

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Beatriz de Roig Gatto**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR PARA PACIENTES  
ONCOLÓGICOS PRÉ-PÚBERES**

**São Paulo**

**2023**

**Beatriz de Roig Gatto RA: SPGR 010592**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR PARA PACIENTES  
ONCOLÓGICOS PRÉ-PÚBERES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Renato Tesser, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo**

Gatto, Beatriz de Roig

Criopreservação de tecido testicular para pacientes oncológicos pré-púberes / Beatriz de Roig Gatto. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

23 p.

Orientação de Renato Borges Tesser.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Fertilidade 2. Oncologia 3. Puberdade 4. Reprodução 5. Vitriificação  
6. Xenoenxertos I. Tesser, Renato Borge II. Centro Universitário São  
Camilo III. Título

CDD: 618.178

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Sérgio e Ivone, que são o fruto das minhas oportunidades e exemplos de dedicação e motivação, as minhas irmãs, Vanessa e Karina, que sempre estiveram comigo em todas as trajetórias da vida me inspirando, e ao meu namorado Murillo, que foi capaz de me proporcionar apoio, serenidade e sorrisos diante dos altos e baixos da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Para a realização do presente trabalho de conclusão de curso me foi contemplado o apoio de diversas pessoas, dentre as quais agradeço imensamente.

Ao meu Prof. Dr. e orientador Renato Tesser, que através de seus conhecimentos me permitiu avançar com meus aprendizados, me proporcionando de sua mais sincera confiança. E a cada professor do Centro Universitário São Camilo que tive o prazer de desfrutar de seus conhecimentos durante minha graduação, todos em conjunto me permitiram a realização de um grande sonho formando a profissional que me tornarei ao concluir mais essa etapa de minha vida.

A minha família, por me permitirem viver cada momento desse ciclo, pela paciência e abraços calorosos recebidos quando me foi necessário. O processo de aprendizado exige uma rede de apoio capaz de nos trazer equilíbrio, e através de cada um deles pude garantir isso. E nesse contexto, ainda gostaria de expressar meu mais sincero suspiro de agradecimento a pessoas que não estão mais aqui comigo hoje, mas sonharam com esse momento tanto quanto eu, meus avós.

Aos meus grandes amigos Carolina Chiovatto, Gabriela Salvo, Gabrielle Muratori, Júlia Magalhães, Vitor Rossi e Wesley Salles pelo companheirismo em dividir desde os melhores aos mais desafiadores momentos que tornam a graduação uma fase de grandes aprendizados.

Aos profissionais maravilhosos que tive a oportunidade de conhecer e tanto aprender durante um longo ano no meu estágio na área de reprodução humana assistida, todos me garantiram bagagens e oportunidades suficientes para estar concluindo essa fase de minha vida.

E por último, mas jamais menos importante, a mim mesma, pela persistência e dedicação, pelo empenho e motivação, que mesmo com todos os desafios lançados, com fé, vim conquistando cada aprendizado.

## RESUMO

A Oncofertilidade surgiu em 2006, representando um avanço crucial na busca por opções de preservação da fertilidade em pacientes diagnosticados com câncer. Desde então, os estudos voltados para essa área da medicina, tem o intuito de aprimorar medidas que possam trazer benefícios a todos os pacientes que o necessitam. Meninos pré-púberes ainda enfrentam desafios em relação a preservação e manutenção de sua fertilidade e, portanto, a ciência vem se empenhando em diversos estudos com o uso de tecido testicular biopsiado. Através dessa técnica, é possível se criopreservar o fragmento até que seja possível sua utilização. Com isso, diversos estudos experimentais como xenoenxerto, enxerto autólogo, maturação in vitro e suspensão de células são avaliados. Dessa forma, o presente estudo buscou revisar as técnicas mencionadas com o uso de tecido testicular imaturo, avaliar protocolos envolvidos no seu congelamento e descongelamento, e ainda, verificar as barreiras que cercam o tema. Para tanto, foi realizado uma revisão de literatura nas plataformas de publicações científicas: Pubmed, Scielo e livros voltados a reprodução humana assistida, publicados entre os anos de 2010 a 2023. Por meio dos dados das pesquisas, foi possível verificar a importância da preservação de um tecido imaturo, demonstrando resultados promissores para futuro uso clínico. Os dados demonstraram ainda a importância por trás da vitrificação do fragmento biopsiado, mantendo a integridade do tecido para uso nas técnicas estudadas. Além disso, contrastou a importância de discussões interdisciplinares voltados às barreiras existentes na preservação da fertilidade em crianças.

**Palavras-chave:** vitrificação, congelamento, técnicas In Vitro, xenoenxerto, transplante autólogo, cultura de órgão, fertilidade, crianças, pré-puberdade, reprodução, oncologia, preservação da fertilidade, criopreservação de tecido testicular, espermatogonia-tronco.

## ABSTRACT

Oncofertility emerged in 2006, representing a crucial advancement in the search for fertility preservation options for patients diagnosed with cancer. Since then, studies in this field of medicine have aimed to enhance measures that can bring benefits to all patients in need. Pre-pubertal boys still face challenges regarding the preservation and maintenance of their fertility, and therefore, science has been dedicated to various studies involving the use of biopsied testicular tissue. Through this technique, it is possible to cryopreserve the tissue fragment until it can be used. As a result, various experimental studies, such as xenografting, autologous grafting, *in vitro* maturation, and cell suspension, are being evaluated. In this way, the present study aimed to review the mentioned techniques using immature testicular tissue, assess protocols involved in its freezing and thawing, and explore the barriers surrounding the topic. To do so, a literature review was conducted on scientific publication platforms: Pubmed, Scielo, and books related to assisted human reproduction, published between the years 2010 and 2023. Through the research data, it was possible to highlight the importance of preserving immature tissue, demonstrating promising results for future clinical use. The data also emphasized the significance of vitrifying the biopsied fragment to maintain tissue integrity for use in the studied techniques. Furthermore, it underscored the importance of interdisciplinary discussions regarding the barriers to fertility preservation in children.

