



Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres

Testicular tissue cryopreservation and culture as a tool for the conservation of wild mammals

Andréia Maria da Silva, Alessandra Fernandes Pereira, Alexandre Rodrigues Silva[‡]

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

Resumo

A criopreservação do tecido testicular se apresenta como ferramenta promissora para a reprodução assistida, possibilitando o armazenamento de fragmentos contendo grande número de células germinativas em várias fases de desenvolvimento, incluindo espermatogônias indiferenciadas que podem ser cultivadas, garantindo a produção ilimitada de espermatozoides. Nesta revisão, são abordados aspectos técnicos relativos ao processamento e aplicabilidade da criopreservação e do cultivo de tecido testicular em mamíferos silvestres, ressaltando seus desafios e perspectivas.

Palavras-chave: biodiversidade, tecidos gonadais, vida selvagem, biobanco.

Abstract

Cryopreservation of the testicular tissue is a promising tool for assisted reproduction, allowing the storage of fragments containing a large number of germ cells in various stages of development, including undifferentiated spermatogonia that can be cultured, guaranteeing the unlimited production of spermatozoa. In this review, technical aspects related to the processing and applicability of testicular tissue cryopreservation and culture in wild mammals are discussed, highlighting their challenges and perspectives.

Keywords: biodiversity, gonadal tissues, wildlife, biobank.

Introdução

A cada dia, mais e mais espécies tem sua população reduzida e, muitas delas, atingem níveis críticos, denotando sua iminente extinção. Devido a isso, esforços multidisciplinares têm sido conduzidos na tentativa de frear esse ritmo, ou de desenvolver alternativas para garantir a sobrevivência das espécies (Comizzoli, 2015). Assim, o desenvolvimento de biotecnologias que garantam a conservação de espécies silvestres é ainda lento, porém promissor (Pukazhenthil et al., 2006).

A possibilidade de formação de bancos de germoplasma surge como uma grande aliada aos programas de conservação (Comizzoli, 2015). Principalmente no que se refere ao germoplasma masculino, inúmeras pesquisas vêm sendo conduzidas quanto ao desenvolvimento de protocolos para criopreservação de espermatozoides, sejam obtidos por eletroejaculação (Maia et al., 2018) ou a partir do epidídimo (Silva et al., 2017a). Paralelamente, a criopreservação do tecido testicular se apresenta como ferramenta promissora para a reprodução assistida, possibilitando o armazenamento de fragmentos contendo grande número de células germinativas em várias fases de desenvolvimento (Picton et al., 2000), incluindo as espermatogônias indiferenciadas que podem ser cultivadas, garantindo a produção ilimitada de espermatozoides (Ning et al., 2012; Lee et al., 2013; Sato et al., 2015). Aliada a técnicas de xenoinxertos de células ou tecidos, esta tecnologia pode promover a restauração tanto da função gametogênica como endócrina após o período de criopreservação (Gosden, 2002).

A conservação do tecido testicular tem sua importância uma vez que, em mamíferos, a espermatogênese é contínua a partir da puberdade, na qual as espermatogônias multiplicam-se e iniciam um processo de diferenciação em sucessivos estágios até a produção de espermatozoides (Russell et al., 1993). Esta regulação envolve todo o microambiente em torno destas células, chamado de nicho espermatogonial, que fornece um suporte físico e produz sinais que regulam a auto renovação e diferenciação espermatogonial (Ning et al., 2012). Com isso, protocolos de criopreservação do tecido testicular devem preservar, não só a espermatogônia-tronco, mas todo o nicho em torno delas, incluindo as células de Sertoli, células peritubulares mióides, células de Leydig e outros componentes intersticiais (Ning et al., 2012). Devido a essa grande variedade de tipos celulares, a preservação do tecido testicular apresenta desafios no ponto de vista criobiológico (Lima et al., 2017).

Nesse contexto, o objetivo dessa revisão é abordar aspectos técnicos relativos ao processamento e aplicabilidade da criopreservação e do cultivo de tecido testicular em mamíferos silvestres, ressaltando seus desafios e perspectivas.

