



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

GABRIELA DA SILVA CARVALHO JOAQUIM

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO ADULTO: DA
EVIDÊNCIA CIENTÍFICA A AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E
VITRIFICAÇÃO**

FORTALEZA - CEARÁ

2024

GABRIELA DA SILVA CARVALHO JOAQUIM

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO ADULTO: DA EVIDÊNCIA CIENTÍFICA A AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA-CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

J58c Joaquim, Gabriela da Silva Carvalho.
CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO ADULTO: DA EVIDÊNCIA CIENTÍFICA A AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO / Gabriela da Silva Carvalho Joaquim. – 2024.
81 f. : il. color.

1. Criopreservação. 2. Testículo. 3. Congelação. 4. Vitrificação. 5. Espermatogônias. I. Título.
CDD 611

GABRIELA DA SILVA CARVALHO JOAQUIM

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO ADULTO: DA EVIDÊNCIA CIENTÍFICA A AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia da Reprodução.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte - UFC (Orientadora)

Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte - UFC
(Examinadora interna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais)

Profa. Dra. Lucy Vanessa Sulca Ñaupas - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - UECE
(Examinadora Externa ao Programa)

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO ADULTO: DA EVIDÊNCIA CIENTÍFICA A AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO

PALAVRAS-CHAVE

Criopreservação, testículo, congelação, vitrificação, espermatogônias.

LINHA DE PESQUISA

Biologia da Reprodução

ORIENTADORA

DRA. ANA BEATRIZ GRAÇA DUARTE - PROFA. ADJUNTA DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA UFC

E-mail: beatrizgduarte@ufc.br

INSTITUIÇÃO EXECUTORA

1. Universidade Federal do Ceará - UFC

Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem - NEMPI

Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina

Rua Delmiro de Farias, 1331, Porangabuçu, Fortaleza, CE

2. Universidade Estadual do Ceará - UECE

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais - LAMOFOPA

Faculdade de Medicina Veterinária - FAVET

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV

Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.714-903, Fortaleza, CE

A Deus, por ter me sustentado até aqui, pelo
seu amor infinito e pela sua misericórdia; ao
meu esposo e família.

Com todo meu amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui, sem ele nada disso seria possível. Obrigada Deus, pela minha saúde, por ter me dado forças nos momentos em que achava que não conseguiria, obrigada por enxugar as minhas lágrimas e confortar meu coração nas madrugadas em que eu chorava e orava pedindo ajuda, e apenas tu, somente tu, Deus, via o meu pranto, pois tu és o meu alívio, o meu socorro bem presente na hora da angústia, obrigada por sempre colocar um sorriso em minha face na presença das pessoas, enquanto só o senhor e eu sabíamos como realmente eu estava por dentro, obrigada por não desistir de mim e me fazer saber o quão valor eu tenho, obrigada pelos teus planos serem sempre maiores e melhores que os meus, pois o senhor me pegou pela mão direita e me disse: filha, eu te levo além, somente descansa e confia em mim. Que toda honra e toda glória sejam dadas a ti Deus.

Sou eternamente grata ao meu esposo, Davide Joaquim pelo incansável incentivo, por ser meu exemplo e guia nos estudos, por ter me mostrado que nunca é tarde para estudar e alcançar um objetivo na vida, pela persistência em não me deixar desistir ao longo de todos esses anos, durante esse caminho árduo e principalmente, por acreditar na minha capacidade quando nem eu mesma acreditava.

As minhas filhas, por serem o motivo de eu não desistir de seguir em frente.

À minha mãe, por suas orações. Meu pai, meus irmãos, familiares e amigos próximos que de alguma forma me ajudaram.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Departamento de Morfologia, ao programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais e ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI).

Aos membros do NEMPI, Dra. Josyane Martins, Cristina Duarte e ao Técnico Junior Lima, pelas orientações, análises e alguns processamentos histológicos, respectivamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa de estudos para realizar a pesquisa.

Expresso imensa gratidão a minha grandíssima orientadora, profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte pela paciência, atenção e confiança em me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao nosso grupo de pesquisa onde conquistei amigos e amigas ao longo dessa trajetória, Ana Cristina, foi a primeira amizade que fiz ao entrar no mestrado, agradeço à Deus por tê-la colocado em meu caminho, pelos conselhos, orientações, por sempre perguntar sobre o andamento dos trabalhos, enfim, sou muito feliz por sua amizade. E aos demais, Ana Júlia, Alexi Fabars, Carla Letícia, Luysa Rodrigues, Monique Rocha, Nádia Damasceno, Raul Monteiro e Thamyres Rodrigues por ser tão prestativa.

Ao senhor Ivan (Auxiliar de laboratório do Departamento de Morfologia) pelas boas palavras de Deus que sempre me expressava.

Agradeço também ao professor adjunto da UFC, professor de bioestatística Dr. Ricardo Viana, pela colaboração em ter realizado as análises estatísticas desse estudo.

Gratidão aos professores Ana Paula Ribeiro Rodrigues e ao José Ricardo de Figueiredo por abrir as portas do Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), para realização dos meus experimentos.

Aos membros do LAMOFOPA, os quais me acolheram, me orientaram e me ajudaram de uma certa forma durante esses dois anos de mestrado, agradeço imensamente as experiências que compartilhamos juntos: Alessandra Façanha, Alesandro Silva, Aline Ribeiro, Anna Clara, Ana Flávia, André Conceição, Aryan Victor, Bianca Almeida, Bianca Silva, em especial, sou bastante grata à Carmen Huayhua, por todo companheirismo e suporte nas demandas dos experimentos. Denilson Gomes, Ramyres Diego, Éverton Pimentel, Gaby Palomino, Gildas Mbemya, Homero Céliz, Isabor Marinho, Jonathan Oliveira, João Elmo, Júnior Mendes, Kamila Gomes, Laritza Lima, Lucy Vanessa pelas grandíssimas orientações, Luciana Mascena, Mariana Brito, Norma Morais, Paula Gabriela, Thiago Costa e ao Sr. João pelas conversas, gentilezas e pipocas.

Agradeço ao abatedouro garrote no município de Caucaia, em especial ao responsável pelos abates, Caetano, por sempre ceder o material biológico (testículos) e dessa forma, contribuir para realização dos meus experimentos.

Agradeço também ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) na pessoa do professor Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas, por sempre ceder o *Mr. Frosty* para ser usado nos experimentos.

Ao Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes (LANUPRUMI) por ceder o freezer - 80° C para armazenado das amostras.

Agradeço também ao laboratório Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) sob a coordenação da professora Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva, por me ceder o microscópio de fluorescência par realização das análises de Imuno-histoquímica.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram com a minha conquista. O meu mais sincero, muito obrigada.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer um método eficiente de criopreservação de fragmento testicular bovino. Para isso, foram utilizados 24 fragmentos de 1,0 cm³ obtidos de cinco pares de testículos e distribuídos aleatoriamente em diferentes tratamentos: Fragmentos de tecido testicular frescos ou controle (TTF), congelação lenta 1 (CL₁ - equilibrado a 4°C e -20°C por 2 horas), congelação lenta 2 (CL₂ - transferido diretamente para freezer a -80 °C), vitrificação 1 (Vit₁ - *ovarian tissue cryosystem* - OTC), vitrificação 2 (Vit₂ - Vitrificação em Superfície Sólida - SSV) e vitrificação 3 (Vit₃ - diretamente em criotubos). Após descongelação ou aquecimento, os fragmentos testiculares foram fixados e processados para análise morfológica e morfométrica (histologia), fibras colágenas (picrosírius), proliferação celular e reparo do DNA. Os resultados morfológicos evidenciaram que o processo de criopreservação causou maiores danos ($p < 0,001$) em todos os tratamentos (CL₁, CL₂, Vit₁, Vit₂ e Vit₃) em comparação ao TTF. Quando comparados os tratamentos entre si, Vit₃ causou danos significativamente maiores em comparação a todos os demais tratamentos (CL₁ $p < 0,001$; CL₂ $p = 0,006$; Vit₁ $p = 0,010$; Vit₂ $p = 0,008$). Quanto ao diâmetro tubular, CL₂ ($p = 0,003$), Vit₁ ($p < 0,001$), Vit₂ ($p = 0,012$) e Vit₃ ($p < 0,001$) apresentaram menor tamanho em comparação ao TTF. O percentual de células imunomarcadas para o PCNA foi significativamente menor na CL₁ ($p < .001$) em comparação a CL₂ ($p < .001$), Vit₁ ($p < .001$) e Vit₂ ($p < .014$). Além disso, a Vit₂ e Vit₁ apresentaram redução significativa em relação a CL₁ ($p = 0,003$) e CL₂ ($p < .001$) e Vit₁ ($p < .004$), respectivamente. O percentual de fibras de colágeno tipo III foi significativamente menor na Vit₃ quando comparada ao TTF ($p = 0,005$), CL₁ ($p < .001$), CL₂ ($p < .001$), Vit₁ ($p = 0,001$) e Vit₂ ($p = 0,003$). Com isso, concluímos que, a vitrificação se mostrou igualmente eficaz aos protocolos de congelação lenta já estabelecidos na literatura para a criopreservação de tecido testicular bovino adulto. O dispositivo OTC e a técnica de SSV foram os mais eficientes para o armazenamento desse tipo de tecido.

Palavras-Chave: Criopreservação; testículo; congelação; vitrificação; espermatogônias.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish an efficient method for cryopreserving bovine testicular fragments. To this end, 24 fragments of 1.0 cm³ obtained from five pairs of testicles were used and randomly assigned to different treatments: Fresh testicular tissue fragments or control (TTF), slow freezing 1 (CL1 - equilibrated at 4°C and -20°C for 2 hours), slow freezing 2 (CL2 - transferred directly to freezer at -80°C), vitrification 1 (Vit1 - ovarian tissue cryosystem - OTC), vitrification 2 (Vit2 - Solid Surface Vitrification SSV) and vitrification 3 (Vit3 - directly in cryotubes). After thawing or heating, the testicular fragments were fixed and processed for morphological and morphometric analysis (histology), collagen fibers (picrosirius), cell proliferation and DNA repair. The morphological results showed that the cryopreservation process caused greater damage ($p < 0.001$) in all treatments (CL1, CL2, Vit1, Vit2 and Vit3) compared to TTF. When the treatments were compared to each other, Vit3 caused significantly greater damage compared to all the other treatments (CL1 $p < 0.001$; CL2 $p = 0.006$; Vit1 $p = 0.010$; Vit2 $p = 0.008$). As for tubular diameter, CL2 ($p = 0.003$), Vit1 ($p < 0.001$), Vit2 ($p = 0.012$) and Vit3 ($p < 0.001$) were smaller compared to TTF. The percentage of cells immunolabeled for PCNA was significantly lower in CL1 ($p < .001$) compared to CL2 ($p < .001$), Vit1 ($p < .001$) and Vit2 ($p < .014$). In addition, Vit2 and Vit1 showed a significant reduction compared to CL1 ($p = 0.003$) and CL2 ($p < .001$) and Vit1 ($p < .004$), respectively. The percentage of type III collagen fibers was significantly lower in Vit3 when compared to TTF ($p = 0.005$), CL1 ($p < .001$), CL2 ($p < .001$), Vit1 ($p = 0.001$) and Vit2 ($p = 0.003$). With this, we conclude that vitrification proved to be equally effective to the slow freezing protocols already established in the literature for the cryopreservation of adult bovine testicular tissue. The OTC device and the SSV technique were the most efficient for storing this type of tissue.

Keywords: Cryopreservation; testis; freezing; vitrification; spermatogonia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA	21
Figura 1: Sistema reprodutor de mamífero da espécie bovina e seus componentes.....	21
Figura 2: Representação esquemática de um corte transversal de um túbulo seminífero de um testículo adulto de mamíferos.....	22
Figura 3: Fases da espermatogênese (proliferativa, meiose e espermiogênese).....	24
Figura 4. Sistemas que são utilizados na congelação do tecido testicular.....	29
Figura 5. Dispositivos e técnicas que são utilizados na vitrificação do tecido testicular..	29
 ARTIGO 1	
Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos para revisão integrativa.....	41
Figura 2 - Agentes crioprotetores identificados nos estudos avaliados.....	43
 ARTIGO 2	
Figura 1 - . Imagem representativa do desenho experimental.....	58
Figura 2 - Imagem representativa do resumo da amostragem de histologia.....	65
Figura 2 - Imagem representativa do resumo da amostragem de morfometria dos túbulos-seminíferos.....	66
Figura 3 - Imagem representativa do resumo da amostragem de <i>Picrosirius red</i>	66
Figura 4 - Imagem representativa do resumo da amostragem de PCNA.....	67
Figura 4 - Imagem representativa do resumo da amostragem de-H2AX.....	68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Caracterização dos estudos primários quanto a autoria e ano de publicação, título, país e periódico.....	41
Tabela 2 - Descrição dos estudos de acordo com idade, meio e técnica de criopreservação, tamanho de tecido e tempo de conservação.....	42
Tabela 3 - Descrição dos estudos primários quanto ao objetivo.....	44
Tabela 4 - Descrição dos estudos primários quanto aos principais resultados.....	45

ARTIGO 2

Tabela 1 - Sistema de pontuação para scores de avaliação da integridade e das alterações estruturais dos túbulos seminíferos dos fragmentos de tecidos testiculares de bovinos.	60
Tabela 2 - Pontuação dos parâmetros histomorfológicos de fragmentos de tecido testicular bovino fresco, congelado e vitrificado.....	64

LISTA DE ABREVIATURASE SIGLAS

ABP	Proteína de ligação de androgênio
ACPs	Agentes Crioprotetores
BSA	<i>Bovine Serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
BAX	<i>BAX BCL2 associated X</i>
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma protein 2</i>
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CD34	Anticorpo monoclonal
CD9	Gene Tspan29
CE	Ceará
CFT	Criopreservação de fragmento testicular
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
C-KIT	CKIT Receptor de proteína tirosina quinase
CTT	Criopreservação de tecido testicular
CL ₁	Congelação Lenta 1
CL ₂	Congelação Lenta 2
CREM	modulador de elemento AMP cíclico
CSs	Células de Sertoli
DeCS	Ciência da Saúde
DMEM	<i>Eagle Modificado por Dulbec</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
ES	Equilibrium solutions (solução de equilíbrio 1)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAVET	Faculdade de Veterinária
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Soro fetal bovino)
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
GFR α -1	Gene marcador de gonócitos/células-tronco espermatogoniais
GLY	Glycerol (Glicerol)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H2AX	Histona de fosforilação

HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hsp70	Proteína de choque térmico humana 70
IIQ	Intervalo interquartil
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais
LANUPRUMI	Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes
LFR	Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
LH	Hormônio luteinizante
MeSH	<i>Medical Subject Heading</i>
MEM	Meio essencial mínimo
MGF	Fator de crescimento mecânico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NANOG	Do inglês <i>Nanog Homeobox protein</i>
NEMPI	Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem
NL	Nitrogênio líquido
OCT4	Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4
OTC	<i>Ovarian Tissue Cryosystem</i>
PAF	Paraformaldeído
PBS	Tampão fosfato salina
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PG	Propilenoglicol
PLZF	Dedo de zinco da leucemia promielocítica
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
PH	Potencial hidrogeniônico
PPROH	Propanodiol
qPCR	<i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	<i>Room temperature</i> (temperatura ambiente)
SAC	Sacarose
SCF	Genes ligante KIT
SE	Standard error (erro padrão)
SPRD	Sem padrão de raça definido

SOX2	Gene de pluripotência
SRD	Sem Padrão de Raça Definida
STRA8	Estimulado pelo Gene 8 do Ácido Retinoico
SSCs	Células-tronco espermatogoniais
SSV	Vitrificação em Superfície Sólida
SV	<i>Vitrification solutions</i> (Solução de vitrificação)
SV 1	Solução de Vitrificação 1
SV 2	Solução de Vitrificação 2
TA	Temperatura ambiente
TS	Túbulo Seminífero
TTF	Tecido testicular fresco
TT	Tecido testicular
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling</i>
UCHL1	Gene marcador de gonócitos/células-tronco espermatogoniais
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIMENTINA	Família de proteínas do filamento intermediário
VIT ₁	Vitrificação 1
VIT ₂	Vitrificação 2
VIT ₃	Vitrificação 3

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

mg - Miligrama

mL - Mililitro

μM - Micromolar

mm - Milímetro

mm³ - Milímetro cúbico

nº - Número

P < 0.05 - Probabilidade de erro menor que 5%

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

% - Porcentagem

< - Menor

> - Maior

= - Igual

± - Mais ou Menos

α - Alfa

* - Asterisco

~ - Aproximadamente

min – Minuto

h – Hora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. Morfofisiologia da gônada masculina.....	21
2.1.1. Espermatogênese.....	23
2.2. Criopreservação.....	25
2.3. Criopreservação de tecido testicular.....	25
2.4. Métodos de criopreservação.....	27
2.4.1. Congelação lenta versus vitrificação para criopreservação de tecido testicular.....	30
2.5. Métodos de avaliação de tecido testicular após criopreservação.....	30
2.5.1. Histologia.....	30
2.5.2. Picrosírius <i>red</i>	31
2.5.3. Imunocoloração.....	31
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	34
5. OBJETIVO.....	35
5.1. Objetivo geral.....	35
5.2. Objetivos específicos.....	35
6. CAPÍTULOS.....	36
6.1. Artigo 1.....	37
6.2. Artigo 2.....	54
7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica reprodutiva recomendada para animais ou seres humanos adultos para preservar gametas masculinos antes do tratamento quimioterápico, permitindo seu uso futuro em tecnologias de reprodução assistida. Contudo, essa opção não é aplicável em indivíduos pré-púberes e animais de alto valor genético ou animais silvestres em vias de extinção que morrem prematuramente (LIMA E SILVA et al., 2017; BEBERE et al., 2019). Frente a isso, a criopreservação de tecido testicular (TT) tem se mostrado como uma excelente opção para a preservação das células germinativas e subsequente retomada da função e diferenciação celular (TRAPPHOFF; DIETERLE, 2023).

A criopreservação de TT tem sido realizada em diferentes espécies domésticas, como ovinos, caprinos e felinos pré-púberes (BEBERE et al., 2019; GOMES et al., 2023; LIMA; SILVA, 2018), além de camundongos e suínos adultos (ZENG et al., 2009; PORTELA et al., 2019). Essa biotécnica também tem sido utilizada em espécies silvestres adultas, como macacos e cutias (SHETTY et al., 2021; SILVA, 2022). No entanto, nascimentos vivos foram relatados apenas em coelhos, camundongos e primatas não humanos após criopreservação por congelamento lento (SINOHARA et al., 2002; YOKONISHI et al., 2014; FAYOMI et al., 2019), e em suínos, após vitrificação (KANEKO et al., 2013).

Especificamente em bovinos, a criopreservação TT tem sido amplamente realizada pelo método da congelamento lento não controlada com resultados promissores na preservação das estruturas do epitélio seminífero (CAI et al., 2016; JIANG et al., 2020; ZHU et al., 2021) e na manutenção da viabilidade de células-tronco espermatogoniais (SSCs) após a criopreservação (ZHANG et al., 2017; LI et al., 2018), cultivo in vitro (CAI et al., 2016; ZHU et al., 2021); e xenotransplante em camundongos receptores (KIM et al., 2015). No entanto, ainda não foram alcançados resultados eficientes relacionados à maturação de espermatozoides e nascimentos.

A criopreservação de TT é amplamente realizada por congelamento lento (ZHANG et al., 2017). No entanto, ainda apresenta vários desafios, dentre elas, a formação de cristais de gelo, além de ser uma técnica que precisa do uso de equipamentos caros, o que restringe sua viabilidade em muitos laboratórios e no campo. Além disso, a congelamento lento não controlada é um processo demorado que pode levar mais de 12 horas (CARVALHO et al., 2011; HERRAIZ et al., 2014; SILVA et al., 2019). Uma alternativa é a vitrificação, uma técnica que se baseia no uso de taxas ultrarrápidas de resfriamento e alta concentração de crioprotetores que evitam a formação de cristais de gelo (CARVALHO et al., 2011; CAMPOS et al., 2016; SHI et al., 2017). Além disso, comparado ao método de congelamento

lenta, a vitrificação é considerada uma técnica mais simples, que economiza tempo e não requer equipamentos especiais ou caros (HERRAIZ et al., 2014; SHI et al., 2017; SILVA et al., 2019), o que permite sua realização mesmo em locais com recursos limitados, como em ambientes de campo. O método de vitrificação tem mostrado resultados promissores na preservação de tecido testicular de cães e javalis (PICAZO et al., 2022), gatos domésticos adultos (EVANGELISTA et al., 2020; CARVALHO et al., 2023) e ovinos pré-púberes (BEBBERE et al., 2019). No entanto, até o momento, não há relatos da criopreservação do tecido testicular bovino utilizando este método. Diante desse contexto, este estudo busca estabelecer um método eficiente de criopreservação de fragmento testicular bovino utilizando os métodos de congelamento lento e vitrificação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfofisiologia da gônada masculina

O sistema reprodutor dos mamíferos é composto por estruturas como testículos, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferente, ductos ejacutórios, uretra, glândulas acessórias e pênis, conforme mostrado na Figura 1 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2019; KONIG & LIEBICH, 2016). Responsáveis pela produção de espermatozoides e hormônios sexuais (MENDONÇA et al., 2019), os testículos bovinos são órgãos em pares, encapsulados e de formato oval, situados na região inguinal e suspensos em um escroto pendente.

