

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO

(Cryopreservation of bovine testicular tissue)

Gabriela da Silva Carvalho JOAQUIM^{1*}; Rensson Homero Céliz 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 congelamento 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 germoplasma 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 congelação lenta ou a vitrificação. A congelação 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 ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 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 bovina, 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 congelação e descongelação 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 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.

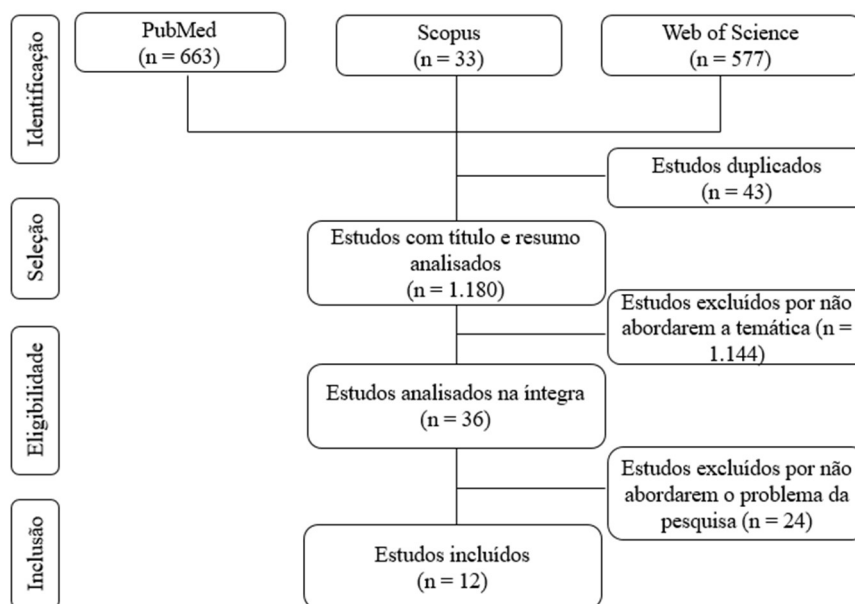


Figura 01: Fluxograma do processo de seleção dos estudos para revisão integrativa.

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)

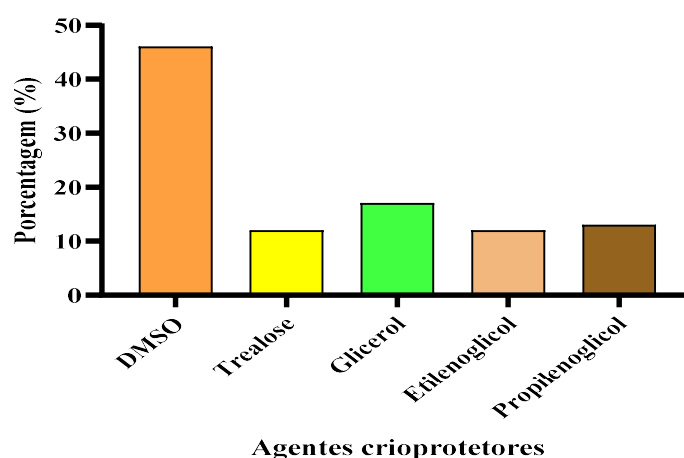
A Tab. 02, apresenta a síntese metodológica dos estudos selecionados. Sobre a idade dos animais, esta variou entre 1 dia a 4 anos. Em relação ao meio de criopreservação utilizado, oito estudos utilizaram o meio *Eagle Modificado por Dulbec* (DMEM). Quanto à técnica de criopreservação, todos os estudos 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 (NOTMAN *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 (KANECO *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 espermatozônias 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 e HE, 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.*, 2016a).

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.*, 2016b). 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.*, 2016b).

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. Vitriificação: 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.; SCHNICHELS, S.; SZURMAN, P.; SPITZER, M.S. Dulbecco's Modified Eagle Medium is neuroprotective when compared to standard vitrectomy irrigation solution. **Graefe's 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.

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.; 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.