[‡]Correspondência: alexrs@ufersa.edu.br

Recebido: 11 de março de 2019

Aceito: 10 de abril de 2019



Coleta e preparação do tecido

O tecido testicular pode ser coletado de animais sexualmente maduros e imaturos, assim como de animais que acabaram de vir a óbito. Em animais imaturos, não existe a produção de espermatozoides, logo, quando estes morrem, todo o seu potencial genético é perdido. Dessa forma a criopreservação do tecido testicular associada às técnicas de transplantes gonadais, como o xenoinxerto (Honaramooz et al., 2002), pode ser uma solução para diminuir a perda genética (Pothana et al., 2015). Nos casos de animais mortos ou submetidos à castração, é sugestiva a coleta do testículo por completo, para posterior preservação (Thuwanut et al., 2013; Pothana et al., 2015).

Em indivíduos vivos, amostras testiculares poderiam ser obtidas por meio de biopsias, conforme descrito para humanos (Uijldert et al., 2017), nos quais a técnica tem sido aplicada, principalmente, para salvaguardar o potencial reprodutivo de homens que serão submetidos à quimioterapia para tratamento de câncer, que poderia afetar a viabilidade das células germinativas (Uijldert et al., 2017). Embora esta possibilidade não tenha, ao nosso conhecimento, sido ainda utilizada em espécies silvestres, ela é citada como importante alternativa.

Para coleta e transporte das amostras, diferentes meios são relatados. Em felinos selvagens, Thuwanut et al. (2013) reportaram o uso da solução salina esterilizada suplementada com penicilina-estreptomicina a 1% para a lavagem e transporte dos testículos. Em saguis (*Callithrix jacchus*), as amostras foram arrefecidas com gelo em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) (Schlatt et al., 2002). Já no trágulo pintado (*Moschiola indica*), as amostras foram transportadas em solução salina fosfatada (PBS) (Pothana et al., 2015).

Após a chegada ao laboratório, o material pode ser fragmentado para então ser submetido a criopreservação. Neste caso, o tamanho do fragmento usualmente varia entre 0,3 mm³ (Thuwanut et al., 2013) a 3 mm³ (Silva et al., 2017b). Em saguis (*Callithrix jacchus*), foram utilizados fragmentos de tecido testicular de 0,5-1,0 mm³ (Schlatt et al., 2002), bem como 0,3 mm³ para diferentes felídeos selvagens (Thuwanut et al., 2013), 1-2 mm³ em trágulo pintado (*Moschiola indica*) (Pothana et al., 2015), e 3 mm³ em catetos (*Tayassu tajacu*) (Silva et al., 2017b).

Métodos de criopreservação

Em geral, duas técnicas são reportadas para a preservação de tecido testicular, seja em animais domésticos ou silvestres: a criopreservação lenta e a vitrificação, cuja eficiência depende de diferentes fatores abordados a seguir.

Congelação lenta

Esta se baseia em uma redução gradual de temperatura, associada a baixas concentrações de agentes crioprotetores, o que apresenta a vantagem da baixa toxicidade de tais substâncias. Contudo, sua capacidade para prevenir a formação de cristais de gelo nestas concentrações nos tecidos torna-se limitada (Massip et al., 1995; Dobrinsky, 1996). Em animais silvestres, a congelação lenta do tecido testicular já foi reportada em saguis (*Callithrix jacchus*) (Schlatt et al., 2002), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Jahnukainen et al., 2007), lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Leon-Quinto et al., 2009), gato-da-selva (*Felis chaus*), leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus*), cervo-do-Timor (*Rusa timorenses*), cervídeo muntjac-de-tenasserim (*Muntiacus feae*), e o goral (*Capricornis sumatraensis*) (Thuwanut et al., 2013).

Para a congelação lenta, é necessário o uso de um congelador programável (Travers et al., 2011), ou container específico, como o Mrfroster[®], dentro de um freezer -80°C (Pukazhenthil et al., 2015). Quando comparado a outros protocolos de criopreservação, a congelação lenta é considerada um processo demorado, podendo durar mais de 24 h (Pothana et al., 2015). Qualquer que seja o método, a congelação lenta segue, basicamente, a seguinte sequência: incubação dos fragmentos em meio de congelação; colocação dos fragmentos no equipamento de congelação; armazenamento das amostras em nitrogênio líquido, e, posteriormente, aquecimento das amostras e remoção dos crioprotetores (Schlatt et al., 2002).

