

Criopreservação e cultivo de tecido testicular em mamíferos - estado da arte, desafios e perspectivas

Cryopreservation and culture of testicular tissue in mammals - state of the art, challenges and perspectives

Ana Glória Pereira¹, Yasmin Carla da Silva Cavalcante¹, Jane Cleide Jenuário Martins¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Rua Francisco Mota, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900

Resumo

O tecido testicular contém células germinativas, que possuem potencial para se desenvolver em espermatozoides viáveis por meio do cultivo *in vitro* ou xenotransplante, sendo uma alternativa interessante a ser utilizada na formação de biobancos. Esta revisão compila as atualizações, desafios e perspectivas relacionadas às técnicas de criopreservação e cultivo de tecido testicular como estratégia para a conservação de espécies mamíferas. O tecido testicular pode ser obtido tanto de indivíduos adultos como pré-púberes, seja após orquiectomia ou até mesmo após a sua morte. O tecido fragmentado pode ser criopreservado por congelamento lento ou rápido e por métodos de vitrificação. Os crioprotetores são indispensáveis durante a criopreservação e podem variar o tipo e concentração de acordo com a espécie. Com os avanços da criopreservação deste material, espermatozoides podem ser obtidos por transplante de fragmentos testiculares ou células germinativas isoladas em camundongos imunodeficientes. No entanto, a obtenção de espermatozoides no cultivo *in vitro* ainda é um desafio.

Palavras-chave: biobanco, espermatogênese, conservação, criobiologia.

Abstract

The testicular tissue contains germ cells, which have the potential to develop into viable spermatozoa through in vitro culture or xenotransplantation, being an interesting alternative to be used in the formation of biobanks. This review compiles updates, challenges and perspectives related to cryopreservation techniques and testicular tissue culture as a strategy for the conservation of mammalian species. Testicular tissue can be obtained from both adult and pre-pubertal individuals, either after orchietomy or even after their death. Fragmented tissue can be cryopreserved by slow or fast freezing and by vitrification methods. Cryoprotectants are indispensable during cryopreservation and may vary in type and concentration according to the species. With advances in cryopreservation of this material, spermatozoa can be obtained by transplanting testicular fragments or isolated germ cells into immunodeficient mice. However, obtaining spermatozoa in in vitro culture is still a challenge.

Keywords: biobank, spermatogenesis, conservation, cryobiology.

Introdução

A criopreservação de tecido gonadal masculino tem se tornado uma grande aliada nos protocolos de conservação do material genético (Carvalho, 2016), tanto para a formação de biobancos (Comizzoli, 2015), como em protocolos de reprodução assistida (Zeng et al., 2009). Conservar o tecido gonadal é uma alternativa interessante, principalmente quando a obtenção de espermatozoides não é possível (Tournaye et al., 2004), como no caso de animais que vêm a óbito. Além da fácil obtenção do tecido testicular, esse ainda proporciona aporte nutricional e proteção para as células testiculares durante seu desenvolvimento (Oliveira, 2015). No entanto, o maior desafio da criopreservação do tecido testicular é manter as células viáveis pós-descongelamento, pois a exposição tecidual a altas taxas de resfriamento pode levar a danos deletérios aos espermatozoides (Carvalho, 2016). Assim, com o intuito de minimizar os efeitos negativos ao tecido e às células testiculares, tem-se estudado as diferentes técnicas de criopreservação, como, a congelamento rápido ou lento (Wyns et al., 2013), e a vitrificação (Teixeira et al., 2021).

Nesse sentido, diversas espécies já tiveram o tecido testicular criopreservado, como felinos

*Correspondência: alexrs@ufersa.edu.br

Recebido: 02 de maio de 2023

Aceito: 20 de maio de 2023

(Evangelista et al., 2020), caninos (Teixeira et al., 2021), suínos (Kaneko et al., 2017), camundongos (Curaba et al., 2011), equinos (Alrashed, 2018) e pequenos ruminantes (Bebbere et al., 2019). Dessa forma, o objetivo desta revisão foi descrever as atualizações, desafios e perspectivas relacionadas às técnicas de criopreservação e cultivo de tecido testicular como estratégia para a conservação de espécies mamíferas.

Obtenção e preparação do tecido testicular

Diversos fatores podem influenciar e determinar o êxito do armazenamento e cultivo do material biológico germinativo. Assim, quando se discute a formação de biobancos para animais, as condições ambientais em que o animal doador veio a óbito e a amostra foi coletada exercem bastante influência sobre a qualidade do material e o resultado final da conservação (Silva et al., 2020).