**Keywords:** vitrification, freezing, In Vitro techniques, xenografting, autologous transplant, organ culture, fertility, children, pre-puberty, reproduction, oncology, fertility preservation, testicular tissue cryopreservation, stem spermatogony.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Surgimento de uma célula cancerosa .....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Espermatogênese .....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática comparando o túbulo seminífero em seção transversal de um testículo pré-púbere adulto .....	<b>7</b>
<b>Figura 4.</b> Biópsia testicular e fragmentação do tecido.....	<b>9</b>
<b>Figura 5.</b> Terapias experimentais atuais para a infertilidade masculina.....	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Comparação entre os métodos de congelamento lento e vitrificação.....	<b>14</b>
<b>Figura 7.</b> Barreiras à preservação da fertilidade em crianças oncológicas .....	<b>16</b>

## Sumário

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	5
2.1 Objetivos gerais.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. Metodologia.....	6
4. Desenvolvimento .....	7
4.1 Tecido testicular .....	7
4.2 Procedimento de criopreservação de tecido testicular e estudos voltados a sua utilização .....	8
4.2.1 Congelamento lento e vitrificação .....	13
4.2.2 Descongelamento ou aquecimento do tecido .....	15
4.3 Barreiras à preservação da infertilidade em crianças oncológicas .....	15
5. Conclusão .....	18
Referências Bibliográficas .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido testicular em pacientes oncológicos pré-púberes vem como uma forma de resguardo para a fertilidade de meninos recém diagnosticados com câncer, e que com isso, enfrentariam tratamentos caracterizados pelo seu papel tóxico de interrupção da divisão celular existentes no organismo, que tem como objetivo impedir o crescimento das células cancerosas (RAFAEL HENRIQUE MARQUES et al., 2022). Essa toxicidade acaba por afetar as células do corpo de forma sistêmica, ou seja, atingindo não somente as células cancerosas, mas também as sadias, e com isso afetando as células germinativas dessas crianças (ONCOGUIA, 2017).

Curiosamente, não somente os tratamentos contra o câncer são fatores de risco, mas também a própria doença por si só, caracterizada pela sua capacidade de afetar a fertilidade por múltiplos mecanismos, como por exemplo, causando danos ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadal - sistema de regulação hormonal, que faz o controle da produção e liberação de hormônios sexuais, importantes para a manutenção da gametogênese. O câncer pode causar danos a esse eixo se chegar as áreas do corpo relacionados a ele, ou através das células cancerosas que, ao adentrar na corrente sanguínea e vasos linfáticos podem se espalhar para todo o corpo, alcançando também o órgão reprodutor (BÎCĂ; SÂRBU; CIONGRADI, 2021) (ONCOGUIA, 2023).

Segundo INCA 2022, Instituto Nacional do Câncer, a cada 3 minutos uma criança morre de câncer, e a cada ano, mais de 400.000 crianças (entre 0 e 19 anos) são diagnosticados no mundo. No Brasil, são esperados 4.230 novos casos avaliados em meninos (“Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer”, 2022). Os cânceres infanto-juvenis acabam por se expressar de forma mais agressiva e se desenvolverem mais rapidamente se comparado aos adultos, por outro lado, esses pacientes vêm respondendo melhor aos tratamentos, aumentando a expectativa de cura e de perspectiva de vida (GINSBERG, 2010) (INCA, 2023).

Já sobre o câncer de testículo, estima-se que corresponda a 1% dos tumores masculinos em todo o mundo, sendo sua incidência caracterizada em idades reprodutivas, entre 15 e 50 anos (INCA, 2022). Segundo o ONCOGUIA 2018, os principais tipos de câncer no testículo, se desenvolvem em 90% dos casos nas células

germinativas. Há casos, como os de jovens com leucemia aguda, que as células malignas do câncer, podem alcançar os testículos, e conseqüentemente favorecerem a formação do tumor.

O câncer é uma doença que se resulta da expressão descontrolada de alguns genes, ou seja, o DNA da célula passa por uma intensa alteração, se multiplicando e compartilhando dessa informação desarmônica, resultando em células cancerosas. O processo da formação do câncer é denominado de carcinogênese ou oncogênese (INCA, 2022), (**figura 1**). Na infância, os tipos mais comuns de câncer são: leucemias, linfomas e tumores do SNC, e embora menos frequentes, também acometem crianças e adolescentes: neuroblastomas, tumor de Wilms, retinoblastoma, tumor germinativo, osteossarcoma e sarcomas (INCA, 2023).

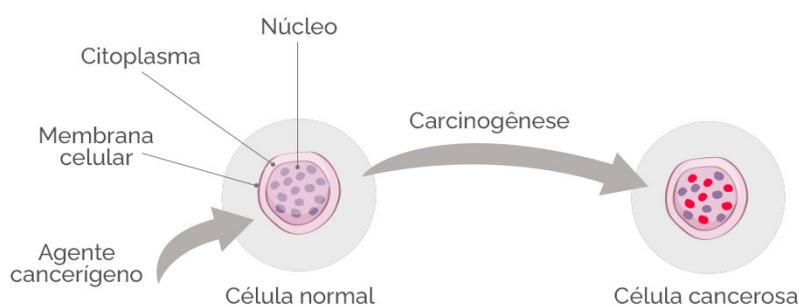


Figura 1. Surgimento de uma célula cancerosa. Figura representativa demonstrando uma célula normal que, através de agentes cancerígenos tendo a capacidade de fazer mutações genéticas, resultou em uma célula cancerosa. FONTE: (INCA, 2022).

O efeito gonadotóxico causado pelos tratamentos oncológicos podem implicar de forma negativa na fertilidade de jovens pré-púberes, interferindo no tecido trazendo futuros problemas ao processo de espermatogênese. Esse processo é fundamental para a formação dos gametas masculino, dando início a partir da puberdade sob estímulos hormonais (BÎCĂ; SÂRBU; CIONGRADI, 2021).

A espermatogênese (**Figura 2**) é fundamental para a produção de células reprodutoras viáveis e funcionais, permitindo a fertilização do oócito na reprodução sexual. Ocorrem basicamente três estágios principais no processo de formação dos gametas masculinos: o primeiro estágio é a mitose, onde as células germinativas primordiais, que foram formadas durante o desenvolvimento fetal, sofrem mitose, resultando em uma grande quantidade de células chamadas de espermatogônias.

Essas, são células-tronco localizadas nos túbulos seminíferos dos testículos, e que pós esse período de multiplicação por mitose, as espermatogônias passam pelo período de crescimento, e ao aumentarem de tamanho são denominados de espermatócitos primários (2N). O segundo estágio importante da espermatogênese, é a fase de maturação, onde os espermatócitos primários passam pela meiose I e dão origem a dois espermatócitos secundários (N), em seguida sofrem a ação da meiose II, dando origem as espermatídes (N). Por fim, o terceiro estágio da espermatogênese é denominado de espermiogênese, fase em que ocorre a diferenciação dessas espermatídes em espermatozoides maduros. Durante esse processo, ocorrem mudanças estruturais com a formação da cauda/flagelo, e a redução do citoplasma, resultando em células altamente especializadas e móveis, sendo liberados no lúmen. (SADLER, 2021).