Em tecido testicular imaturo do trágulo pintado (*Moschiola indica*), por exemplo, os fragmentos foram colocados por 30 min no meio HEPES DMEM / F12 suplementado com 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) e 80% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, foram acondicionados em criotubos e estes colocados em congelador programável a -80°C por 24 h, quando foram então armazenados em nitrogênio líquido. Posteriormente, o aquecimento dos criotubos foi realizado em banho-maria a 37 °C, em meio contendo DMEM HEPES suplementado com SFB a 10%, 100 UI/mL de penicilina-estreptomicina, 40 mg/mL de gentamicina, onde foram realizadas três lavagens. Embora tenha sido observado aumento na degradação de DNA de 22,8 ± 2,0% para 46,3 ± 3,4%, constatou-se desenvolvimento até espermátócito primário no fragmento submetido ao xenotransplante (Pothana et al., 2015).

Vitrificação

Esta é uma alternativa à congelação lenta, devido à sua praticidade e baixo custo, e, conseqüentemente, maior rentabilidade (Vajta et al., 1998). Em geral, pode ser realizada em qualquer laboratório ou mesmo na sala de



operação do paciente/animal ou a campo, e imediatamente após a morte de um animal (Amorim et al., 2011).

Nesta técnica, são utilizadas rápidas taxas de congelação (20.000 a 40.000°C/min – Lin et al., 2008) associadas a altas concentrações de crioprotetores para promover o aumento da viscosidade, visando inibir a união de moléculas de água para formar cristais de gelo (Mukaida e Oka, 2012). Assim, o estado vitrificado consiste em um sistema amorfo, que carece de estrutura organizada, mas possui as propriedades mecânicas e físicas de um sólido (Taylor et al., 2004). Em resumo, a técnica consiste em equilibrar os fragmentos em um meio com alta concentração de crioprotetor por alguns minutos, seguindo-se da remoção deste meio, transferência do fragmento para uma superfície sólida em contato direto com o nitrogênio líquido e armazenamento dos fragmentos em criotubos, os quais são estocados em botijão criobiológico, para posterior aquecimento em banho-maria à 37°C, em solução contendo concentrações decrescentes de sacarose objetivando a remoção do crioprotetor (Thuwanut e Chatdarong, 2012; Baert et al., 2015).

A técnica já vem sendo desenvolvida com êxito em animais domésticos como os suínos, nos quais, inclusive, a vitrificação de tecido testicular imaturo associada ao xenotransplante possibilitou a produção de espermatozoides viáveis, os quais foram utilizados para injeção intra-citoplasmática (ICSI) e produção de embriões que foram transferidos, resultando no nascimento de leitões (Kaneko et al., 2013). Em animais silvestres, a aplicação da técnica é ainda recente, conforme reportado para os macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) (Poels et al., 2012), catetos (*Pecari tajacu*) (Silva et al., 2017b), e preás (*Galea spixii*) (Lago et al., 2017).

Fatores que afetam a criopreservação de tecido testicular

Crioprotetores

Conforme utilizados para a criopreservação de outros germoplasmas, a adição de agentes crioprotetores (ACPs) é essencial para que as células resistam às lesões resultantes do processo (Jang et al., 2017). Neste sentido, vários estudos examinaram a criopreservação de suspensões de células testiculares ou fragmentos de tecido utilizando ACPs penetrantes de diferentes pesos moleculares, como glicerol (92,10 g/mol), etileno glicol (EG; 62,07 g/mol), dimetil-sulfóxido (DMSO; 78g/mol), ou propanodiol (76,9 g/mol) (Abrishami et al., 2010; Hu et al., 2015). Dentre estes, o uso isolado do DMSO tem sido destacado por apresentar resultados promissores na conservação de tecido testicular de sagui (*Callithrix jacchus*) (Schlatt et al., 2002), lince-ibérico (*Lynx pardinus*) (Leon-Quinto et al., 2009), e trágulo pintado (*Moschiola indica*) (Pothana et al., 2015); porém, a combinação do DMSO com o EG tem também sido efetivamente reportada para gato-das-selvas (*Felis chaus*), leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus*), (Thuwanut et al., 2013) e cateto (*Pecari tajacu*) (Silva et al., 2017b).

A associação dos ACPs penetrantes com os não penetrantes, em especial a sacarose, tem também se mostrado efetiva para a criopreservação de tecido testicular. Esse açúcar confere proteção às membranas celulares quanto a lesões oriundas do frio por meio de sua ligação com as cabeças dos grupos de fosfolípidos presentes na membrana (Anchordoguy et al., 1987). A incorporação deste açúcar foi reportada com êxito para congelação lenta do tecido testicular de trágulos (Pothana et al., 2015) e na vitrificação em macacos (Poels et al., 2012), catetos (Silva et al., 2017b) e preás (Lago et al., 2017).