Sob a ótica das variações ambientais externas, existem relatos científicos que demonstram a viabilidade de resgatar e congelar testículos de felinos adultos, incluindo gatos selvagens (*Felis chaus*), leões (*Panthera leo*) e leopardos (*Panthera pardus*), bem como espécies ruminantes como o veado Rusa (*Rusa timorensis*) e outras duas espécies de ungulados (*Muntiacus feae* e *Capricornis sumatraensis*) no período *post mortem* (Thuwanut et al., 2013). No entanto, foi destacado que o tempo de remoção do testículo *post mortem* foi um fator importante que afeta a morfologia testicular. Além disso, foi descoberto que as altas temperaturas ambientais experimentadas pelos animais antes do óbito também pode afetar a qualidade dos espermatozoides, bem como a morfologia testicular. As temperaturas ambientais parecem atuar em maneiras diferentes em espécies distintas, como relatado por Pothana et al. (2015) que relataram a recuperação de testículos de veado-malhado indiano (*Moschiola indica*) encontrados 1 hora após sua morte devido ao estresse térmico durante o verão na Índia.

Acrescenta-se, ainda, que a criopreservação de tecido testicular seria uma alternativa para preservação de germoplasma em espécies silvestres nas quais os procedimentos de coleta de sêmen não são ainda eficientes, como em cutias (Praxedes et al., 2018) ou em animais pré-púberes, nos quais a espermatogênese não foi iniciada ainda (Arkoun et al., 2016).

Além do processo de recuperação do tecido testicular, os meios adequados para lavagem e transporte das amostras biológicas também são essenciais para o sucesso do cultivo. Nesse contexto, diversos meios podem ser efetivamente usados para esse fim, como a solução salina estéril utilizada com sucesso no transporte de tecido gonadal de cutias (Silva et al., 2022) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) usada para cervos, chimpanzés (*Pan troglodytes*) (Pothana et al., 2015, 2016) e furão-de-patas-pretas (*Mustela nigripes*) (Lima et al., 2020). Como uma alternativa, o meio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco Cell Culture[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) foi usado para o transporte de testículos resfriados em gelo de espécies domésticas, como cães (Lee et al., 2016).

Métodos de criopreservação

Há, principalmente, dois métodos de criopreservação (Tabela 1) aplicados no tecido testicular de mamíferos: a congelação lenta (CL), e as técnicas de vitrificação. De forma geral, as técnicas de vitrificação utilizadas são a vitrificação em criotubos (VC), a vitrificação em superfície sólida (VSS), a vitrificação por imersão de agulhas (VIA), e a vitrificação em *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC).

A congelação lenta utiliza baixas concentrações de crioprotetores e reduz de forma gradual a temperatura, sendo esta controlada e programada por um freezer (Travers et al., 2011). Assim, as etapas da técnica consistem em expor a amostra a temperaturas de -80°C em um freezer ou um dispositivo como por exemplo o MrFroster (Pukazhenthil et al., 2015), podendo levar 24 horas de duração. No entanto, a técnica possui a desvantagem de ser um procedimento relativamente oneroso por exigir equipamentos sofisticados, além disso, durante o congelamento induz a formação de cristais de gelo na célula ou tecido (Pothana et al., 2015; Woelders & Chaveiro, 2004).

Apesar disso, o método por CL ainda tem sido discutido na literatura sobre os seus efeitos no tecido testicular de mamíferos, como exemplo Picazo et al. (2022), que comparou a CL com a VSS em tecido testicular de suínos (*Sus scrofa*) e cães (*Canis familiaris*) analisando a viabilidade celular e integridade do DNA. Na espécie canina foi observado que a CL (66,9 ± 6,1%) foi superior que a VSS (50,7 ± 4,5%) na preservação da integridade do DNA. Já no javali as duas técnicas de criopreservação mantiveram a viabilidade celular e integridade do DNA.

Tabela 1. Criopreservação de tecido testicular em mamíferos.