Funcionalmente, o testículo dos mamíferos é organizado em dois compartimentos principais (**Figura 2**): o compartimento tubular, responsável pela produção dos gametas; e o compartimento intersticial, responsável pela produção hormonal. Esses hormônios são importantes tanto para a espermatogênese quanto para a expressão das características sexuais masculinas secundárias (MARTIN, 2016).

O compartimento do túbulo seminífero é avascular e composto por células de Sertoli (CSs), que desempenham um papel fundamental na produção de fatores essenciais para o processo espermatogênico, além das células germinativas em diferentes estágios de maturação (MARTIN, 2016; OATLEY; GRISWOLD, 2017). Esses túbulos seminíferos são envolvidos por uma membrana basal e uma camada de células mióides peritubulares (MARTIN, 2016).

As CSs estendem-se da membrana basal até o lúmen tubular, adotando uma forma piriforme. Durante o processo de diferenciação espermatogênica, as membranas das CSs e das células germinativas mantêm contato, fornecendo suporte nutricional e secretando fatores essenciais e hormônios para a diferenciação e progressão das células gaméticas (MEDONÇA et al., 2019). As CSs permanecem proliferativas até a puberdade na maioria das espécies de mamíferos e são as únicas células somáticas presentes no epitélio seminífero. Ao longo da espermatogênese dos mamíferos, as CSs fornecem suporte morfogenético por meio de interações célula-célula, bem como componentes bioquímicos através da secreção de lactato, citocinas e hormônios (NI et al., 2019; O'DONNELL; SMITH; REBOURCET, 2022).

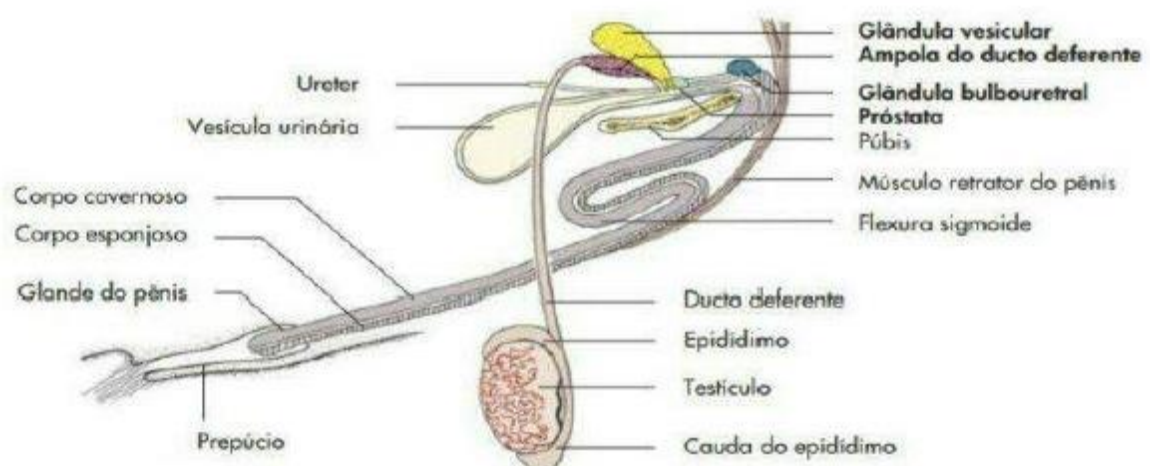
As junções entre as CSs, assim como as células mióides peritubulares, formam a barreira sangue-testículo na base dos túbulos seminíferos, a qual desempenha um papel fundamental na proteção imunológica das células germinativas em meiose e das espermátides em maturação. Essa barreira também contribui para manter diferenças na composição do

ambiente entre os compartimentos intratubular e intertubular (MARTIN, 2016). As células mióides peritubulares compreendem um grupo de células musculares lisas contráteis que estão organizadas em múltiplas camadas ao redor dos túbulos seminíferos. Essas células diferenciam-se em resposta ao aumento da produção de andrógenos que ocorre no início da puberdade. Além de fornecerem integridade estrutural, elas contribuem para a contração dos túbulos seminíferos (MARTIN, 2016).

Em relação ao compartimento intersticial, este é composto por células de Leydig, macrófagos, fibroblastos, células mióides, linfócitos, plasmócitos e vasos sanguíneos e linfáticos (MARTIN, 2016). As células de Leydig são as principais responsáveis pela síntese e secreção do andrógeno testicular, incluindo a testosterona (MARTIN, 2016). Além disso, produzem o hormônio semelhante à insulina (INSL3), que regula a descida dos testículos durante a vida fetal e a sobrevivência das células germinativas em adultos (MARTIN, 2016; ANAD-IVELL et al., 2019).

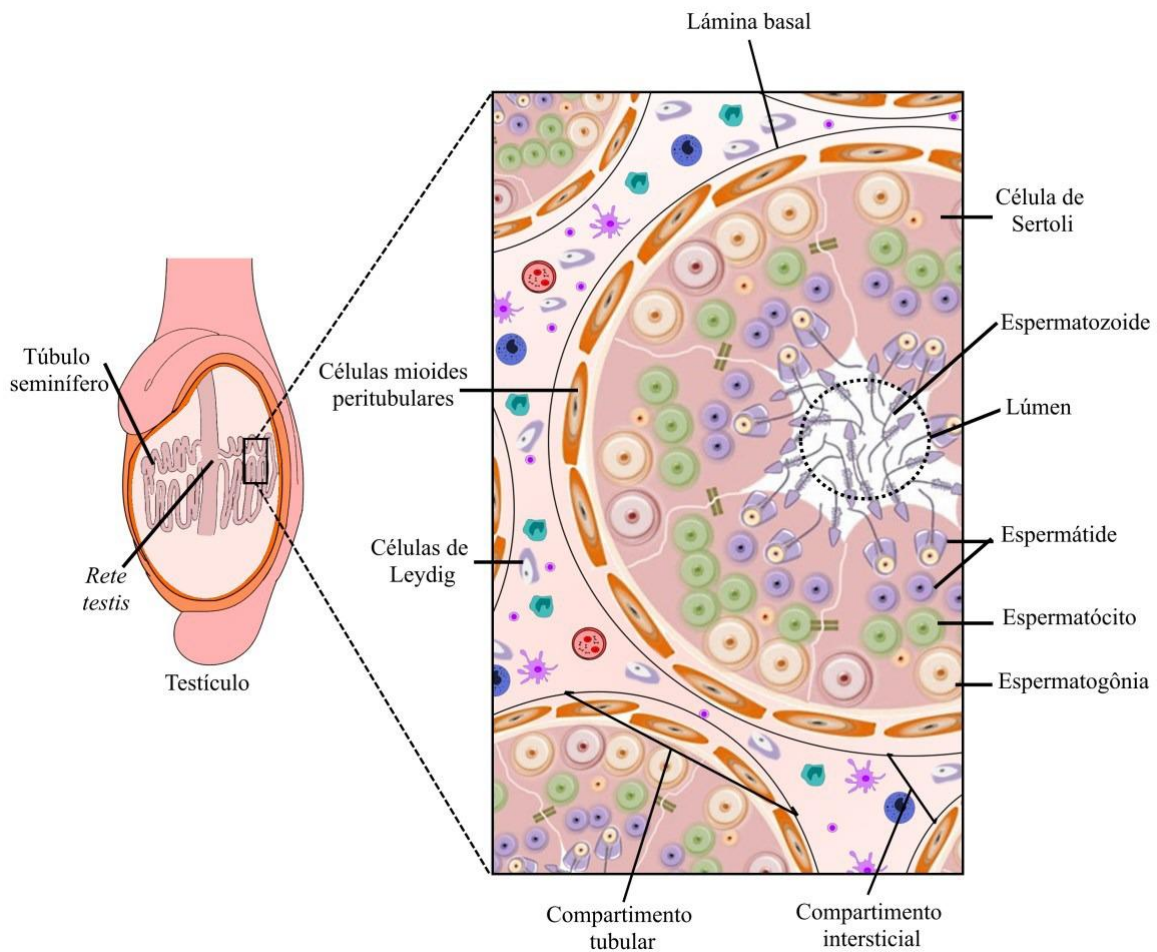
O tecido conjuntivo intersticial é um componente essencial do testículo, fornecendo suporte estrutural e regulando a função dos túbulos seminíferos. Além das células, contém a matriz extracelular sintetizada principalmente por fibroblastos. A matriz extracelular fornece suporte estrutural para os túbulos seminíferos e regula a migração e a proliferação das células germinativas.

Figura 1. Sistema reprodutor de mamífero da espécie bovina e seus componentes.



Fonte: Konig e Libich (2016).

Figura 2. Representação esquemática de um corte transversal de um túbulo seminífero de um testículo adulto de mamíferos



Fonte: Adaptado de Ntemou et al. (2019)

2.1.1. Espermatogênese

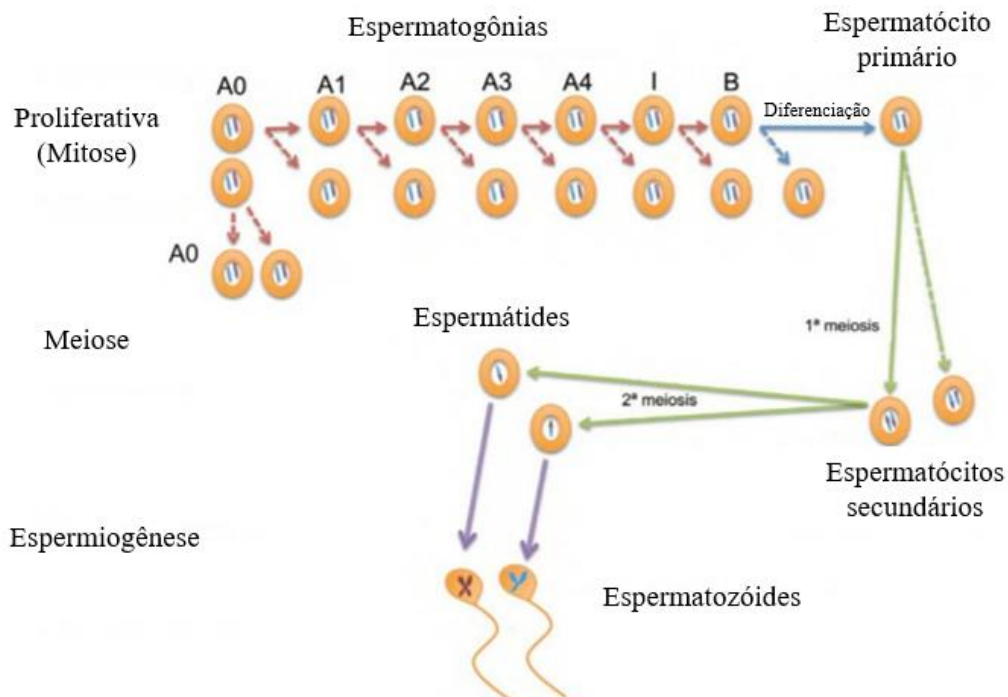
A espermatogênese é um processo celular complexo no qual os espermatozoides, células germinativas haploides ou gametas, são formados a partir de espermatogônias diploides. Esse processo inicia-se na vida fetal, onde as células sofrem uma série contínua de divisões celulares e modificações de desenvolvimento, e ocorre no interior dos túbulos seminíferos (SANTOS et al., 2016).

Com base na evolução, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: proliferativa, meiose e espermiogênica (**Figura 3**). A fase proliferativa, também chamada de mitose, é caracterizada por uma série de divisões mitóticas das células germinativas espermatogoniais, resultando na formação de espermatócitos primários (ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023). As espermatogônias do tipo A são células-tronco com núcleo volumoso e ovoide, contendo grânulos de cromatina dispostos de forma irregular no nucleoplasma, além de possuírem de

um a três nucléolos. Por meio de mitoses sucessivas, essas células se dividem em espermatogônias tipo A1, A2, A3 e A4. A espermatogônia do tipo A4, por sua vez, divide-se para dar origem às espermatogônias intermediárias (tipo I), que por sua vez se dividem novamente para formar o tipo B (SANTOS et al., 2016; ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023).

As espermatogônias do tipo B saem do ciclo mitótico e entram na meiose, sendo estimuladas pelo ácido retinóico, um derivado da vitamina A. Os núcleos esféricos diminuem progressivamente até a última geração desta célula. A transição da espermatogônia tipo B para espermatócito primário (espermatócito I) é caracterizada por um aumento no volume citoplasmático da célula (SANTOS et al., 2016; ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023). Cada espermatócito I passa pela primeira divisão meiótica, que resulta na separação dos cromossomos homólogos, formando dois espermatócitos II com volume citoplasmático igual e haploides. Estes, por sua vez, após completarem a segunda divisão meiótica, onde ocorre a separação das cromátides irmãs, originando células haploides chamadas de espermátides (KANG et al., 2022; FAIAD et al., 2022). Cada espermatócito II origina duas espermátides haplóides de tamanho semelhante, contendo núcleos arredondados, pequenos e claros (ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023).

Figura 3. Fases da espermatogênese (proliferativa, meiose e espermiogênese)



Fonte: Adapto de Silva (2020).

A espermiogênese trata-se de um processo bioquímico e morfológico que transforma as espermátides em espermatozoides (KANG et al., 2022; ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023). Durante esse processo, ocorre a condensação da cromatina e alongamento nuclear, a eliminação da maior parte do citoplasma, bem como o desenvolvimento da cauda e do acrossoma (ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023).

2.2. Criopreservação

A criopreservação de amostras biológicas tornou-se uma técnica de suma importância tanto para a pesquisa científica quanto para inúmeras terapias clínicas modernas, incluindo a medicina reprodutiva (JANG et al., 2017). Em humanos, além de preservar os gametas para permitir uma maior flexibilidade no momento em que as pessoas desejam ter filhos, a criopreservação pode ser adotada em tratamentos agressivos, como quimioterapia e radioterapia, em indivíduos em idade reprodutiva (ONOFRE et al., 2016; GUALTIERI et al., 2021).

Em animais, a criopreservação tem se mostrado uma aliada na produção animal junto a outras biotecnologias, principalmente na aceleração da genética do rebanho, além de permitir a formação de criobancos de germoplasma, seja de espécies domésticas ou ameaçadas de extinção (LI et al., 2018; ZHU et al., 2021; GUALTIERI et al., 2021).

Os criobancos melhoram os índices de reprodução animal, bem como a difusão e utilização de diversas biotecnologias, tais como transferência de embriões, fertilização *in vitro*, inseminação artificial em tempo fixo e o uso do sêmen sexado (JANG et al., 2017; SILVA et al., 2019). A inseminação artificial em bovinos destaca-se como uma das biotecnologias mais amplamente aplicadas na reprodução animal, com significativo impacto no melhoramento genético de animais destinados à produção zootécnica (SILVA et al., 2019).

2.3. Criopreservação de tecido testicular

A criopreservação de tecido testicular tem se estabelecido firmemente como uma técnica inovadora e promissora na preservação da fertilidade de animais e humanos jovens pré-púberes, nos quais as gônadas ainda não iniciaram o processo de espermatogênese, assim como em adultos nos quais os espermatozoides maduros não são produzidos devido as condições patológicas (MING et al., 2018; PATRA; PATHAK; GUPTA, 2021). Esse tecido é

uma importante fonte de células imaturas, as espermatogônias (ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023), que podem ser preservadas para posterior produção *in vitro* ou transplante.

A criopreservação de tecido testicular oferece uma oportunidade única de preservar fragmentos de tecido que contêm um grande número de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo as espermatogônias indiferenciadas (ONOFRE et al., 2016; PATRA; PATHAK; GUPTA, 2021). Também permite preservar o microambiente ao redor das células germinativas, conhecido como nicho espermatogonial. Tal nicho oferece suporte físico e produz sinais que regulam tanto a auto-renovação quanto a diferenciação espermatogonial, além de fornecer aporte nutricional e proteção dessas células durante o desenvolvimento (PEREIRA et al., 2023).

Os fragmentos de tecido testicular criopreservados podem ser armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente utilizados para restaurar a fertilidade por meio de transplante ou fertilização *in vitro* (ONOFRE et al., 2016; PATRA; PATHAK; GUPTA, 2021). O transplante do tecido testicular pode não apenas recuperar a função gametogênica, mas também restaurar a função endócrina após o período de criopreservação (SILVA; PEREIRA; SILVA, 2019; FAYOMI et al., 2019). Também possibilita estudar a manipulação de diversos aspectos do processo dinâmico da espermatogênese, mecanismos de transplante e sobrevivência de células espermatogônias (EUGENI et al., 2022).

A literatura demonstra que a criopreservação de tecido testicular é um procedimento viável, capaz de resultar em gestações e nascimentos de animais saudáveis após o transplante desse tecido. Shinohara et al. (2002) relataram o nascimento de camundongo após microinseminação *in vitro* com espermatozoides originados de tecidos testiculares imaturos de camundongos e coelhos criopreservado. Fayomi et al. (2019) descreveram o nascimento de um macaco saudável após a criopreservação, nutrição e enxertos de esperma por injeção intracitoplasmática em uma macaca receptora. Em humanos, Younis et al. (2023) demonstraram que tecido testicular imaturo criopreservado pode ser mantido em cultura organotípica por 32 dias, preservando células germinativas e somáticas viáveis. Além disso, observaram a diferenciação esporádica de espermatogônias em espermátócitos primários.

Esses resultados têm impulsionado cada vez mais a criação de centros especializados na coleta e criopreservação de tecido testicular ao redor do mundo. Uma pesquisa realizada em 2019 revelou que mais de 1.000 meninos tiveram seu tecido testicular armazenado, representando um aumento de quatro vezes em relação ao primeiro estudo realizado em 2012

(PICTON et al., 2015; GOOSSENS et al., 2020). Esse aumento substancial no número de amostras criopreservadas destaca a crescente conscientização e aceitação desse procedimento como uma medida promissora para preservar a fertilidade masculina em casos de risco.

No entanto, o principal desafio enfrentado na criopreservação do tecido testicular ainda é manter as células viáveis após o descongelamento, uma vez que a exposição a taxas de resfriamento extremamente baixas pode resultar em danos deletérios aos espermatozoides e outras células do tecido (PEREIRA et al., 2023). A criopreservação pode levar à perda da integridade das membranas plasmáticas e acrossomais, bem como à redução do potencial mitocondrial e reparo do DNA, resultando consequentemente em uma diminuição da fertilidade (EZZATI et al., 2020; GUALTIERI et al., 2021).

2.4. Métodos de criopreservação

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: a congelação lenta e a vitrificação (JANG et al., 2017). A congelação envolve o uso de baixas concentrações de crioprotetores e a redução gradual da temperatura (GROTTER et al., 2019). Devido à sua natureza lenta, esse método pode induzir a formação de cristais de gelo no interior das células e do estroma, resultando a sua morte celular ou disfunção após a retomada das condições fisiológicas (RIVAS LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019).

A congelação lenta pode ser realizada através de dois sistemas: não controlado e controlado (**Figura 4**). No sistema não controlado, a redução da temperatura ocorre a uma taxa de cerca de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, utilizando um dispositivo chamado *Mr. Frosty*. Já no sistema controlado, a temperatura é reduzida de acordo com um programa computadorizado pré-estabelecido (LIERMAN et al., 2021).

Por outro lado, a vitrificação, uma alternativa ao processo de congelação lenta, é um método ultrarrápido que evita a formação de cristais de gelo, uma das principais causas de danos celulares (RIVAS LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019). Esse processo resulta na formação de um estado vítreo (sólido amorfa), onde a água é solidificada sem expansão, devido ao aumento da viscosidade da solução até um ponto em que as moléculas ficam imobilizadas e a amostra adquire propriedades sólidas (CARVALHO, 2013).

A vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de crioprotetores (CARVALHO, 2013; RIVAS LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019; AMINI; BENSON, 2023). No entanto, essas altas concentrações podem causar toxicidade e estresse

osmótico, resultando em danos celulares. Para mitigar esses efeitos, é utilizado um volume mínimo de solução como estratégia para reduzir os danos causados pelo choque osmótico, bem como o efeito solução, caracterizado pela desidratação excessiva das células, alta concentração de solutos, modificação do pH e consequente alteração na função celular (CARVALHO, 2013).

A vitrificação pode ser realizada através de diferentes técnicas e dispositivos destacando-se respectivamente a vitrificação em superfície sólida (SSV) e o *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) (**Figura 6**). A SSV consiste na sobreposição do tecido em uma superfície metálica parcialmente submersa em nitrogênio líquido, ocasionando um rápido resfriamento da amostra, que é então armazenada em criotubos (CARVALHO et al., 2011; AMINI et al., 2023).

O OTC é uma estrutura metálica composta por uma base na qual as amostras são colocadas, uma inserção contendo perfurações para permitir a exposição e remoção da solução de vitrificação e uma tampa para fechar hermeticamente o dispositivo. Essa técnica é um sistema de baixo custo e alta viabilidade, já utilizado para a preservação de tecido ovariano (CARVALHO et al., 2011). Este dispositivo evita que amostra tenha contato direto com o nitrogênio líquido e melhora a troca de calor (CARVALHO et al., 2013). Um estudo que avaliou a influência dos métodos de vitrificação na matriz extracelular e no desenvolvimento folicular ovariano, comparando OTC e SSV, conclui que o dispositivo OTC é mais eficiente que o SSV por preservar a viabilidade e morfologia folicular e permite um melhor desenvolvimento do folículo ovariano, além de ser capaz de manter a integridade dos componentes da matriz extracelular do ovário em ovinos (BANDEIRA et al., 2014).

