



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SAMARA LIMA OLINDO

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DA PELE E CARTILAGEM
AURICULAR APICAL DE *Galea spixii* (WAGLER, 1831)**

MOSSORÓ-RN

2023

SAMARA LIMA OLINDO

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DA PELE E CARTILAGEM
AURICULAR APICAL DE *Galea spixii* (WAGLER, 1831)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira

MOSSORÓ–RN

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

O46a Olindo, Samara Lima.
 Avaliação das técnicas de criopreservação da
 pele e cartilagem auricular apical de Galea
 spixii (Wagler, 1831) / Samara Lima Olindo. -
 2023.
 68 f. : il.

 Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
 2023.

 1. Roedores silvestres. 2. Preás. 3.
 Criobancos. 4. Congelação lenta. 5. Vitrificação em
 superfície sólida. I. Pereira, Alexsandra
 Fernandes, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

SAMARA LIMA OLINDO

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DA PELE E CARTILAGEM
AURICULAR APICAL DE *Galea spixii* (WAGLER, 1831)**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 21 / 09 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

**Alexsandra
Fernandes Pereira**

Assinado de forma digital por
Alexsandra Fernandes Pereira
Dados: 2023.10.17 12:08:04 -03'00'

Profª. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
Presidente e Orientadora

**LEONARDO VITORINO COSTA
DE AQUINO:10889734429**

Assinado de forma digital por LEONARDO
VITORINO COSTA DE AQUINO:10889734429
Dados: 2023.10.20 23:51:09 -03'00'

Mestre em Ciência Animal, Leonardo Vitorino Costa de Aquino
Membro Examinador



Documento assinado digitalmente
RADAN ELVIS MATIAS DE OLIVEIRA
Data: 20/10/2023 16:44:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Doutor em Ciência Animal, Radan Elvis Matias de Oliveira
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força para continuar mesmo nos momentos mais difíceis e para superar cada etapa.

À minha mãe, Maria Vanésia de Sousa Lima e à minha tia, Maria Vanusa de Sousa Lima, por me apoiarem em todos os momentos, me acolherem e por me darem tanto amor, do jeitinho de vocês. Sair de casa para estudar em outro Estado não foi uma tarefa fácil e, sem vocês, nada disso seria possível. Sou grata por tudo que fizeram e continuam a fazer por mim. Ao meu padrasto, Erivaldo Supriano Dantas, por ter me acolhido como filha, e me ajudado em tantos momentos. À minha irmã, Sarah Lima Dantas, por nos dias mais difíceis me tirar um sorriso com alguma de suas brincadeiras. A pessoa que sou hoje é graças a vocês. Obrigada por tanto, amo vocês!

Ao João Victor Leite dos Santos, por todo o companheirismo, amor e suporte. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por todos os finais de semana que me acompanhou na universidade para realização dos experimentos. Mesmo nos meus piores dias, você me incentivou a continuar. A vida é boa com você, meu bem. Amo você.

Às amigas que a Biotecnologia me deu, Karinne Yascara Pereira Amorim e Yasmin Beatriz França Moura. Nós estivemos juntas desde o começo da graduação, e tudo seria mais difícil sem a companhia de vocês. Karinne, continue sendo sempre essa amiga alegre e radiante. Yasmin, mantenha sempre seu jeito meigo e divertido de ser. Muito obrigada por estarem comigo nos melhores e piores momentos, sempre me motivando e dando suporte. Amo vocês.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), pelo auxílio nos experimentos e companheirismo mesmo nos dias mais caóticos. Em especial, à Leonardo Vitorino Costa de Aquino, por todo o auxílio para o desenvolvimento deste trabalho. Ainda, agradeço a todos que fizeram possível para a realização deste experimento.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira, por ter me mostrado a Biotecnologia Animal, e por acreditar em mim. Obrigada por todos os incentivos, ensinamentos e cobranças, para que eu possa me tornar uma boa profissional.

Ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) pela disponibilidade dos animais.

À instituição que fez tudo isso possível, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), assim como o corpo docente do curso de Biotecnologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Iniciação Científica por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq).