Idade do animal

A princípio, espera-se que tecnologia para a conservação do tecido testicular seja aplicável a todo e qualquer indivíduo. Entretanto, a maioria das pesquisas tem mostrado uma maior eficiência para animais imaturos, principalmente se associando ao xenoenxerto (Pothana et al., 2015), suscitando um grande desafio para o desenvolvimento de protocolos aplicáveis a animais adultos (Arregui e Dobrinski 2014). Tais diferenças devem-se, particularmente, ao fato de que o tecido testicular de animais imaturos é caracterizado pela presença das espermatogônias indiferenciadas como únicas células germinativas presentes no epitélio seminífero. Neste sentido, o tecido apresentaria um metabolismo reduzido, o que favoreceria sua resistência à hipóxia derivada do processamento para a preservação (Assis-Neto et al., 2003; Aponte et al., 2005). Porém, no animal maduro, o desenvolvimento dos túbulos seminíferos é completo, com a presença das células germinativas, desde a espermatogônia até o espermatozoide, assim como a maturação de células de Sertoli e formação da barreira hematotesticular (Assis-Neto et al., 2003; Aponte et al., 2005). Neste contexto, para os adultos, permanece o desafio inerente ao desenvolvimento de métodos eficientes que possibilitem a conservação de todos os tipos celulares presentes (Ning et al., 2012).

Cultivo de tecido testicular

A manutenção *in vitro* de gônadas masculinas de mamíferos tem sido relatada como uma ferramenta eficiente para avaliação e desenvolvimento do tecido criopreservado (Yokonishi et al., 2014; Lee et al., 2016), sendo também uma estratégia promissora para preservar a fertilidade do macho, em especial quando utilizado em associação com a criopreservação (Yokonishi et al., 2014).

Inicialmente, o método clássico de cultivo *in vitro* de órgãos utilizando-se o gel de agarose foi utilizado com sucesso para induzir a espermatogênese completa em ratos neonatos, cujo tecido testicular havia sido



previamente submetido à congelação lenta ou vitrificação. Neste trabalho, inclusive, os espermatozoides gerados foram utilizados para produção de prole (Sato et al., 2011a).

Diferentes meios de cultura têm sido reportados para o cultivo de tecido testicular. Em camundongos (Sato et al., 2015) e bovinos (Cai et al., 2016), tem-se utilizado α MEM; já em cão (Lee et al., 2016) e suíno (Lee et al., 2013), o meio StemPro-34 tem se mostrado melhor que o DMEM. Além disso, a adição de fatores como o fator de crescimento epidermal – mEGF, o fator básico de crescimento de fibroblastos – BFGF, e o fator neurotrófico derivado de células gliais – GDNF, tem sido reportados por incrementar a proliferação celular (Lee et al., 2013; 2016). Ainda, é necessária a adição de fonte de proteínas como o SFB ou albumina (Sato et al., 2015), de hormônios como rFSH e hCG (Reda et al., 2014) ou b-estradiol e progesterona (Lee et al., 2013), e de fontes de energia como a glicose e o piruvato (Sato et al., 2011b).

Alternativamente, ao invés de simplesmente realizar o crescimento celular em uma superfície plana, na placa de Petri, outras estratégias de cultura de células foram desenvolvidas. Assim, a disposição das células em um arranjo tridimensional (3D) pode simular um túbulo seminífero, onde a composição do meio de cultivo em contato basolateral pode ser manipulado através da adição de componentes que estimulam a proliferação e auto renovação espermatogonial, mimetizando as condições endócrinas de um indivíduo adulto (Gadella e Ferraz 2015).

Em adição, o xenoenxerto de fragmentos testiculares, que é considerado um método de cultivo *in vivo*, consiste no enxerto de pequenas peças (1-2 mm³) de parênquima testicular de uma espécie sob a pele ou cápsula renal de um camundongo imunodeficiente orquiectomizado (Abrishami et al., 2010). Ao contrário das tentativas para reproduzir a espermatogênese em condições *in vitro*, o xenoenxerto de fragmentos testiculares tem a vantagem de manter a arquitetura complexa do testículo (Pukazhenthil et al., 2006). Por meio deste, foi possível a obtenção de prole a partir de espermatozoides obtidos pelo xenoenxerto de tecido testicular criopreservado oriundo de suínos (Kaneko et al., 2013) e camundongos (Sato et al., 2011a) pré-púberes.