Figura 4. Sistemas que são utilizados na congelação do tecido testicular

**Congelação lenta
não controlada**



Mr. Frosty ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
(ZHANG *et al.*, 2017)

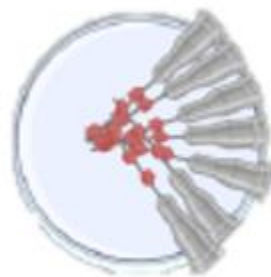
**Congelação lenta
controlada**



Sistema computadorizado
FAYOMI *et al.*, 2019

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5. Dispositivos e técnicas que são utilizados na vitrificação de fragmento testicular



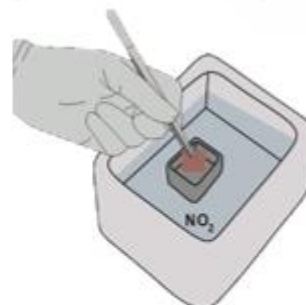
Agulhas
(LIMA *et al.*, 2018)



Dispositivo - OTC
(CARVALHO *et al.*, 2013)



Criotubo
(SILVA *et al.*, 2021)



Superfície Sólida
(SILVA *et al.*, 2022)

Fonte: adaptado de Carvalho et al. (2023)

2.4.1. Congelação lenta versus vitrificação para criopreservação de tecido testicular

O tecido testicular de cada espécie de animal pode responder de forma distinta ao método de criopreservação. Picazo et al. (2022), ao compararem a viabilidade e integridade do DNA das espermatídes e espermatozoides de cães e javalis por congelação lenta e vitrificação, concluíram que a eficiência da criopreservação depende do tipo de célula, do método de criopreservação e da espécie. A vitrificação parece ser o método mais apropriado para preservar o tecido testicular de cães, devido à elevada viabilidade celular e ao baixo grau de fragmentação do DNA, enquanto que nos javalis, qualquer um dos métodos pode ser utilizado.

Em uma pesquisa que comparou os métodos de congelação lenta não controlada, vitrificação direta em criotubo e vitrificação em superfície sólida com a congelação lenta controlada utilizando tecido testicular humano, os resultados evidenciaram que o protocolo de congelação lenta não controlada produziu melhores efeitos. Esse método foi mais eficaz na prevenção de apoptose, proteção do epitélio tubular, manutenção da integridade do compartimento intersticial, capacidade de proliferação celular, número de espermatogônias e preservação da ultraestrutura das células testiculares (BAERT et al., 2013).

Em um estudo com gatos domésticos, Evangelista et al. (2020) observaram que a vitrificação utilizando o dispositivo OTC obteve maior eficácia na preservação morfológica das células da linhagem germinativa e das células de Sertoli, quando comparado ao método de vitrificação em palhetas convencionais. Em outro estudo também realizado com gatos domésticos, Carvalho et al. (2023) observaram que o dispositivo OTC e a vitrificação em superfície sólida (SSV) foram os mais eficientes na manutenção da integridade e viabilidade testicular de gatos adultos após a vitrificação. Essas informações são valiosas para o estabelecimento de protocolos eficientes de preservação de tecido testicular bovino, visando à retomada da funcionalidade reprodutiva e posterior utilização em biotecnologias de reprodução.

2.5. Métodos de avaliação de tecido testicular após criopreservação

A avaliação do tecido testicular após criopreservação pode ser realizada através de diversos métodos:

2.5.1. Histologia

A histologia clássica se destaca como uma das técnicas mais utilizadas para examinar a qualidade das estruturas teciduais e a morfologia celular. Essa abordagem se fundamenta no uso de corantes como Hematoxilina e Eosina (H&E), os quais permitem avaliar a histologia do núcleo, citoplasma e substância fundamental amorfa do tecido (SANTOS NETTO et al., 2020).

A coloração H&E oferece uma visão ampla do tecido, facilitando a identificação de seus elementos constituintes. Com essa técnica, os núcleos são corados pela hematoxilina, aparecendo em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, exibindo uma tonalidade rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2019). Esta coloração permite avaliar qualitativamente a arquitetura tecidual, utilizando escores que determinam a integridade do túbulo seminífero. Os parâmetros avaliados incluem ruptura da membrana basal, associação das CSs e germinativas, distinção de nucléolos, condensação do material nuclear, perda celular e formação de espaços intercelulares (*gaps*) (FAES; GOOSSENS, 2017).

2.5.2. Picrosírius red

Picrosírius red, também chamada de coloração "*Sirius red*", é uma técnica histoquímica amplamente compreendida e eficaz na identificação seletiva de redes de colágeno. Esta coloração é particularmente útil para destacar a estrutura do colágeno, permitindo uma análise detalhada da integridade e organização das fibras colágenas no tecido (RITTIÉ, 2017).

2.5.3. Imunomarcacão

A imunomarcacão é uma técnica amplamente utilizada para a análise de fragmentos testiculares após os procedimentos de CFT, com destaque para a imuno-histoquímica e a imunofluorescência. Essas técnicas permitem a localização de proteínas em nível quantitativo dentro de células e tecidos usando anticorpos acoplados a enzimas, fluorocromos ou outras partículas (PIÑA et al., 2022). Elas são empregadas para investigar proteínas com funções específicas nas células, como, por exemplo, *UCHL1*, *CD34* e *VIMENTIN*, que estão relacionadas à proliferação das espermatogônias, células peritubulares e células de Sertoli, respectivamente (ZHU et al., 2021).

Essas técnicas também permitem visualizar o processo da espermatogênese ao identificar células germinativas em diferentes estágios do ciclo celular, como as células espermatogoniais indiferenciadas marcadas por OCT4 (LIMA et al., 2020). A fluorescência

também é usada para detectar apoptose por meio do ensaio TUNEL, que avalia a integridade do DNA (PERIS-FRAU et al., 2023; PICAZO et al., 2022), ou para marcar proteínas específicas envolvidas na cascata de morte celular, como a enzima Caspase-3 ativada (OLIVEIRA; FERNANDES; SANTOS, 2023).

3. JUSTIFICATIVA

Na literatura, há resultados controversos em relação ao emprego das técnicas de congelamento lento e vitrificação na criopreservação de Tecido Testicular (TT) em diferentes espécies de animais. Em caprinos e suínos, a congelamento lento foi eficaz para reduzir a apoptose celular, e aumentar a produção de hormônios (XI et al., 2019; ZENG et al., 2009), enquanto que a utilização da vitrificação em superfície sólida foi o melhor protocolo para criopreservação de TT em cutias adultas (SILVA et al., 2022). No entanto, ainda não está claro se as técnicas usadas nas espécies mencionadas acima podem ser aplicadas em bovinos (*Bos taurus*), devido às diferenças evidentes da estrutura dos testículos entre as diferentes espécies. Além disso, por ser uma espécie extensivamente utilizada na produção de animais para consumo de carne e leite, a investigação de protocolos que facilitem a sua aplicação fora do ambiente do laboratório, em fazendas ou a campo, sem a utilização de equipamentos de alto custo, ainda se faz necessária. A alta qualidade do TT bovino após o aquecimento pode determinar o sucesso na aplicação de técnicas como enxertos de TT ou transplante de células tronco espermatogoniais, especialmente em animais de alto valor genético e economicamente valiosos.

Nos países desenvolvidos por meio de seleções e aplicações de modernas tecnologias, surgiram raças bovinas altamente produtivas que vem substituindo as raças brasileiras (locais). No Brasil, houve introdução de muitas raças exóticas que por cruzamentos, foram causando erosão genética e substituição destas raças locais. A conservação genética das características destes bovinos locais é de grande relevância, uma vez que são eles que deverão fornecer dados e subsídios para o melhoramento genético animal (EMBRAPA CERRADOS, 2006). Dessa forma, a preservação das células germinativas testiculares pode contribuir para evitar que o material genético dessas raças desapareça. A escolha de animais adultos para execução do presente trabalho também se justifica pela inclusão da preservação dos diferentes tipos celulares junto com as células-tronco testiculares presentes nos túbulos seminíferos, como as células germinativas (espermatogônias e espermatozoides), células mioides peritubulares, assim como as células de Sertoli e Leydig maduras, que fornecem um suporte físico e produção de sinais que regulam a autorrenovação e diferenciação espermatogonial (OGAWA; OHMURA; OHBO, 2005; SILVA; PEREIRA; SILVA, 2019).

A otimização dos protocolos de criopreservação requer refinamentos nas taxas de criopreservação e aquecimento, nas condições osmóticas, no tipo, toxicidade, concentração e nos tempos de equilíbrio dos agentes crioprotetores (ACPs). Além disso, o uso de técnicas

convenientes e baratas, como congelamento não controlado ou vitrificação, deve ser estudado como uma alternativa ao congelamento controlado (BAERT et al., 2012). Melhorias em todos esses fatores podem resultar em melhor sobrevivência e funcionalidade de amostras de tecido e células e uma restauração bem-sucedida da fertilidade. Informações sobre a eficiência desses protocolos e a sua influência em modificações genéticas e epigenéticas em células germinativas após a criopreservação podem ser cuidadosamente estudadas em modelos animais como bovinos por exemplo. Portanto, esta pesquisa também pode servir como modelo translacional contribuindo com um protocolo de criopreservação ideal para TT e Células-Tronco Espermatogoniais (CTEs) de seres humanos, que poderá se beneficiar da experiência reunida em diferentes modelos animais.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A vitrificação através do dispositivo OTC e da técnica em superfície sólida preserva a arquitetura e viabilidade celular de fragmento testicular bovino melhor que a congelação lenta.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo geral

Estabelecer um método eficiente de criopreservação de fragmento testicular bovino.

5.2. Objetivos específicos

- a. Comparar o efeito de diferentes métodos de congelação lenta e vitrificação do tecido testicular bovino sobre a:
- b. Morfologia e morfometria dos túbulos seminíferos
- c. Proliferação celular (PCNA) e reparo do DNA (γ -H2Ax)

6. CAPITULOS

Regimento

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Para responder aos objetivos desta dissertação, os resultados serão apresentados no formato de dois artigos acadêmicos, redigidos de acordo com as normas da revista, cada um deles abordando um aspecto do trabalho.

6.1 Artigo 1:

Criopreservação de tecido testicular bovino

Periódico: Ciência Animal

Qualis capes: B4 - Ciências Biológicas II

6.1. ARTIGO 1

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO

(Cryopreservation of bovine testicular tissue)

Gabriela da Silva Carvalho JOAQUIM^{1*}; Rensson Homero Céлиз YGNACIO²; Gildas Mbemya TETAPIN²; Ana Paula Ribeiro RODRIGUES²; Ana Beatriz Graça DUARTE¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará. Rua Delmiro de Farias, 1331, Campus do Porangabuçu, Fortaleza/CE. CEP: 60.430-170.; ²Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais

(FAVET/UECE). *E-mail: gaby_bmg@outlook.com

RESUMO

A criopreservação de tecido testicular bovino se apresenta como alternativa viável para a preservação do potencial reprodutivo. Permite, além de armazenar fragmentos de tecidos contendo grande número de células germinativas, preservar o nicho em torno dessas células, oferecendo um suporte físico e mecanismos de regulação das células-tronco espermatogônias. Esse artigo tem como objetivo analisar as produções científicas referentes aos protocolos de criopreservação do tecido testicular bovino. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, realizada no mês de março de 2023. Utilizou-se a estratégia PICO para formular a pergunta norteadora: Quais as evidências científicas disponíveis na literatura sobre a criopreservação de tecido testicular bovino? Bases de dados consultadas foram PubMed, Scopus e Web of Science, utilizando os descritores cryopreservation, tissues, tissue, testis, testicle e cattle. Foram selecionados artigos disponíveis na íntegra e sem restrições de idioma e data de publicação. Ao todo, foram analisados doze artigos, com destaque de publicação entre os anos de 2015 e 2016, a maioria foram desenvolvidos na China e publicados na revista Cryobiology. Foi observado que todas as pesquisas utilizaram a técnica de congelação lenta não controlada. O meio base Eagle Modificado por Dulbec suplementado com crioprotetores, como dimetilsulfóxido, glicerol e etilenoglicol, eram mais utilizados para a criopreservação. Em relação ao tamanho dos fragmentos, variam de 1 a 2mm até 0,3 a 0,5cm³. A padronização de protocolos de criopreservação de tecido testicular bovino ainda permanece um desafio a ser superado devido à dificuldade de harmonizar os diferentes protocolos, além dos fatores como tempo de exposição e solução de crioprotetores.

Palavras-chave: Criopreservação, testículos, bovino.

ABSTRACT

The cryopreservation of bovine testicular tissue is a viable alternative for the reproductive potential preservation. In addition to storing tissue fragments containing a large number of germ cells, it allows the preservation of the niche around these cells, offering physical support

and mechanisms for the regulation of spermatogonial stem cells. This article aims to analyze the scientific productions related to the protocols for cryopreservation of bovine testicular tissue. It is an integrative literature review conducted in March 2023. The PICO strategy was used to formulate the guiding question: What is the scientific evidences available in the literature on the cryopreservation of bovine testicular tissue? The databases consulted were PubMed, Scopus, and Web of Science, using the descriptors cryopreservation, tissues, tissue, testis, testicle, and cattle. Articles available in full and without language and publication date restrictions were selected. In total, twelve articles were analyzed, with a publication highlight between the years 2015 and 2016, most of them were developed in China and published in the journal Cryobiology. It was observed that all research used the technique of uncontrolled slow freezing. The Eagle's Modified Medium supplemented with cryoprotectants, such as dimethyl sulfoxide, glycerol, and ethylene glycol, was more commonly used for cryopreservation. Regarding the size of the fragments, they varied from 1 - 2 mm to 0.3 - 0.5cm³. The standardization of cryopreservation protocols for bovine testicular tissue remains a challenge to be overcome due to the difficulty of harmonizing the different protocols, in addition to factors such as exposure time and cryoprotectant solution.

Keywords: Cryopreservation, testicles, bovine.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido testicular (CTT) bovino é a principal estratégia de preservação de gamoplasma de gado de alta qualidade e valor econômico ou ameaçados de extinção (LI et al., 2018; ZHU et al., 2021). Ela permite a formação de bancos genéticos (CHICAIZA-CABEZAS et al., 2023), além de oferecer a base teórica para o estudo dos mecanismos da espermatogênese (CAI et al., 2016; ZHU et al., 2021), bem como o desenvolvimento de técnicas que podem ser extrapoladas para o tratamento da infertilidade em seres humanos (LI et al., 2018; CHICAIZA-CABEZAS et al., 2023).

O tecido testicular bovino pode ser criopreservado de duas maneiras: a congelamento lenta ou a vitrificação. A congelamento lenta baseia-se na redução gradual da temperatura, associada a baixas concentrações de crioprotetores, porém, não é capaz de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (GROTTER et al., 2019). Esse método, pode ser realizado através de dois sistemas: o não controlado, que é caracterizado pela redução da temperatura (-1° C/min) utilizando um dispositivo chamado *Mr. Frosty*; ou o controlado, no qual a temperatura é reduzida mediante a um programa já pré-estabelecido com o uso de um freezer programável (LIERMAN et al., 2021). Este método apresenta a vantagem de ser menos tóxico para as

células, pois requer baixas concentrações de crioprotetores (CARVALHO et al., 2011; SILVA et al., 2019).

Com relação à vitrificação, é um método de criopreservação rápido, baseado no uso de taxas rápidas de resfriamento e altas concentrações de crioprotetores (CARVALHO et al., 2011; SILVA et al., 2019). Este método evita a formação de cristais de gelo devido a desidratação tecidual ou celular, pelo uso de altas concentrações de crioprotetores e velocidade de resfriamento ultrarrápida, o que pode minimizar o risco de danos ou ruptura da membrana celular ou de organelas intracelulares (POELS et al., 2012; SHI et al., 2017).

Entretanto, atualmente, ainda não existe um protocolo padrão para a CTT bovino, devido à complexidade estrutural do testículo. O tecido testicular está funcionalmente organizado em duas regiões: porção tubular, responsável pela produção de gametas; e a porção intersticial (intertubular), responsável pela produção e liberação de hormônios, cruciais para a espermatogênese e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (SILBER et al., 2018).

No epitélio dos túbulos seminíferos, além de células-tronco espermatogoniais, o tecido testicular contém as células germinativas que dão origem aos espermatozoides, e as células de Sertoli, responsáveis por fatores essenciais, como suporte e nutrição, para a espermatogênese. No espaço peritubular, estão células mióides e células de Leydig, secretoras de testosterona. Cada compartimento possui arquitetura tecidual específica, diferentes tipos celulares e, portanto, diferentes graus de tolerância e vulnerabilidade a baixas temperaturas e pressão osmótica e ao processo de congelamento e descongelamento como um todo (ZHANG et al., 2017).

Assim, os protocolos de criopreservação devem buscar o ponto de equilíbrio, levando em consideração a preservação das células-tronco espermatogoniais e de todo o nicho em torno delas, bem como a restauração de sua função, seja *in vitro* ou *in vivo* (ZHU et al., 2021). Assim, esta revisão integrativa, visa identificar e analisar as produções científicas disponíveis na literatura, referentes aos protocolos de criopreservação de tecido testicular bovino, permitindo conhecer e compreender a situação atual sobre a preservação de tecido testicular nesta espécie.

DESENVOLVIMENTO

O presente estudo, trata-se de uma revisão integrativa de literatura sobre a CTT bovina e foi desenvolvido seguindo as etapas propostas por Melnyk e Fineout-Overholth (2022) a saber: definição da questão norteadora; definição dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos; seleção das bases de dados e busca das publicações; escolha e análise dos artigos; desenvolvimento da discussão e síntese da revisão.

A questão norteadora foi elaborada com base na estratégia PICO, um acrônimo em que a letra P (population) indica a população, a letra I (intervention) está relacionada à intervenção, C (comparison) diz respeito à comparação e a letra O (outcome) se refere aos desfechos esperados (METHLEY et al., 2014). Nesta revisão, a letra P = refere-se ao tecido testicular bovino; I = à criopreservação; C = não se aplica e O = às evidências disponíveis na literatura. Dessa forma, formulou-se a seguinte questão: Quais as evidências científicas disponíveis na literatura sobre a criopreservação de tecido testicular bovino?

A busca das publicações foi realizada nas bases PubMed, Scopus e Web of Science no mês de março de 2023, utilizando os descritores escolhidos mediante consulta aos Descritores Ciência da Saúde (DeCS) e Medical Subject Heading (MeSH): cryopreservation, tissues, tissue, testis, testicle, cattle. Os operadores booleanos, AND e OR, foram usados para combinar os descritores nas bases de dados. Os resultados das pesquisas foram exportados para plataforma Rayyan. Após a identificação de duplicatas, as publicações foram selecionadas a partir do título e resumo.

Como critérios de inclusão, foram considerados artigos disponíveis na íntegra que abordassem a temática em questão, sem restrições de idioma e data de publicação. Foram excluídos estudos de revisões. Todos os artigos selecionados foram analisados quanto a autoria, ano de publicação, título, objetivo, método de criopreservação utilizado e crioprotetores, principais resultados e considerações adicionais.

Resultados

Um total de 1.273 publicações foram identificadas nas bases de dados, sendo 663 na PubMed, 33 na Scopus e 577 na Web of Science. Desse número, 43 duplicatas, 36 foram selecionadas pelo título e resumo e 12 pela leitura do texto na íntegra, conforme a Fig. 01.

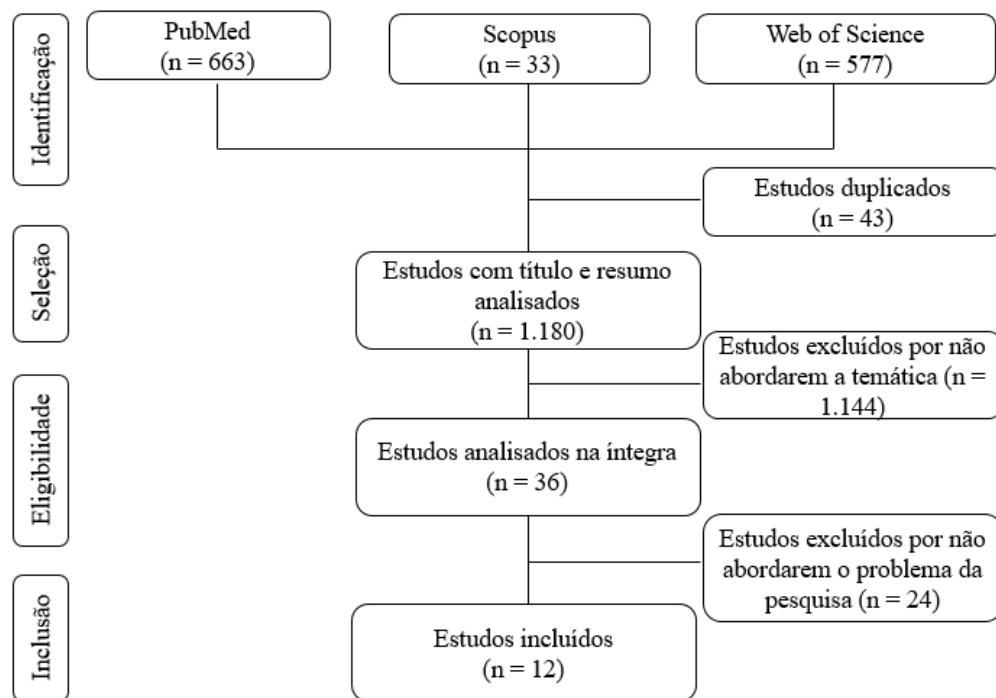


Figura 01: Fluxograma do processo de seleção dos estudos para revisão integrativa.