Espécies	Método de criopreservação	Objetivos	Principais resultados	Referência
Gato doméstico (<i>Felis catus</i>)	Vitrificação por imersão de agulhas	Comparar a influência de diferentes temperaturas de aquecimento em fragmentos testiculares vitrificados de gatos pré-púberes.	Manutenção da integridade de túbulos seminíferos e atividade mitocondrial pós aquecimento na temperatura 50°C.	Fernandes et al. (2021)
Cão doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Vitrificação em superfície sólida	Avaliação dos efeitos da vitrificação no tecido testicular de cães pré-púberes com diferentes associações de crioprotetores (DMSO/GLI; EG/GLI e DMSO/EG).	As associações DMSO/EG e EG/GLI preservaram a morfologia testicular após o processo de vitrificação	Teixeira et al. (2021)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	Congelação lenta, vitrificação em criotubos e vitrificação em superfície sólida	Avaliação de diferentes técnicas de criopreservação, incluindo combinações de crioprotetores (DMSO/GLI; DMSO/EG e EG/GLI).	Preservação morfológica nos grupos criopreservados em criotubos e congelação lenta com associação de DMSO/EG. A integridade do DNA foi preservada pelo método de congelação lenta em associação de DMSO/EG.	Silva et al. (2021)
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>)	Vitrificação em superfície sólida, vitrificação em criotubos e Congelação lenta	Avaliação dos efeitos de diferentes técnicas de criopreservação sobre o tecido testicular de cutias.	A vitrificação em superfície sólida foi eficiente na preservação do potencial proliferativo das células germinativas.	Silva et al. (2022)
Lobo cinzento (<i>Canis lupus</i>)	Vitrificação por imersão em agulhas e congelação lenta	Comparar os efeitos da congelação lenta e vitrificação sobre a preservação do tecido testicular de lobos cinzentos além de avaliar a ação do DMSO sozinho vs associado ao etilenoglicol na congelação lenta.	A congelação lenta preservou melhor a morfologia dos tecidos testiculares criopreservados e a combinação DMSO+EG manteve a viabilidade celular.	Andrae et al. (2021)
Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	Congelação lenta	Avaliar o efeito da maca negra como crioprotetor durante a criopreservação de fragmentos testiculares e células tronco espermatogônias de alpacas.	A suplementação de maca negra no meio de criopreservação promoveu a sobrevivência celular e preservou a atividade mitocondrial das células testiculares.	Valdivia et al. (2021)
Cão e suíno (<i>Sus scrofa</i>)	Vitrificação por imersão em agulhas e congelação lenta	Comparar a viabilidade e integridade do DNA de células testiculares, de cão e javali, após criopreservação de tecido testicular por congelação lenta ou vitrificação.	Para o suíno, ambos os métodos foram eficientes na preservação da viabilidade e integridade de DNA das células germinativas. No cão, a porcentagem de células germinativas viáveis foi maior após a vitrificação.	Picazo et al. (2022)
Macacos cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	Congelação lenta	Avaliar se a eficiência da criopreservação depende do tipo de amostra (células vs tecidos) e testar a ação de diferentes crioprotetores (trealose, hipotaurina, necrostatina-1 e melatonina)	A taxa de sobrevivência e o número de células recuperadas foram maiores em tecidos criopreservados do que em suspensões de células. A trealose na concentração de 200 mmol/l promoveu maior taxa de recuperação celular.	Jung et al. (2020)
Caprinos (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Congelação lenta e congelação rápida	Identificar os efeitos dos crioprotetores externos (trealose e sacarose) e métodos de criopreservação (congelação lenta vs congelação rápida) nas características funcionais pós-aquecimento de células-tronco espermatogônias caprinas criopreservadas.	A taxa de recuperação celular foi maior nas amostras criopreservadas com trealose no método de congelação lenta.	Quadri et al. (2023)
Furão-de-patas-pretas (<i>Mustela nigripes</i>)	Vitrificação por imersão em agulhas	Avaliar as propriedades estruturais e funcionais de tecidos testiculares vitrificados após o aquecimento ou pós-aquecimento seguido de um curto período de cultivo in vitro	A porcentagem de túbulos seminíferos íntegros reduziu logo após a vitrificação/aquecimento e melhorou após o cultivo. As proporções de células marcadas com marcadores de diferenciação também aumentaram durante o cultivo in vitro.	Lima et al. (2020)

A vitrificação consiste em submeter o tecido a maiores concentrações de crioprotetores (Mukaida & Oka, 2012) e em seguida a baixas taxas de temperaturas de forma ultrarrápida, para solidificação tecidual, caracterizando o tecido a um estado vítreo (Brockbank et al., 2000). Assim, possui a vantagem de poder ser empregada a campo, e não requer equipamentos mais elaborados para sua execução (Silva et al., 2019). Porém, expor o tecido a altas concentrações de crioprotetores pode levar a efeitos tóxicos a célula ou tecido, além de desidratação pelas mudanças osmóticas do meio (Woelders & Chaveiro, 2004). Logo, com o intuito de diminuir os efeitos deletérios da vitrificação, diversos estudos têm sido realizados ao longo dos anos.

A vitrificação em criotubos segue a ordem metodológica de expor os fragmentos a solução de equilíbrio e em seguida a solução de vitrificação, e posteriormente os fragmentos são colocados dentro de criotubos e imersos diretamente em nitrogênio líquido (Lima et al., 2018). Lima et al., (2018) testaram pela primeira vez a VC em tecido testicular de gatos domésticos com diferentes associações de crioprotetores (dimetilsulfóxido – DMSO/glicerol – GLY, etilenoglicol – EG/GLY, ou DMSO/EG), e observaram que a viabilidade e a morfologia do tecido foram mantidas entre o grupo DMSO/GLI ($3,60 \pm 2,30$) em comparação com o grupo fresco ($3,85 \pm 1,81$).

A técnica de vitrificação em superfície sólida é atualmente uma das mais utilizadas em tecido testicular de mamíferos, seu uso já foi aplicado na conservação de tecido testicular de espécies silvestres como urso negro (Peris-Freau et al., 2022) e cutias, onde Silva et al. (2022) testaram a VSS em comparação com a vitrificação em criotubos e congelamento lento e constataram a eficiência da VSS sobre os demais métodos na preservação do potencial proliferativo das células germinativas. No tocante aos domésticos, Teixeira et al., (2021) aplicaram a VSS no tecido testicular de cães pré-púberes após orquiectomia, comparando a associação de diferentes crioprotetores (DMSO/EG, EG/GLI e DMSO/GLI), onde as associações de DMSO/EG e EG/GLI preservaram a morfologia testicular após o processo de vitrificação.

