas no interior de núcleo e nucléolos (Sanches, 2010). A coloração pela prata das regiões

organizadoras de nucléolos (RONs) é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucleico ribossômico, avaliando a proliferação em células normais ou neoplásicas. Esta pode ser uma forma de avaliar os efeitos deletérios do processo de vitrificação, que podem induzir a degeneração testicular (Chacur et al., 2015).

A análise ultraestrutural do tecido testicular pode ser realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que possibilita a observação de características microtopográficas da superfície celular, bem como o detalhamento a arquitetura dos túbulos seminíferos (Beu *et al.*, 1998). A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é uma importante ferramenta para se analisar componentes celulares que são mais susceptíveis a sofrerem injúrias pelos métodos de criopreservação, incluindo a integridade do citoplasma, membrana nuclear e diversas organelas (Keros et al., 2007; Wyns et al., 2007).

O cultivo *in vitro* do tecido testicular de mamíferos tem sido relatado como uma ferramenta eficiente para avaliação e desenvolvimento do tecido criopreservado (Yokonishi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016), sendo promissor no intuito de preservar a fertilidade do macho, especialmente quando executado em associação com a criopreservação (Yokonishi *et al.*, 2014). Células imaturas de tecido testicular de camundongos cultivadas imediatamente após o processamento ou a criopreservação já foram utilizadas para desenvolvimento *in vitro*, seguido de inseminação artificial e obtenção de proles saudáveis (Sato *et al.*, 2011; Yokonishi *et al.*, 2014). Em cães, o cultivo de fragmentos de tecido testicular de indivíduos pré púberes seguido do xenotransplante em camundongos levou a formação de novos túbulos seminíferos com células germinativas viáveis.

5. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Comparar os efeitos de diferentes métodos de vitrificação sobre a preservação do tecido testicular de cães pré púberes.

Objetivos específicos:

- Evidenciar o protocolo de vitrificação mais adequado para a criopreservação do tecido testicular canino.
- Avaliar os efeitos da vitrificação sobre a manutenção das características histomorfológicas, viabilidade e potencial proliferativo celular no tecido testicular de cães pré púberes.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Bioética e animais experimentais

Foram coletados cinco pares de testículos de cães machos, de 3 a 5 meses de idade, hígdos e domiciliados e sem raça definida, provenientes de orquiectomias eletivas realizadas em clínicas veterinárias da cidade Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte. Todos os procedimentos realizados seguiram as regulamentações internacionais de bem-estar animal.

Delineamento experimental

Inicialmente, cada par de testículos foi dividido em fragmentos de 1 a 3mm³, dos quais três fragmentos foram imediatamente fixados em Bouin, para análise morfológica por meio de histologia clássica e em paraformaldeído 4 %, para a quantificação das Regiões Organizadoras de Nucleolos (Lima *et al.*, 2018a). Um fragmento foi destinado para a análise da viabilidade celular por meio de microscopia de fluorescência. Foram testados diferentes métodos de vitrificação: em superfície sólida, imersão em agulhas, criotubos e OTC.

Vitrificação e aquecimento de fragmentos do tecido testicular

Os tecidos fragmentados foram imersos em duas soluções contendo os crioprotetores Dimetilsufóxido (DMSO) e Etilenoglicol (EG). A primeira solução, constituída de DMEM acrescido de 0,25 M de sacarose, 10% de SFB e 1,4M de cada crioprotetor, foi considerada uma solução de equilíbrio. A solução de vitrificação continha DMEM acrescido de 0,5 M de sacarose, 10% de SFB e 2,8M de cada crioprotetor. Os fragmentos foram imersos 10 minutos em solução de equilíbrio e 5 minutos na solução de vitrificação. Em seguida, foram enxutos com gaze e submetidos a vitrificação. (Lima *et al.*, 2018)

Na vitrificação em superfície sólida foi colocada uma superfície metálica em contato com nitrogênio líquido; ao entrar em contato com a superfície os fragmentos foram vitrificados, transferidos para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido. (Teixeira *et al.*, 2021). Para a vitrificação em agulhas, os fragmentos foram espetados em agulhas 30G que, em seguida, foram colocadas nas soluções de equilíbrio e vitrificação pelo tempo determinado. Após serem enxutas, as agulhas contendo os fragmentos foram imersas em nitrogênio líquido e transferidas para criotubos. (Lima *et al.*, 2018b). Na vitrificação em criotubos, os fragmentos após serem retirados da solução de vitrificação, foram enxutos com

gaze e acondicionados em criotubos previamente identificados e, em seguida, imersos em nitrogênio líquido (Lima et al., 2018a). Já na vitrificação em OTC, os fragmentos foram imersos na SV dentro do dispositivo, a solução de vitrificação foi retirada e o OTC fechado e imerso em nitrogênio líquido. (Carvalho et al., 2013). Todas as amostras foram acondicionadas em botijões criobiológicos por uma semana.

Após uma semana de armazenamento, o material foi retirado dos botijões, exposto a temperatura ambiente durante 1 minuto e, então imerso em banho maria a 37°C até o completo derretimento da solução de vitrificação. Os crioprotetores foram removidos do tecido testicular através de banhos consecutivos, de 5 minutos de duração cada, utilizando DMEM suplementado com SFB (10%) e concentrações decrescentes de sacarose (0,5M, 0,25M e 0M), de acordo com Silva *et al.*, 2019a. Após este procedimento, as amostras foram destinadas a análise histológica.