A Tab. 01, apresenta características dos estudos selecionados. Quanto ao ano de publicação, destaca-se que, entre 2015 e 2016, houve três e duas publicações, respectivamente. Em relação ao país, dez estudos eram provenientes da China. Sobre o periódico, cinco estudos estavam disponíveis na revista *Cryobiology* e três na *Andrologia*.

Tabela 01: Caracterização dos estudos primários quanto a autoria e ano de publicação, título, país e periódico.

Autoria/ano	Título do artigo	País	Periódico
Chicaiza-Cabezas <i>et al.</i> (2023)	<i>Germplasm cryopreservation in bulls: Effects of gonadal tissue type, cryoprotectant agent, and freezing-thawing rates on sperm quality parameters</i>	Equador	<i>Cryobiology</i>
Zhu <i>et al.</i> (2021)	<i>Survivable potential of germ cells after trehalose cryopreservation of bovine testicular tissues</i>	China	<i>Cryobiology</i>
Jiang <i>et al.</i> (2020)	<i>Cryopreservation of calf testicular tissues with knockout serum replacement</i>	China	<i>Cryobiology</i>
Li <i>et al.</i> (2018)	<i>Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue</i>	China	<i>Reproduction in Domestic Animals</i>
Zhang <i>et al.</i> (2017)	<i>Effects of various cryoprotectants on the quality of frozen-thawed immature bovine (Qinchuan cattle) calf testicular tissue</i>	China	<i>Andrologia</i>

Cai <i>et al.</i> (2016)	<i>Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue</i>	China	<i>Animal Reproduction Science</i>
Cai <i>et al.</i> (2016)	<i>Enrichment and in vitro features of the putative gonocytes from cryopreserved testicular tissue of neonatal bulls</i>	China	<i>Andrologia</i>
Zhang <i>et al.</i> (2015)	<i>Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue</i>	China	<i>Cryobiology</i>
Kim <i>et al.</i> (2015)	<i>Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing</i>	Coreia do Sul	<i>Cryobiology</i>
Hu <i>et al.</i> (2015)	<i>Effects of different cryoprotectants on the cryopreservation of cattle testicular tissue</i>	China	<i>Archives Animal Breeding</i>
Wu <i>et al.</i> (2014)	<i>Effect of newborn bovine serum on cryopreservation of adult bovine testicular tissue</i>	China	<i>Andrologia</i>
Wu <i>et al.</i> (2011)	<i>Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment</i>	China	<i>CryoLetters</i>

(Fonte: Elaborada pelos autores, 2024)

A Tab. 02, apresenta a síntese metodológica dos estudos selecionados. Sobre a idade dos animais, esta variou entre 1 dia a 4 anos. Em relação ao meio de criopreservação utilizado, oito estudos utilizaram o meio *Eagle Modificado por Dulbec* (DMEM). Quanto à técnica de criopreservação, todos os estudos foram desenvolvidos utilizando a técnica de congelamento lento não controlado. Sobre o tamanho do fragmento do tecido testicular e o tempo de conservação, observou-se estes variaram de 0,3cm³ a 2mm³ e de 7 dias a 1 ano, respectivamente.

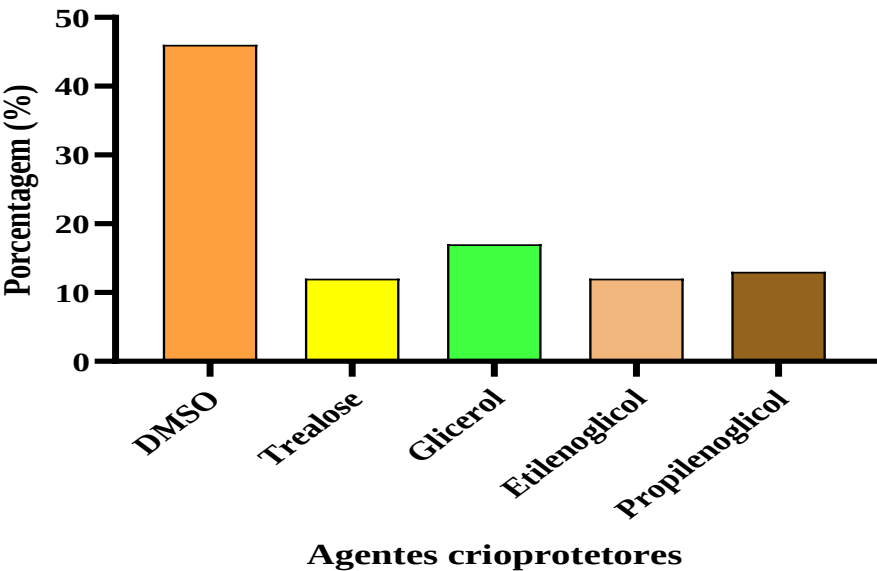
Tabela 02: Descrição dos estudos de acordo com idade, meio e técnica de criopreservação, tamanho de tecido e tempo de conservação.

Autoria/ ano	Idade	Meio de criopreservação	Técnica de criopreservação	Tamanho de tecido	Tempo de Armazenamento
Chicaiza-Cabezas <i>et al.</i> (2023)	3 anos	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lenta não controlada	0,5-1,0cm ³	7 dias
Zhu <i>et al.</i> (2021)	Adulto	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lenta não controlada	1–2mm ³	6 meses
Jiang <i>et al.</i> (2020)	1 dia	Meio Mínimo Essencial	Congelação lenta não controlada	0,3-0,5cm ³	1 mês
Li <i>et al.</i> (2018)	6 meses	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação rápida	1–2mm ³	7 dias
Zhang <i>et al.</i> (2017)	6 meses	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lenta não controlada	1–2mm ³	1 mês
Cai <i>et al.</i> (2016)	2 a 4 anos	Meio Mínimo Essencial	Congelação lenta não controlada	0,3–0,5cm ³	6 - 12 meses

Cai <i>et al.</i> (2016)	1 dia	Meio Mínimo Essencial	Congelação lenta não controlada	0,3–0,5cm ³	6 meses a 12meses
Zhang <i>et al.</i> (2015)	6 meses	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lenta não controlada	1–2mm ³	7 dias
Kim <i>et al.</i> (2015)	10 a 14 semanas	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lento não controlado	Não informado	1 mês
Hu <i>et al.</i> (2015)	8 meses	Eagle Modificado por Dulbec	Congelação lenta	1–2mm ³	Não informado
Wu <i>et al.</i> (2014)	2 a 4 anos	Meio Mínimo Essencial	Congelação lenta não controlada	0,3–0,5cm ³	12 meses
Wu <i>et al.</i> (2011)	2 a 4 anos	Meio Mínimo Essencial	Congelação lenta não controlada	0,3–0,5cm ³	Não informado

(Fonte: Elaborada pelos autores, 2024)

No que se refere aos crioprotetores, destacam-se o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) em onze estudos, glicerol em quatro estudos, e etilenoglicol, trealose e propilenoglicol em três estudos (Fig. 02).



(Fonte: Elaborada pelos autores, 2024)

Figura 02: Agentes crioprotetores identificados nos estudos avaliados.

As Tab. 03 e 04, descrevem os objetivos e principais resultados dos estudos selecionados. Sobre os objetivos, quatro estudos investigaram os efeitos de diferentes crioprotetores na criopreservação e duas pesquisas avaliaram os efeitos da adição de trealose ao meio de criopreservação de tecido testicular bovino.

Tabela 03: Descrição dos estudos primários quanto ao objetivo.

Autoria	Objetivo
Chicaiza-Cabezas <i>et al.</i> (2023)	Descrever os efeitos de protocolo de criopreservação lenta e não controlada em espermatozoides bovinos associados a tecidos testiculares ou epididimários.
Zhu <i>et al.</i> (2021)	Investigar se a suplementação de trealose ao meio de congelação reduz o dano tissular e melhora a qualidade das células testiculares nos tecidos testiculares bovinos criopreservados.
Jiang <i>et al.</i> (2020)	Examinar os efeitos de crioproteção do meio de congelamento contendo reposição de soro nocaute.
Li <i>et al.</i> (2018)	Investigar o efeito de diferentes crioprotetores no tecido testicular bovino em nível molecular.
Zhang <i>et al.</i> (2017)	Investigar os efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores na viabilidade celular, e na expressão de genes relacionados à espermatogênese em tecido testicular bovino criopreservado.
Cai <i>et al.</i> (2016)	Identificar as características biológicas de espermatogônias de tecido testicular bovino (contendo SSCs) adulto criopreservado, cultivadas em diferentes concentrações séricas variadas na presença ou ausência de células de Sertoli.
Cai <i>et al.</i> (2016)	Identificar as características biológicas <i>in vitro</i> dos supostos gonócitos de tecido testicular bovino neonatal criopreservado com base em nosso trabalho anterior.
Zhang <i>et al.</i> (2015)	Comparar o efeito da adição de diferentes concentrações de trealose (5, 10, 15, 20 e 25%) em meios criogênicos sobre a viabilidade celular e avaliar as principais atividades de enzimas antioxidantes em tecido testicular bovino congelado/descongelado.
Kim <i>et al.</i> (2015)	Desenvolver um protocolo de criopreservação eficiente para preservação de células-tronco espermatogoniais bovinas utilizando a técnica de congelamento lento.
Hu <i>et al.</i> (2015)	Investigar os efeitos de diferentes agentes crioprotetores em várias concentrações na criopreservação de tecido testicular de bezerro.
Wu <i>et al.</i> (2014)	Comparar os efeitos de diferentes concentrações de soro de bezerro recém-nascido sobre a criopreservação de tecido testicular bovino adulto e subsequente enriquecimento de Espermatogônias
Wu <i>et al.</i> (2011)	Comparar os efeitos do dimetilsulfóxido, propilenoglicol e etilenoglicol, em diferentes concentrações (5, 10, 15%), bem como as temperaturas de descongelamento (4, 37 e 97-100 °C) na criopreservação do tecido testicular bovino adulto.

(Fonte: Elaborada pelos autores, 2024)

Quanto aos principais resultados, os trabalhos mostraram que os tecidos criopreservados com 10% de DMSO apresentaram maior viabilidade celular. Os autores mencionam ainda a proteção da integridade estrutural e a continuidade da função celular, além da expressão dos genes CREM, Stra8 e HSP70-2, que são relacionados na ativação da espermatogênese no tecido testicular bovino. Os estudos concluíram que a suplementação de trealose ao meio de criopreservação apresentou maior porcentagem de viabilidade celular, atividade enzimática e antioxidante.

Tabela 04: Descrição dos estudos primários quanto aos principais resultados.

Autoria	Principais resultados
Chicaiza-Cabezas <i>et al.</i> (2023)	A criopreservação prejudicou a integridade da membrana e a motilidade espermática, mas não alterou a cromatina ou a morfologia. O DMSO melhorou a viabilidade celular e preservou a morfologia dos tecidos semelhante ao controle, assim como o processamento a 4 °C.
Zhu <i>et al.</i> (2021)	O meio de criopreservação contendo 10% DMSO, 10% de soro nocaute, 20% de trealose e 5% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) é capaz de proteger a integridade estrutural e a continuidade da função celular nos tecidos testiculares bovinos criopreservados.
Jiang <i>et al.</i> (2020)	As taxas de recuperação em todos os grupos contendo o soro nocaute foram significativamente maiores do que no grupo com adição de 10% de DMSO no meio de criopreservação, embora não houve diferença significativa entre os grupos com o soro nocaute e soro bovino fetal a 5%.
Li <i>et al.</i> (2018)	A combinação de 30mg/mL de albumina sérica bovina e 40mg/mL de trealose na criopreservação de tecidos testiculares bovinos elevou a viabilidade celular e a expressão dos genes OCT4, MGF, e C-KIT, superando outros grupos.
Zhang <i>et al.</i> (2017)	A criopreservação de tecido testicular bovino com DMSO a 10%, glicerol e etileno glicol maximizou a viabilidade celular e a expressão gênica essencial para a espermatogênese, com destaque para a eficácia do DMSO.
Cai <i>et al.</i> (2016)	A criopreservação manteve a integridade do tecido testicular bovino, preservando espermatogônias viáveis e a função das células de Sertoli, essenciais para a proliferação das espermatogônias <i>in vitro</i> .
Cai <i>et al.</i> (2016)	A criopreservação de tecidos testiculares de touros neonatos com 10% de DMSO e 2,5% de soro de vitelo mantém gonócitos com potencial e características semelhantes às de células-tronco espermatogoniais, expressando marcadores específicos a nível de mRNA e proteína <i>in vitro</i> .
Zhang <i>et al.</i> (2015)	A criopreservação do tecido testicular resultou em redução da viabilidade celular e da atividade antioxidante, com aumento do malondialdeído. No entanto, um meio com 15% de trealose foi o mais eficaz em manter a viabilidade e atividade antioxidante.
Kim <i>et al.</i> (2015)	A CTT bovino com 200mM de trealose melhorou a recuperação e proliferação de células germinativas, além de reduzir a apoptose em comparação ao grupo controle. Esse método favoreceu a formação de colônias dessas células em camundongos receptores após xenotransplante.
Hu <i>et al.</i> (2015)	Para a criopreservação testicular, 10% de DMSO foi o mais eficaz entre os crioprotetores testados, que também incluíram glicerol e sacarose a 10%, e propilenoglicol a 7,5%, em preservar viabilidade celular e produção de testosterona.
Wu <i>et al.</i> (2014)	A viabilidade celular foi superior a 80%, melhorando ligeiramente com mais soro de bezerro recém-nascido, até 20%. Células vivas aparecem brilhantes e agrupadas, enquanto as mortas mostram encolhimento ou condensação.
Wu <i>et al.</i> (2011)	A criopreservação de tecido testicular bovino com 10% de DMSO, PG, e EG aumentou a viabilidade celular, sendo o DMSO mais eficiente para preservar espermatogônias. Descongelar em banho-maria a 37 °C ou 97-100 °C mostrou melhores resultados, do que a 4 °C.

(Fonte: Elaborada pelos autores, 2024)

Com relação aos suplementos adicionados aos meios de criopreservação, a albumina sérica bovina é apontada, nos estudos analisados, como o suplemento mais apropriado para a criopreservação de tecido testicular bovino, pois aumenta significativamente a taxa de sobrevivência das células testiculares (LI *et al.*, 2018). O soro nocaute, um suplemento de reposição sérica composto por aminoácidos, vitaminas, antioxidantes, oligoelementos e proteínas, recebeu destaque. No entanto, não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao soro fetal bovino (JIANG *et al.*, 2020).

Um estudo observou que o processo de descongelamento do tecido testicular a 4 °C apresentou maior viabilidade celular (CHICAIZA-CABEZAS *et al.*, 2023) e outra pesquisa evidenciou que as células de tecidos descongelados entre 37 a 40 °C e 97 a 100 °C, apresentaram viabilidade semelhantes ao grupo controle e foram significativamente maiores do que as células de tecidos processados a 4 °C (WU *et al.*, 2011).

Os desafios da CTT estão no estabelecimento do protocolo ideal, devido à complexidade da arquitetura tecidual do testículo, com o epitélio seminífero contendo grupos de células com dimensões e funções específicas, e o tecido conjuntivo intersticial com suas células e matriz extracelular que conferem uma variação na tolerância a baixas temperaturas e pressão osmótica (ZHU *et al.*, 2021).

Esse conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de novos estudos relacionados à temática e a padronização de protocolo de criopreservação para uma obtenção futura de células/espermatozoides viáveis. Essas células poderão ser usadas na preservação do germoplasma animal, geração de bancos genéticos para espécies ameaçadas de extinção e desenvolvimento de técnicas de preservação da fertilidade em pacientes submetidos a tratamento gonadotóxico, como por exemplo, de quimio e radioterapia (CHICAIZA-CABEZAS *et al.*, 2023).

Quanto à técnica de criopreservação, o fato de todos os estudos utilizarem congelamento lento pode ser justificado, em parte, pela sua adoção generalizada na maioria dos laboratórios especializados em criopreservação de produtos biológicos (MUCCI *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-WALLBERG *et al.*, 2019). Também, esse achado revela que a CTT bovino é uma temática ainda pouco explorada. Dada a falta de estudos com a vitrificação, ainda não está claro qual técnica oferece melhor resultado após CTT bovino.

No que diz respeito ao meio *Eagle Modificado por Dulbecco* (DMEM), sua utilização na maioria dos estudos incluídos nesta revisão pode estar baseada no fato de proteger as células contra estresse citotóxico induzido pela adição de crioprotetores (SCHULTHEISS *et*

al., 2013), além de ser um meio amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de diferentes tipos celulares.

Quanto ao tamanho do fragmento testicular a ser removido e criopreservado, foi observado que os tecidos testiculares bovinos são frequentemente cortados em diversos tamanhos. Esse resultado destaca a ausência de um padrão definido para o tamanho utilizado na criopreservação e qual a sua influência na qualidade do tecido após os processos de resfriamento, aquecimento, cultivo *in vitro* ou transplante. No entanto, um estudo mostrou que pequenos fragmentos de tecido (0,5cm³) criopreservados com DMSO, apresentaram maior viabilidade após aquecimento do que em tamanhos maiores e morfologia semelhante ao grupo controle (CHICAIZA-CABEZAS *et al.*, 2023). Esse achado sugere que, nos fragmentos de tecido testicular de tamanho reduzido, os crioprotetores conseguem penetrar no tecido, minimizando os efeitos osmóticos e resultando na preservação da integridade funcional das células.

No presente trabalho, foi possível identificar que o DMSO é o crioprotetor mais utilizado para a CTT bovino. Isso provavelmente se deve à sua natureza hidrofílica e capacidade de modular a permeabilidade da membrana celular em diversos tipos de tecidos e células. De fato, o DMSO penetra facilmente a membrana celular e barreiras biológicas, facilitando seu uso como veículo para aumentar a permeabilidade e absorção de compostos biológicos (KARIM *et al.*, 2023). A permeabilidade aumentada da membrana aos solutos permite um equilíbrio osmótico rápido, mas controlado, entre o espaço intra e extracelular, prevenindo a cristalização intracelular do gelo (MOTMAN *et al.*, 2006). Além disso, o DMSO é amplamente utilizado em criopreservação de tecido de várias espécies, como búfalo (DEVI *et al.*, 2016), cordeiro (PUKAZHENTI *et al.*, 2015) e suínos (KANEKO *et al.*, 2013).

O uso de DMSO na CTT bovina parece proteger melhor a viabilidade celular. Hu *et al.* (2015) avaliaram os efeitos de diferentes crioprotetores em várias concentrações e observaram que 10% DMSO poderia efetivamente preservar a viabilidade celular e a restauração da produção de testosterona *in vitro*. Resultado similar foi encontrado por Wu *et al.* (2011), que relataram que o uso de 10% DMSO proporcionou um percentual significativamente maior de espermatogônias do que o processamento com 10% de PG e EG na mesma concentração, após plaqueamento diferencial. Essa eficácia pode ser atribuída a capacidade de DMSO de atravessar facilmente na membrana celular, substituindo as moléculas de água presentes no citoplasma da célula, o que contribui para a prevenção da formação de cristais de gelo (LI *et al.*, 2018).

Além disso, descobriu-se que o uso de DMSO associado a trealose é capaz de proteger a integridade estrutural e a continuidade da função celular nos tecidos testiculares bovinos criopreservados (ZHU *et al.*, 2021), bem como a produção de colônias de células germinativas derivadas de doadores após xenotransplante em testículos de camundongos receptores (KIM *et al.*, 2015). A trealose é um açúcar natural com função de proteção biológica, amplamente utilizada para a criopreservação de tecidos e células (LEE *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2015), atuando como um agente protetor extracelular (RAO *et al.*, 2015; STEWART *et al.*, 2018). A sua eficácia é frequentemente associada a diversas interações benéficas, incluindo a proteção de membranas lipídicas, a estabilização de proteínas sensíveis durante os estágios de congelamento e descongelamento, e a formação de uma matriz vítrea estável durante o resfriamento das células (NTAI *et al.*, 2018). Entretanto, a literatura aponta que sua utilização isolada não apresenta qualquer potencial crioprotetor significativo, devendo, portanto, ser empregada em combinação com outros crioprotetores (SCHEINKONIG *et al.*, 2004).

Outros crioprotetores identificados nos estudos revisados foram glicerol, EG e PG. Os efeitos desses crioprotetores na CTT bovina ainda suscitam contradições. Zhang *et al.* (2017) relataram que o uso de 10% de glicerol e EG preserva a viabilidade celular. Wu *et al.* (2011) observaram maiores viabilidades de células testiculares nos meios contendo PG e EG na concentração de 10%. Por outro lado, Hu *et al.* (2015) encontraram as concentrações ideais de 7,5% para glicerol e 10% para PG, no entanto, esses resultados contrastam com a pesquisa de Li *et al.* (2018), que observou efeitos negativos na expressão de RNAm de três genes relacionados às células-tronco espermatogoniais (SSC), octâmero-4 (*OCT4*), ligante KIT (*MGF/SCF*) e kit oncogene (*C-KIT*), em tecidos tratados com glicerol e EG. Esse fato aconteceu principalmente em concentrações superiores a 10% e além disso, os efeitos desses crioprotetores e DMSO no tecido testicular bovino durante a criopreservação não foram claramente compreendidos em nível molecular (ZHANG *et al.*, 2017).

A respeito da idade dos animais relatada nos estudos revisados, a presença de tecido testicular de bezerros, com apenas um dia de idade, destaca a importância da CTT, uma vez que, nesta condição, os animais não conseguem produzir ejaculação normal contendo espermatozoides (ZHANG *et al.*, 2017).