RESUMO

A ordem Rodentia é constituída por uma variedade de espécies de pequeno a grande porte, e destes, o *Galea spixii* é um representante de importante papel ecológico, econômico e científico. Buscando contribuir para a conservação e conhecimento da espécie, bancos de tecidos somáticos representam um passo significativo para o uso destas amostras como estratégias de conservação, sendo o estabelecimento adequado dos protocolos de criopreservação tecidual a primeira etapa da formação destes bancos. Portanto, o objetivo foi comparar duas técnicas de criopreservação tecidual (vitricificação em superfície sólida vs. congelação lenta) na conservação de tecidos somáticos de *G. spixii*. Para tanto, tecidos somáticos derivados de biópsias do pavilhão auricular apical de quatro *G. spixii* machos e adultos pertencentes ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) foram coletados, e transportados ao laboratório em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos-antimicótico. No laboratório, as amostras foram tricotomizadas, fragmentadas em 9,0 mm³ e distribuídas, aleatoriamente, entre os grupos: **i)** grupo controle (não criopreservado); **ii)** vitricificação em superfície sólida (VSS) e **iii)** congelação lenta (CL). Para a CL, DMEM em associação a 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de SFB e sacarose (SAC; 0,2 M) foram empregados como solução de criopreservação, enquanto para a VSS, 3,0 M de DMSO em associação a 3,0 M de etilenoglicol (EG) e 0,25 M de SAC foram empregados. Tecidos somáticos foram avaliados quanto às suas características morfológicas, morfométricas e proliferativas por técnicas histológicas. Além disso, fragmentos foram submetidos ao cultivo primário, onde foi observada a viabilidade, atividade proliferativa e metabólica, e níveis apoptóticos das células recuperadas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, considerando um animal/uma repetição. Os dados foram analisados pelo software GraphPad, considerando $P < 0,05$. Para a análise da espessura da pele, apenas a córnea sofreu alteração após a criopreservação por VSS ($0,99 \pm 0,31 \mu\text{m}$), quando comparada ao controle ($0,81 \pm 0,16 \mu\text{m}$). Já na epiderme, derme e pele total, não foi verificado diferença entre os grupos avaliados. Em relação à quantificação celular, a VSS ($77 \pm 17,8$) se mostrou similar ao controle ($81 \pm 18,9$) quanto ao número de células da epiderme, enquanto a CL ($22 \pm 3,93$) apresentou um maior número de halos perinucleares quando comparado ao controle ($19 \pm 3,97$). Na derme, o número de fibroblastos manteve-se similar entre os grupos experimentais, apesar da técnica por CL ter apresentado um menor percentual de fibras colágenas. Após a avaliação da cartilagem, foi observado que a VSS continha um maior número de condrócitos degenerados. Contudo, a CL apresentou um menor número de condrócitos normais e lacunas preenchidas. Ainda, a técnica por CL ($1,65 \pm 0,47$) revelou uma maior área de AgNOR/célula quando comparado ao controle ($1,07 \pm 0,14$) e VSS ($1,30 \pm 0,31$). Após o cultivo *in vitro* dos tecidos somáticos, não foi observada diferença após a análise da viabilidade celular e atividade metabólica, demonstrando uma eficiência das técnicas empregadas. Embora isso tenha ocorrido, as células pertencentes aos tecidos da VSS ($34,1 \text{ h} \pm 2,9$) necessitaram de um maior tempo para duplicar-se quando comparado ao controle ($19,6 \text{ h} \pm 4,3$) e CL ($24,4 \text{ h} \pm 2,9$). Quanto aos níveis apoptóticos, foi observado que a CL continha um maior número de células em apoptose tardia ($22,3 \pm 4,2$) e necróticas ($5,6 \pm 2,2$) quando comparado a técnica por VSS ($5,8 \pm 1,6$; $0,4 \pm 0,3$, respectivamente). Em síntese, os protocolos de criopreservação foram eficientemente empregados em pele e cartilagem auricular de *G. spixii*. Contudo, considerando a manutenção da arquitetura estrutural do tecido após a avaliação por histologia e cultivo *in vitro*, a técnica por VSS se destaca em virtude da sua fácil execução, baixo custo e por oferecer a possibilidade de aplicação em campo. Portanto, com essas informações, foi possível compreender algumas das etapas envolvidas para a formação de bancos somáticos para o *G. spixii*.

Palavras-chave: Roedores silvestres, preás, criobancos, congelação lenta, vitricificação em superfície sólida.