Outra técnica de criopreservação que tem sido estudada recentemente em tecido gonadal é a vitrificação por imersão de agulhas (Fernandes et al., 2021). Um estudo envolvendo esta técnica foi realizado em lobos cinzentos (Andrae et al., 2021), onde os autores comparam as técnicas de vitrificação em superfície sólida e por imersão em agulhas, no qual a VIA resultou em redução nos tamanhos dos túbulos seminíferos, deslocamento da membrana basal e aumento de apoptose celular. Outro estudo recente comparando a VIA com a congelamento lento sobre a integridade e a viabilidade do DNA de células testiculares em diferentes espécies mamíferas silvestres (Peris-Frau et al., 2022), constatou que a congelamento lento manteve a viabilidade e a integridade do DNA de todas as espécies, com exceção dos carnívoros que a VIA preservou melhor esses parâmetros.

A vitrificação *Ovarian Tissue Cryosystem* embora seja um método desenvolvido para a criopreservação de tecido ovariano, já tem sido testada em tecido testicular de felinos domésticos, tendo bons resultados em comparação com a vitrificação em superfície sólida (Evangelista et al., 2020) quando analisadas por histologia clássica. Evangelista et al., (2020) observou que a OTC preservou melhor os aspectos morfológicos das células de linhagens espermáticas e as células de Sertoli. Assim, a técnica se baseia em um dispositivo cilíndrico de aço inoxidável com boa condução de calor e resfriamento rápido da amostra (Carvalho et al., 2013), tendo como vantagem a fácil estocagem em nitrogênio líquido. No entanto, este método ainda precisa ser estudado para constatar a sua aplicabilidade no tecido gonadal masculino de outras espécies mamíferas.

Comparando os quatro métodos de vitrificação aqui citados, Pereira (2022) avaliou os efeitos da VSS, VC, VIA e OTC sobre a criopreservação de tecido testicular de cães pré-púberes, os resultados obtidos demonstram que a vitrificação em criotubos e com o uso de OTC foram superiores à VSS e VIA no que diz respeito à preservação da morfologia e potencial proliferativo do tecido testicular canino. Dessa forma, infere-se que o uso de sistemas fechados de vitrificação podem ser eficazes na preservação deste material, contribuindo para a formação de um banco de germoplasma da espécie.

Cultivo e transplante de tecido e células testiculares

Após a criopreservação, o maior desafio é proporcionar condições adequadas para que o tecido possa retomar a espermatogênese (Silva et al., 2020). O cultivo *in vitro* do tecido testicular de mamíferos tem sido relatado como uma ferramenta eficiente para avaliação e desenvolvimento do tecido criopreservado (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 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).

Diversas metodologias vêm sendo empregadas no cultivo *in vitro* de fragmentos testiculares, com o intuito de obter espermatozoides (Tabela 2). O cultivo organotípico consiste na disposição de um fragmento de tecido sobre um gel de agarose, cercado por um meio que dará aporte nutricional à multiplicação celular (Wahab et al., 2020). A técnica em gota suspensa na formação de agregados celulares pequenas gotas de meio de cultivo, que ficam invertidas em placas específicas para este fim (Yang et al., 2023). Ambas as técnicas já foram empregadas no cultivo de tecido testicular de caprinos (Patra et al., 2021), apresentando uma superioridade do cultivo organotípico em relação ao de células suspensas no que concerne à viabilidade, perda celular, espaço intraluminal e degeneração do tecido. Além disso, com o cultivo organotípico foi possível a visualização de espermátides alongadas entre o 7° e 14° de incubação.

No tocante ao desenvolvimento da espermatogênese *in vivo*, uma das técnicas utilizadas é o xenotransplante, que consiste na transferência do tecido entre espécies diferentes de animais, no intuito de restabelecer as funções gametogênicas (Silva et al., 2020). No que diz respeito ao xenotransplante de tecido testicular, os primeiros estudos datam de 2002, nos quais fragmentos testiculares de suínos e caprinos foram transplantados para camundongos imunossuprimidos, o que resultou na espermatogênese completa em ambas as espécies (Honaramooz et al., 2002). Em 2019, Ntemou et al. obtiveram a espermatogênese completa de saguis pré púberes após o xenotransplante de fragmentos de tecido testicular para camundongos imunodeficientes. Os fragmentos foram transplantados diretamente no testículo dos receptores e também no tecido subcutâneo. Quatro meses após o transplante, a espermatogênese completa foi observada em nos transplantes intratesticulares, enquanto no mesmo período os espermátócitos foram o tipo de célula germinativa mais avançado presente nos transplantes ectópicos. Após 9 meses, 50% dos transplantes intratesticulares permaneceram viáveis, enquanto nenhum dos transplantes ectópicos sobreviveu. Os autores reforçam que o parênquima testicular pode fornecer um microambiente favorável para a diferenciação das células germinativas e a sobrevivência das amostras transplantadas, provavelmente devido à mecanismos de regulação de temperatura, fatores de crescimento e suporte hormonal.