Esta revisão mostrou que o tecido testicular bovino pode ser criopreservado de sete dias até um ano, mantendo alto potencial proliferativo e características *in vitro* semelhantes as células-tronco espermatogoniais, além de expressar marcadores de gonócitos/células-tronco

espermatogoniais tanto no nível de RNAm quanto no nível de proteína durante o cultivo (CAI *et al.*, 2016).

Após criopreservação, o cultivo *in vitro* (CIV) pode permitir a retomada funcional das células, além de avaliar o sucesso do protocolo de criopreservação (YOKONISHI *et al.*, 2014). Em bovinos, existem poucos estudos empregando o CIV de longo prazo utilizando tecido testicular previamente criopreservado, no entanto, os estudos estão centrados em cultivo de curto prazo com a finalidade da restauração da viabilidade dos fragmentos imediatamente após descongelação. Assim, o cultivo após 24 horas em um sistema de interfase entre ar e meio, permitiu que o tecido mantenha a expressão de RNAm de genes CREM (relacionados com a tradução de sinais durante o ciclo espermatogênico), STRA8 (iniciação da meiose na espermatogênese) e HSP70-2 manutenção da conformação e estabilidade das proteínas) (ZHANG *et al.*, 2017).

Outra alternativa para a retomada do tecido testicular criopreservado é o isolamento de células tronco espermatogoniais, para posterior CIV. Para tanto, tecido testicular de bovinos pré-púberes foi criopreservado e posteriormente as células foram isoladas e cultivadas *in vitro*. Durante o cultivo, as colônias celulares descendentes de SSCs apareceram em tamanhos variados e expandiram-se dramaticamente no dia 7. As colônias obtidas a partir desses tecidos apresentam capacidade de proliferação, marcadores conservados da linha germinativa e características *in vitro* semelhantes a SSCs (CAI *et al.*, 2016). Além disso, o cultivo de SSCs criopreservadas e isoladas, co-cultivadas com células de Sertoli, expressou níveis altos de CD9, PLZF, fatores de sobrevivência e proliferação (CAI *et al.*, 2016).

Embora tenha sido realizada tentativas para isolar e cultivar as SSCs (SAHARE *et al.*, 2016), a expansão de SSCs de bovinos ainda é difícil. Além disso, ainda não está claro quais são as condições ideais para o cultivo visando o crescimento, proliferação e manutenção *in vitro*. As tecnologias relacionadas às SSCs levantaram novas possibilidades para gerar animais domésticos transgênicos de alta qualidade e alto rendimento usando células-tronco da linhagem germinativa masculina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de tecido testicular bovino tem sido discutida na literatura como estratégia para preservação de germoplasma de gado de alta qualidade e valor econômico ou ameaçados de extinção. Embora tenha sido relatado resultados promissores com a congelação lenta, os estudos analisados evidenciaram a necessidade de pesquisas que empreguem o método de vitrificação. Além disso, a padronização de protocolos para esta espécie, ainda permanece um desafio a ser superado devido à necessidade de ajustes nos diferentes protocolos empregados. Também da estrutura do tecido testicular que varia de acordo com a espécie e idade do animal, fatores como tempo de exposição, solução de criopreservação/crioprotetores ainda não foram bem estabelecidos.

REFERÊNCIAS

- CAI, H.; TANG, B.; WU, J.Y.; ZHAO, X.X.; WANG, Z.Z.; AN, X.L.; ZHANG, X.M. Enrichment and in vitro features of the putative gonocytes from cryopreserved testicular tissue of neonatal bulls. **Andrology**, v.4, n.6, p.1150-1158, 2016a.
- CAI, H.; WU, J.Y.; AN, X.L.; ZHAO, X.X.; WANG, Z.Z.; TANG, B.; ZHANG, X.M. Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. **Animal Reproduction Science**, v.166, p.109-115, 2016b.
- CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinária Brasília**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- CHICAIZA-CABEZAS, N.; GARCIA-HERREROS, M.; APONTE, P.M. Germplasm cryopreservation in bulls: Effects of gonadal tissue type, cryoprotectant agent, and freezing-thawing rates on sperm quality parameters. **Cryobiology**, v.110, p.24-35, 2023.
- DEVI, L.; MAKALA, H.; POTHANA, L.; NIRMALKAR, K.; GOEL, S. Comparative efficacies of six different media for cryopreservation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) calf testis. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, n.7, p.872–885, 2016.
- GRÖTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P.E.; KJELLAND, M.E.; FERRÉ, L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.4, p.655-665, 2019.
- HU, S.; ZHU, Q.C.; HAN, C.; ZHANG, X.G.; SONG, B.Y.; XIE, D.Q.; HU, J.H. Effects of different cryoprotectants on the cryopreservation of cattle testicular tissue. **Archives Animal Breeding**, v.58, n.2, p.433-439, 2015.

- JIANG, Y.; ZHU, W.Q.; ZHU, X.C.; CAI, N.N.; YANG, R.; CAI, H.; & ZHANG, X.M. Cryopreservation of calf testicular tissues with knockout serum replacement. **Cryobiology**, v. 92, p. 255-257, 2020.
- KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; TAMAS 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, n.7, p.e70989, 2013.
- KARIM, M.; BOIKESS, R.S.; SCHWARTZ, R.A.; COHEN, P.J. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. **Archives of Dermatological Research**, v.315, n.6, p.1465-1472, 2023.
- KIM, K.J.; LEE, Y.A.; KIM, B.J.; KIM, Y.H.; KIM, B.G.; KANG, H.G.; RYU, B.Y. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. **Cryobiology**, v.70, n.2, p.175-183, 2015.
- LEE, Y.A.; KIM, Y.H.; KIM, B.J.; KIM, B.G.; KIM, K.J.; AUH, J.H.; SCHMIDT, J.A.; RYU, B.Y. Cryopreservation in Trehalose Preserves Functional Capacity of Murine Spermatogonial Stem Cells. **PLOS ONE**, v.8, n.1, p.e54889, 2013.
- LIERMAN, S.; BUS, A.; ANDRIES, S.; TRIAS, E.; BOLS, P.E.J.; TILLEMANN, K. Passive slow freezing is an efficacious and cost-effective alternative to controlled slow freezing for ovarian tissue cryopreservation. **Cryobiology**, v.100, p.164-172, 2021.
- LI, H.; BIAN, Y.L.; SCHREURS, N.; ZHANG, X.G.; RAZA, S.H.A.; FANG, Q.; HU, J.H. Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.5, p.1211-1218, 2018.
- MELNYK, B.M.; FINEOUT-OVERHOLTH, E. **Evidence-Based Practice in Nursing & Healthcare**. 5. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2022.
- METHLEY, A.M.; CAMPBELL, S.; CHEW-GRAHAM, C., MCNALLY, R.; CHERAGHI-SOHI, S. PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. **BMC Health Services Research**, v.1, p. 1-10, 2014.
- MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1551-1562, 2006.
- NOTMAN, R.; NORO, M.; O'MALLEY, B.; ANWAR, J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.43, p.13982-13983, 2006.
- NTAI, A.; LA SPADA, A.; DE BLASIO, P.; BIUNNO, I. Trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v.31, p.102-112, 2018.

- POELS, J.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEHOUX, J.P.; 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, n.5, p.1008-1013, 2012.
- PUKAZHENTHI, B.S.; NAGASHIMA, J.; TRAVIS, A.J.; COSTA, G.M.; ESCOBAR, E.N.; FRANÇA, L.R.; WILDT, D.E. slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **PLOS ONE**, v.10, n.4, p.e0123957, 2015.
- RAO, W.; HUANG, H.; WANG, H.; ZHAO, S., Dumbleton, J.; ZHAO, G.; HE, X. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. **ACS applied materials & interfaces**, v.7, n.8, p.5017-5028, 2015.
- RODRIGUEZ-WALLBERG, K.A.; WATERSTONE, M.; ANASTÁCIO, A. Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction—An update. **Reproductive Biology**, v.19, n.2, p.119-126, 2019.
- SAHARE, M.; KIM, S.M.; OTOMO, A.; KOMATSU, K.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, n.12, p.2039-2050, 2016.
- SCHEINKÖNIG, C.; KAPPICHT, S.; KOLB, H.J.; SCHLEUNING, M. Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells. **Bone marrow transplantation**, v.34, n.6, p.531-536, 2004.
- SCHULTHEISS, M.; JANUSCHOWSKI, K.; RUSCHENBURG, H.; SCHRAMM, C.; SCHNICHEL, S.; SZURMAN, P.; SPITZER, M.S. Dulbecco's Modified Eagle Medium is neuroprotective when compared to standard vitrectomy irrigation solution. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.251, p.1613-1619, 2013.
- SHI, Q.; XIE, Y.; WANG, Y.; LI, S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.8538, 2017.
- SILBER, S.J.; DEROSA, M.; GOLDSMITH, S.; FAN, Y.; CASTLEMAN, L.; Melnick, J. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue: results from one center in the USA. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.35, p.2205-2213, 2018.
- SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.P.; PRAXEDES, E.C.G.; MOREIRA, S.S.J.; DE SOUZA, C.M.P.; DE OLIVEIRA, M.F. 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.
- STWART, S.; HE, X. "Intracellular delivery of trehalose for cell banking." **Langmuir**, v.35, n.23, p.7414-7422, 2018.
- WU, J.; HU, T.; GUO, B.; YUE, Z.; YANG, Z.; ZHANG, X. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment. **CryoLetters**, v.32, n.5, p.402-409, 2011.

WU, J.Y.; SUN, Y.X.; WANG, A.B.; CHE, G.Y.; HU, T.J.; & ZHANG, X.M. Effect of newborn bovine serum on cryopreservation of adult bovine testicular tissue. **Andrologia**, v. 46, n. 3, p. 308-312, 2014.

YOKONISHI, T.; SATO, T.; KOMEYA, M.; KATAGIRI, K.; KUBOTA, Y.; NAKABAYASHI, K.; OGAWA, T. Produção de descendentes com espermatozoides cultivados in vitro a partir de tecidos testiculares criopreservados. **Comunicações da natureza**, v.5, n.1, p.4320 2014.

ZHANG, X.G.; WANG, Y.H.; HAN, C.; HU, S.; WANG, L.Q.; & HU, J.H. Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 246-252, 2015.

ZHANG, X.G.; LI, H.; HU, J.H. Effects of various cryoprotectants on the quality of frozen-thawed immature bovine (Qinchuan cattle) calf testicular tissue. **Andrologia**, v.49, n.9, p.e12743, 2017.

ZHU, W.Q.; CAI, N.N.; JIANG, Y.; YANG, R.; SHI, J.Z.; ZHU, C.L.; ZHANG, X.M. Survivable potential of germ cells after trehalose cryopreservation of bovine testicular tissues. **Cryobiology**, v.101, p.105-114, 2021.

6.2 ARTIGO 2:

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO E CONGELAÇÃO LENTA NA PRESERVAÇÃO DO TECIDO TESTICULAR DE BOVINOS ADULTOS

Gabriela da Silva Carvalho Joaquim^a; Lucy Vanessa Sulca Ñaupas^b; Davide Carlos Joaquim^b; Rensson Homero Céliz Ygnácio^b; Francisco Denilson Rodrigues Gomes^b; Carmen Patricia Huayhua LLacho^b; Thamyres Rodrigues Damasceno^a; Gildas Mbemya Tetaping^b; Ricardo Borges Viana^a; Ana Paula Ribeiro Rodrigues^b; Ana Beatriz Graça Duarte^a.

^aCenter for Studies in Microscopy and Image Processing - NEMPI. Department of Morphology, School of Medicine, Fortaleza, CE, Brazil.

^bLaboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil.

*Corresponding author

Center for Studies in Microscopy and Image Processing - NEMPI. Department of Morphology, School of Medicine. Rua Delmiro de Farias, 1331, Porangabuçu, Fortaleza, CE, Brazil.

Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil. Av. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi. Fortaleza - CE - Brasil. CEP: 60740 903 Tel.: +55.85. 3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840.

E-mail address: beatrizgduarte@ufc.br

RESUMO:

O objetivo deste estudo foi estabelecer um método eficiente de criopreservação de fragmento testicular bovino. Para isso, foram utilizados 24 fragmentos de 1,0 cm³ obtidos de cinco pares de testículos e distribuídos aleatoriamente em diferentes tratamentos: Fragmentos de tecido testicular frescos ou controle (TTF), congelação lenta 1 (CL₁ - equilibrado a 4°C e -20°C por 2 horas), congelação lenta 2 (CL₂ - transferido diretamente para freezer a -80 °C), vitrificação 1 (Vit₁ - *ovarian tissue cryosystem* - OTC), vitrificação 2 (Vit₂ - Vitrificação em Superfície Sólida - SSV) e vitrificação 3 (Vit₃ - diretamente em criotubos). Após descongelação ou aquecimento, os fragmentos testiculares foram fixados e processados para análise morfológica (histologia), fibrose (picrosírius), proliferação celular e reparo do DNA. Os resultados morfológicos evidenciaram que o processo de criopreservação causou maiores danos ($p < 0,001$) em todos os tratamentos (CL₁, CL₂, Vit₁, Vit₂ e Vit₃) em comparação ao TTF. Quando comparados os tratamentos entre si, Vit₃ causou danos significativamente maiores em comparação a todos os demais tratamentos (CL₁ $p < 0,001$; CL₂ $p = 0,006$; Vit₁ $p = 0,010$; Vit₂ $p = 0,008$). Quanto ao diâmetro tubular, CL₂ ($p = 0,003$), Vit₁ ($p < 0,001$), Vit₂ ($p = 0,012$) e Vit₃ ($p < 0,001$) apresentaram menor tamanho em comparação ao TTF. O percentual de células imunomarcadas para o PCNA foi significativamente menor na CL₁ ($p < .001$) em comparação a CL₂ ($p < .001$), Vit₁ ($p < .001$) e Vit₂ ($p < .014$). Além disso, a Vit₂ e Vit₁ apresentaram redução significativa em relação a CL₂ ($p = 0,003$) e CL₂ ($p < .001$) e Vit₁ ($p < .004$), respectivamente. O percentual de fibras de colágeno tipo III foi significativamente menor na Vit₃ quando comparada ao TTF ($p = 0,005$), CL₁ ($p < .001$), CL₂ ($p < .001$), Vit₁ ($p = 0,001$) e Vit₂ ($p = 0,003$). Com isso, concluímos que, a vitrificação se mostrou igualmente eficaz aos protocolos de congelação lenta já estabelecidos na literatura para a criopreservação de tecido testicular bovino adulto. O dispositivo OTC e a técnica de SSV foram os mais eficientes para o armazenamento desse tipo de tecido.

Palavras-Chave: Criopreservação; testículo; congelação; vitrificação; espermatogônias.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido testicular é uma biotecnologia promissora para a preservação de material genético. Essa abordagem permite o armazenamento de um grande número de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo espermatogônias indiferenciadas (Patra; Pathak; Gupta, 2021). Além disso, facilita a preservação do microambiente ao redor dessas células, conhecido como nicho espermatogonial. Esse nicho oferece suporte físico e produz sinais que regulam tanto a auto-renovação quanto a diferenciação das espermatogônias, além de fornecer aporte nutricional e proteção essenciais durante o desenvolvimento celular (Pereira et al., 2023).

O tecido testicular bovino pode ser criopreservado por meio de congelação lenta ou vitrificação. Há vários protocolos desenvolvidos para ambas as técnicas. Por exemplo, a congelação lenta pode ser realizada com controle da taxa de resfriamento (congelação lenta

controlada) ou sem (congelação lenta não controlada). Esta última utiliza um pequeno dispositivo de resfriamento passivo, conhecido como *Mr. Frosty*, que atinge uma taxa de resfriamento de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (Lima et al., 2017; Lierman et al., 2021). Estudos anteriores relataram o sucesso na criopreservação de tecido testicular bovino com essa técnica de congelação lenta não controlada (Chicaiza-Cabeza et al., 2023; Zhu et al., 2021; Jiang et al., 2020). Contudo, esse método é demorado e apresenta limitações, como a formação de cristais de gelo intracelular, que resulta em alterações na morfologia e na ultraestrutura celular (Lima et al., 2017; Silva et al., 2020).

Por outro lado, a vitrificação surge como uma alternativa promissora à congelação lenta, oferecendo diversas vantagens. Esse método é rápido e, ao utilizar altas concentrações de crioprotetores e taxas de resfriamento ultrarrápidas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), reduz significativamente a formação de cristais de gelo (Lima et al., 2017; Carvalho et al., 2023). Além disso, a vitrificação é uma opção econômica que pode ser realizada fora do ambiente laboratorial, ampliando a acessibilidade no campo (Nikmahzar et al., 2023). Na última década, várias técnicas de vitrificação foram desenvolvidas, incluindo criotubos (Beck et al., 2020), o *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) (Carvalho et al., 2023) e vitrificação em superfície sólida (Amini et al., 2023). A vitrificação tem sido estudada como método de preservação de tecido testicular em diversas espécies domésticas, incluindo porcos (Abrishami et al., 2010), camundongos (Yamini et al., 2016), cães (Teixeira et al., 2021) e gatos (Carvalho et al., 2023), apresentando resultados promissores. No entanto, até o momento, ainda não está estabelecido um protocolo apropriado para a preservação do tecido testicular bovino.

Embora a literatura aponte que a vitrificação, ao impedir a formação de cristais de gelo, pode evitar lesões mecânicas e preservar a integridade morfológica dos tecidos de maneira mais eficaz do que a congelação lenta (Zhao et al., 2019), a eficácia desse método ainda é controversa em várias espécies, uma vez que as altas concentrações de crioprotetores utilizadas podem ser tóxicas para as células (Lima et al., 2017). Recentemente, uma pesquisa realizada em nosso laboratório observou-se aumento do espaçamento entre a membrana basal e as células do túbulo seminífero, além de picnose, desorganização e retração tubular em tecidos vitrificados (Gomes et al., 2023). Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes métodos de congelação lenta e vitrificação do tecido testicular bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Comitê de ética e substâncias químicas

Este estudo foi aprovado e realizado sob as diretrizes do Comitê de Ética para Uso Animal da Universidade Estadual do Ceará (Nº 31032.001406/2023-61).

Salvo indicação em contrário, todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), e os agentes crioprotetores [etilenoglicol (EG) e dimetilsulfóxido (DMSO)] foram obtidos da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil).

2.2. Origem e coleta dos testículos

Os 5 pares de testículos bovinos adultos sem padrão de raça definido (SPRD) foram obtidos de abatedouro privado (Garrote, Município Caucaia, Ceará, Brasil). No local, os testículos foram lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em solução fisiológica suplementada com 100 µg /mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, os testículos foram colocados dentro de recipientes e transportados para o Laboratório em solução fisiológica a 4 °C durante aproximadamente 1h (Chicaiza-Cabezas et al., 2023).

No laboratório, os testículos foram lavados em solução fisiológica (solução salina) três vezes para remover o restante de sangue. O epidídimo, túnica vaginal e albugínea foram removidos usando bisturi e pinça em superfície esterilizada (Li et al., 2018). O parênquima testicular foi cortado transversalmente e posteriormente fragmentado (1 cm³) (Wu et al., 2011; Chicaiza-Cabezas et al., 2023).

2.3. Desenho Experimental

Cinco pares de testículos bovinos adultos foram coletados e em seguida recuperados 24 fragmentos por cada par e divididos aleatoriamente em seis grupos: fresco (controle), congelação lenta 1 (CL1), congelação lenta 2 (CL2), vitrificação1- usando o dispositivo OTC (Vit1), vitrificação 2 - em superfície sólida (Vit 2) e vitrificação 3 - diretamente em criotubos (Vit 3). Após as fragmentações, o controle fresco foi somente fixado no fixador Bouin, enquanto os dois protocolos de congelação lenta foram colocados em criotubos, armazenados no dispositivo *Mr. Frosty* e em seguida armazenadas no botijão de nitrogênio líquido por uma semana. Já o método de vitrificação 1 foi armazenada em botijão de nitrogênio no dispositivo OTC, a vitrificação 2 e 3 foi armazenada no botijão em criotubos onde também permaneceram por uma semana. Após descongelação/aquecimento todo material foi fixado e

foram feitas as análises: Morfologia e morfometria - (Histologia); Fibrose (Picrosíríus); Proliferação e reparo do DNA (Imuno-histoquímica - PCNA e H2AX) (**Figura 1**).