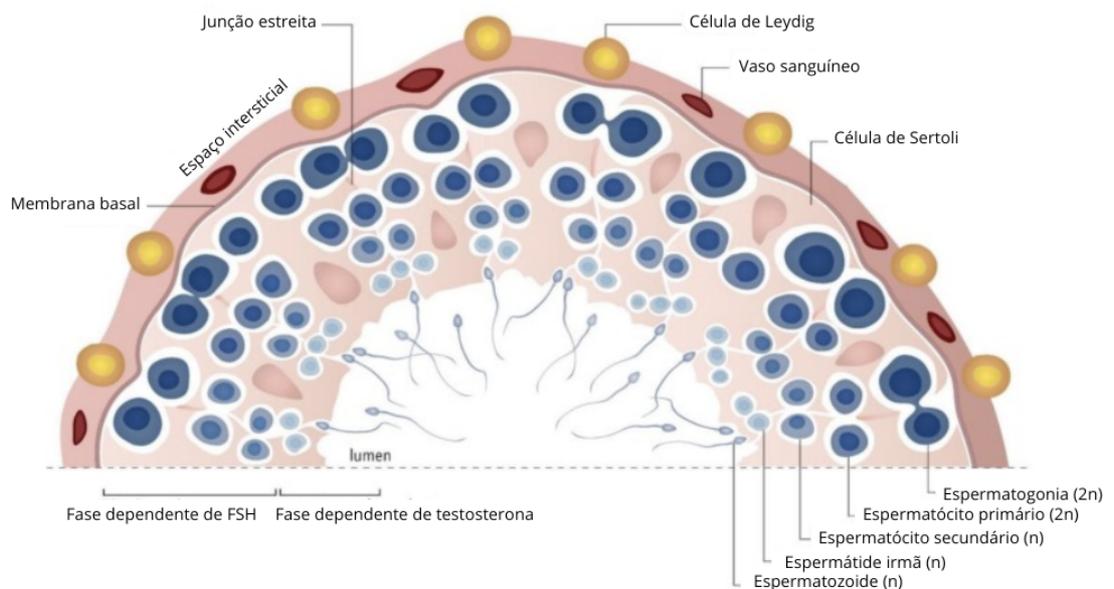


Figura 2. Espermatogênese. Figura representativa do processo de formação dos espermatozoides. FONTE: (ADAPTADO DE SANTI et al., 2022).

A preservação da fertilidade para pacientes que dispõe de seus gametas, já é uma realidade. A partir de 1960, a criopreservação de sêmen humano foi introduzida com a ideia de manter a conservação do material por tempo indeterminado servindo como importante ferramenta até os dias atuais para a preservação da fertilidade. Essa técnica consiste em conservar ao máximo a função e integridade dos espermatozoides para futura utilização na reprodução assistida. Entretanto, a ciência está em busca de melhores perspectivas para aqueles pacientes que ainda não

passaram pela puberdade, ou seja, ainda não dispõem dos gametas a serem preservados (AZAMBUJA, 2017).

Um estudo descreveu o desenvolvimento de uma estratégia farmacológica com potencial de proteção gonadotóxica, ou seja, uso de fármacos com eficácia em barrar os efeitos tóxicos das terapias contra câncer especialmente sobre as células germinativas, sendo uma abordagem preventiva e não invasiva, mas até o momento, essa estratégia não provou ser bem-sucedida (NTEMOU et al., 2019).

A criopreservação do tecido testicular, se trata de um procedimento com estratégias mais promissoras. Embora ainda em fases experimentais, é válido lembrar dos resultados animadores vindos de uma ideia parecida, o uso de tecido ovariano criopreservado, que hoje já é utilizado em fase clínica com protocolos validados (AZAMBUJA, 2017).

A preservação do tecido testicular através do seu congelamento tem como principal objetivo resguardar as células precursoras de espermatozoides, para isso, a técnica envolve o congelamento de pequenas porções de tecidos biológico extraídos através de uma biópsia antes ou em estágios iniciais do tratamento oncológico. O tecido biopsiado é dividido em pequenos fragmentos, onde uma parte será realizada uma análise morfológica e estudada para averiguar riscos de presença de células cancerosas no local, e o restante dos fragmentos são submetidos as técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  com o uso de crioprotetores para proteger o fragmento tecidual de possíveis criolesões. A realização da criopreservação de tecido testicular pode ser realizada pelo método de congelamento lento ou vitrificação (DHONNABHAIN; GETREU, 2021). Dada a crescente proporção do assunto, alguns estudos e experimentos foram feitos a fim de se investigar melhores formas de se utilizarem tecidos testiculares criopreservados para garantir a futura fertilidade de pacientes pré-púberes.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo geral

Revisar e descrever os conhecimentos atuais referente a criopreservação de tecido testicular para a aplicação em jovens pré-púberes oncológicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a viabilidade da criopreservação do tecido testicular e sua utilização;
- b) Descrever as técnicas envolvidas no congelamento e vitrificação do tecido testicular;
- c) Descrever as técnicas envolvidas no descongelamento do tecido testicular;
- d) Considerar as barreiras relacionadas a criopreservação de tecido testicular em pacientes pediátricos.

### 3. METODOLOGIA

Foi realizado uma revisão de literatura nas plataformas de publicações científicas: PubMed, Scielo e livros voltados a reprodução humana. Com isso, foram utilizadas as seguintes palavras chaves: “vitrification”, “freezing”, “In Vitro techniques”, “xenografting”, “autologous transplant”, “organ culture”, “fertility”, “children”, “pre-puberty”, “reproduction”, “oncology”, “fertility preservation”, “testicular tissue cryopreservation”, “stem spermatogony”.

Os artigos científicos utilizados para esse estudo foram dos anos de 2010 a 2023. Como critério de exclusão, foi descartado qualquer estudo que não destacasse a realização da criopreservação em pacientes oncológicos em fase pré-púbere ou, que não compreendesse a importância de tal técnica como alternativa para assegurar a capacidade reprodutora. Também não foram utilizados artigos que detalhassem cânceres específicos, uma vez que o estudo tem como relevância averiguar a técnica para estabilidade e conservação futura da fertilidade em pacientes juvenis.

## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.1 TECIDO TESTICULAR

O tecido testicular é composto por células-tronco com a capacidade de se diferenciarem em todos os tipos de células quando reimplantadas, incluindo células-tronco espermatogênicas, visando se transformarem em espermatozoides maduros no futuro (GALUPPO, 2015). O processo da gametogênese masculina é regulado pela capacidade de auto-renovação e diferenciação das células-tronco presentes nas espermatogônias, essa atividade ocorre de forma contínua amparada pela célula de Sertoli (CHEN; LIU, 2015).

Na pré-puberdade é possível perceber a ausência da espermatogênese, porém uma grande quantidade de células de Sertoli e Leydig imaturas, já após a puberdade, essas células se apresentam maduras e há a ocorrência da espermatogênese. É possível reconhecer também na seção pós-púbere, a formação dos “Blood- testis barrier” (BTB) – barreira hemato-testicular, que desempenha um papel crucial na espermatogênese, como demonstrado na **figura 3**.