Avaliação morfológica do tecido testicular por histologia clássica

As amostras do grupo controle fresco e da vitrificação foram analisadas quanto à morfologia através da histologia clássica. Para tanto, os fragmentos serão fixados em Bouin durante 12 h e inclusos em parafina histológica (Teixeira *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2018a; Baert *et al.*, 2012). As amostras foram seccionadas em cortes de 5µm de espessura e a cada 5ª secção as lâminas foram montadas e coradas com hematoxilina-eosina para posterior avaliação em microscopia de luz (400x).

Foram analisados 30 túbulos seminíferos de acordo com a integridade e o grau de separação da membrana basal, distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, visualização nuclear, condensação nuclear e organização da estrutura tubular. A avaliação foi feita por meio de escores de 1 a 3, utilizando um protocolo de avaliação proposto Thuwanut *et al.* (2013), com algumas adaptações, conforme ilustrado no Quadro 1, onde o escore 3 indica o melhor resultado, com a preservação de todas as estruturas analisadas e organização celular, e 1 o comprometimento dos parâmetros avaliados.

Quadro 1. Classificação da integridade dos parâmetros morfológicos do tecido testicular de cães pré púberes.

Parâmetros	Características	Escore
Separação da membrana basal	Sem separação	3
	<75% de separação	2
	>75% de separação	1
Ruptura da membrana basal	Totalmente íntegra	3
	Parcialmente rompida	2
	Totalmente rompida	1
Distinção entre espermatogônias/Sertoli	Fácil distinção	3
	Difícil distinção	2
	Impossível distinção	1
Visualização Nuclear	Fácil visualização	3
	Difícil visualização	2
	Impossível visualização	1
Condensação Nuclear	Sem núcleos picnóticos	3
	<40% de núcleos picnóticos	2
	>40% de núcleos picnóticos	1
Estrutura	Células totalmente organizadas	3
	Células parcialmente organizadas	2
	Células totalmente desorganizadas	1

Fonte: Adaptado de Thuwanut et al., 2013.

Viabilidade celular

Para isolar as células do tecido, os fragmentos foram digeridos usando um protocolo de digestão enzimática (Silva et al., 2019). Para tanto, foi utilizado 0,2% de collagenase tipo IV a 37 ° C por 20 min sob agitação lenta e a reação foi interrompida pela adição de um volume igual de SFB. Para a análise da viabilidade celular seguiu-se a metodologia descrita por Campos (2019). 10 µL da solução contendo células isoladas foram incubadas em uma solução constituída por uma mistura de 3 µL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato e PBS) e 3 µL de Hoechst 33342 (40 mg/mL em PBS) durante 10 min a 37 ° C para detectar a viabilidade das células testiculares e permitir a contagem de

núcleos, respectivamente. Em seguida, um total de 100 células foram contadas e classificadas como inviável (fluorescência vermelha; iodeto de propídio) ou viável (fluorescência azul; Hoechst 33342).

Avaliação da proliferação celular por AgNOR

Os fragmentos de tecidos testicular foram fixados em paraformaldeído (4%), e após o processamento histológico foram seccionados (5 mm de espessura) e processados segundo Sanches (2010).

A contagem das RONS foi realizada observando os pontos de coloração enegrecida no interior dos nucléolos em cada um dos tipos celulares: espermatogônias, células de Leydig e Sertoli, por meio de microscopia óptica (magnitude de 1000x). O padrão de contagem das regiões foi realizado considerando-se 10 células/campo de cada tipo celular, repetindo-se em 10 campos microscópicos aleatórios, totalizando a contagem de 100 células de cada um dos tipos celulares, conforme Lima *et al* (2018a)

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Para todas as análises, o software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado. Para análise da morfologia, os escores foram inicialmente comparados entre todos os tratamentos utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis para verificação de homogeneidade. Ao serem detectadas diferenças, as amostras foram comparadas pareadamente utilizando-se o teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Os dados referentes à viabilidade celular e quantificação das regiões organizadoras de nucléolos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Fisher PLSD. Para todos os resultados, foi considerado um valor de significância de $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

A histomorfologia do tecido testicular no grupo fresco (Figura 1A) revelou túbulos seminíferos com arquitetura normal, e com epitélio germinativo pouco desenvolvido, com uma fácil visualização e distinção entre espermatogônias e células de Sertoli. O tecido intersticial era escasso e preenchido com tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células de Leydig. Todas as amostras frescas apresentaram estrutura bem preservada em relação aos parâmetros avaliados. Em todas as amostras analisadas foi comprovada a ausência de espermatozoides, compatível com animais pré-púberes.

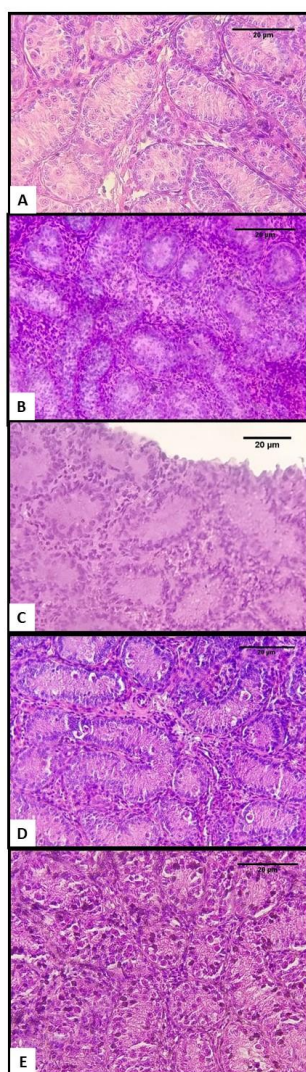


Figura 1. Avaliação morfológica do tecido testicular de cães pré púberes (n=5). A- Fresco (400x), B- Superfície Sólida (400x), C- Imersão em Agulhas (400x), D- Criotubos (x400), E- Ovarian Tissue Cryosystem (400x).