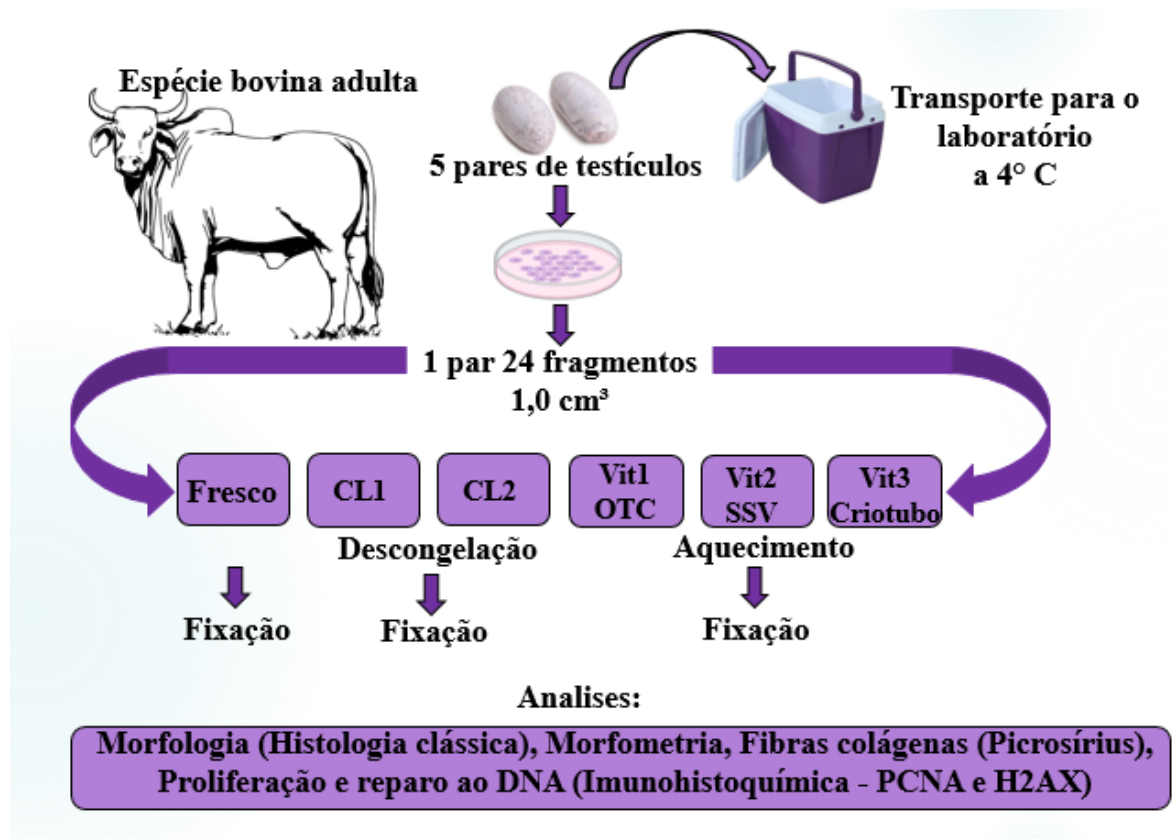


Figura 1. Imagem representativa do desenho experimental

2.4. Congelação lenta de tecido testicular bovino (Protocolos 1 e 2)

A congelação lenta 1 e 2 basearam-se nos estudos de Zhang et al. (2017) e Pukazhenti et al. (2015) respectivamente. Resumidamente, os fragmentos de tecido testicular bovino foram expostos por 10 minutos à solução de congelação Meio Essencial Mínimo (MEM) tamponado com HEPES, 20% soro fetal bovino (SFB) e 20 % dimetilsulfóxido (DMSO) em criotubo de 2,0 mL a temperatura ambiente (RT). Em seguida, os criotubos foram colocados em recipiente de congelamento Nalgene (*Mr. Frosty, Fisher Scientific*) com álcool isopropílico, onde a congelação lenta 1 foi equilibrada a 4°C e -20°C por 2 horas cada um, posteriormente foram transferidos ao freezer a -80 °C por 12 horas. Já a congelação lenta 2 foi transferida

diretamente para o freezer -80 °C por 12 horas. Por fim, os criotubos foram armazenados em botijão de nitrogênio líquido por 7 dias.

Para a descongelação, os criotubos foram removidos do nitrogênio líquido, mantidos em temperatura ambiente por 1 minuto. Os fragmentos da congelação lenta 1 foram imersos em banho-maria a 37 °C por 2 minutos, já os fragmentos da congelação lenta 2 foram ao banho-maria à 37 °C por 1 minuto. A cada criotubo foi adicionado 1,5 mL de MEM/HEPES, mantidos por 1 min a temperatura ambiente e em seguida os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri estéril (35 mm), lavados duas vezes em 5 mL de meio MEM/HEPES por 2 min para remoção do crioprotetor (Pukazhenti et al., 2015).

2.6. Vitrificação de tecido testicular bovino

Vitrificação 1- OTC: Para este protocolo de vitrificação foi utilizado uma metodologia proposta por Carvalho et al. (2013) utilizando-se um dispositivo de armazenamento desenvolvido para vitrificação de tecido ovariano, denominado *ovarian tissue cryosystem* (OTC). Os fragmentos de tecido testicular foram expostos a duas soluções de vitrificação (SV1 e SV2) por 4 e 1 min, respectivamente, dentro do próprio dispositivo. A solução de vitrificação 1 (SV1) foi constituída de MEM suplementado com 10 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25 M de sacarose (SAC), 10% EG e 10% de DMSO. A SV2 constituída do mesmo meio suplementado, mas com concentrações maiores dos mesmos crioprotetores (20% EG e 20% DMSO). Os fragmentos foram removidos da solução de vitrificação e o dispositivo OTC foi fechado e imerso em nitrogênio líquido (-196 °C) por 7 dias.

Vitrificação 2 - Superfície Sólida (SSV): Para o protocolo de vitrificação em superfície sólida, foi adotada uma metodologia previamente descrita por Silva et al. (2022) com algumas modificações. Os fragmentos de tecido testicular foram expostos a mesmas soluções de vitrificação, SV1 e SV2 utilizadas no protocolo de vitrificação com OTC. Seguidamente, os fragmentos foram colocados em gaze estéril para remoção do excesso de líquido e transferidos imediatamente a uma superfície de alta condutividade térmica, que constituíam de pequenos recipientes de alumínio em contato direto com nitrogênio líquido. Após 30 segundos, os fragmentos foram armazenados em criotubos em nitrogênio líquido.

Vitrificação 3 - criotubos: Para o procedimento de vitrificação convencional (diretamente em criotubos), foi adotada uma metodologia previamente descrita por Silva et al. (2021) com algumas modificações. Resumidamente, os fragmentos de tecido testicular foram expostos a duas soluções de vitrificação (SV) similar aos anteriores. Logo após, os tecidos

foram secados em gazes estéril e em seguida, foram transferidos para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido por 7 dias (uma semana).

Para o aquecimento, tanto os dispositivos OTCs quanto os criotubos foram aquecidos à temperatura ambiente (RT) por 30 segundos, em seguida, imerso em banho-maria a 37 °C por 1 min. Posteriormente os crioprotetores foram removidos utilizando três lavagens sucessivas, com duração de 5 minutos cada, em meio MEM contendo BSA (10 mg/mL) e concentrações decrescentes de sacarose (0,5; 0,25 e 0 M) (Carvalho et al., 2013).

2.9. Análise morfológica

Os fragmentos de tecido testicular frescos, congelados ou vitrificados foram descongelados/aquecidos e fixados em solução de Bouin por 4 horas, em seguida colocados no álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas, diafanizados e embebidos em parafina. Cada amostra foi cortada em seções de 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Um total de 15 túbulos seminíferos/fragmentos foram avaliados em microscópio óptico com aumento de 400X. Para avaliar a morfologia dos túbulos seminíferos, foram considerados os seguintes parâmetros: ruptura ou não da membrana celular, organização ou desorganização do epitélio seminífero, formação de espaços/vacúolos intercelulares (Gaps), condensação dos núcleos (núcleos picnóticos), perda celular e tamanho dos túbulos seminíferos. Para cada um desses parâmetros, foi utilizada uma escala de pontuação de 0 a 3, na qual 0 significa nenhuma alteração, 1 para alteração baixa, 2 para alteração média e 3 para alteração alta (Celiz et al., 2023). Os diâmetros dos túbulos seminíferos foram medidos usando o software *ImageJ v1.8.0*.

Tabela 1. Sistema de pontuação para scores de avaliação da integridade e das alterações estruturais dos túbulos seminíferos dos fragmentos de tecidos testiculares de bovinos.

Parâmetros nucleares	Parâmetros epiteliais	Escore
Condensação de núcleos, distinção dos núcleos	Aderência celular/integridade da membrana basal, perda celular	
	Sem alteração	0
	Pouca alteração (<40%)	1
	Parcialmente alterado (entre 40 - 80%)	2
	Completamente alterado (>80%)	3

Adaptado de De Michele et al. (2018)

2.10. Quantificação das fibras de colágeno tipo I e III - Picrosírius red -

Cortes testiculares foram corados pela coloração *Picrosirius red* (0,1%) com solução saturada de ácido pícrico (1,2%) por 40 min em temperatura ambiente. Os cortes foram analisados por microscopia polarizada com aumento de 100X, acoplada a um sistema de captura de imagens. Para avaliar a porcentagem de fibras, foram considerados 15 campos dos túbulos seminíferos. A medida do limiar RGB foi utilizada para obter a porcentagem de colágeno tipo I (fibras vermelhas) e colágeno do tipo III (fibras verdes) em cada imagem usando o *software ImageJ*.

2.11. Análise Imunohistoquímica

Os fragmentos testiculares de todas as condições experimentais foram fixados em paraformaldeído (PAF) a 4% por 12 horas e desidratados em uma série gradativa de etanol, clareados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em uma espessura de 5 µm. As seções foram montadas em lâminas carregadas positivamente e processadas para Imunohistoquímica para antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e reparo ao DNA (γ -H2AX). A recuperação do antígeno foi realizada incubando-se as lâminas em um tampão de recuperação de pH de proteína específico *Envision Flex Retrieval Solution* (Dako, Santa Clara, CA, EUA) por 30 minutos a 90 °C. Em seguida foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (*Envision flex peroxidase endógena* Dako) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com de tampão Washer buffer (Dako) e posteriormente incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho anti-PCNA (1:100; Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) e γ -H2AX (1:200; Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) Overnight. Em seguida as lâminas foram lavadas novamente e incubadas com *Envision HRP polímero* (Dako) 30 minutos (1:200; Abcam Inc.). Após essa etapa, as lâminas foram lavadas e seguidas para coloração com DAB, logo após foi feito a contra coloração com hematoxilina e solução de amônia a 0,5%. Seções processadas com a omissão do anticorpo primário foram consideradas como controles negativos para cada proteína investigada. Por fim, as lâminas foram fotografadas no aumento 40x e consideradas a intensidade da coloração marrom para PCNA e coloração roxa para γ -H2AX, ambas calculadas em 4 campos por lâmina para cada grupo experimental usando o *software NIS*. A imunocoloração foi avaliada qualitativamente, conforme descrito por Gomes et al. (2021).

2.13. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando *Jeffrey's Amazing Statistics Program* (JASP, versão 0.18.3.0, Holanda). Todos os parâmetros avaliados apresentaram distribuição

não Gaussiana (não normal) pelo teste de *Shapiro-Wilk*. O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparar os parâmetros entre os grupos controles (fresco), congelação lenta 1 e 2, vitrificação 1 usando o dispositivo - OTC, vitrificação 2 - SSV e vitrificação 3 - diretamente em criotubos. Quando aplicável, o *post hoc de Dunn* com correção de *Bonferroni* foi utilizado para identificar as diferenças entre pares. Os dados numéricos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IQR). Os dados categóricos foram apresentados como frequências absolutas e relativas (%). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Escore geral

Em geral, observou-se que o processo de criopreservação causou danos morfológicos significativamente maiores ($p < 0,001$) aos tecidos testiculares (TT) em todos os tratamentos (CL₁, CL₂, Vit₁, Vit₂ e Vit₃) em comparação ao TTF. Vale destacar que o Vit₃ foi o tratamento que causou danos significativamente maiores em comparação os demais tratamentos (CL₁ $p < 0,001$; CL₂ $p = 0,006$; Vit₁ $p = 0,010$; Vit₂ $p = 0,008$) (**Tabela 2**).

3.2. Escores individuais

3.2.1. Alterações do epitélio seminífero

Em relação à integridade da membrana basal dos túbulos seminíferos, todos os tratamentos (CL₁, CL₂, Vit₁, Vit₂ e Vit₃) apresentaram alterações morfológicas significativamente maiores ($p < 0,001$) em comparação ao TTF (**Figura 2A**). Quando os tratamentos foram comparados entre si, Vit₃ mostrou escores de membrana basal e de organização do epitélio significativamente maiores em comparação a todos os demais tratamentos ($P < 0,05$; **Figura 2F**). Além do Vit₃, o tratamento Vit₂ também demonstrou danos significativamente maiores ($p < 0,001$) em comparação ao TTF. Em relação aos gaps, Vit₁ exibiu danos significativamente maiores em comparação ao CL₁ ($p = 0,004$) e ao Vit₂ ($p = 0,009$). No que diz respeito à retração do epitélio dos túbulos seminíferos, os tratamentos CL₂, Vit₁ e Vit₃ mostraram um aumento significativo dos danos ($p < 0,001$; **Figura 2 C, D, F**) em comparação ao TTF. O tratamento Vit₃ também mostrou danos significativamente mais elevados ($p < 0,001$) em comparação a CL₂ e Vit₂ (**Tabela 1; Figura 2F**).

3.2.2. Aspectos celulares

Quanto aos núcleos picnóticos, todos os tratamentos apresentaram escores significativamente maiores em comparação ao TTF ($P < 0,05$). Em relação à perda de células epiteliais, o Vit₃ foi o único que apresentou aumento em relação ao controle e também quando comparado aos outros tratamentos CL₂, Vit₁, Vit₂ ($p < 0,05$) (**Tabela 1**).

Tabela 2. Pontuação dos parâmetros histomorfológicos de fragmentos de tecido testicular bovino fresco, congelado e vitrificado.

Item e grupos	Tecido testicular Fresco (TTF)	Congelação lenta 1 (CL ₁)	Congelação lenta 2 (CL ₂)	Vitrificação 1 - OTC (Vit ₁)	Vitrificação 2 - SSV (Vit ₂)	Vitrificação 3 - Criotubo (Vit ₃)	Teste de Kruskal-Wallis	
	Mediana [IIQ]	Mediana [IIQ]	Mediana [IIQ]	Mediana [IIQ]	Mediana [IIQ]	Mediana [IIQ]	H [5]	p-valor
Alterações no epitélio seminífero								
Membrana basal (0 – 3)	0 [0]	0 [1] ^a	0 [1] ^a	1 [1] ^a	1 [1] ^a	1 [2] ^{a,b,c,d,e}	76,737	<0,001
Organização do epitélio (0 – 3)	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [1] ^a	1 [1] ^{a,b,c,d,e}	72,391	<0,001
Espaços (gaps) entre as células do epitélio (0 – 3)	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0,5] ^b	0 [0] ^d	0 [0]	19,873	0,001
Retração do epitélio seminífero (0 – 3)	0 [0]	0 [0]	0 [1] ^a	0 [1] ^a	0 [0]	0 [3] ^{a,b,e}	65,831	<0,001
Aspectos celulares								
Núcleos picnóticos (0 – 3)	1 [1]	1 [0] ^a	1 [0] ^a	1 [0] ^a	1 [0] ^a	1 [0] ^a	53,599	<0,001
Perda de células epiteliais (0 – 3)	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	0 [0] ^{a,c,d,e}	15,570	0,008
Total (0 – 18)	1 [1]	1 [1] ^a	2 [3] ^a	2 [3] ^a	2 [2] ^a	4 [4] ^{a,b,c,d,e}	103,288	<0,001

IIQ: intervalo interquartil. H [5]: resultados da estatística Kruskal-Wallis com cinco graus de liberdade. **Nota:** O post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni foi utilizado para identificar as diferenças significantes entre os grupos. ^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo fresco. ^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo congelação lenta 1. ^cDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo congelação lenta 2. ^dDiferença estatisticamente significativa em relação a vitrificação 1 - OTC. ^eDiferença estatisticamente significativa em relação a vitrificação 2 - SSV. ^fDiferença estatisticamente significativa em relação a vitrificação 3 - criotubos.

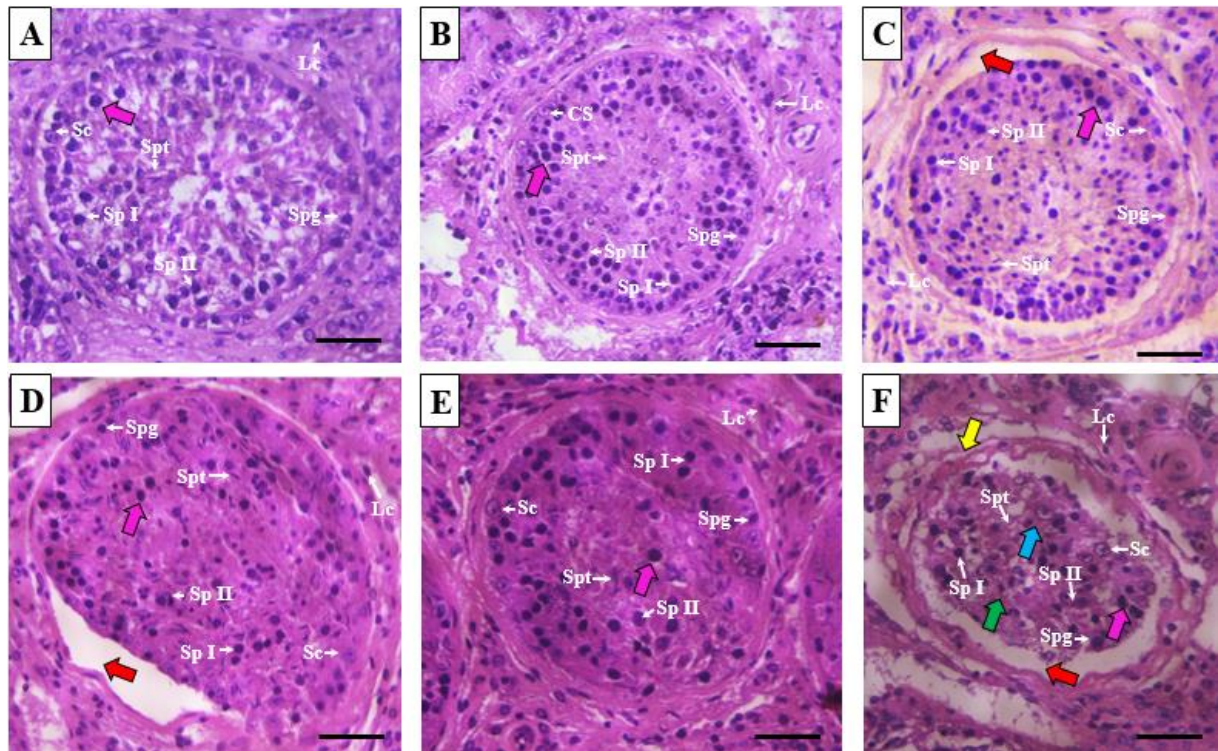


Figura 2. Micrografias representativas em lente de 40X de túbulos seminíferos de tecido testicular de bovinos adultos. Grupo controle não criopreservado (A), congelação lenta 1 (B), congelação lenta 2 (C), vitrificação 1 (D), vitrificação 2 (E) e vitrificação 3 (F). Na figura 2A, B, C, D, E e F, mostram as células indicadas por siglas com setas brancas das células que compõem os túbulos seminíferos de um mamífero adulto (CL= Células de Leydig; Spg = espermatogônias; CS = Células de Sertoli; Spt = espermatídes; Sp I = espermatídes I; Sp II = espermatídes II). Figura 2A, B, C, D, E e F, as setas rosas indicam os núcleos picnóticos dos túbulos seminíferos. Figura 2C, D, F, a seta vermelha indica retração do epitélio dos túbulos seminíferos. Em figura 2F, a seta amarela indica alterações da membrana basal, a seta azul indica desorganização de células epiteliais e a seta verde indica perdas de células epiteliais. Barra de escala: 50 µm.

3.3. Tamanho dos túbulos seminíferos

Em relação ao diâmetro dos túbulos seminíferos, todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa em relação ao TTF ($p < 0,05$). Vale destacar que não foram encontradas diferenças significativas no diâmetro tubular entre os métodos de vitrificação e congelação lenta ($p > 0,05$) (**Figura 3**).