Ao contrário, quando xenotransplantado o tecido testicular de animais sexualmente maduros, os fragmentos tendem a degenerar. Possivelmente, o processo degenerativo é devido à demora na angiogênese, pois os animais adultos têm uma população celular diversa no epitélio seminífero de seus testículos, logo sem aporte sanguíneo para suprir as necessidades fisiológicas (Arregui e Dobrinski 2014). Tal fato suscita o desafio para o estabelecimento dessa tecnologia nesta categoria de indivíduos.

Considerações finais

Em geral, o potencial reprodutivo contido no testículo dos animais é descartado quando estes morrem ou são castrados, portanto, a capacidade de salvar este material pode representar um valioso recurso para o banco genético (Pukazhenthil et al., 2006). Esta tecnologia permitiria a conservação do material genético de animais em qualquer fase reprodutiva, e mesmo dos que vierem a óbito subitamente (Thuwanut et al., 2013), provendo uma fonte de gametas masculinos que poderia ser utilizada em um futuro próximo. Tal afirmação, inclusive, é evidenciada pelo recente relato amplamente divulgado pela mídia acerca da produção de um filhote de macaco a partir de espermatozoides produzidos por xenoenxerto de tecido testicular pré-púbere previamente criopreservado (Fayomi et al., 2019).

Esta biotécnica pode ser adaptada a partir de protocolos desenvolvidos para animais domésticos e otimizada para as espécies silvestres, podendo ser utilizada no armazenamento de tecido testicular de machos geneticamente valiosos (Leon-Quinto et al., 2009). Diante do exposto, no entanto, fica clara a necessidade do aprimoramento de protocolos adequados à criopreservação e cultivo, em especial, de animais adultos que venham subitamente a óbito. Assim, com todos os passos dominados, esta poderá ser uma biotécnica altamente utilizada na formação de bancos de gamoplasma animal.

Referências

- Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A.** Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*, v.73, p.86-96, 2010.
- Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans M-M, Donnez J.** Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, v.23, p.160-186, 2011.
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH.** Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, v.24, p.324-331, 1987.
- Aponte PM, Rooij DG, Bastidas P.** Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*, v.64, p.1440-1455, 2005.
- Arregui L, Dobrinski I.** Xenografting of testicular tissue pieces: 12 years of an *in vivo* spermatogenesis system. *Reproduction*, v.148, p.7184, 2014.
- Assis-Neto AC, Carvalho MAM, Melo MIV, Miglino MA, Oliveira MF, Mariana ANB.** Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*, v.40, p.71-79, 2003.
- Baert Y, Braye A, Struijk RB, Pelt AMMV, Goossens E.** Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter *in vitro* cell dynamics. *Fertil Steril*, v.104, p.1244-1252, 2015.