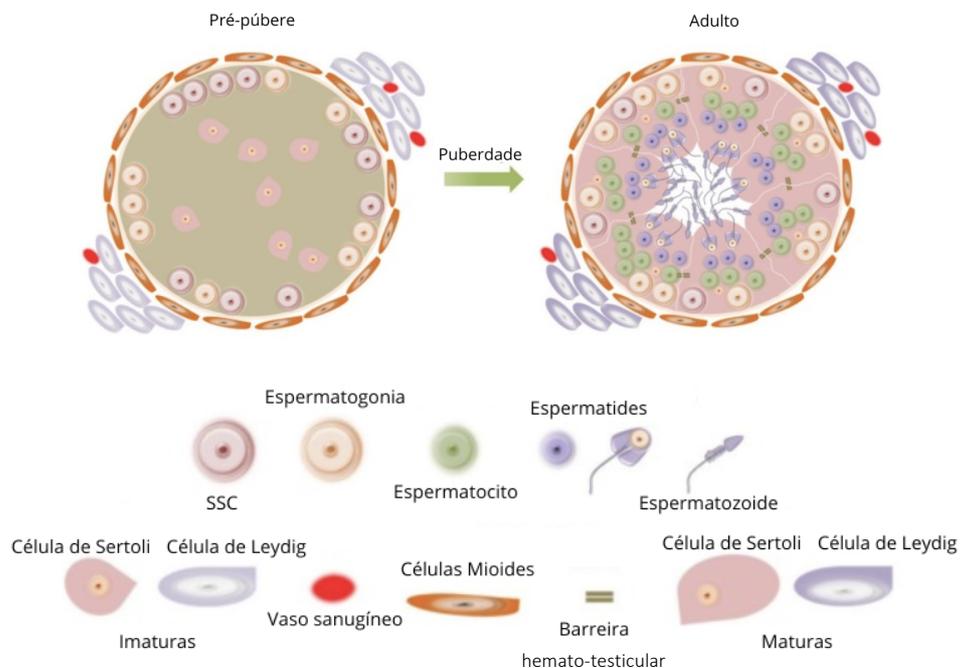


Figura 3. Representação esquemática de um túbulo seminífero em seção transversal de um testículo pré-púbere e adulto. Observe que o túbulo seminífero de um testículo pré-púbere é cercado de células ainda imaturas, e que a partir da puberdade elas se desenvolvem permitindo o processo de espermatogênese. FONTE: (ADAPTADO DE NTEMOU et al., 2019).

Nos testículos contém duas células de grande importância para o processo de espermatogênese, são elas as células de Sertoli e de Leydig. A célula de Sertoli, encontrada no interior dos túbulos seminíferos, tem papel de sustentação e proteção das células germinativas, papel indispensável para a nutrição, auxiliando no crescimento dos espermátócitos e das espermátides, produção de proteínas e hormônios que regulam o ambiente dentro dos túbulos seminíferos, e capacidade de exercer a função de fagocitar e eliminar algumas células defeituosas ou não funcionais durante a espermatogênese. Já a célula de Leydig, também conhecida como célula intersticial, localizado nos espaços intersticiais entre os túbulos seminíferos, desempenha papel fundamental na produção e secreção de hormônios sexuais masculinos, especialmente a testosterona, por isso, essa célula se torna mais evidente a partir da puberdade (UCHÔA; CARNEIRO, 2022). Preservar a integridade dessas células é extrema importância para avaliar a funcionalidade das terapias experimentais que diz respeito a proteção da fertilidade de pacientes que não possuem diretamente os gametas a serem preservados e utilizados para a reprodução assistida.

#### 4.2 PROCEDIMENTO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR E ESTUDOS VOLTADOS A SUA UTILIZAÇÃO

A criopreservação de tecido testicular vem se destacando muito pela necessidade de restauração da espermatogênese em meninos que enfrentaram doenças e tratamentos com altos efeitos tóxicos, tais como os tratamentos oncológicos (GALUPPO, 2015). Em humanos ainda não foi apresentado resultados relacionados a restauração da fertilidade bem-sucedida após a criopreservação do tecido testicular. Em animais, estudos e resultados foram e são utilizados com a intenção de discutir diferentes abordagens do uso desses tecidos criopreservados, outro ponto diz respeito da grande expectativa dos pesquisadores em utilizar das tecnologias experimentais baseadas em células-tronco ou tecido testicular para obter melhores resultados em testes em humanos, com isso, muitos centros de pesquisa em todo o mundo coletam tecidos testiculares biopsiados e os criopreservam para esse fim (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

Atualmente, se discute muito sobre diferentes estratégias para o armazenamento a longo prazo das células tronco espermatogoniais (SSCs), como a Suspensão Celular Testicular e Tecido Testicular Criopreservado. Ambas as técnicas são caracterizadas pela estratégia de armazenamento a longo prazo das células-tronco germinativas, as espermatogônias (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

O procedimento de criopreservação de tecido testicular requer de pequenos fragmentos do tecido biopsiado através de uma cirurgia consideravelmente invasiva, demonstrado na **figura 4**, que serão submetidos posteriormente as técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido com o uso de crioprotetores. Em A, é possível visualizar a primeira etapa para se realizar a criopreservação, onde o tecido testicular é biopsiado, e em seguida, esse tecido será fragmentado, ou seja, diminuído a porções de 6mm, como apontado em B (BAERT et al., 2018).

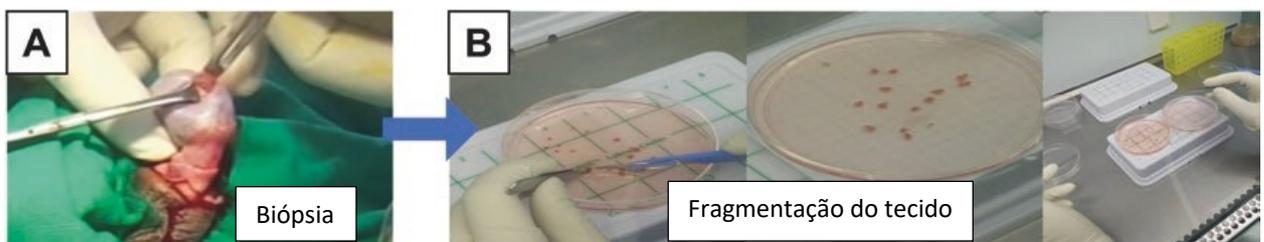


Figura 4. Biópsia testicular e fragmentação do tecido. **(A)**: Testículo sendo biopsiado. **(B)**: Tecido que foi biopsiado sendo fragmentado a porções de 6mm. FONTE: (ADAPTADO DE BAERT et al., 2018).

Após a coleta e fragmentação do tecido, para serem criopreservados, os fragmentos passarão pelos métodos de congelamento e armazenados em palhetas (para o método de congelamento lento) ou criotubos (para o método de vitrificação), etiquetados com todos os dados do paciente em questão, e acoplados a uma raque metálica, que também contém todos os dados do paciente. Posteriormente são armazenados dentro de botijões contendo nitrogênio líquido (PUKAZHENTHI et al., 2015).