ABSTRACT

The order Rodentia is composed of a variety of species from small to large, and of these, the *Galea spixii* is a representative of important ecological, economic, and scientific role. Seeking to contribute to the conservation and knowledge of the species, somatic tissue banks represent a significant step towards the use of these samples as conservation strategies, and the adequate establishment of tissue cryopreservation protocols is the first step in the formation of these banks. Therefore, the aim was to compare two techniques of tissue cryopreservation (solid-surface vitrification vs. slow freezing) in the conservation of ear cartilage and skin of *G. spixii*. For this purpose, somatic tissues derived from ear apical skin biopsies of four adult male *G. spixii* belonging to the Center for Multiplication of Wild Animals (CEMAS/UFERSA) were collected and transported to the laboratory in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) plus 10% fetal bovine serum (FBS) and 2% antibiotic-antimycotic solution. In the laboratory, the samples were trichotomized, fragmented in 9.0 mm³ and randomly distributed among the groups: **i)** control group (not cryopreserved); **ii)** solid-surface vitrification (SSV) and **iii)** slow freezing (SF). For SF, DMEM in association with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% FBS and sucrose (SUC; 0.2 M) were employed as cryopreservation solution, while for SSV, 3.0 M DMSO in association with 3.0 M ethylene glycol (EG) and 0.25 M SUC were employed. Somatic tissues were evaluated for their morphological, morphometric, and proliferative characteristics by histological techniques. Moreover, fragments were subjected to primary culture, where viability, proliferative and metabolic activity, and apoptotic levels were observed in the recovered cell. The results were expressed as mean $\pm$ standard error, considering one animal/one repetition. Finally, the data were analyzed by GraphPad software, considering $P < 0.05$. For the analysis of skin thickness, only the cornea was altered after cryopreservation by SSV (0.99 ± 0.31 μ m), when compared to the control (0.81 ± 0.16 μ m). In the epidermis, dermis, and total skin, there was no significant difference between the groups. Regarding cell quantification, the SSV (77 ± 17.8) was similar to the control (81 ± 18.9) regarding the number of epidermal cells, while the SF (22 ± 3.93) showed a higher number of perinuclear halos when compared to the control (19 ± 3.97). In the dermis, the number of fibroblasts remained similar between the experimental groups, although the SF technique showed a lower percentage of collagen fibers. After cartilage evaluation, it was observed that the SSV technique contained a higher number of degenerated chondrocytes. However, the SF technique showed a lower number of normal chondrocytes and filled gaps. Also, the SF technique (1.65 ± 0.47) revealed a larger AgNOR/cell area when compared to control (1.07 ± 0.14) and SSV (1.30 ± 0.31). After *in vitro* culture of the somatic tissues, no significant difference was observed after analysis of cell viability and metabolic activity, demonstrating an efficiency of the techniques employed. Although this occurred, cells belonging to SSV tissues ($34.1 \text{ h} \pm 2.9$) required a longer time to duplicate when compared to control ($19.6 \text{ h} \pm 4.3$) and SF ($24.4 \text{ h} \pm 2.9$). Finally, on the apoptotic levels, it was observed that the SF technique contained a higher number of cells in late apoptosis (22.3 ± 4.2) and necrotic (5.6 ± 2.2) when compared to the SSV technique (5.8 ± 1.6 ; 0.4 ± 0.3 , respectively). In summary, the cryopreservation protocols were efficiently employed in ear cartilage and skin of *G. spixii*. However, considering the maintenance of the structural architecture of the tissue after evaluation by histology and *in vitro* culture, the SSV technique stands out due to its easy execution, low cost and for offering the possibility of application in the field. Therefore, with this information, it was possible to understand some of the steps involved in the formation of somatic banks for *G. spixii*.