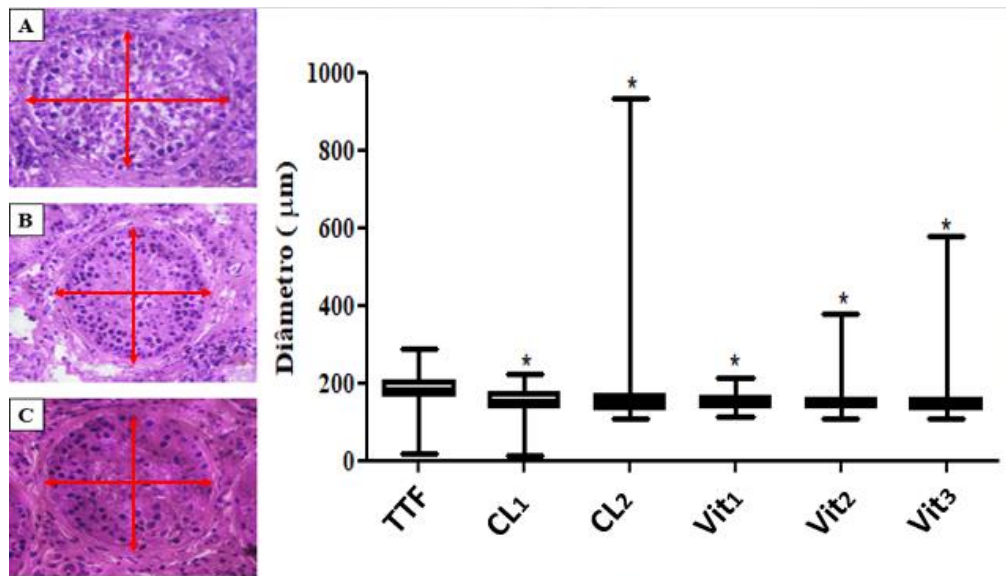
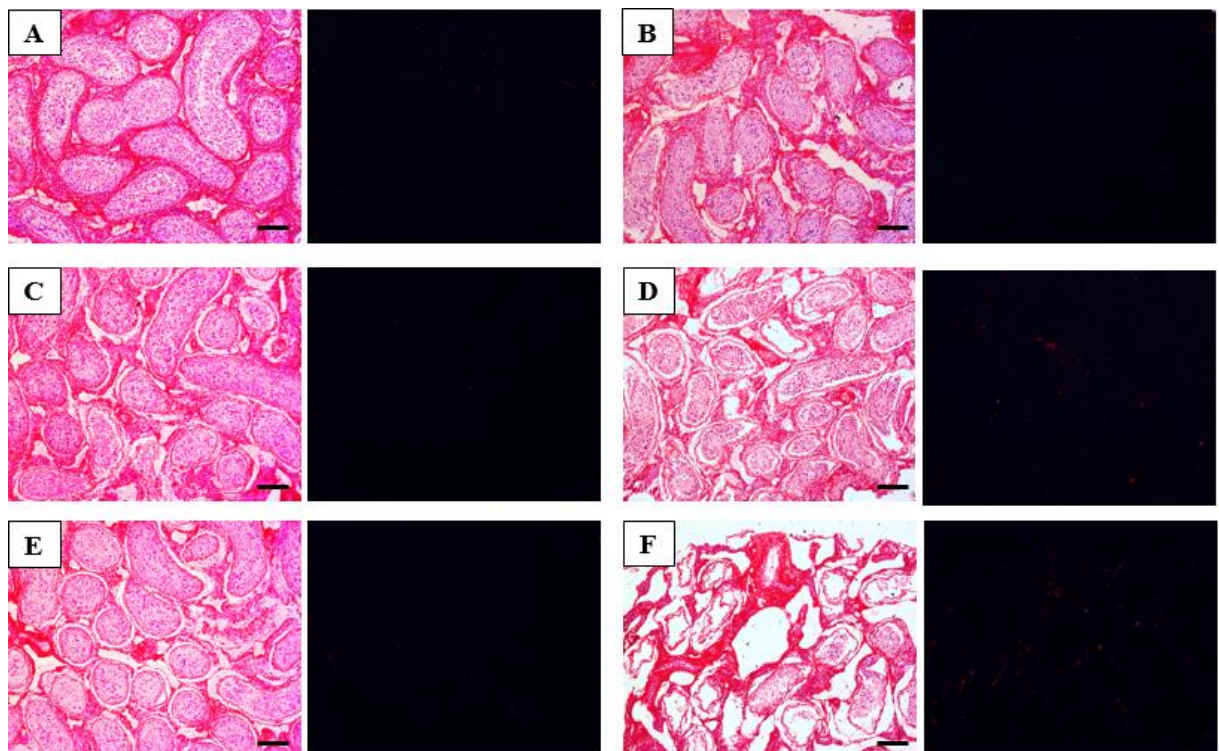


Figura 3. Diâmetro dos túbulos seminíferos de tecido testicular bovino adulto. Controle/ fresco, congelado e vitrificado (A, B, C) respectivamente. Na figura 3A, B e C, as setas vermelhas representam as medidas horizontais e verticais dos túbulos seminíferos. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao TTF ($p < 0.05$).

3.4. Quantificação de fibras de colágeno tipo I e III

Após a criopreservação, não houve alteração significativa no teor de fibras colágenas do tipo I em nenhum dos protocolos testados (TTF; $p > 0.05$). Por outro lado, a vitrificação em criotubos (Vit3) reduziu significativamente o teor de fibras colágenas do tipo III quando comparada aos demais tratamentos ($p < 0.05$) (**Figura 4**).



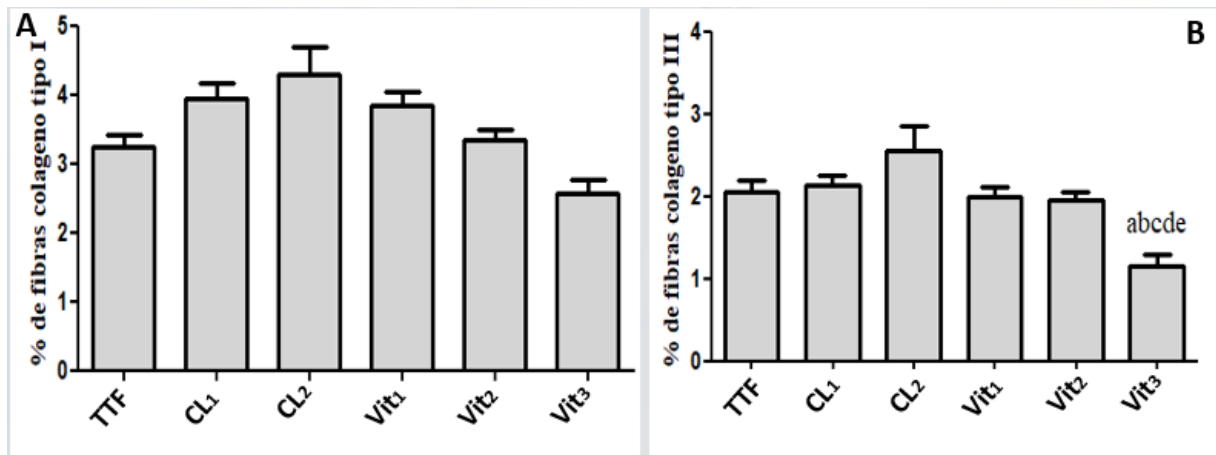


Figura 4 - Imagens representativas da coloração de *picrosirius red* nos TTF (A), CL₁ (B), CL₂ (C), Vit₁ (D), Vit₂ (E) e Vit₃ (F). Barra de escala: 50 μ m. Quantificação do colágeno tipo I (A) e III (B). ^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao TTF. ^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CL₂. ^cDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CL₂. ^dDiferença estatisticamente significativa em relação a Vit₁. ^eDiferença estatisticamente significativa em relação a Vit₂.

3.5. Marcação para o antígeno de proliferação nuclear (PCNA)

O potencial proliferativo de células do tecido testicular bovino foi avaliado pela quantificação de células PCNA-positivas. O tecido testicular fresco apresentou um percentual de 5% de células positivas para PCNA. Ainda assim, todos os tratamentos apresentaram uma redução significativa em comparação ao TTF ($p < 0,01$). Vale ressaltar que CL₁ foi o tratamento com menor percentual de proliferação celular em comparação aos demais ($p < 0,05$), exceto ao tratamento Vit₃ (**Figura 5**).

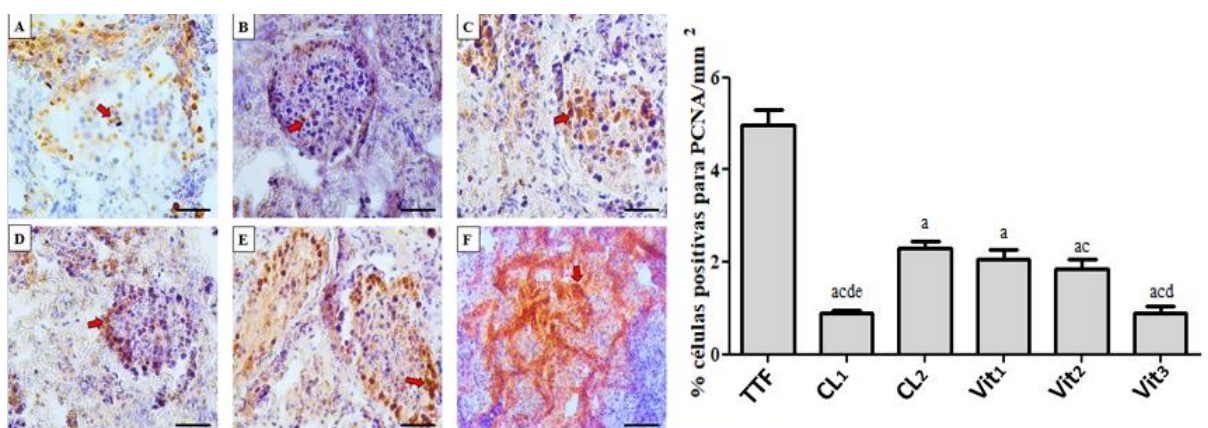


Figura 5 - Quantificação do potencial proliferativo avaliado pela imunomarcagem celular positiva de PCNA do fragmento testicular de bovinos adultos. Grupo controle não criopreservado (A), congelamento lento 1 (B), congelamento lento 2 (C), vitrificação 1 (D), vitrificação 2 (E) e vitrificação 3 (F). As setas vermelhas apontam as células marcadas. Barra de escala: 50 μ m. ^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao TTF. ^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CL₁. ^cDiferença estatística em relação ao grupo CL₂. ^dDiferença estatisticamente significativa em relação a Vit₁. ^eDiferença estatisticamente significativa em relação a Vit₂.

Quanto a H2AX, não foram observadas marcações positivas em nenhum dos tratamentos avaliados (**Figura 6**).

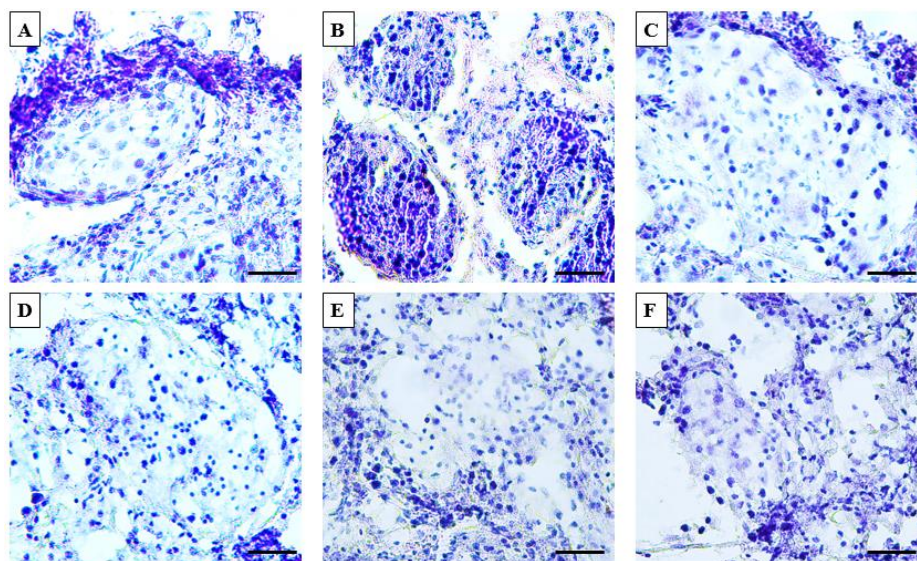


Figura 6 - Quantificação da imunomarcagem de H2AX no tecido testicular de bovinos adultos. A) Tecido testicular não criopreservado, B) congelação lenta 1, C) congelação lenta 2, vitrificação 1 D), vitrificação 2; E) vitrificação 3 (F). Barra de escala: 50 μ m.

4. DISCUSSÃO

Embora já tenham sido relatadas tentativas de criopreservação do tecido testicular bovino, o estado atual da arte ainda é limitado (Joaquim et al., 2024). Além disso, até o momento, as pesquisas têm se concentrado apenas no método de congelação lenta, com foco na comparação de diferentes concentrações de crioprotetores (Zhu et al., 2021; Zhang et al., 2017; Cai et al., 2016; Zhang et al., 2015; Kim et al., 2015), além de avaliar tamanhos de fragmentos e temperatura de descongelação (Chicaiza-Cabezas et al., 2023). No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que comparou a eficácia entre os métodos de congelação lenta e vitrificação e os dispositivos de armazenamento, na viabilidade do tecido testicular bovino adulto criopreservado.

Os dados morfológicos mostraram que os métodos de congelação e vitrificação não apresentaram diferenças significativas na preservação de parâmetros histomorfológicos gerais e na morfometria. Esses achados são consistentes com os resultados de Radaelli et al. (2017), Curaba et al. (2011) e Gouk et al. (2011), que apontaram a vitrificação como uma abordagem promissora, capaz de preservar, respectivamente, tecido testicular de ratos e camundongos pré-púberes com eficiência semelhante à do método de congelação lenta, porém de forma mais rápida e conveniente. No entanto, resultados divergentes foram relatados por Gomes et

al. (2023) e Pukazhenth et al. (2015), realizados com tecido testicular de caprinos pré-púberes e ovelhas neonatas, respectivamente, nos quais a vitrificação resultou em alterações significativamente mais acentuadas em comparação à congelação lenta. Essa discrepância pode ser atribuída a diversos fatores, como o tipo e a concentração de crioprotetores, o meio de preservação, a temperatura de descongelação e a espécie estudada (Cai et al., 2016; Peris-Frau et al., 2023). Além disso, os dispositivos de armazenamento de tecido e as técnicas de vitrificação também são elementos que podem explicar essa diferença.

Em nosso estudo, observou-se que tanto o dispositivo OTC quanto a técnica de SSV apresentaram resultados similares aos protocolos de congelação lenta já utilizados na literatura (Pukazhenti et al., 2015; Zhang et al., 2017), enquanto a vitrificação direta em criotubos parece não ser adequada para manutenção de parâmetros morfológicos como integridade da membrana basal e da organização do epitélio. Resultados semelhantes foram relatados em estudos com tecido testicular de gatos domésticos (Carvalho et al., 2023; Evangelista et al., 2020). Esses achados podem estar associados a vários fatores, dentre eles os dispositivos usados, tanto o OTC quanto o SSV apresentam alta condutividade térmica (Abrishami et al., 2010; Carvalho et al., 2013), o que permite que o material alcance a temperatura de vitrificação de forma mais rápida (Carvalho et al., 2013; Brandão et al., 2021). Além disso, o dispositivo OTC evita o contato direto do material biológico com o nitrogênio líquido, facilitando a adição e remoção da solução de vitrificação e minimizando os danos causados pela manipulação (Faustino et al., 2015). Acreditamos também que o método SSV elimina o isolamento criado pelas paredes plásticas dos criotubos entre o nitrogênio líquido e a solução de vitrificação, permitindo altas taxas de aquecimento devido à maior condutividade térmica do dispositivo (Xing et al., 2010).

Em relação às proteínas da matriz, observou-se que não houve diferença significativa na porcentagem de fibras de colágeno tipo I entre os tecidos frescos e criopreservados, independentemente do método empregado. Entretanto, o tecido vitrificado diretamente em criotubos (Vit₃) apresentou uma redução significativa na porcentagem de fibras de colágeno tipo III. Este resultado pode estar relacionado à lesão tecidual sem reparo adequado. Segundo Ruger et al. (2020), o estresse ou lesão tecidual sem um processo de reparo eficaz pode levar à diminuição do colágeno tipo III.

Em nosso estudo, realizamos a imunolocalização para o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) com o intuito de quantificar espermatogônias e espermátócitos primários em proliferação. Quanto ao potencial proliferativo, observou-se que tanto o método de

congelamento lento quanto o de vitrificação resultaram em uma redução na capacidade proliferativa do tecido testicular bovino adulto. No entanto, essa redução foi mais acentuada quando o tecido foi vitrificado diretamente em criotubos. Esses dados se correlacionam bem com os parâmetros histomorfológicos, confirmando que a vitrificação diretamente em criotubos não foi capaz de preservar adequadamente o tecido testicular bovino adulto, nem seus componentes celulares. A capacidade proliferativa de células testiculares pode ser avaliada através de PCNA, uma proteína nuclear de 35 kDa que desempenha um papel importante durante a replicação do DNA cromossômico como fator de processividade da enzima polimerase delta (Rives-Feraille et al., 2022). PCNA é considerado um marcador preditivo de sobrevivência e função celular; assim, sua expressão reduzida após a criopreservação pode ser um indicativo de degeneração celular resultante da crioinjúria (MILAZZO et al., 2010; RIVES-FERAILLE et al., 2022).

Por outro lado, é interessante notar que a imunomarcagem de H2AX não foi observada em todos os tratamentos/grupos. A H2AX é um componente crucial da cromatina, envolvido na resposta ao reparo do DNA. Sua fosforilação (γ H2AX) se acumula rapidamente nas regiões de cromatina próximas às quebras de fita dupla de DNA, sendo facilmente detectada nos núcleos celulares por meio de microscopia de imunofluorescência (Firsanov et al., 2011). Isso permite seu uso como um marcador quantitativo eficaz para identificar áreas de quebra de fita dupla de DNA (Redon et al., 2011).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a vitrificação se mostrou igualmente eficaz aos protocolos de congelamento lento já estabelecidos na literatura para a criopreservação de tecido testicular bovino adulto. O dispositivo OTC e a técnica de SSV apresentaram resultados equivalentes aos da congelamento lento. Além disso, este estudo revela, pela primeira vez, a viabilidade de preservar tecido testicular bovino adulto por meio desse método. Esses resultados são promissores para a aplicação prática em condições de campo, já que o método dispensa o uso de equipamentos programáveis e sofisticados.

7. 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, n. 1, p. 86-96, 2010.
- AMINI, M.; BENSON, J. D. Technologies for vitrification based cryopreservation. **Bioengineering**, v. 10, n. 5, p. 508, 2023.
- BECK, K.; SINGH, J.; DAR, M. A.; ANZAR, M. Angiogênese e desenvolvimento folicular em tecido ovariano de bovinos após vitrificação e cultura pós-aquecimento em membrana corioalantóide de frango. **Animal Reproduction Science**, v. 212, p. 106254, 2020.
- BRANDÃO, F. A. S.; ALVES, K. A.; DE BRITO, D. C. C.; PEREIRA, L. M. C.; DE MORAIS, G. B.; ÑAUPAS, L. V. S.; TEIXEIRA, D. Í. A. Vitrification of canine ovarian tissue using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) device. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 8, p. 1156-1161, 2021.
- CAI, H.; WU, J.Y.; AN, X.L.; ZHAO, X.X.; WANG, Z.Z.; 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.
- CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. 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, J. V. G. D.; SOARES, A. R.; LEÃO, D. L.; REIS, A. N.; SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P.; DOMINGUES, S. F. Effect of Different Vitrification Techniques on Viability and Apoptotic Index of Domestic Cat Testicular Tissue Cells. **Animals**, v. 13, n. 17, p. 2768, 2023.
- CHICAIZA-CABEZAS, N.; GARCIA-HERREROS, M.; APONTE, P. M. Germplasm cryopreservation in bulls: Effects of gonadal tissue type, cryoprotectant agent, and freezing-thawing rates on sperm quality parameters. **Cryobiology**, 2023.
- CURABA, M.; VERLEYSEN, M.; AMORIM, C. A.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCKT, A.; HOVATTA, O.; DONNEZ, J. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 4, p. 1229-1234. e1, 2011.
- EVANGELISTA, I. T. A.; DE CARVALHO, J. V. G.; TORRES, E. C. B.; DA CRUZ, R. E.; RODRIGUES, A. P. R.; DOMINGUES, S. F. S. Vitrification effects during morphological preservation of testicular tissue from domestic cat. 2020.
- FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; ROSSETO, R.; LOPES, C. A. P.; TILBURG, M. F.; CARNEIRO, P. B. M.; BÁO, S. N.; MOURA, A. A. A.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian córtex. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 27, p.440–448, 2015.
- FIRSANOV, D. V.; SOLOVJEVA, L. V.; SVETLOVA, M. P. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. **Clinical epigenetics**, v. 2, p. 283-297, 2011.

- GOMES, F. D. R.; ÑAUPAS, L. V. S.; PALOMINO, G. J. Q.; CELIZ, R. H. Y.; SÁ, N. A. R.; NOVAES, M. A. S.; RODRIGUES, A. P. R. Definição de protocolos para criopreservação e cultura tridimensional in vitro de tecido testicular de cabra pré-púbere após análise histomorfológica, ultraestrutural e funcional. **Theriogenology**, v. 211, p. 151-160, 2023.
- GOUK, S. S.; LOH, Y. F. J.; KUMAR, S. D.; WATSON, P. F.; KULESHOVA, L. L. 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.
- JIANG, Y.; ZHU, W. Q.; ZHU, X. C.; CAI, N. N.; YANG, R.; CAI, H.; ZHANG, X. M. Cryopreservation of calf testicular tissues with knockout serum replacement. **Cryobiology**, v. 92, p. 255-257, 2020.
- JOAQUIM, G. D. S. C.; YGNACIO, R. H. C.; TETAPIN, G. M.; RODRIGUES, A. P. R.; DUARTE, A. B. G. Criopreservação de tecido testicular bovino. **Ciência Animal**, v. 34, n. 2, p. 80 a 92-80 a 92, 2024.
- KIM, K. J.; LEE, Y. A.; KIM, B. J.; KIM, Y. H.; KIM, B. G.; KANG, H. G.; RYU, B. Y. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 175-183, 2015.
- LIERMAN, S et al. O congelamento lento passivo é uma alternativa eficaz e econômica ao congelamento lento controlado para criopreservação de tecido ovariano. **Criobiologia**, v. 100, p. 164-172, 2021.
- LIMA D.; SILVA T.; MORAIS G. B.; AQUINO-CORTEZ A.; EVANGELISTA J.; XAVIER JÚNIOR F.; VIANA DA, SILVA L. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reprod Domest Anim**, v.52, p.235–241, 2017.
- LIMA, D. B. C., & SILVA, L. D. M. D. Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. **Ciência Rural**, v. 47, p. e 20170135, 2017.
- LIMA, D. B. C., & SILVA, L. D. M. D. Vitrificação testicular de felinos pré-púberes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 42, p. 125-128, 2018.
- MILAZZO, J. P.; TRAVERS, A.; BIRONNEAU, A.; SAFSAF, A.; GRUEL, E.; ARNOULT, C.; RIVES, N. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. **Journal of andrology**, v. 31, n. 6, p. 617-630, 2010.
- NIKMAHZAR, A., KHADIVI, F., ABBASI, M., MAHDAVINEZHAD, F., ABBASI, Y., & DANESHI, E. Testicular tissue vitrification: a promising strategy for male fertility preservation. **Reproductive Sciences**, v. 30, n. 6, p. 1687-1700, 2023.
- PATRA, T., PATHAK, D., & GUPTA, M. K. Strategies for cryopreservation of testicular cells and tissues in cancer and genetic diseases. **Cell and tissue research**, v. 385, p. 1-19, 2021.
- PEREIRA, A. G., CAVALCANTE, Y. C. D. S., Martins, J. C. J., & Silva, A. R. Criopreservação e cultivo de tecido testicular em mamíferos-estado da arte, desafios e perspectivas. **Rev. bras. Reprod. Anim**, p. 544-553, 2023.
- 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, p. 1114695, 2023.