Em contraste com o processo normal de espermatogênese, o transplante de células germinativas começa com a migração das células doadoras do lúmen para a periferia dos túbulos seminíferos. Nesse processo, as células germinativas doadoras obtidas por isolamento e digestão dos tecidos testiculares são transplantadas para os túbulos seminíferos testiculares receptores e, então, colonizadas no microambiente (Zhag et al., 2021). As células tronco espermatogônias implantadas podem sofrer o processo de auto renovação e diferenciação em células espermatogênicas em todos os níveis, eventualmente restabelecendo a espermatogênese do doador (Cham, 2021).

Pela primeira vez em 1994, Brinster e colaboradores transplantaram suspensões de células testiculares contendo células tronco germinativas de camundongos férteis doadores para os túbulos seminíferos dos testículos de camundongos receptores inférteis e imunossuprimidos. Eles observaram a espermatogênese completa derivada de células doadoras, que resultou na formação de espermatozoides maduros, e obtiveram a descendência de espermatogônias doadoras por meio de acasalamento natural. Este estudo abriu novos caminhos para a utilização das células testiculares para atender o campo da biomedicina e da reprodução animal, contribuindo para a preservação de recursos genéticos em espécies ameaçadas de extinção e tratamento da infertilidade masculina. Nas décadas seguintes, o transplante de células germinativas foi reproduzido em várias espécies animais, incluindo suínos (Kim et al., 2014), caprinos (Kim et al., 2014), ovinos (Stockwell et al., 2013), macacos (Shetty et al., 2020) cães (Lee et al., 2016) musaranhos (Li et al., 2017) e camelos (Herrid et al., 2019).

Desafios e perspectivas na conservação de tecido testicular em mamíferos

Considerando o grande potencial do tecido testicular ser utilizado para a formação de biobancos, no intuito de salvaguardar esse material e restabelecer a espermatogênese, é necessário que os protocolos de criopreservação e cultivo de tecido testicular sejam aprimorados. Ademais, é preciso considerar que, embora a congelamento seja um método utilizado em muitos estudos, sua execução é demorada e necessita de equipamentos como freezers programáveis, que demandam um alto custo (Silva et al., 2020). Neste sentido, a vitrificação oferece uma alternativa mais adequada para ser realizada à campo. Além disso, os promissores resultados obtidos com o uso dessa técnica no tecido testicular de espécies domésticas, como o gato (Evangelista et al., 2020), podem ser extrapolados para espécies silvestres filogeneticamente próximas, como os felinos selvagens, onde a vitrificação é pouco relatada.

Não existe um protocolo de criopreservação ideal, que possa ser aplicado em todas as espécies. Cada espécie tem suas particularidades com relação à fisiologia reprodutiva e sensibilidade à

Tabela 2. Cultivo *in vitro* e *in vivo* de fragmentos e células testiculares de mamíferos.