Na avaliação em escores dos parâmetros morfológicos (Tabela 1), todos os métodos de vitrificação foram eficientes na preservação da integridade da membrana basal, apresentando índices de retração e ruptura de membrana semelhantes ao grupo fresco ($P>0,05$). No tocante à distinção celular, visualização nuclear, condensação nuclear e estrutura dos túbulos, houve uma redução significativa no grupo vitrificado, quando comparado ao fresco. No entanto, as amostras submetidas à vitrificação em criotubos (Figura 1D) apresentaram resultados significativamente maiores de distinção celular, visualização nuclear, condensação nuclear e estrutura dos túbulos seminíferos, quando comparados aos métodos de vitrificação em superfície sólida (Figura 1B) e agulhas (Figura 1C), diferindo da vitrificação em OTC (Figura 1E) apenas na condensação nuclear, onde o sistema fechado foi superior, apresentando menor índice de núcleos picnóticos.

Tabela 1. Avaliação morfológica em escores (3, normal a 1, degenerado) de tecido testicular de cães pré-púberes (n=5) fresco vs criopreservado utilizando diferentes métodos de vitrificação.

Tratamento	Retração de Membrana	Ruptura de Membrana	Distinção Celular	Visualização Nuclear	Condensação Nuclear	Estrutura
Fresco	$2,97 \pm 0,01^a$	$2,93 \pm 0,02^a$	$2,60 \pm 0,04^a$	$2,78 \pm 0,03^a$	$2,69 \pm 0,03^a$	$2,94 \pm 0,01^a$
VSS	$2,98 \pm 0,01^a$	$2,97 \pm 0,01^a$	$1,77 \pm 0,04^c$	$1,76 \pm 0,05^c$	$1,66 \pm 0,05^e$	$2,06 \pm 0,05^c$
Agulhas	$2,99 \pm 0,01^a$	$2,91 \pm 0,02^a$	$1,75 \pm 0,04^c$	$1,90 \pm 0,03^c$	$1,75 \pm 0,04^d$	$1,99 \pm 0,01^d$
Criotubos	$2,94 \pm 0,01^a$	$2,92 \pm 0,02^a$	$2,10 \pm 0,04^b$	$2,11 \pm 0,04^b$	$1,86 \pm 0,02^c$	$2,28 \pm 0,04^b$
OTC	$2,95 \pm 0,01^a$	$2,94 \pm 0,02^a$	$1,99 \pm 0,05^b$	$2,15 \pm 0,04^b$	$2,06 \pm 0,04^b$	$2,20 \pm 0,04^{bc}$

^{abcde}Na mesma coluna, diferentes sobrescritos demonstram diferenças significativas ($P<0,05$).

Em relação à viabilidade (Figura 2), todas as amostras submetidas ao procedimento de vitrificação sofreram uma redução significativa da viabilidade, quando comparadas ao grupo fresco. As amostras criopreservadas por vitrificação em superfície sólida, imersão em agulhas e vitrificação em criotubos apresentaram viabilidade superior às vitrificadas em OTC.

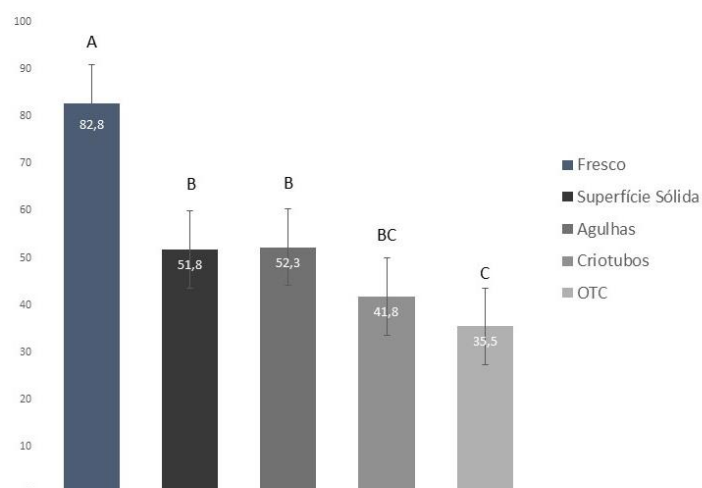


Figura 2. Avaliação da viabilidade de células do tecido testicular fresco vs criopreservado de cães pré-púberes (n=5). ^{ABC}Diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A quantificação das regiões organizadoras de nucléolos das espermatogônias (Figura 4A) mostrou que os grupos submetidos a vitrificação em superfície sólida (Figura 3B), vitrificação em criotubos (Figura 3D) e vitrificação em OTC (Figura 3E) foram semelhantes ao grupo fresco, enquanto na vitrificação por imersão em agulhas (Figura 3C) o número foi maior. A preservação do potencial proliferativo das células de Leydig (Figura 4B) foi semelhante ao grupo fresco nas amostras vitrificadas em superfície sólida, agulhas e OTC, apresentando uma redução significativa ($P < 0,05$) do número de RONS no grupo submetido a vitrificação em criotubos. Já em relação as células de Sertoli (Figura 4C), a quantificação das regiões organizadoras de nucléolos nos grupos vitrificados em criotubos e em OTC foi semelhante ao grupo fresco; no entanto, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) do número de RONS das amostras submetidas a vitrificação em superfície sólida e por imersão em agulhas.