Keywords: Wild rodents, spix's yellow-toothed, cryobanks, slow freezing, vitrification on solid surface.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos dos gêneros de preás	17
Figura 2. Processo de criopreservação tecidual	24
Figura 3. Desenho experimental para as avaliações histológicas e celulares derivados do tecido auricular de <i>G. spixii</i> antes e após a criopreservação	33
Figura 4. Coleta e processamento de fragmentos derivados da pele de <i>G. spixii</i>	33
Figura 5. Avaliação histológica de fragmentos teciduais derivados do pavilhão auricular de <i>G. spixii</i> corados com hematoxilina-eosina antes e após a criopreservação	39
Figura 6. Quantificação de condrócitos e lacunas presentes na cartilagem de fragmentos derivados do pavilhão auricular de <i>G. spixii</i> antes e após a criopreservação	41
Figura 7. Quantificação de fibras colágenas de fragmentos derivados do pavilhão auricular de <i>G. spixii</i> corados com tricrômico de Gomori antes e após a criopreservação	42
Figura 8. Análise das regiões organizadoras de nucléolos de fragmentos derivados do pavilhão auricular de <i>G. spixii</i> antes e após a criopreservação	43
Figura 9. Cultivo <i>in vitro</i> de fragmentos derivados do tecido auricular de <i>G. spixii</i>	44
Figura 10. Análise da viabilidade celular, curva de crescimento, PDT e atividade metabólica de células somáticas derivadas da pele auricular de <i>G. spixii</i> antes e após a criopreservação	46
Figura 11. Níveis de apoptose de células somáticas derivadas da pele auricular de <i>G. spixii</i> antes e após a criopreservação	47

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Estabelecimento de cultivo primário e secundário de células somáticas derivados do tecido auricular de <i>G. spixii</i> após criopreservação por vitrificação em superfície sólida (VSS) e congelamento lento (CL).	45
--	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Uso de tecidos somáticos de roedores de laboratório e silvestres visando a formação de bancos somáticos.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Regiões organizadoras nucleolares argirofilas
ANOVA	Análise de variância
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de Carbono
CT	Cartilagem
D	Derme
DMEM	Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Epiderme
EP	Erro Padrão
EG	Etilenoglicol
h	Hora
HE	Hematoxilina-eosina
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LABMORFA	Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
M	Molar
Min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
Nº	Número
nm	Nanômetro
PBS	Tampão Salino Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico

SAC

Sacarose

SFB

Soro Fetal Bovino

TNCS

Transferência Nuclear de Célula Somática

UFERSA

Universidade Federal Rural do Semi-Árido

μL

Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

*	Ve­zes
<	Menor que
>	Maior que
°	Grau
±	Mais ou menos
=	Igual
%	Porcentagem
vs	Versus
/	Dividido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. Aspectos ecológicos, econômicos e científicos do <i>G. spixii</i>	17
2.2. Estudos reprodutivos e estratégias de conservação em <i>G. spixii</i>	18
2.3. Conservação de tecidos somáticos em roedores de laboratório e silvestres.....	20
2.4. Técnicas de criopreservação empregadas na conservação de tecidos somáticos	23
2.5. Métodos de análise tecidual.....	25
3. HIPÓTESES	29
4. JUSTIFICATIVA.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
5.1. Objetivo geral.....	31
5.2. Objetivos específicos	31
6. MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1. Bioética e locais de execução	32
6.2. Animais e desenho experimental	32
6.3. Obtenção de amostras somáticas por biópsias da pele e cartilagem	32
6.4. Criopreservação dos fragmentos auriculares.....	34
6.4.1. Congelação lenta	34
6.4.2. Vitrificação em superfície sólida	34
6.4.3. Aquecimento	34
6.5. Processamento histológico	34
6.6. Avaliação morfológica, morfométrica e proliferativa usando técnicas histológicas	35
6.7. Cultivo <i>in vitro</i> e avaliações	36
6.7.1. Avaliação morfológica e viabilidade celular	36
6.7.2. Avaliação da atividade proliferativa e metabólica	36
6.7.3. Avaliação dos níveis apoptóticos	37
6.8. Análise estatística	38
7. RESULTADOS.....	39
7.1. Análises morfológicas, morfométricas e proliferativas da pele e cartilagem auricular de <i>G. spixii</i> após a criopreservação.....	39
7.1.1. Avaliação da pele e cartilagem por histologia clássica	39
7.1.2. Avaliação das fibras colágenas e potencial proliferativo de fibroblastos	41
7.2. Análise do cultivo primário de tecidos somáticos de <i>G. spixii</i> após a criopreservação.....	43
7.2.1. Avaliação da viabilidade, potencial proliferativo e metabolismo celular	46
7.2.2. Quantificação dos níveis apoptóticos	47
8. DISCUSSÃO.....	48
9. CONCLUSÕES.....	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A diversidade da fauna brasileira possui números significativos, sendo considerada uma das maiores à nível mundial (REIS et al., 2006). Nesse sentido, insere-se a ordem Rodentia constituída por mais de 2000 roedores de pequeno à grande porte (CARLETON; MUSSER, 2005). Destes, o *Galea spixii*, pertencente a subordem histricomorfa, representa uma das espécies mais estudadas em virtude de seu papel ecológico, econômico e científico (ARRIEIRA et al., 2013; BARCELOS, 2018).