PUKAZHENTHI, B. S.; NAGASHIMA, J.; TRAVIS, A. J.; COSTA, G. M.; ESCOBAR, E. N.; FRANÇA, L. R.; WILDT, D. E. Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123957, 2015.

RADAELLI, M. R.; ALMODIN, C. G.; MINGUETTI-CÂMARA, V. C.; CERIAILLI, P. M. A.; NASSIF, A. E.; GONÇALVES, A. J. A comparison between a new vitrification protocol and the slow freezing method in the cryopreservation of prepubertal testicular tissue. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 188, 2017.

REDON, C. E.; NAKAMURA, A. J.; MARTIN, O. A.; PAREKH, P. R.; WEYEMI, U. S.; BONNER, W. M. Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 2, p. 168, 2011.

RIVES-FERAILLE, A.; LIARD, A.; BUBENHEIM, M.; BARBOTIN, A. L.; GISCARD D'ESTAING, S.; MIRALLIÉ, S.; RIVES, N. Assessment of the architecture and integrity of frozen-thawed testicular tissue from (pre) pubertal boys with cancer. **Andrology**, v. 10, n. 2, p. 279-290, 2022.

RUGER, B. M.; BUCHACHER, T.; DAUBER, E. M.; PASZTOREK, M.; UHRIN, P.; FISCHER, M. B.; LEITNER, G. C. De novo vessel formation through cross-talk of blood-derived cells and mesenchymal stromal cells in the absence of pre-existing vascular structures. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 602210, 2020.

SILVA, A. M. D., PEREIRA, A. F., COMIZZOLI, P., & SILVA, A. R. Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 3, p. 235-243, 2020.

TRAPPHOFF, TOM; DIETERLE, STEFAN. Criopreservação de Tecido Ovariano e Testicular e a Influência no Padrão Epigenético. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11061, 2023.

TEIXEIRA, D. O., OLIVEIRA, E. S., FERNANDES, J. S., PALOMINO, G. J. Q., TABOSA, B. E. A., BARBOSA, H. T. S., ... & SILVA, L. D. M. Histological evaluation of testicles from prepubertal dogs submitted to vitrification with different cryoprotectant associations. **Res. Soc. Dev**, v. 10, n. 348101623864, p. 10.33448, 2021.

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. G.; BEZERRA, L. G. P.; JERÔNIMO MOREIRA, S. S.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, M. F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Animals: an Open Access Journal from MDPI**, v. 12, n. 6, p. 738, 2022.

WU, J., HU, T., LIU, Y., JIN, B., CHE, G., GUO, B., ... & ZHANG, X. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue. In: **2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering**. IEEE, p. 8155-8158. 2011

XING, Weijie et al. Solid-surface vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 1-9, 2010.

YAMINI, N., POURMAND, G., AMIDI, F., SALEHNIA, M., NEJAD, N. A., & MOUGAHI, S. M. Developmental potential of vitrified mouse testicular tissue after ectopic transplantation. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 18, n. 1, p. 74, 2016.

ZHANG, X-G; LI, H.; HU, J.-H. Effects of various cryoprotectants on the quality of frozen–thawed immature bovine (Qinchuan cattle) calf testicular tissue. **Andrologia**, v. 49, n. 9, p. e12743, 2017.

ZHAO, Q., ZHANG, Y., SU, K., WANG, X. W., HAI, P. P., HAN, B., ... & GUO, R. X. Vitrification freezing of large ovarian tissue in the human body. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, p. 1-8, 2019.

ZHU, W. Q.; CAI, N. N.; JIANG, Y.; YANG, R.; SHI, J. Z.; ZHU, C. L.; ZHANG, X. M. Survivable potential of germ cells after trehalose cryopreservation of bovine testicular tissues. **Cryobiology**, v. 101, p. 105-114, 2021.

8. CONCLUSÃO

Na revisão integrativa da literatura sobre criopreservação do tecido testicular bovino, observou-se que, embora a técnica de congelação lenta apresente resultados promissores, ainda há necessidade de pesquisas adicionais que explorem o método de vitrificação. Além disso, a padronização de protocolos específicos para essa espécie continua sendo um desafio, exigindo adaptações aos diferentes métodos aplicados.

No estudo experimental, a vitrificação se mostrou igualmente eficaz aos protocolos de congelação lenta já estabelecidos na literatura para a criopreservação do tecido testicular bovino adulto. O dispositivo OTC e a técnica de SSV foram os mais eficientes para o armazenamento desse tipo de tecido. Esses resultados são promissores para aplicação prática em condições de campo, pois o método dispensa o uso de equipamentos programáveis e sofisticados.

9. PERSPECTIVAS

Os resultados positivos deste estudo, ao comparar os métodos de congelação lenta e vitrificação utilizando o dispositivo OTC e a técnica de SSV, representam uma contribuição significativa para o desenvolvimento de um protocolo viável de criopreservação do tecido testicular de bovinos. Contudo, são necessárias pesquisas futuras para avaliar a capacidade de restauração da função testicular e a maturação de espermatozoides por meio de sistemas de cultivo *in vitro* ou *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, p. 2145-2154, 2019.
- CAI, H.; WU, J.Y.; AN, X.L.; ZHAO, X.X.; WANG, Z.Z.; 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.
- CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R., SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R. 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, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- DE MICHELE, F.; POELS, J.; VERMEULEN, M.; AMBROISE, J.; GRUSON, D.; GUIOT, Y.; WYNS, C. Haploid Germ Cells Generated in Organotypic Culture of Testicular Tissue From Prepubertal Boys. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.
- EVANGELISTA, I. T. A.; DE CARVALHO, J. V. G.; TORRES, E. C. B.; DA CRUZ, R. E.; RODRIGUES, A. P. R.; DOMINGUES, S. F. S. Vitrification effects during morphological preservation of testicular tissue from domestic cat. 2020.
- FAYOMI, A. P. et al. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. **Science**, v. 363, n. 6433, p. 1314-1319, 2019.
- GOMES, F. D. R.; ÑAUPAS, L. V. S.; PALOMINO, G. J. Q.; CELIZ, R. H. Y.; SÁ, N. A. R.; NOVAES, M. A. S.; RODRIGUES, A. P. R. Definição de protocolos para criopreservação e cultura tridimensional in vitro de tecido testicular de cabra pré-púbere após análise histomorfológica, ultraestrutural e funcional. **Theriogenology**, v. 211, p. 151-160, 2023.
- GOOSSENS, E.; JAHNUKAINEN, K.; MITCHELL, R. T.; VAN PELT, A. M. M.; PENNING, G.; RIVES, N.; STUKENBORG, J. B. Fertility preservation in boys: recent developments and new insights. **Human reproduction open**, v. 2020, n. 3, p. hoaa016, 2020.
- GRÖTTER, L. G.; CATTANEO, L.; MARINI, P. E.; KJELLAND, M. E., & FERRÉ, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 4, p. 655-665, 2019.
- GUALTIERI, R.; KALTHUR, G.; BARBATO, V.; Di NARDO, M.; ADIGA, S. K.; TALEVI, R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 337, 2021.
- HERRAIZ, S.; NOVELLA-MAESTRE, E.; RODRÍGUEZ, B.; DÍAZ, C.; SÁNCHEZ-SERRANO, M.; MIRABET, V.; PELLICER, A. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 3, p. 775-784. e1, 2014.

HU, S.; ZHU, Q. C.; HAN, C.; ZHANG, X. G.; SONG, B. Y.; XIE, D. Q.; HU, J. H. Effects of different cryoprotectants on the cryopreservation of cattle testicular tissue. **Archives Animal Breeding**, v. 58, n. 2, p. 433-439, 2015.

JAHED, K. R., SAINI, A. K., & SHERIF, S. M. Coping with the cold: unveiling cryoprotectants, molecular signaling pathways, and strategies for cold stress resilience. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1246093, 2023.

JANG, T. H., PARK, S. C., YANG, J. H., KIM, J. Y., SEOK, J. H., PARK, U. S., ... & HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative medicine research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2017.

JIANG, Y.; ZHU, W. Q.; ZHU, X. C.; CAI, N. N.; YANG, R.; CAI, H.; ZHANG, X. M. Cryopreservation of calf testicular tissues with knockout serum replacement. **Cryobiology**, v. 92, p. 255-257, 2020.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica - texto e atlas. 13ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2019.

KABIRI, Doron et al. Establishment of a controlled slow freezing-based approach for experimental clinical cryopreservation of human prepubertal testicular tissues. **F&S Reports**, v. 3, n. 1, p. 47-56, 2022.

KANEKO, H. et al. 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, n. 7, p. e70989, 2013.

KANG, C., PUNJANI, N., LEE, R. K., LI, P. S., & GOLDSTEIN, M. Effect of varicoceles on spermatogenesis. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2022. p. 114-124.

KECK, Maike et al. Adipose tissue engineering: three different approaches to seed preadipocytes on a collagen-elastin matrix. **Annals of plastic surgery**, v. 67, n. 5, p. 484-488, 2011.

KIM, K. J.; LEE, Y. A.; KIM, B. J.; KIM, Y. H.; KIM, B. G.; KANG, H. G.; RYU, B. Y. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 175-183, 2015.

KULESHOVA, L. L.; GOUK, S. S.; HUTMACHER, D. W. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1585-1596, 2007.

KUMAR, A., PRASAD, J. K., SRIVASTAVA, N., & GHOSH, S. K. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Biopreservation and biobanking**, v. 17, n. 6, p. 603-612, 2019.

LI, H.; BIAN, Y. L.; SCHREURS, N.; ZHANG, X. G.; RAZA, S. H. A.; FANG, Q. ... & HU, J. H. Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 5, p. 1211-1218, 2018.

LIMA, D. B. C., & SILVA, L. D. M. D. Vitrificação testicular de felinos pré-púberes. Rev. Bras. **Reprod. Anim**, v. 42, p. 125-128, 2018.

LIMA, D. B. C., SILVA, T. F. P., MORAIS, G. B., AQUINO-CORTEZ, A., EVANGELISTA, J. S. A. M., XAVIER JÚNIOR, F. A. F., ... & SILVA, L. D. M. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 235-241, 2017.

MARTIN, LUC J. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 6, p. 470-487, 2016.

MAZUR, Peter. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MENDONÇA, K. A., FIGUEIREDO, J. R., de MELO SANTOS, L., DA SILVA, M. C., da CRUZ, D. M., DE FREITAS LIMA, R. C., ... & BRANCO, Y. N. T. C. C. Importância dos aspectos biométricos na seleção de reprodutores bovinos: revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 162, 2019.

MING, J. M., CHUA, M. E., LOPES, R.I.; MALONEY, A.M.; GUPTA, A. A e LORENZO, A. J. Criopreservação de tecido testicular em meninos pré-púberes e adolescentes com risco de infertilidade: um procedimento de baixo risco. **Revista de Urologia Pediátrica**, v.3, pág. 274. e1-274. e5, 2018.

MPHAPHATHI, M., LEDWABA, M., & THEMA, M. The Current Status of Semen and Oocytes Cryopreservation. In: **Cryopreservation-Applications and Challenges**. IntechOpen, 2023.

MURRAY, Kathryn A.; GIBSON, Matthew I. Chemical approaches to cryopreservation. **Nature Reviews Chemistry**, v. 6, n. 8, p. 579-593, 2022.

ÑAUPAS, L. V. S.; BRITO, D. C. C.; DE SOUZA, S. S.; BRANDÃO, F. A. S.; DA SILVA, R. F.; DA SILVA RAPOSO, R., ... & RODRIGUES, A. P. R. Alpha Lipoic Acid Supplementation Improves Ovarian Tissue Vitrification Outcome: An Alternative to Preserve the Ovarian Function of Morada Nova Ewe. **Reproductive Sciences**, p. 1-14, 2021.

O'DONNELL, L., SMITH, L. B., & REBOURCET, D. Sertoli cells as key drivers of testis function. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, p. 2-9. 2022.

O'DONNELL L.; STANTON P.; KRETZER D. M. Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. 2015.

OGAWA, T., OHMURA, M., OHBO, K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. **International journal of hematology**, v. 82, p. 381-388, 2005.

OLIVEIRA, Milena; FERNANDES, Thiago P.; SANTOS, Natanael A. **Câncer de mama: teoria e pesquisa**. Editora Dialética, 2023.

ONOFRE, J., BAERT, Y., FAES, K., & GOOSSENS, E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. **Human reproduction update**, v. 22, n. 6, p. 744-761, 2016.

PATRA, T., PATHAK, D., & GUPTA, M. K. Strategies for cryopreservation of testicular cells and tissues in cancer and genetic diseases. **Cell and tissue research**, v. 385, p. 1-19, 2021.

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.

PICTON, H. M., WYNS, C., ANDERSON, R. A., GOOSSENS, E., JAHNUKAINEN, K., KLIESCH, S., & SCHLATT, S. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. **Human reproduction**, v. 30, n. 11, p. 2463-2475, 2015.

PIÑA, Ricardo et al. Ten approaches that improve immunostaining: a review of the latest advances for the optimization of immunofluorescence. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1426, 2022.

POELS, J., VAN L. A.; DEHOUX, J.P, 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, n. 5, p. 1008-1013, 2012.

PORTELA, JM, Mulder, CL, van Daalen, SK, de Winter-Korver, CM, Stukenborg, JB, Repping, S., & van Pelt, AM. As linhagens importam: o sucesso da espermatogênese murina in vitro depende do background genético. **Developmental biology**, v. 456, n. 1, p. 25-30, 2019.

PUKAZHENTHI, B.S., NAGASHIMA, J., TRAVIS, A.J., COSTA, G.M., ESCOBAR, E.N., FRANÇA, L.R. AND WILDT, D.E. slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. **PLoS One**. 10 (4): e0123957, 2015.

RECCHIA, Kaiana et al. Actions and roles of FSH in germinative cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10110, 2021.

REY R.; JOSSO N.; RACINE C. Sexual differentiation. **Endotext** [Internet], 2020.

RITTIÉ, Laure. Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. **Fibrosis: methods and protocols**, p. 395-407, 2017.

RIVAS LEONEL, E. C., LUCCI, C. M., & AMORIM, C. A. Cryopreservation of human ovarian tissue: a review. **Transfusion medicine and hemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 173-181, 2019.

RUSSELL, Nicholas; GROSSMANN, Mathis. Mechanisms in endocrinology: estradiol as a male hormone. **European Journal of Endocrinology**, v. 181, n. 1, p. R23-R43, 2019.

RYAN, P. L.; HOFFMANN, F. G. Endocrine and exocrine function of the bovine testes. **Bovine Reproduction**, p. 11-31, 2021.

SANTOS NETTO, Alfredo dos et al. Avaliação das propriedades histológicas de enxertos meniscais humanos armazenados em banco de tecido. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 55, p. 778-782, 2021.

SHETTY, Gunapala et al. Postpubertal spermatogonial stem cell transplantation restores functional sperm production in rhesus monkeys irradiated before and after puberty. **Andrology**, v. 9, n. 5, p. 1603-1616, 2021.

SHI, Q., XIE, Y., WANG, Y., & LI, S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8538, 2017.

SHINOHARA, T., INOUE, K., OGONUKI, N., KANATSU-SHINOHARA, M., MIKI, H., NAKATA, K., ... & OGURA, A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. **Human reproduction**, v. 17, n. 12, p. 3039-3045, 2002.

SILVA, A. M. D., PEREIRA, A. F., COMIZZOLI, P., & SILVA, A. R. Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 3, p. 235-243, 2020.

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

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. G.; BEZERRA, L. G. P.; JERÔNIMO MOREIRA, S. S.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, M. F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Animals: an Open Access Journal from MDPI**, v. 12, n. 6, p. 738, 2022.

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. G.; MACEDO, L. B.; SOUZA-JUNIOR, J.; BEZERRA DE MOURA, C. E.; PEREIRA, A. F.; FRANCO DE OLIVEIRA, M.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. 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, A. M.; PEREIRA, A. G.; MACEDO, L. B.; SOUZA-JUNIOR, J.; BEZERRA DE MOURA, C. E.; PEREIRA, A. F.; FRANCO DE OLIVEIRA, M.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. 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, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; SILVA, C.M.G.; LOBO, C.H.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; TAVARES, L.M.T.; CAMPELO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Ascorbic acid improves the survival and in vitro growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim. Reprod.**, v. 8, p. 14–24, 2011.

SILVA, H. V. R., NUNES, T. G. P., RIBEIRO, L. R., DE FREITAS, L. A., DE OLIVEIRA, M. F., DE ASSIS NETO, A. C., ... & DA SILVA, L. D. M. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. **Animal reproduction science**, v. 203, p. 84-93, 2019.

SILVA, L. M., MBEMYA, G. T., GUERREIRO, D. D., BRITO, D. C. C., DONFACK, N. J., MORAIS, M. L. G., ... & RODRIGUES, A. P. R. Effect of catalase or alpha lipoic acid supplementation in the vitrification solution of ovine ovarian tissue. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 4, p. 258-269, 2018.

SIMONETTI, R. B. Efeito do quelante de zinco na resposta eletrofisiológica da testosterona e do decanoato de nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos. 2017.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v.12, p.27-35, 2018.

TRAMONTANO, Lucas. Os outros são os outros: percepções de homens usuários sobre os efeitos adversos da testosterona. **Saúde e Sociedade**, v. 31, p. e210116, 2021.

WANG, Y. Q., & CHEN, S. R. Selective deletion of WLS in peritubular myoid cells does not affect spermatogenesis or fertility in mice. 2018.

WASHBURN, R. L., HIBLER, T., THOMPSON, L. A., KAUR, G., & DUFOUR, J. M. Therapeutic application of Sertoli cells for treatment of various diseases. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, p. 10-23. 2022

WU, J. Y.; SUN, Y. X.; WANG, A. B.; CHE, G. Y.; HU, T. J.; & ZHANG, X. M. Effect of newborn bovine serum on cryopreservation of adult bovine testicular tissue. **Andrologia**, v. 46, n. 3, p. 308-312, 2014.

WU, J., HU, T., LIU, Y., JIN, B., CHE, G., GUO, B., ... & ZHANG, X. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue. In: **2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering**. IEEE, p. 8155-8158. 2011

XI H., REN F., ZHANG X., LI Y., ZHANG L., WEN F., FENG T., ZHANG X., NIU T., HU J., WANG P. Trehalose protects testicular tissue of dairy goat upon cryopreservation. **Reprod. Domest. Anim**, v.54, p.1552–1559, 2019.

YOUNIS, N., CALDEIRA-BRANT, A. L., CHU, T., ABDALLA, S., & ORWIG, K. E. Human immature testicular tissue organ culture: a step towards fertility preservation and restoration. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1242263, 2023.

YOKONISHI, T. et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 4320, 2014.

YONG, K. W., WAN SAFWANI, W. K. Z., XU, F., WAN ABAS, W. A. B., CHOI, J. R., & PINGGUAN-MURPHY, B. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. **Biopreservation and biobanking**, v. 13, n. 4, p. 231-239, 2015.

ZENG W., SNEDAKER A. K., MEGEE S., RATHI R., CHEN F., HONARAMOOZ A., DOBRINSKI, I. W. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. **Reprod Fertil Dev**, v.21, p.48-497, 2009.

ZHANG, B.; CAO, H. J.; LIN, H. M.; DENG, S. G.; & WU, H. Insights into ice-growth inhibition by trehalose and alginate oligosaccharides in peeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 278, p. 482-490, 2019.

ZHANG, X. G.; WANG, Y. H.; HAN, C.; HU, S.; WANG, L. Q.; HU, J. H. Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 246-252, 2015.

ZHANG, X-G; LI, H.; HU, J.-H. Effects of various cryoprotectants on the quality of frozen–thawed immature bovine (Qinchuan cattle) calf testicular tissue. **Andrologia**, v. 49, n. 9, p. e12743, 2017.

ZHU, W.Q.; CAI, N.N.; JIANG, Y.; YANG, R.; SHI, J.Z.; ZHU, C.L.; ZHANG, X.M. Survivable potential of germ cells after trehalose cryopreservation of bovine testicular tissues. **Cryobiology**, v.101, p.105-114, 2021.

ZIMIC, S., BAN-FRANGEZ, H., & STIMPFEL, M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 6, p. 4716-4734, 2023.

ZOMER, H. D., & REDDI, P. P. Characterization of rodent Sertoli cell primary cultures. **Molecular reproduction and development**, v. 87, n. 8, p. 857-870, 2020.