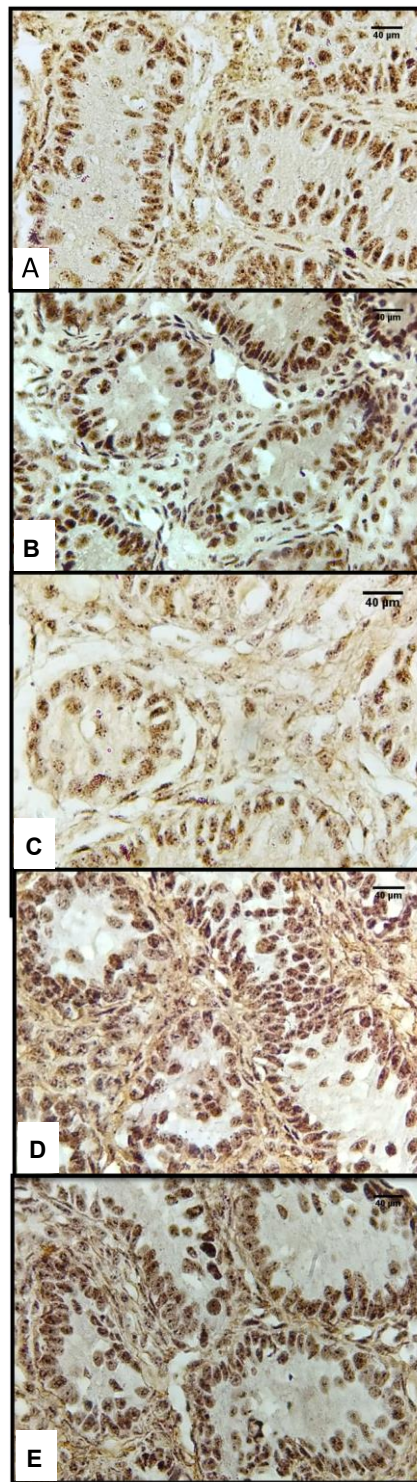


Figura 3. Imagem representativa do potencial proliferativo avaliado pela quantificação das regiões organizadoras de nucléolos em células testiculares de cães pré púberes (n = 5). A- Fresco (1000x), B- Superfície Sólida (1000x), C- Imersão em Agulhas (1000x), D- Criotubos (1000x), E- Ovarian Tissue Cryosystem (1000x).