Alguns estudos relatam a realização da criopreservação de tecido testicular pelo método de congelamento lento ou vitrificação, mas é importante ressaltar que não há uma padronização acordada até o momento para a realização do procedimento da criopreservação de um tecido testicular imaturo (DHONNABHAIN;

GETREU, 2021) (NIKMAHZAR et al., 2022). Já outro estudo apontou a análise do protocolo de vitrificação comparado ao método de congelamento lento afim de melhorar os resultados na criopreservação do tecido, visando ter menor índice de exposições e riscos de criolesões, e visando a viabilidade do procedimento. Apesar da necessidade de mais estudos para a confirmação dos resultados, o protocolo de vitrificação testado demonstrou que a integridade morfológica do tecido se manteve bem preservado (RADAELLI et al., 2017).

Importante ressaltar que, o método de congelamento lento é funcional para a criopreservação de tecido testicular, e normalmente é considerado o protocolo de primeira escolha, porém é eminente a busca por melhores métodos, uma vez que esse tipo de congelamento é demorado, exige equipamentos de alta complexidade e precisão, e é mais suscetível a formação de cristais de gelo, portando, atrasando então o início da terapia do paciente e sendo menos acessível. Já a vitrificação se encaixa como um método possivelmente mais benéfico na viabilidade do tratamento do paciente, por ser relativamente mais rápido, simples e trazendo menos comprometimentos ao tecido criopreservado (RADAELLI et al., 2017).

Com o tecido testicular obtido, algumas terapias vêm sendo amplamente discutidas e testadas experimentalmente para a retomada da fertilidade do paciente, são elas: enxerto autólogo, xenoenxerto e cultura de órgãos, todas com o potencial de produzirem espermatozoides a fim de serem utilizadas futuramente na realização de uma ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides).

Através do mesmo tecido biopsiado, pode ser realizado também, uma suspensão celular testicular, a fim de usá-los em duas terapias também atualmente discutidas, são elas: cultura de espermatogônia tronco – podendo posteriormente serem introduzidas no testículo do paciente já adulto, e a morfogênese testicular – que refere-se basicamente a reconstituir novos túbulos seminíferos, a fim de produzir espermatozoides a serem utilizados futuramente na técnica de ICSI, demonstrados na **figura 5** (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

O uso de tecido testicular criopreservado – em comparação com a técnica de suspensão de células testiculares, até então provou preservar de forma eficaz a arquitetura das células tronco germinativas pós descongelamento, garantindo melhor a sua viabilidade e função. Por outro lado, na criopreservação desses fragmentos,

podem ocorrer danos ao tecido pelo impacto da permeabilidade dos crioprotetores ou pela formação de cristais de gelo a depender do protocolo seguido de congelamento (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

Contudo, as terapias experimentais voltadas para a infertilidade masculina, contam com diferentes opções, sinalizados por GASSEI; ORWIG 2016, na **figura 5**. Onde em A é representado uma terapia já muito usual para os pacientes que dispõe de seus gametas a serem preservados e utilizados na inseminação intrauterina, na fertilização in vitro (FIV) e na técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Em B é representado as técnicas experimentais para pacientes que não dispõe dos gametas a serem preservados e utilizados, portanto, necessitam do auxílio da realização de uma biópsia para se obter o fragmento do tecido testicular. Com isso, a suspensão das células desse fragmento pode ser eficaz para realizar a cultura de células-tronco espermatogoniais ou para a morfogênese testicular. Outra opção utilizando os fragmentos do tecido testicular biopsiados, é o enxerto autólogo, xenoenxerto e cultura de órgãos para a produção de espermatozoides in vitro.

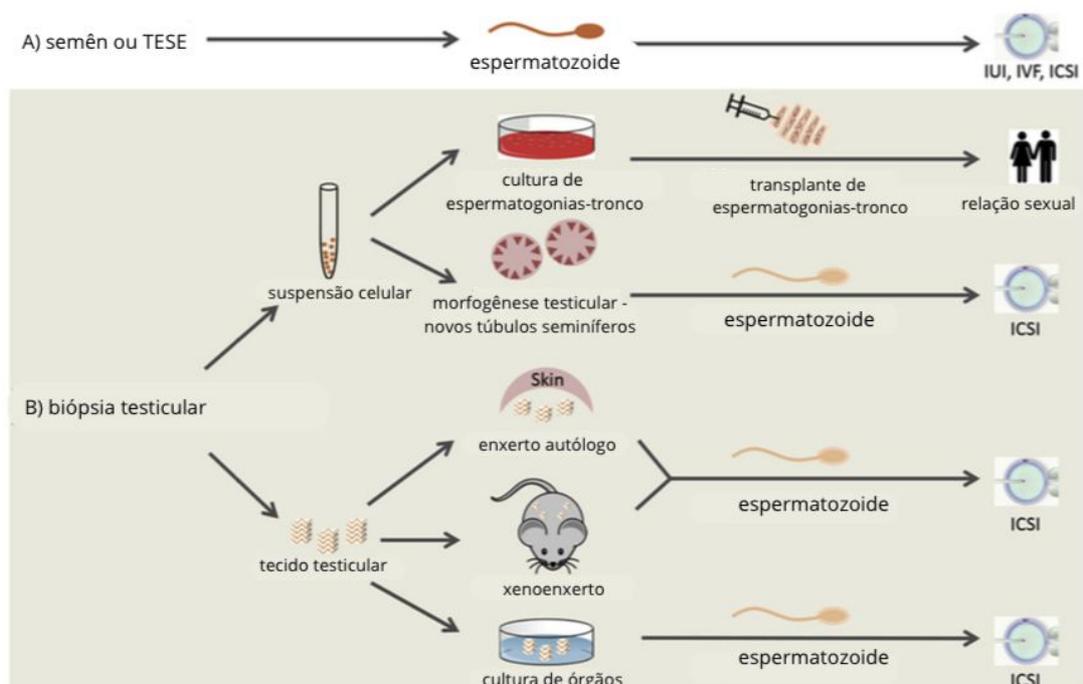


Figura 5. Terapias experimentais para a infertilidade masculina. **(A)**: Terapia já usual para a preservação da fertilidade de pacientes que dispõe de seus gametas. Nesse caso, é possível obter o sêmen a ser criopreservado e futuramente usado para terapias de fertilização. **(B)**: Demonstra que através do tecido testicular biopsiado é possível a realização de duas técnicas atualmente estudadas para a preservação e manutenção da fertilidade de pacientes que não dispõe de seus gametas. FONTE: (ADAPTADO DE GASSEI; ORWIG.,2016).

O enxerto autólogo é uma técnica que consiste em transplantar o tecido que foi criopreservado do paciente, nele mesmo – sob a pele ou no próprio testículo. O que diferencia claramente do que caracteriza o xenoenxerto, onde o tecido seria transplantado para um ser de outra espécie, como por exemplo, um roedor, usando-o para que nutra o tecido e permita realizar sua atividade de maturação sem ser ameaçado no organismo do paciente pelos efeitos tóxicos das terapias oncológicas ou pelo próprio câncer. Em contrapartida, a técnica de xenoenxerto/ xenotransplante trás diversos desafios como: o tempo de vida do animal utilizado - fazendo com que talvez seja necessário o uso de outros animais até que aquele tecido possa oferecer espermatozoides para uso, a questão ética e psicológica que cercam a família do paciente e o paciente em si – questionando até que ponto faria sentido e seria bem visto pela família a decisão de se usar um animal para resguardar a fertilidade de seu filho, e também, importante ressaltar os riscos existentes de transmissão de zoonoses (GASSEI; ORWIG, 2016) (EUGENI et al., 2022).