Ecologicamente, o *G. spixii* tem importância na manutenção de ecossistemas florestais, atuando na dispersão de sementes e na manutenção da cadeia alimentar, uma vez que são presas de grandes animais (SALVADOR; FERNANDEZ, 2008; BARCELOS, 2018). Além de seu papel ecológico, esses roedores possuem relevância econômica em virtude da sua inserção no ecoturismo pela possibilidade de atividades turísticas, educacionais e culturais (KERBER, 2017). Adicionalmente, o *G. spixii* possui relevância científica, pois além de apresentarem uma população estável (CATZEFLIS et al., 2016), podem ser empregados na conservação de roedores ameaçados de extinção, como o *Cavia intermedia* (ROACH, 2016).

Diante das razões citadas, bem como da perda da biodiversidade motivada por fatores naturais e ações antrópicas (ALHO, 2012), pesquisas voltadas para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a sua conservação e otimização do potencial reprodutivo têm sido empregadas (SILVA et al., 2016; PRAXEDES et al., 2020a). Dentre as estratégias empregadas, a ferramenta *ex situ* e *in vitro* com o objetivo de promover a manutenção da biodiversidade genética por meio da formação de bancos de tecidos somáticos se destaca como uma ferramenta interessante para atender essa estratégia (TUNSTALL et al., 2018).

A formação destes bancos possui inúmeras vantagens, especialmente pela possibilidade de recuperar tecidos e células somáticas de maneira menos invasiva a partir de biópsias da pele (COSTA et al., 2020). Tais amostras podem ser recuperadas de indivíduos independentemente da idade, estágio reprodutivo e sexo (PEREIRA et al., 2021). Adicionalmente, células recuperadas destes tecidos podem ser empregadas em estudos voltados para a reprogramação celular (HOU et al., 2013) e na clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS) (MARKOULAKI et al., 2008).

Neste cenário, o primeiro passo para a formação destes biobancos em *G. spixii* consiste no estabelecimento de protocolos adequados para a criopreservação de tecidos somáticos. A conservação de tecidos somáticos consiste numa etapa interessante em condições em que o cultivo *in vitro* de tecidos são limitadas (QUEIROZ NETA et al., 2018). No que se refere as

técnicas de criopreservação tecidual, a congelação lenta e a vitrificação têm sido as mais empregadas em roedores e mamíferos silvestres, tais como em catetos (*Pecari tajacu*, BORGES et al., 2017), onças-pintadas (*Panthera onca*, PRAXEDES, et al., 2019) e cutias (*Dasyprocta leporina*, COSTA et al., 2020).

Em geral, a congelação lenta (CL) é uma técnica que utiliza baixas concentrações de crioprotetores, sendo realizada a partir da redução gradual e controlada da temperatura, onde um freezer programável é requerido (PRAXEDES et al., 2018a). Embora essa metodologia seja amplamente utilizada, o seu uso depende de altos custos em virtude da necessidade de equipamentos sofisticados (PRAXEDES et al., 2019). Além disso, nessa técnica, há uma grande quantidade de cristais de gelo que ocasionam danos às células (CARVALHO et al., 2011).

Por outro lado, a vitrificação vem sendo mais difundida, pois além de não demandar altos custos e poder ser empregada a campo, tem-se observado uma menor formação de cristais de gelo (CAMPOS et al., 2019). Nesse sentido, dentre os métodos empregados, a vitrificação em superfície sólida (VSS) destaca-se como um método de vitrificação usado em diferentes tipos teciduais (CARVALHO et al., 2011; COSTA et al., 2020), como tecido ovariano (PRAXEDES et al., 2017), testicular (SILVA et al., 2019) e somático (COSTA et al., 2020). Essa técnica tem permitido a conservação morfológica de pele e cartilagem derivados de *D. leporina* (COSTA et al., 2020), roedor da mesma subordem do *G. spixii*. Ainda, outro parâmetro determinante no estabelecimento da técnica de criopreservação consiste na avaliação do potencial dessas amostras durante o cultivo *in vitro*, visando a recuperação celular (PRAXEDES et al., 2019).