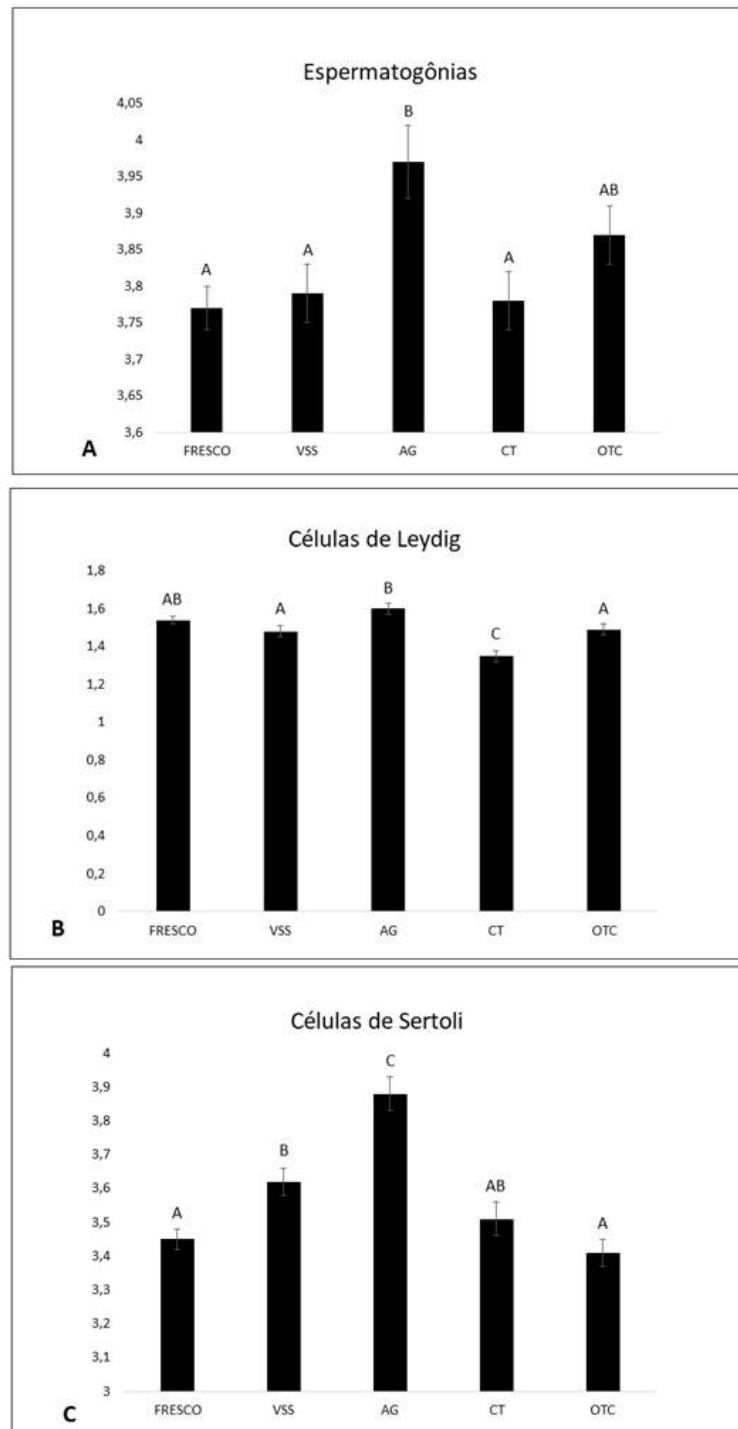


Figura 4. Avaliações da capacidade proliferativa com o número de Regiões Organizadoras de Nucléolos (média $\pm$ erro padrão) em espermatogônias (A), células de Leydig (B) e células de Sertoli (C) no tecido testicular de cães pré púberes (n=5) exposto a diferentes métodos de vitrificação (Superfície Sólida, Imersão em Agulhas, Criotubos e OTC). ^{ABC}Diferentes letras maiúsculas acima das barras indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$).

8. DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a comparar diferentes métodos de vitrificação no tecido testicular de cães pré púberes, inclusive propondo o uso da vitrificação em criotubo e em OTC como alternativas às previamente já testadas VSS e VIA para essa espécie. A associação dos crioprotetores DMSO/EG utilizada neste trabalho já havia sido estabelecida por Teixeira *et al.* (2021), demonstrando que essa associação foi capaz de preservar os parâmetros morfológicos do tecido testicular de cães pré púberes pós vitrificação.

A vitrificação se baseia no uso de uma taxa de resfriamento ultrarrápida, resultando em menor formação de cristais de gelo no interior das células e consequente redução de danos estruturais e funcionais (Wyns *et al.*, 2013). O principal objetivo da criopreservação testicular é obter células germinativas viáveis para a geração de futuros descendentes, seja por fertilização *in vitro*, que tem sido realizada com espermatozoides de animais adultos (Buarpong *et al.*, 2013), ou cultivo *in vitro* de células germinativas imaturas obtidas de animais pré-púberes para a reativação da espermatogênese (Yokonishi *et al.*, 2014). Nesse contexto, os fragmentos testiculares de cães domésticos devem ser preservados morfolologicamente, com células viáveis e funcionais obtidas após a vitrificação. A morfologia testicular preservada fornece um ambiente funcional para o ciclo espermático (Song *et al.*, 2010). Com as estruturas celulares intactas após a criopreservação, a espermatogênese pode ser retomada e espermatozoides podem ser obtidos para uso futuro (Milazzo *et al.*, 2008). Essa relação entre a morfologia e a capacidade das células de retomar suas funções foi evidenciada nesse estudo quando foi avaliado o potencial de proliferação celular dos tecidos após a vitrificação. Travers *et al.* (2011), avaliando o tecido testicular de ratos após criopreservação e cultivo *in vitro* descobriram que uma melhor preservação da arquitetura tecidual se correlacionava com uma maior taxa de proliferação celular, com diferenciação iniciada durante o cultivo. Em um estudo sobre fragmentos testiculares de uma espécie de cervo indiano, Pothana *et al.* (2015) também verificaram a ausência de células proliferativas em túbulos seminíferos degenerados após xenotransplante em camundongos.

A criopreservação de tecido testicular pré púbere tem como principal vantagem a possibilidade de preservação da fertilidade em animais jovens, de alto valor genético, que venham a morrer subitamente (Thuwanut *et al.*, 2013). Além disso, a baixa atividade espermatogênica do tecido testicular pré púbere tem sido evidenciada como um fator que

contribui para o sucesso da sobrevivência desse tecido no xenotransplante. O crescimento dos túbulos seminíferos no período pré púbere é dependente da capacidade de divisão das células de Sertoli e espermatogônias. Já o tecido testicular adulto tem como característica um maior número de células diferenciadas e perda da capacidade de divisão das células de Sertoli, dificultando sua utilização na técnica de xenotransplante (Lee *et al.*, 2016).

Esta foi a primeira vez que a vitrificação em criotubos foi utilizada na criopreservação de tecido testicular de cães pré púberes e se mostrou eficiente na preservação dos parâmetros morfológicos de integridade da membrana basal, distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, bem como a organização estrutural dos túbulos seminíferos. As características morfológicas, proliferativas e de viabilidade das células germinativas foram mantidas após o aquecimento dos fragmentos. O uso dessa biotecnologia já foi descrito para o tecido ovariano de ovelhas, resultando no nascimento de uma prole normal após o autotransplante de tecido ovariano vitrificado (Bordes *et al.*, 2005). Silva *et al.*, (2021), comparando o uso da vitrificação em criotubos e da superfície sólida na criopreservação de tecido testicular de catetos (*Pecari tajacu*), obtiveram resultados positivos na conservação da morfologia do tecido com a utilização da vitrificação em criotubos, sugerindo que esta técnica permitiria uma melhor adequação do tecido às mudanças de temperatura oriundas do processo de vitrificação.