Espécie	Técnica Aplicada	Objetivo	Principais Resultados	Referência
Sagui-comum (<i>Callithrix jacchus</i>)	Cultivo <i>in vitro</i> organotípico	Avaliar a resposta de fragmentos de tecido testicular de Sagui-comum à exposição exógena de irisinina em um cultivo organotípico.	O cultivo na presença de irisinina aumentou os níveis de expressão das células de Sertoli e espermatogônias quando comparados a grupos cultivados sem irisinina.	Wahab et al. (2020)
Caprinos (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Cultivo <i>in vitro</i> organotípico e em gota suspensa do tecido testicular pós vitrificação em superfície sólida.	Comparar o cultivo organotípico com a gota suspensa sobre o desenvolvimento da espermatogênese no tecido testicular de caprinos vitrificado.	O cultivo organotípico foi superior ao método gota suspensa em termos de atividade metabólica pós-aquecimento do tecido testicular e a formação de espermatozoides alongados no tecido testicular fresco e vitrificado-aquecido.	Patra et al. (2021)
Suíno doméstico (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Cultivo de células testiculares suínas frescas ou criopreservadas com a formação de esferoides cultivados sobre gel de agarose.	Avaliar a capacidade de células testiculares suínas criopreservadas e frescas de reconstruir um testículo organoide.	Os esferoides celulares cultivados em cima de géis de agarose imersos em meio levaram à formação de testículos organoide com estruturas tubulares que se assemelhavam aos testículos da mesma idade.	Cham (2021)
Cão doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Congelamento lento de células testiculares e transplante de células testiculares em camundongos imunossuprimidos.	Identificar as condições ideais para a criopreservação de células testiculares caninas, seguida do cultivo de células germinativas.	As células transplantadas colonizaram o testículo do receptor e iniciaram a formação de novos túbulos seminíferos.	Lee et al. (2016)
Macaco rhesus (<i>Macaca mulata</i>)	Criopreservação seguida do transplante autólogo de fragmentos testiculares frescos e criopreservados	Avaliar o desenvolvimento da espermatogênese no tecido testicular de macacos rhesus antes e após a criopreservação através do transplante autólogo de fragmentos testiculares.	A espermatogênese completa foi confirmada em todos os enxertos. Os espermatozoides produzidos eram competentes para fertilizar ovócitos de rhesus, levando ao desenvolvimento embrionário pré-implantação, gravidez e nascimento de um bebê saudável do sexo feminino.	Fayomi et al. (2019)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	Transplante de fragmentos testiculares e suspensão de células testiculares	Avaliar a progressão da espermatogênese nos fragmentos e suspensão de células testiculares de catetos imaturos transplantados em camundongos imunossuprimidos	Espermatogênese completa após 6 meses de xenotransplante e 8 meses no transplante de células testiculares. Espermatozoides obtidos no xenotransplante deram origem a embriões diploides.	Campos-Junior et al. (2014)
Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	Cultivo <i>in vitro</i> de células tronco espermatogônia	Avaliar os meios de cultivo DMEM e STEMPRO em um sistema de cultivo para diferenciação das células tronco espermatogônias de alpaca.	As células cultivadas apresentaram formação de colônias a partir de 21 dias de cultivo em meio DMEM e em STEMPRO	Valdivia et al. (2019)
Touro (<i>Bos taurus</i>)	Criopreservação de tecido testicular seguido do cultivo <i>in vitro</i> de espermatogônias	Identificar as características biológicas de espermatogônias bovinas quando cultivadas em diferentes sistemas com ou sem células de Sertoli.	Espermatogônias cultivadas com células de Sertoli apresentaram taxa de proliferação maior do que na sua ausência.	Cai et al. (2016)
Cervo-de-cauda-branca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Xenotransplante de tecido testicular	Avaliar o desenvolvimento da espermatogênese após xenotransplante de fragmentos testiculares de cervos imaturos.	Formação de espermátides redondas e alongadas após 8 meses, seguido por espermatozoides totalmente formados em 12 meses.	Abbasi e Honaramooz (2012)
Bisão (<i>Bison bison</i>)	Xenotransplante de tecido testicular	Avaliar o resultado a longo prazo do xenotransplante de tecido testicular de bisões recém-nascidos como modelo para ungulados raros ou ameaçados de extinção	Expansão dos túbulos seminíferos após 2 meses; espermátocitos aos 6 meses; espermátides redondas aos 12 meses e espermátides alongadas, aos 16 meses.	Abbasi e Honaramooz (2011)

criopreservação testicular. Os estudos de diferentes técnicas de criopreservação, bem como concentrações de crioprotetores devem ser empregados para cada espécie a fim de determinar o protocolo mais adequado.

Apesar da possibilidade de transplantar fragmentos de tecido testicular no intuito de desenvolver a espermatogênese *in vivo*, o cultivo *in vitro* tornou-se uma ferramenta interessante, pois pode auxiliar no entendimento da espermatogênese em indivíduos adultos. No entanto, ainda são necessários estudos sobre as condições de cultivo e criopreservação, meios de cultura e suplementação para garantir o sucesso na obtenção de espermatozoides, principalmente em indivíduos adultos.

Embora a criopreservação e cultivo de tecido testicular tenham sido relatados em mamíferos domésticos e silvestres, as limitações, principalmente quanto às peculiaridades específicas da espécie e a idade do animal, têm sido fatores importantes para o sucesso dessas técnicas. No entanto, a idade do animal ainda é o fator mais representativo para a conservação dos fragmentos testiculares, uma vez que os testículos apresentam diferenças morfológicas entre indivíduos de diferentes maturidades sexuais. Assim, tecidos derivados de adultos, independentemente da origem do órgão, são geralmente vulneráveis a condições *ex vivo* e difíceis de manter nessas condições devido à diversidade celular que exibem.

Referências

- Abbasi S, Honaramooz A.** Feasibility of salvaging genetic potential of post-mortem fawns: production of sperm in testis tissue xenografts from immature donor white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in recipient mice. *Animal Reproduction Science*, v.135, p.47-52, 2012.
- Abbasi S, Honaramooz A.** Xenografting of testis tissue from bison calf donors into recipient mice as a strategy for salvaging genetic material. *Theriogenology*, v.76, n.4, p.607-614, 2011.
- Alrashed A.** The Effect of Cryopreservation Solutions and Cooling Rates on the Structural and Cellular Integrity of Frozen/Thawed Horse Testicular Tissue, 2018.
- 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.
- Andrae CS, Oliveira EC, Ferraz MA, Nagashima JB.** Cryopreservation of grey wolf (*Canis lupus*) testicular tissue. *Cryobiology*, v.100, p.173-179, 2021.
- Arkoun B, Dumont L, Milazzo JP, Rondanino C, Bironneau A, Wils J, Rives N.** Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of *in vitro* spermatogenesis? *Cell and tissue research*, v.364, p.661-674, 2016.
- Bebbere D, Pinna S, Nieddu S, Natan D, Arav A, Ledda S.** Gene expression analysis of ovine prepubertal testicular tissue vitrified with a novel cryodevice (E. Vit). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. v.36, 2145-2154, 2019.
- Brinster RL, Zimmermann JW.** Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.91, n.24, p.11298-11302, 1994
- Brockbank KGM, Song YC, Khirabadi BS, Lightfoot FG, Boggs JM, Taylor MJ.** Storage of tissues by vitrification. *Transplantation Proceedings*. v.32, p.3-4, 2000.
- Cai H, Wu JY, An XL, Zhao XX, Wang ZZ, Tang B, Zhang, X. M.** Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. *Animal Reproduction Science*, v.166, p.109-115, 2016.
- Campos-Junior PHA, Costa GMJ, Avelar GF, Lacerda SMSN, da Costa NN, Ohashi OM, de Franca LR.** Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*Tayassu tajacu*). *Reproduction*, v.147, n.3, p.291-299, 2014.
- Carvalho AA, Faustino IR, Silva CMG, Castro SV, Lopes CAP, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** 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 MC.** Criopresevação de tecido testicular de cães- Avaliação histológica e ultraestrutural. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de morfologia e fisiologia animal, Recife, 2016.
- Cham, Tat Chuan.** Establishment and characterization of a porcine testis organoid culture system. Diss. University of Saskatchewan, 2021.
- 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.
- Curaba M, Verleysen M, Amorim CA, Dolmans MM, Van Langendonck A, Hovatta O, Donnez J.** Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. *Fertility and sterility*. v.95, n.4, p.1229-1234, 2011.