Portanto, considerando que a técnica de criopreservação tem relações específicas com o tecido usado e espécie de interesse (BORGES et al., 2017), o objetivo foi comparar diferentes técnicas de criopreservação (CL e VSS) na conservação da pele e cartilagem auricular de *G. spixii*, visando a formação de bancos de recursos somáticos da espécie.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos ecológicos, econômicos e científicos do *G. spixii*

A biodiversidade dos ecossistemas pode ser considerada como o maior potencial natural do mundo contemporâneo, servindo de material para estudos científicos (BARBOSA, 2001). Os pequenos mamíferos constituem um grupo ecológico e economicamente importante, tanto do ponto de vista da abundância e diversidade das espécies, quanto por serem encontrados como peças fundamentais em quase todos os ecossistemas terrestres (REIS et al., 2008).

Neste cenário, os preás, representantes da ordem Rodentia, a qual possui aproximadamente 40% das espécies da classe de mamíferos, participam de três gêneros, sendo *Galea*, *Cavia* e *Microcavia* (**Figura 1**). Dentre estes gêneros, insere-se a espécie *Galea spixii* que é amplamente distribuída pela América do Sul (SILVA et al., 2017a). No Brasil, essa espécie pode ser encontrada em todos os Estados do Nordeste, bem como nos Estados do Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Distrito Federal (MACÊDO et al., 2018).

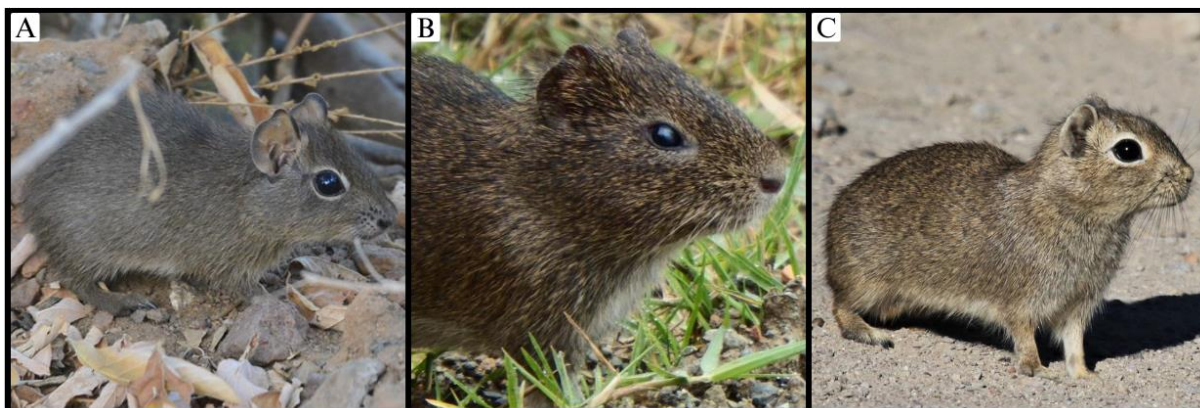


Figura 1. Exemplares dos gêneros de preás. (A) Exemplar do gênero *Galea* (*Galea spixii*). (B) Exemplar do gênero *Cavia* (*Cavia aperea*). (C) Exemplar do gênero *Microcavia* (*Microcavia australis*). Fonte: Flickr, Flickr, iNaturalist.

Do ponto de vista anatômico, o *G. spixii* é caracterizado por seu corpo alongado com uma coloração uniforme, exibindo uma superfície dorsal em tons de cinza-escuro e um ventre branco, além da ausência de cauda (LACHER, 1981). O que o diferencia de outros gêneros são as características morfológicas de seus molariformes, cujos dentes incisivos possuem uma

coloração mais clara, um dorso de tonalidade mais clara, além da presença de pelos pós-auriculares como observado por Wagler, em 1831.