O OTC também foi utilizado pela primeira vez na criopreservação de tecido testicular de cães neste trabalho, apresentando bons resultados no tocante a preservação da morfologia e organização celular nos túbulos seminíferos, sendo ainda superior a vitrificação em criotubos na condensação nuclear, com menos índice de núcleos picnóticos. Esses resultados podem ser relacionados com as informações obtidas a partir da utilização desse dispositivo na criopreservação de tecido ovariano, onde foi possível evitar a formação de cristais de gelo hexagonais (Carvalho *et al.*, 2013). Com o uso do OTC há uma maior condutividade da temperatura do nitrogênio líquido para o tecido, maximizando as taxas de resfriamento. No entanto, houve uma grande redução da viabilidade celular com o uso dessa técnica, o que pode estar relacionado a uma maior exposição aos agentes crioprotetores, já que na vitrificação em OTC os fragmentos não são enxutos para retirar o excesso da solução de vitrificação antes de serem criopreservados, como ocorre nos demais métodos.

A vitrificação em superfície sólida foi a que mais prejudicou a preservação da morfologia do tecido, comprometendo a distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, a visualização e condensação nuclear, além de diminuir a organização estrutural. Estes efeitos deletérios podem estar relacionados com o tempo de execução da técnica, uma vez que os fragmentos precisam ser colocados sobre a superfície metálica e só depois transferidos para criotubos com o auxílio de pinças (Silva *et al.*, 2019a), o que dificulta a manipulação das amostras e aumenta o tempo de exposição do tecido ao vapor de nitrogênio. Em um estudo utilizando esta técnica na criopreservação de tecido testicular de cães pré púberes (Teixeira *et al.*, 2021), foi relatado que todas as amostras criopreservadas apresentaram um índice maior de separação da membrana basal, o que pode prejudicar o aporte nutricional das células germinativas. Já com a utilização desse método na criopreservação de tecido testicular de cães adultos, Carvalho (2016) relatou que o grupo vitrificado apresentou degeneração e diminuição do número de células germinativas, formação de células gigantes multinucleadas, vacuolização de células tubulares e perda de espermátides alongadas em túbulos seminíferos atrofiados, o que pode estar relacionado a uma degeneração lipídica. Também foram encontrados grande número de vacúolos em algumas células de Sertoli.

A vitrificação em agulhas afetou consideravelmente a organização estrutural do tecido, com células bastante desorganizadas nos túbulos seminíferos, arquitetura testicular prejudicada e grande incidência de condensação nuclear. Na criopreservação de tecido testicular de cães adultos (Picazo *et al.*, 2022), utilizando esta técnica, a análise histológica revelou que esse tipo de vitrificação afetou a integridade estrutural dos túbulos, com incidência de vacuolização e necrose celular registradas em todos os tipos de células germinativas. Em um estudo comparando a congelção lenta vs vitrificação por imersão em agulhas na criopreservação de tecido testicular de lobos (Andrae *et al.*, 2021), verificou-se que a vitrificação por imersão em agulhas foi inferior na preservação da morfologia dos túbulos, apresentando um maior grau de descolamento da membrana basal.

No presente trabalho, os fragmentos vitrificados pelos métodos de vitrificação em criotubos e em OTC mantiveram potencial proliferativo das células germinativas semelhante ao fresco, correlacionando com a preservação da morfologia, que foi superior nesses dois métodos, em comparação com a vitrificação em superfície sólida e por imersão em agulhas.

As informações obtidas nesse trabalho podem contribuir para o estabelecimento de protocolos de vitrificação de tecido testicular cães domésticos, possibilitando a preservação da fertilidade de animais pré púberes de alto valor genético, que venham a morrer subitamente ou que tenham que passar por tratamentos que prejudiquem a espermatogênese, como as quimioterapias. Além disso o cão pode servir como modelo experimental para o desenvolvimento de biotécnicas aplicadas à reprodução de espécies filogeneticamente próximas, que estejam ameaçadas de extinção, permitindo salvaguardar o material genético dessas espécies mesmo após a sua morte.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se o uso da vitrificação em criotubos para a preservação da morfologia, viabilidade e potencial proliferativo celular no tecido testicular de cães pré-púberes. A vitrificação em OTC também pode ser utilizada na criopreservação de tecido testicular canino, possibilitando a manutenção das características morfológicas. Nesse contexto, o tecido testicular canino pode ser criopreservado com o uso de técnicas de vitrificação em sistemas fechados. Estas técnicas, aparentemente, possibilitam a manutenção da integridade e potencial de multiplicação das células germinativas, como as espermatogônias, que são responsáveis pela produção de espermatozoides, contribuindo para a preservação de germoplasma masculino de canídeos.

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, 2010.
- ALLEN, W. Edward, et al. Fertility and obstetrics in the dog. **Ferdinand Enke Verlag**, 1994.
- ANDRAE, Christopher S., et al. Cryopreservation of grey wolf (*Canis lupus*) testicular tissue. **Cryobiology**, v.100, p.173-179, 2021.
- ARAV, Amir; PATRIZIO, Pasquale. Techniques of cryopreservation for ovarian tissue and whole ovary. **Clinical Medicine Insights: Reproductive Health**, 2019.
- ASIKAINEN, Juha, et al. Seasonal reproductive endocrine profile of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) - effects of melatonin and food deprivation. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v.299, n.2, p.180-187, 2003.
- BAERT, Yoni, et al. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell dynamics. **Fertility and sterility**, v.104, p.1244-1252, 2015.
- BAGCHI, Aniruddha; WOODS, Erik J.; CRITSER, John K. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert review of medical devices**, v.5, n.3, p.359-370, 2008.
- BAUMANS, Vera, et al. Testosterone secretion during gubernacular development and testicular descent in the dog. **Reproduction**, v.73, n.1, p.21-25, 1985.
- BEU, C. C. L., ORSI, A. M., GREGÓRIO, E. A., MATHEUS, S. M. M., & BASSO, N. A. A Scanning Electron Microscopic Study of the Rete testis of the Guinea Pig. **Acta Anatomica**, v.162, n.4, p.194-198, 1998.
- BORDES, Agnes, et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v.20, n.10, p.2745-2748, 2005.
- BRANDÃO, Fabiana Aparecida Santilli, et al. Vitrification of canine ovarian tissue using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) device. *Reproduction in Domestic Animals*, v.56, n.8, p.1156-1161, 2021.
- BRITO, L. F. Efeito de características morfológicas do escroto, funículos espermáticos e testículos sobre a termorregulação testicular e a produção e qualidade espermática em touros. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade estadual Paulista**, Botucatu, 2000.
- 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.
- BUDRAS, K.D. et al. Anatomy of the dog - an illustrated text. 3. ed. London: **Mosby-Wolfe**, 1994. 124p.