Nos experimentos realizados, ao transplantar os fragmentos do tecido testicular de um animal para outro de diferente espécie, alguns estudos contemplaram o sítio ectópico e já outros o sítio testicular, e por questões de temperatura, a região testicular demonstrou melhor probabilidade de maturação e sobrevivência do tecido. Em relação a utilização de um tecido criopreservado ou na utilização de um tecido a fresco para a realização do respectivo estudo, não se obteve resultados importantes demonstrando grandes discrepâncias. (NTEMOU et al., 2019).

Embora haja muitas controversas em relação a técnica de xenoenxerto, é de extrema importância os contínuos esforços nas pesquisas e estudos para avaliar a sobrevivência das células espermatogoniais em diferentes mecanismos de transplantes. Até o momento alguns estudos que foram feitos em animais permitiram resultados animadores demonstrando a espermatogênese do animal doador muito bem intacta (EUGENI et al., 2022).

Estudos experimentais utilizando tecidos testicular humano xenoenxertados em camundongos, não conseguiram demonstrar a ocorrência de uma espermatogênese completa, sendo questionável a possível problemática envolvida a respeito das diferenças filogenéticas entre humanos e camundongos. Em contrapartida, outro

experimento utilizando o tecido testicular de um macaco pré-púbere xenoenxertado, resultou na formação de espermatozoides, conseqüentemente, no nascimento vivo de um primata (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020) (EUGENI et al., 2022).

Além do xenoenxerto como uma opção de abordagem extracorpórea, existe a cultura de órgãos de tecidos testiculares – maturação *in vitro*. Nesse cenário é possível usar um fragmento biopsiado do testículo e cultivá-lo em condições controladas no laboratório possibilitando avaliar seu funcionamento e sua resposta.

Um estudo revelou que fragmentos de tecido testicular de camundongos recém-nascidos poderiam ser mantidos em cultura de tecido - em uma placa de agarose embebida em meio, até que produzissem espermatogênese completa, obtendo assim espermatozoides viáveis para a fertilização. Esse experimento resultou em descendentes saudáveis, que chegaram a fase adulta férteis, provando assim que se a cultura de órgãos pudesse ser reproduzida em humanos, poderia proporcionar uma alternativa interessante para auxiliar na técnica de transplante autólogo de células tronco espermatogoniais ou para enxerto autólogo (SATO et al., 2013).

Seguindo a ideia da cultura de órgão ainda com experimentos em animais, uma análise comparativa entre tecidos testiculares imaturos sendo cultivados a 34°C e a 37°C, demonstrou que em uma temperatura menor, há uma redução de possíveis alterações, como na morfologia e apoptose. Além do monitoramento da temperatura, é importante verificar condições do cultivo que possam trazer mais nutrição ao tecido para que ele se desenvolva bem (MEDRANO et al., 2018). Expor o tecido a suplementação gonadotrófica resultou num aumento da quantidade de espermatogônias indiferenciadas e na melhora da sobrevivência das células de Sertoli (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

#### 4.2.1 CONGELAMENTO LENTO E VITRIFICAÇÃO

Como mencionado anteriormente, a dois protocolos estudados para se criopreservar o tecido testicular, são eles congelamento lento e vitrificação. Até o momento não existe um protocolo específico, mas é necessário compreender os benefícios e os prejuízos gerais por de trás de cada técnica (**figura 6**).

Há dois tipos de crioprotetores em específico que são bem avaliados para uso em tecido testicular, o DMSO (dimetilsulfóxido) – que é indicado quando se visa manter a integridade das espermatogonias-tronco e das “Very Small Embryonic-Like Stem Cells” (células-tronco menores ainda), que seriam o subgrupo das espermatogonias-tronco. E o crioprotetor a base de glicerol, que visa mais a integridade das células espermáticas (AZAMBUJA, 2017).

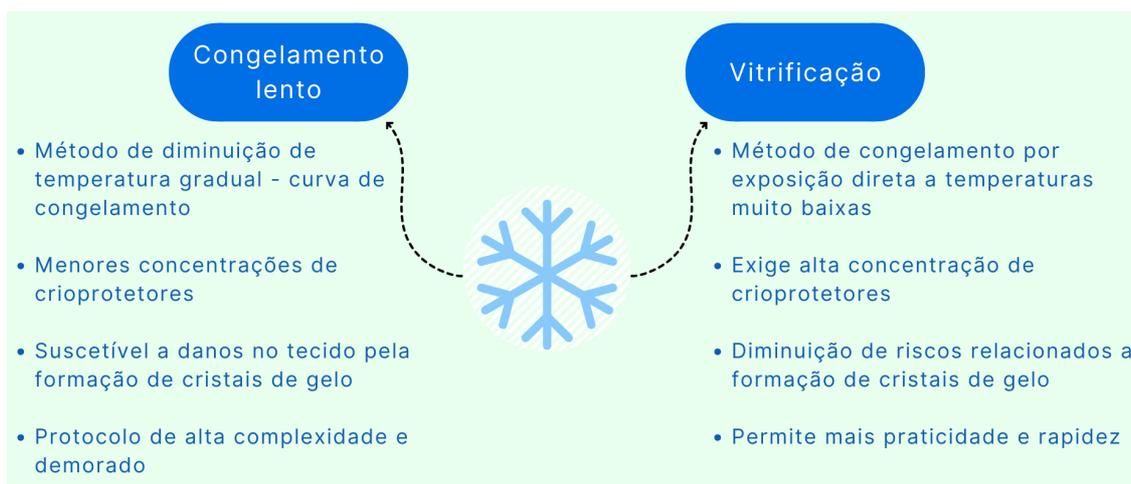


Figura 6. Comparação entre os métodos de congelamento lento e vitriificação. FONTE: (IMAGEM AUTORAL, 2023).

O primeiro passo para o congelamento lento de tecido testicular, envolve o preparo do meio em que ele será criopreservado. Deve-se misturar o crioprotetor com a sucrose e o HSA (Human Serum Albumin), mantendo-o a uma temperatura de 4°C. A partir de então, aplicá-lo no fragmento e, com o auxílio de um freezer com controle de temperatura, proceder a curva de congelamento, onde a ideia sugere diminuir a temperatura aos poucos (temperaturas e intervalos de tempo programáveis) até que possa ser então mergulhado ao nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C (BAERT et al., 2018) (AZAMBUJA, 2017). Embora essa seja a ideia geral envolvida no congelamento lento, diferentes protocolos podem descrever volumes de materiais, intervalos de temperaturas e tempos diferentes, mas sempre visando o mesmo movimento de expor o fragmento a curva decrescente de temperatura até que seja congelado.