- Cai H, Wu JY, An XL, Zhao XX, Wang ZZ, Tang B, Yue ZP, Li ZY, Zhang XM.** Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. *Ani Reprod Sci*, v.166, p.109-115, 2016.
- Comizzoli P.** Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J Androl*, v.17, p.640-645, 2015.
- Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.45, p.17-26, 1996.
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich M, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinki I, Orwig KE.** Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*, v.363, p.314-319, 2019.
- Gadella BM, Ferraz MA.** A review of new technologies that may become useful for in vitro production of boar sperm. *Reprod Domest Anim*, v.2(Suppl 50), p.61-70, 2015.
- Gosden R.** Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. *Reprod Biomed Online*, v.4, p.64-67, 2002.
- Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I.** Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, v.66, p.21-28, 2002.
- Hu S, Zhu Q-C, Han C, Zhang X-G, Song BY, Xie D-Q, Wei S-Y, Hu J-H.** Effects of different cryoprotectants on the cryopreservation of cattle testicular tissue. *Arch Ani Breed*, v.58, p.433-439, 2015.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S.** Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod*, v.22, p.1060-1067, 2007.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J.** Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*, v.6, p.12-18, 2017.
- Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Tanihara F, Ito J, Kashiwazaki N.** Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PLoS ONE*, v.8, p.1-8, 2013.
- Lago AEA, Silva AM, Praxedes ECG, Bezerra LGP, Almeida LM, Oliveira MF, Silva AR.** Vitrification of Spix' s yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) testicular tissue – Preliminary results. *Ani Reprod*, v.14, p.295, 2017.
- Lee KH, Lee WY, Kim DH, Lee SH, Do JT, Park C, Kim JH, Choi YS, Song H.** Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. *Sci Rep*, v.6, p.e21919, 2016.
- Lee WY, Park HJ, Lee R, Lee KH, Kim YH, Ryu BY, Kim NH, Kim JH, Kim JH, Moon SH, Park JK, Chung HJ, Kim DH, Song H.** Establishment and in vitro culture of porcine spermatogonial germ cells in low temperature culture conditions. *Stem Cell Res*, v.11, p.1234-1249, 2013.
- Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martinez-Hernandez FJ, Moreno JM, Vargas A, Martinez F, Soria B.** Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Ani Reprod Sci*, v.112, p.347-361, 2009.
- Lima DBC, Silva LBM.** Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, v.47, p.e20170135, 2017.
- Lin TC, Yen JM, Kuo TC, Gong KB, Hsu KH, Hsu TT.** Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC biotechnol*, v.8, p.38, 2008.
- Maia KM, Souza ALP, Praxedes ECG, Bezerra LGP, Silva AM, Campos LB, Moreira SSJ, Apolina CAC, Al MET.** Environmental factors related to a semiarid climate influence the freezability of sperm from collared peccaries. *Biopreserv Biobank*, v.16, p.186-190, 2018.
- Massip A, Mermillod P, Dinnyes A.** Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod*, v.10, p.3004-3011, 1995.
- Mukaida T, Oka C.** Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v.26, p.789-803, 2012.
- Ning L, Goossens E, Geens M, Saen DV, Tournaye H.** Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Middle East Fert Soc J*, v.17, p.1-7, 2012.
- Picton HM, Kim SS, Gosden RG.** Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *Br Med Bull*, v.56, p.603-615, 2000.
- Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, Donnez J, Wyns C.** Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology*, v.77, p.1008-1013, 2012.
- Pothana L, Makala H, Devi L, Varma VP, Goel S.** Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology*, v.83, p.625-633, 2015.
- Pukazhenthil B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE.** Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fert Dev*, v.18, p.77-90, 2006.
- Pukazhenthil BS, Nagashima J, Travis AJ, Costa GM, Escobar EN, França LR, Wildt DE.** Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. *PLoS ONE*, v.10, p.1-15, 2015.
- Reda A, Hou M, Landreh L, Kjartansdóttir KR, Svechnikov K, Söder O, Stukenborg JB.** In vitro spermatogenesis – optimal culture conditions for testicular cell survival, germ cell differentiation, and



steroidogenesis in rats. *Front Endocrinol*, v.5, p.21, 2014.

Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int J Androl*, v.16, p.83-83, 1993.

Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, v.471, p.504-507, 2011a.

Sato T, Katagiri K, Kojima K, Komeya M, Yao M, Ogawa T. In vitro spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. *PLoS ONE*, v.10, p.1-13, 2015.

Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Ogawa T. In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature*, v.2, p.472, 2011b.

Schlatt S, Kim SS, 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.

Silva AM, Bezerra JAB, Campos LB, Praxedes ÉCG, Lima GL, Silva AR. Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed caviary (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods. *Acta Zoologica*, v.98, p.285-291, 2017a.

Silva AR, Silva AM, Praxedes ECG, Maia KM, Moreira SSM, Souza CM, Bezerra LG, Comizzoli P. Vitrification of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) testicular tissue using different cryoprotectants. In: Proceedings of the 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Washington DC. 114, 2017b. (Abstract).

Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM. Vitrification in tissue preservation: New developments, In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE (editors). *Life in the Frozen State*. CRC Press; New York: 2004.

Thuwanut P, Chatdarong K. Cryopreservation of cat testicular tissues: effects of storage temperature, freezing protocols and cryoprotective agents. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.777-781, 2012.

Thuwanut P, Srisuwatanasagul S, Wongbandue G, Tanpradit N, Thongpakdee A, Tongthainan D, Manee-in S, Chatdarong K. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology*, v.67, p.244-247, 2013.

Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, Metton C, Bironneau A, Mace B, Rives N. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology*, v.76, p.981-990, 2011.

Uijldert M, Meißner A, Melker AA, Pelt AMMV, Wetering MDV, Rijn RRV, Wely MV, Veen FVD, Repping S. Development of the testis in pre-pubertal boys with cancer after biopsy for fertility preservation. *Hum Reprod*, v.32, p.2366-2372, 2017.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Develop*, v.51, p.53-58, 1998.

Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature*, v.5, p.4320, 2014.