- Dela Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M.** Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*. v.123, n.4, p.593-600, 2002.
- Evangelista, ITA, de Carvalho, JVG, Torres, ECB, Rodrigues, APR, Domingues, SFS.** Efeitos da vitrificação na preservação morfológica do tecido testicular de gato doméstico. *Ciência Animal*, v.30, n.4, p.234-238, 2020.
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Orwig KE.** Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*, v.363, n.6433, p.1314-1319, 2019.
- Fernandes JDS, Tabosa BED, Brito BF, Silva HVR, Lima DBC, Silva LDM.** Influence of different warming temperatures on the vitrified testicular fragments from pre-pubertal cat. *Reproduction in Domestic Animals*, v.56, n.10, p.1342-1348, 2021.
- Herrid M, Nagy P, Juhasz J, Morrell JM, Billah M, Khazanehdari K, Skidmore JA.** Donor sperm production in heterologous recipients by testis germ cell transplantation in the dromedary camel. *Reprod Fertil Dev*, v.31, p.538-546, 2019.
- Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I.** Germ cell transplantation in pigs. *Biology of reproduction*, v.66, n.1, p.21-28, 2002.
- Jung SE, Ahn JS, Kim YH, Kim BJ, Won JH, Ryu BY.** Effective cryopreservation protocol for preservation of male primate (*Macaca fascicularis*) prepubertal fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, v.41, n.6, p.1070-1083, 2020.
- Kaneko H, Kikuchi K, Men NT, Nakai M, Noguchi J, Kashiwazaki, N, Ito J.** Production of sperm from porcine fetal testicular tissue after cryopreservation and grafting into nude mice. *Theriogenology*. v.91, 154-162, 2017.
- Kim BG, Kim YH, Lee YA, Kim BJ, Kim KJ, Jung SE, Chung HJ, Hwang S, Choi SH, Kim M.** Production of transgenic spermatozoa by lentiviral transduction and transplantation of porcine spermatogonial stem cells. *Tissue Eng Regen Med*, v.11, p.458-466, 2014.
- Lee KH, Lee WY, Kim DH, Lee SH, Do JT, Park C, Song H.** 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.21919, 2016.
- Li CH, Yan LZ, Ban WZ, Tu Q, Wu Y, Wang L, Bi R, Ji S, Ma YH, Nie WH.** Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res*, v.27, p.241-252, 2017.
- Lima DBC & Silva LDM.** Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*. v.47, n.11, p.1-8, 2017.
- Lima DBC, Silva LDM, Marinari P, Comizzoli P.** Long-term preservation of testicular tissue integrity and viability using vitrification in the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Animals*, v.10, n.10, p.1865, 2020.
- Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Leiva-Revilla J, Silva LDM.** Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology*, v.110, p.110-115, 2018.
- Mukaida T, Oka C.** Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. v.26, p.789-803, 2012
- Ntemou E, Kadam P, Van Saen D, Wistuba J, Mitchell RT, Schlatt S, Goossens E.** Complete spermatogenesis in intratesticular testis tissue xenotransplants from immature non-human primate. *Human Reproduction*, v.34, n.3, p.403-413, 2019.
- Oliveira, ECS.** Criopreservação de tecido testicular. *Rev Bras Reprod Anim*, v.1, p.109-110, 2015.
- Patra T, Pathak D, Gupta MK.** Comparison of two culture methods during in vitro spermatogenesis of vitrified-warmed testis tissue: organ culture vs. hanging drop culture. *Cryobiology*, v.100, p.142-150, 2021.
- Pereira AG.** Criopreservação de tecido testicular de cães pré-púberes utilizando diferentes métodos de vitrificação. *Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Curso de Medicina Veterinária*, 2022.
- Peris-Frau P, Benito-Blanco J, Martínez-Nevado E, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velázquez R, Santiago-Moreno J.** DNA integrity and viability of testicular cells from diverse wild species after slow freezing or vitrification. *Frontiers in Veterinary Science*, v.9, 2022
- Picazo CM, Castaño C, Bóveda P, Toledano-Díaz A, Velázquez R, Pequeño B, Santiago-Moreno J.** Cryopreservation of testicular tissue from the dog (*Canis familiaris*) and wild boar (*Sus scrofa*) by slow freezing and vitrification: Differences in cryoresistance according to cell type. *Theriogenology*, v.190, p.65-72, 2022.