O congelamento lento pode trazer implicações a respeito da demora que leva para concluir o procedimento e enfim criopreservar o tecido. Todo o processo

envolvido visa controlar de forma cuidadosa a taxa de resfriamento, já que ao congelar o tecido, as células tendem a perder água, podendo formar cristais de gelo dentro das células, sendo prejudicial ao fragmento. Portanto esse protocolo de congelamento permite ajustar a temperatura em que ocorre esse resfriamento de modo que as células tenham tempo para se adaptar ao máximo (ONOFRE et al., 2016).

Já para a vitrificação, ao se acrescentar os meios crioprotetores ao fragmento, a etapa seguinte basicamente envolve a desidratação do tecido em etapas. A cada uma dessas etapas em que o fragmento passa, ocorre um aumento progressivo de concentração dos crioprotetores e o tempo em que ele é exposto, até que enfim o material possa ser colocado nos criotubos, e mergulhados imediatamente ao nitrogênio líquido finalizando o procedimento (AZAMBUJA, 2017).

A vitrificação trás mais agilidade, porém a controversas a respeito do quão exposto a agentes crioprotetores o fragmento é colocado. Por outro lado, essas diferentes concentrações de crioprotetores aplicadas, é uma forma de proteger o fragmento da formação de cristais de gelo em um resfriamento considerado ultrarrápido (PELZMAN; ORWIG; HWANG, 2020).

#### 4.2.2 DESCONGELAMENTO OU AQUECIMENTO DO TECIDO

O descongelamento associado ao tecido que foi criopreservado pelo protocolo de congelamento lento, é realizado mantendo a amostra a temperatura ambiente por pelo menos 2 min e em seguida no banho-maria a 37°C por mais 2 min. A partir de então, o fragmento é banhado três vezes utilizando valores decrescentes de Sucrose e levado para avaliação e utilização (AZAMBUJA, 2017).

Já a desvitrificação sugere que ao retirar o fragmento do nitrogênio líquido, o mesmo seja imediatamente mergulhado algumas vezes a um meio de cultivo contendo Sucrose, em seguida, com concentrações decrescentes ainda utilizando a Sucrose, o aquecimento do tecido é realizado. Após esse procedimento, é necessário verificar as condições do tecido para uso (AZAMBUJA, 2017).

### 4.3 BARREIRAS À PRESERVAÇÃO DA INFERTILIDADE EM CRIANÇAS ONCOLÓGICAS

Embora com os avanços de diagnósticos e tratamentos contra o câncer, os pacientes pediátricos veem respondendo e se recuperando de forma positiva, e com isso buscando por melhores qualidades de vida trazendo à tona a preocupação em relação a fertilidade, um ponto a ser avaliado desrespeito as barreiras que cercam a ideia de se criopreservar tecido testicular de crianças oncológicas, como destacados na **figura 7** (RAFAEL HENRIQUE MARQUES et al., 2022).



Figura 7. Barreiras à preservação da fertilidade em crianças oncológicas. Essas barreiras dizem respeito das técnicas ainda em estudo para pacientes pré-púberes. FONTE: (IMAGEM AUTORAL, 2023).

Não raro o diagnóstico de câncer ser impactante para qualquer pessoa, e ao se tratar da doença durante a juventude, o assunto pode gerar ainda mais abalos emocionais aos pacientes e aos familiares.

Assim, os avanços na ciência vêm permitindo uma perspectiva de sobrevida maior aos pacientes oncológicos pediátricos. Porém, a depender da forma de resposta da doença, do tratamento indicado e dos aspectos externos - como socioeconômicos

e estilo de vida - esses pacientes podem permanecer com risco de recorrência e/ou progressão do câncer, ou até mesmo doenças crônicas e deficiências funcionais (RAFAEL HENRIQUE MARQUES et al., 2022).

Outro ponto acerca da ideia da preservação da fertilidade em crianças com câncer, diz respeito a tomada de decisões, questionando até que ponto psicologicamente, os pais teriam a capacidade de serem assertivos com a ideia de como prosseguir num tratamento para a fertilidade de seu filho, mas também de serem atenciosos a urgência do câncer. Com isso, também compreender sobre a capacidade de tomada de decisão e entendimento da situação por parte da criança, levando a certas considerações éticas ao consentimento e assentimento de um paciente, que por sua vez, é menor de idade (“OUP accepted manuscript”, 2022).

Um estudo descreveu uma análise de como seria possível amenizar a dificuldade da tomada de decisões por parte dos familiares, com base nos sentimentos do paciente e dos pais sobre o aconselhamento da preservação da fertilidade em crianças. Tal análise demonstrou a importância referente aos profissionais serem atenciosas e esclarecerem de forma detalhada aos familiares que essas técnicas de preservação estão em estudo, mas que até então muitos resultados foram animadores, demonstrando que o sucesso referente a preservação da fertilidade poderia trazer esperanças quanto a saúde reprodutiva dessas crianças (WYNS et al., 2015).

O mesmo estudo ainda esclareceu que, avaliando pacientes adultos com câncer ou que passaram pelos tratamentos oncológicos, demonstraram que a questão “capacidade reprodutiva” pode ser um fator impactante, trazendo à tona o forte desejo de serem informados quanto as opções referentes a oncofertilidade. Porém, é mais difícil de verificar esses aspectos em pacientes pediátricos, uma vez que a paternidade obviamente não é algo desejável na cabeça de uma criança, deixando esse planejamento sobre a responsabilidade dos pais ou familiares.

Referente ao conteúdo detalhado sobre a preservação da fertilidade esclarecido a essas crianças, “apenas 33,3% dos meninos com idade <12 anos conseguiram compreender as informações” (WYNS et al., 2015). Embora a tomada de decisões referente a saúde e bem-estar de uma criança, sejam responsabilidade de seus superiores, toda criança tem por direito de expressar e compreender o que

lhe diz respeito, e isso deve ser respeitado e levado em consideração. Portanto, é ideal que os profissionais saibam interagir com esses pacientes, não direcionando apenas o olhar aos pais e responsáveis.

Um estudo trouxe à tona também, a questão da dependência de disponibilidade dos serviços de saúde como uma barreira questionável, uma vez que esse tipo de preservação a fertilidade, além de ser experimental, é de elevado custo, conseqüentemente podendo não ser coberto por muitos seguros e estar disponível a todos os pacientes que o necessitassem. Para tanto, seria interessante maiores discussões entre profissionais de como aplicar tais técnicas de forma clínica permitindo que os pacientes o usufríssem sem grandes problemas (BURNS et al., 2018).