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, A. A., et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal reproduction science**, v.138, n.3-4, p.220-227, 2013.

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.

CHACUR, Marcelo George Mungai, et al. Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.447-454, 2015.

CROCKER, John; BOLDY, David AR; EGAN, Mark J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **The Journal of pathology**, v.158, n.3, p.185-188, 1989.

COMIZZOLI, P., et al. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.47-52, 2009.

COMIZZOLI, P., et al. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1666-1681, 2012.

CONCANNON, P. W. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.3-15, 2009.

CONERA, VII. Xenotransplantes ovarianos e testiculares: estado da arte e perspectivas em mamíferos domésticos e silvestres. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, p.407-411, 2014.

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.

DOBRINSKY J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

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.

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

GLORIA, Alessia, et al. Pulse-wave Doppler pulsatility and resistive indexes of the testicular artery increase in canine testis with abnormal spermatogenesis. **Theriogenology**, v.158, p.454-460, 2020.

GONÇALVES, D. Correlações da biometria ultrassonográfica testicular com medidas prostáticas e corporais de cães. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), **Universidade de São Paulo**. 2015.

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.

GOTTELLI, D. et al. Molecular genetics of the most endangered canid: The Ethiopian Wolf *Canis Simensis*. **Mol Ecol**, v.3, p.301-12, 1994.

GOUK, S.S. et al. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. **Fertility and Sterility**, v.95, n.7, p.2399-2403, 2011.

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

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal. 7. ed. São Paulo: **Manole**. 2004. 513p.

HIRSH AG. Vittrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology**, v.24, p.214-228, 1987.

HONARAMOOZ, Ali. Cryopreservation of testicular tissue. **Current frontiers in cryobiology**. California, v.2, p.209-238, 2012.

HNUKAINEN, K. EHMCKE, J. SCOTT D. HERGENROTHER, SCHLATT, S. Effect of cold storage and cryopreservation of non-human primate immature testicular tissue on the potential of sperm stem cells in xenografts, **Human Reproduction**, v.22, n.4, p.1060-1067, 2007.

JEWGENOW, Katarina; SONGSASEN, Nucharin. Reproduction and advances in reproductive studies in carnivores. **Reproductive sciences in animal conservation**, p.205-239, 2014.

JOHANNES, James E. The Basenji annual estrus: Controlled by short-day photoperiod. **Basenji**, v.39, p.12-13, 2003.

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

KARLSSON J., TONER M. Armazenamento de longo prazo de tecidos por criopreservação: questões críticas. **Biomateriais**, v.17, p.243-256, 1996.

KEROS, Victoria, et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. **Human Reproduction**, v.22, n.5, p.1384-1395, 2007.

KHALIFEH, F.A, SARRAF. M, DABIT. S.T. Case report: full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen thawed testicular tissue. **Human Reproduction**, v.12, p.87-88, 1997.

KITAGAWA, Beatriz Yuko; COUTINHO, Selene Dall'Acqua. Benefícios advindos da interação homem-cão. **J. Health Sci. Inst.**, p.123-128, 2004.

LEE, Yong-An, et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. **Fertility and sterility**, 2014.

LEE, Kyung Hoon, et al. Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. **Scientific reports**, v.6, n.1, p.1-11, 2016.

LEONARD, Jennifer A., et al. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**, v.298, n.5598, p.1613-1616, 2002.

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**, Santa Maria, v.47: 11, e20170135, 2017.

LIMA, D. B. C., et al. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.235-241, 2017.

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, 2018a.

LIMA, David Baruc Cruvinel; SILVA, Lúcia Daniel Machado da; COMIZZOLI, Pierre. 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**, 2018b.

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

LOPES, Katia Regina Freire; SILVA, Alexandre Rodrigues. Considerações sobre a importância do cão doméstico dentro da sociedade humana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.3, p.177-185, 2012.

LORD, Kathryn, et al. Variation in reproductive traits of members of the genus *Canis* with special attention to the domestic dog (*Canis familiaris*). **Behavioural processes**. v.92, p.131-142, 2013.

LUYET B.J., GEHENIO P.M. Life and Death at Low Temperatures. 3ªed. **Biodynamica**, Normandy, p.352. 1940.

LUZ, M. R., SILVA, A. R. Reprodução de Cães. Barueri: **Manole**. 2019, 432p.

MASSIP, Alban; MERMILLOD, Pascal; DINNYES, Andras. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v.10, n.11, p.3004-3011, 1995.

MESADRI, Samantha Bregeron, et al. 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., et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. **Human Reproduction**, v.23, n.1, p.17-28, 2008.

MINTER, L. J.; DELIBERTO, T. J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). **Theriogenology**, v.69, n.8, p.946-952, 2008.

MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, v. 75, p. 331-336, 1995.

NAGASHIMA, Jennifer B.; SONGSASEN, Nucharin. Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. **Animals**, v.11, n.3, p.653, 2021.

NASCIMENTO EF, SANTOS RL. Patologia da reprodução dos animais domésticos. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1997.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L.; EDWARDS, J.F. Sistema Reprodutor Masculino. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A. C. Patologia Veterinária. 1 ed. **Roca**, 2011.

NIKIFOROV, D., RUSSO, V., NARDINOCCHI, D. et al. A abordagem inovadora de múltiplos protetores aumenta a taxa de sobrevivência após a vitrificação do tecido ovariano e folículos isolados, com melhores resultados em comparação com o método convencional. **J. Ovarian Res**, 2018

O'DONNELL, Liza, et al. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v.22, n..3, p.289-318, 2001.

OFNER, D.; SCHMID, K.W. Standardized AgNOR analysis: Its use-fulness in surgical oncology. **Histochem. Cell Biol.**, v.106, p.193- 196, 1996.

OLIVEIRA, E.C.S. et al. Viabilidade *in vitro* do sêmen canino submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 363-365, 2003.

PASSOS, Thaíse Silva. Avaliação da integridade da membrana plasmática e cromatina no semen bovino congelado. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, **UFMS**, Mato Grosso do Sul, 2007.

PICAZO, C. M., et al. 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.

POELS, J. et al. Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. **Theriogenology**, v.77, n.5, p.1008-1013, 2012.

PORTELA, Joana MD, et al. Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre) pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. **Human Reproduction**, v.34, n.12, p.2443-2455, 2019.

POTHANA L., et al. Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. **Theriogenology**, v.83, p.625-633, 2015.

PUKAZHENTHI B. S., et al. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **Plos One**, v.10, p.1-15, 2015

POPESKO, P. Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos. São Paulo: **Manole**, 1997.

RALL W.F. MAZUR P. J. MCGRATH, J. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. **Biophysical Journal**. v. 41, n.1, p. 1-12, 1983

RUDERT, S., et al. Activity pattern, reproductive behaviors and gonadal hormones in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). **Zoo biology**, v.30, n.2, p.134-148, 2011.

SANCHES, O.C. Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, 2010.

SANCHES, GUILHERME LESSA; COSTA, ENRICO DUAYER DA SILVA DREUX. Torção testicular em cães - revisão de literatura. **Revista científica de medicina veterinária**, 2017.

SATO, Takuya, et al. In vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. **Plos one**, 2015.

SCHIABEL, Mariana Duarte. Avaliação das principais lesões testiculares de cães sem raça definida na região de Uberlândia - MG. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2018.

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.

SERPELL, James; JAGOE, J. A. Early experience and the development of behaviour. The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1995.

SMITH, Bradley P., et al. Taxonomic status of the Australian dingo: the case for *Canis dingo* Meyer, 1793. **Zootaxa**, v.4564, n.1, p.173–197, 2019.

SILVA Andreia Maria, et al. Combination of intracellular cryoprotectants preserves the structure and the cells proliferative capacity potential of adult collared peccary testicular tissue subjected to solid surface vitrification. **Cryobiology**, 2019a.

SILVA, Andréia Maria; PEREIRA, Alessandra Fernandes; SILVA, Alexandre Rodrigues. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.43, n.2, p.229-234, 2019b.

SILVA, Andréia Maria, et al. Influence of freezing techniques and glycerol-based cryoprotectant combinations on the survival of testicular tissues from adult collared peccaries. **Theriogenology**, 2021.

SILVA, A, R; CARDOSO, R. C. S; SILVA, L. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.6, p. 1021-1025, 2000.

SONG, Ying, et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. **Cryobiology**, 2010.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. Dukes–fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, v.35, p.603-614, 1996.

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.

TEIXEIRA, Diego Oliveira. Vitrificação testicular de cães pré púberes. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – **Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza, 2021.

THUWANUT, Paweena, et al. 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., et al. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. **Theriogenology**, v.76, p.981-990, 2011.

UNNI, Sreepoorna, 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.

VAN DEN BERGHE, Femke, et al. Social rank does not affect sperm quality in male African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.31, n.5, p.875-887, 2019.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

WANG Yan, et al. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. **Hum Reprod**, 2008.

WANKE MM, GOBELLO C. Reproduccion en caninos y felinos domésticos. Buenos Aires: **Intermedica**, 2006. p.129-135.

WENG, Qiang, et al. Seasonal changes in immunolocalization of inhibin/activin subunits and testicular activity in wild male raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*). **Journal of Reproduction and Development**, 2006.

WILDT, David E.; WEMMER, Christen. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. **Biodiversity & Conservation**, v.8, n.7, p.965-976, 1999.

WILDT, David E., et al. Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v.77, n.5, p.397-409, 2010.

WILSSON, Erik; SUNDGREN, Per-Erik. The use of a behaviour test for the selection of dogs for service and breeding, I: Method of testing and evaluating test results in the adult dog, demands on different kinds of service dogs, sex and breed differences. **Applied Animal Behaviour Science**, v.53, n.4, p.279-295, 1997.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. **Johns Hopkins University Press**, p. 2,142, 3 ed., 2005.

WYNS, Christine, et al. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. **Human reproduction**, v.22, n.6, p.1603-1611, 2007.

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

Yildiz, C., Mullen, B., Jarvi, K., McKerlie, C., & Lo, K. C. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. **Cryobiology**, v.67, n.1, p.70-75, 2013.

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