Quanto ao perfil ecológico, o *G. spixii* é considerado uma das principais espécies que atuam na dispersão de sementes (ANDRESEN, 2000). Esses animais têm importância fundamental no equilíbrio dos ecossistemas, mantendo a existência e o desenvolvimento das áreas naturais (SANTOS, 2011). Além disso, *G. spixii* apresenta características ecológicas para formarem pequenos grupos sociais, ocupando áreas de uso estáveis, como margem de rios e mata (SAMPAIO et al., 2012). No que diz respeito a fatores econômicos, esses animais são importantes na inserção ao ecoturismo, uma vez que a cada ano cresce o número de pessoas que procuram os parques naturais para apreciar estes animais silvestres (SANTOS, 2011). Adicionalmente, eles representam uma fonte alternativa de fonte proteica pelo consumo de carne de reduzido custo e elevado valor nutritivo, desempenhando um papel crucial nos meios de subsistência e segurança alimentar (MACÊDO et al., 2018).

Já em relação ao cunho científico, o *G. spixii* pode ser empregado como modelos experimentais para outros roedores que possam estar sob ameaça de extinção (PRAXEDES et al., 2018b). Isso acontece porque além de possuírem população estável, segundo Catzefflis et al. (2016), podem ser utilizados em estudos voltados para o conhecimento anatômico, morfológico e fisiológico que auxiliam na compreensão de atividades relacionadas ao seu comportamento e de outras espécies filogeneticamente próximas (OLIVEIRA et al., 2017).

Considerando a importância do *G. spixii* para os ecossistemas globais, bem como seu valor econômico e sua relevância científica, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de conservação e manutenção do potencial reprodutivo desta espécie.

2.2. Estudos reprodutivos e estratégias de conservação em *G. spixii*

Uma série de estudos tem sido desenvolvidos para o *G. spixii* e roedores filogeneticamente próximos, com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre sua morfologia, comportamento, distribuição geográfica e diversidade genética. Além disso, pesquisas têm sido realizadas buscando identificar os níveis de ameaça enfrentados pela espécie e suas estratégias de conservação.

Sabe-se que o *G. spixii* tem sua população estável e é classificado como de menor preocupação (CATZEFLIS et al., 2016). Contudo, seu parente próximo, o *Cavia intermedia*, tem enfrentado uma redução significativa em sua população, sendo considerado criticamente em perigo de extinção (SALVADOR, 2021). Essa espécie, encontrada em uma das ilhas do

Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, a maior Unidade de Conservação de Santa Catarina, enfrenta como maior ameaça a interação com os seres humanos (NARCISO; MOREIRA-SÁ; SALVADOR, 2020). Deste modo, foi desenvolvido o Plano de Ação para Conservação do preá-de-Moleques-do-Sul, nome pelo qual é popularmente conhecido, com o objetivo de proteger a espécie e reduzir o risco de extinção. As ações incluem o monitoramento do acesso à ilha, a redução dos impactos ambientais e a divulgação de informações de qualidade (NARCISO; MOREIRA-SÁ; SALVADOR, 2020).

Além disso, é fundamental compreender a importância de ações de conservação como essas, uma vez que a interação com seres humanos também representa uma realidade para o *G. spixii*, podendo ter impactos prejudiciais. A espécie enfrenta a caça para fins alimentícios (LIMA et al., 2018), e ainda pode ser criada como animal de estimação (SANTOS et al., 2019). A captura desses animais em seu habitat natural para o manejo em ambientes controlados de maneira ilegal, pode resultar não apenas em alterações morfológicas, comportamentais e genéticas (DA SILVA SANTOS; BONIFÁCIO; LUCENA, 2021), mas também na ameaça de extinção da espécie.

Com o objetivo de compreender melhor os aspectos reprodutivos de *G. spixii* e visando a conservação de seus gametas, diferentes estudos têm sido realizados. Em machos, há estudos abordando a morfologia e fisiologia dos órgãos reprodutivos, bem como a avaliação das diferentes fases do desenvolvimento sexual e da espermatogênese. Pesquisas investigaram as estruturas reprodutivas (RODRIGUES et al., 2013), avaliaram os componentes estruturais do testículo para compreensão do desenvolvimento sexual e da espermatogênese (SANTOS et al., 2012), bem como analisaram a espermatogênese por meio da microscopia eletrônica de transmissão (SANTOS et al., 2014a).

Além disso, foram conduzidos estudos relacionados à coleta de espermatozoides do epidídimo por diferentes métodos (SILVA et al., 2017b) e ao desenvolvimento de protocolos para a conservação desses espermatozoides com a avaliação de diferentes diluentes (SILVA et al., 2017c). Ainda, foi explorada a criopreservação de tecido testicular usando a VSS como técnica de criopreservação (SILVA et al., 2019), e, mais recentemente, Moreira et al. (2021) testaram diferentes diluentes para a criopreservação de espermatozoides epididimários de *G. spixii*, sugerindo que o diluente Tris suplementado com 10% de gema de ovo apresentou melhores resultados.