## 5. CONCLUSÃO

A criopreservação de tecido testicular para pacientes que ainda não passaram pela gametogênese pode vir a ser viável, uma vez que os estudos experimentais referentes ao seu uso, vem trazendo grandes resultados com a obtenção de espermatozoides. Porém, dentre essas técnicas estudadas, o xenoenxerto não deve ser levado a clínica considerando as implicações que o cercam com o uso de animais para a manutenção da fertilidade de um paciente.

Já o método que diz respeito a cultura de órgão, ou, maturação *in vitro*, vem enfrentando desafios perante a criação de um ambiente propício para o desenvolvimento do tecido fora do corpo, porém sua ideia visa ser mais promissora, podendo solucionar as barreiras que cercam as outras técnicas estudadas com o uso de tecido testicular criopreservado.

Em relação as abordagens de criopreservação do tecido, tem sido discutido diversas propostas, mas ainda não há um protocolo definitivo determinando o mais eficaz. Contudo, o método de vitrificação vem se destacando pelos resultados promissores em modelos experimentais obtendo a integridade morfológica do tecido bem preservado. Quanto ao aquecimento/ descongelamento do tecido, é um procedimento consideravelmente tranquilo, se comparado as técnicas discutidas na criopreservação.

No que diz respeito as barreiras relacionadas ao tema, é de grande importância que sejam levadas em consideração juntamente ao desenvolvimento e avanço dos estudos que trazem implicância a preservação da fertilidade desses pacientes, tais implicâncias devem ser resolvidas e discutidas de forma interdisciplinar.

Os grandes avanços e desafios que cercam a utilização de um tecido testicular imaturo, provam que os estudos referentes a preservação da fertilidade de pacientes oncológicos pré-púberes são cada vez mais promissores.

## REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, Ricardo (ed.). REPRODUCAO ASSISTIDA: Técnicas de laboratório. 1. ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: AGE Editora, 2017. 320 p. ISBN 978-85-8343-315-6.

BAERT, Y. et al. Cryopreservation of Human Testicular Tissue by Isopropyl-Controlled Slow Freezing. **Methods in Molecular Biology**, p. 287–294, 2018.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

BRAYE, A.; TOURNAYE, H.; GOOSSENS, E. Setting Up a Cryopreservation Programme for Immature Testicular Tissue: Lessons Learned After More Than 15 Years of Experience. **Clinical Medicine Insights: Reproductive Health**, v. 13, p. 117955811988634, jan. 2019.

BURNS, K. C. et al. Fertility preservation options in pediatric and adolescent patients with cancer. **Cancer**, v. 124, n. 9, p. 1867–1876, 25 jan. 2018.

**Câncer infantojuvenil.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/infantojuvenil>>.

CHEN, S.-R.; LIU, Y.-X. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. **REPRODUCTION**, v. 149, n. 4, p. R159–R167, abr. 2015.

**Como surge o câncer?** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>>.

**Câncer de testículo.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/testiculo>>.

DHONNABHAIN, B. N.; GETREU, N. Freezing protocols for the cryopreservation of immature testicular tissue - a systematic review. **Cryo Letters**, v. 42, n. 4, p. 188–201, 2021.

EUGENI, E. et al. Fertility Preservation and Restoration Options for Pre-Pubertal Male Cancer Patients: Current Approaches. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 16 jun. 2022.

GALUPPO, Andrea Giannotti. Spermatogonial stem cells as a therapeutic alternative for fertility preservation of prepubertal boys. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 4, p. 637–639, 2015.

GASSEI, K.; ORWIG, K. E. Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 2, p. 256–266, fev. 2016.

GEHM, M.; CHAMMAS, R.; RODRIGUES, R. **Tratado de Oncologia - Vol. 01 e Vol. 02.** [s.l: s.n.].

GINSBERG, J. P. Educational paper. **European Journal of Pediatrics**, v. 170, n. 6, p. 703–708, 4 dez. 2010.

JOANA et al. Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 34, n. 12, p. 2443–2455, 1 dez. 2019.

KOSKENNIEMI, J. J.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Testicular growth and development in puberty. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 24, n. 3, p. 215–224, jun. 2017.

LONG, C. J.; GINSBERG, J. P.; KOLON, T. F. Fertility Preservation in Children and Adolescents With Cancer. **Urology**, v. 91, p. 190–196, maio 2016.

MEDRANO, J. V. et al. Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 6, p. 1045-1057.e3, 1 nov. 2018.

**Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**

**Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.** [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>.

NTEMOU, E. et al. Complete spermatogenesis in intratesticular testis tissue xenotransplants from immature non-human primate. **Human Reproduction**, v. 34, n. 3, p. 403–413, 12 fev. 2019.

NTEMOU, E. et al. Oncofertility: Pharmacological Protection and Immature Testicular Tissue (ITT)-Based Strategies for Prepubertal and Adolescent Male Cancer Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5223, 21 out. 2019.

ONCOGUIA, I. **Estatísticas para Câncer Infantil.** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatisticas-para-cancer-infantil/10665/459/>>.

ONCOGUIA, I. **O câncer.** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>.

ONCOGUIA, Instituto. **Tratamentos do Câncer. Instituto Oncoguia.** Disponível em: . <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/>>.

ONCOGUIA, I. **Sobre o Câncer de Testículo.** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/719/157/>>.

**O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>.

ONOFRE, J. et al. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 6, p. 744–761, 27 ago. 2016.

PELZMAN, D. L.; ORWIG, K. E.; HWANG, K. Progress in translational reproductive science: testicular tissue transplantation and in vitro spermatogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 3, p. 500–509, mar. 2020.

PUKAZHENTHI, B. S. et al. Slow Freezing, but Not Vitrification Supports Complete Spermatogenesis in Cryopreserved, Neonatal Sheep Testicular Xenografts. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123957, 29 abr. 2015.

RADAELLI, M. R. M. et al. 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, 2017.

RAFAEL HENRIQUE MARQUES et al. Oncofertility in pediatric patients: current perspectives. **Wspolczesna Onkologia-Contemporary Oncology**, v. 26, n. 3, p. 165–173, 1 jan. 2022.

SADLER, T. W. **Langman. Embriologia Médica; 14.ed.** [s.l.]: Guanabara Koogan, 21 jan. 2021. 336p. ISBN 97888527736022.

SANTI, D. et al. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1014, 1 abr. 2020.

SATO, T. et al. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2098–2104, 3 out. 2013.

SCHOENWOLF, G. C. et al. **Larsen's human embryology**. 5. ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone, 2015.

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

UCHÔA, C.; CARNEIRO, J. **Histología básica : texto y atlas**. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2022.

WHELAN, E. C. et al. Reestablishment of spermatogenesis after more than 20 years of cryopreservation of rat spermatogonial stem cells reveals an important impact in differentiation capacity. **PLOS Biology**, v. 20, n. 5, p. e3001618, 10 maio 2022.

WYNS, C. et al. Fertility preservation in the male pediatric population: factors influencing the decision of parents and children. **Human Reproduction**, v. 30, n. 9, p. 2022–2030, 1 set. 2015.