- 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.
- Praxedes ECG, Peixoto GCX, Silva AM, Silva AR.** Reproduction in agouti (*Dasyprocta* spp.): A review of reproductive physiology for developing assisted reproductive techniques. *Animal Reproduction*, v. 15, n. 4, p. 1181, 2018.
- Quadri SA, Singh SP, Kharche SD, Pathak J, Saxena A, Soni YK, Swain D.** Different Effects of Sugars and Methods to Preserve Post-Thaw Functional Properties of Cryopreserved Caprine Spermatogonial Stem Cells. *Cells Tissues Organs*, v.1, 2023.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T.** In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, v.471, p.504-507, 2011.
- Shetty G, Mitchell JM, Meyer JM, Wu Z, Lam TNA, Phan TT, Zhang J, Hill L, Tailor RC, Peters KA.** Restoration of functional sperm production in irradiated pubertal rhesus monkeys by spermatogonial stem cell transplantation. *Andrology*, v.8, p.1428-1441, 2020.
- Silva AM, Bezerra LGP, Praxedes ECG, Moreira SSJ, Souza CMP, Oliveira MF, Silva AR.** 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*, v.91, p.53-60, 2019.
- Silva AM, Pereira AG, Bezerra LG, Jerônimo Moreira SS, Pereira, AF, Oliveira, MF, Silva AR.** Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina Linnaeus, 1758*). *Animals*, v.12, n.6, p.738, 2022.
- Silva AM, Pereira AG, Brasil AV, Macedo LB, Souza-Junior JB, Moura CEB, Silva AR.** Influence of freezing techniques and glycerol-based cryoprotectant combinations on the survival of testicular tissues from adult collared peccaries. *Theriogenology*, v.167, p.111-119, 2021.
- Silva AMD, Pereira AF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation. *Biopreservation and Biobanking*, v.18, n.3, p. 235-243, 2020.
- Stockwell S, Hill JR, Davey R, Herrid M, Lehnert SA.** Transplanted germ cells persist long-term in irradiated ram testes. *Anim Reprod Sci*, v.142, p.137-140, 2013.
- Teixeira DO, da Silva OE, Souza Fernandes J, Palomino GJQ, Alemida Tabosa BE, Barbosa HTS, Silva LDM.** 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.
- Thuwanut P, Srisuwatanasagul S, Wongbandue G, Tanpradit N, Thongpakdee A, Tongthainan D, Chatdarong K.** Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology*, v. 67, n. 2, p. 244-247, 2013.
- Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Frederickx V, De Block G, Devroey P, Van Steirteghem A.** Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Human Reproduction Update*, v.10, n.6, p.525-532, 2004.
- Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, Metton C, Bironneau A, Macé B, Rives N.** Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology*, v.76, n.6, p.981-90, 2011.
- Valdivia M, Bravo Z, Reyes J, Gonzales GF.** Rescue and conservation of male adult alpacas (*Vicugna pacos*) based on spermatogonial stem cell biotechnology using atomized Black Maca as a supplement of cryopreservation medium. *Frontiers in Veterinary Science*, v.8, 2021.
- Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Cancho C, Castañeda S, Limaymanta O, Gonzales GF.** In vitro culture of spermatogonial stem cells isolated from adult alpaca (*Vicugna pacos*) testes analysed with *Dolichos biflorus* by flow cytometry. *Andrologia*, v.51, n.6, 2019.
- Wahab F, Drummer C, Mätz-Rensing K, Fuchs E, Behr R.** Irisin is expressed by undifferentiated spermatogonia and modulates gene expression in organotypic primate testis cultures. *Molecular and cellular endocrinology*, v.504, 2020.
- Woelders H, Chaveiro A.** Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, v.49, n.3, p.258-71, 2004.
- Wyns C, Abu-Ghannam G, Poels J.** Vitrification du tissu testiculaire: évolution ou révolution? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, v.41, p.558-561, 2013.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Ogawa T.** Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature communications*, v.5, n.1, p.4320, 2014.
- Zeng W, Snedaker AK, Megee S, Rathi R, Chen F, Honaramooz A, Dobrinski I.** Preservation and transplantation of porcine testis tissue. *Reproduction, Fertility and Development*, v.21, n.3, p.489-497,

2009.

Zeng W, Tang L, Bondareva A, Honaramooz A, Tanco V, Dores C, Megee S, Modelski M, Rodriguez-Sosa JR, Paczkowski M. Viral transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, v.88, n.27, 2013.