No que diz respeito às fêmeas de *G. spixii*, Santos et al. (2014b) descreveram a morfologia dos órgãos reprodutivos em fêmeas adultas. Em estudos subsequentes foi caracterizado o ciclo estral e sua duração na espécie (SANTOS et al., 2015), bem como o

desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2017). Já no campo da conservação de germoplasma, Praxedes et al. (2017) realizaram uma caracterização por microscopia eletrônica de transmissão da população de folículos pré-antrais do ovário de *G. spixii* e buscaram estabelecer um protocolo de criopreservação de tecido ovariano utilizando a técnica de VSS.

Apesar de *G. spixii* ser um dos principais roedores silvestres estudados na América do Sul (SILVA et al., 2017a), há uma escassez de estudos direcionados à conservação de amostras somáticas. Em contraste, foram observados maiores avanços em roedores próximos, como em *Cavia porcellus* (MEHRABANI et al., 2014) e *Dasyprocta leporina* (CARVALHO et al., 2015; PRAXEDES et al., 2021). Contudo, Pereira et al. (2021) iniciaram estudos com amostras somáticas da espécie, comparando dados morfométricos da pele auricular e da cartilagem de *G. spixii* e *D. leporina*, onde constataram diferenças entre as espécies, ressaltando a necessidade de protocolos específicos para cada uma delas. Portanto, são necessários mais estudos utilizando tecidos somáticos de *G. spixii*, visando o estabelecimento de protocolos adequados, de modo a permitir o uso posterior dessas amostras em biotécnicas avançadas.

2.3. Conservação de tecidos somáticos em roedores de laboratório e silvestres

O uso de tecidos somáticos visando a formação de bancos somáticos, tornou-se nos últimos anos uma das principais estratégias empregadas na conservação de roedores de laboratório e silvestres (AMSTISLAVSKY et al., 2015; COSTA et al., 2020). Essa ferramenta é classificada como *ex situ* e *in vitro*, pois envolve a recuperação de recursos genéticos de uma espécie visando a sua conservação fora de seu habitat natural (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016). A partir disso é possível observar inúmeras vantagens, como a manutenção de populações cativas e geneticamente viáveis, permitindo o resgate de populações que estejam em risco de extinção ou que se extinguiram (RAMOS et al., 2011), possibilitando a obtenção de características biológicas que necessitem ser preservadas nas espécies (SILVA et al., 2012; PAIVA et al., 2016).

Em roedores de laboratório e silvestres, a formação de bancos a partir de tecidos somáticos já foram observados (**Quadro 1**). Contudo, em *G. spixii*, a conservação de tecido somático, buscando a formação de um criobanco, ainda é uma etapa que necessita de atenção, uma vez que apenas a caracterização morfológica e estrutural da pele da espécie foi realizada (PEREIRA et al., 2021). Dada a essa escassez de informação, bem como a necessidade de conservação da espécie, novos estudos precisam ser conduzidos, e, dentre estes, a formação de um criobanco somático, como passo seguinte torna-se essencial. Isso porque a partir desse

banco biológico é possível realizar o armazenamento de tecidos somáticos a longo prazo, permitindo conservar a variabilidade genética das espécies, mantendo a integridade gênica e biológica (ZACARIOTTI et al., 2013). Além disso, é possível empregar esses tecidos somáticos durante o cultivo *in vitro*, permitindo a recuperação de fibroblastos, células que podem ser utilizadas em estudos relacionados a reprogramação celular (FUKUDA et al., 2016) e clonagem por transferência nuclear de célula somática (WAKAYAMA et al., 2022).

Pensando na pele e na cartilagem do pavilhão auricular de *G. spixii* como região de melhor escolha para a recuperação e formação de bancos biológicos (PEREIRA et al., 2021), o próximo passo a ser realizado é a seleção do melhor protocolo de criopreservação tecidual. Isso é importante, pois há uma ampla variação na escolha dos procedimentos (PRAXEDES et al., 2019), condições de temperatura (SILVESTRE et al., 2003) e tipos de crioprotetores a serem empregados (LEÓN-QUINTO et al., 2014), que influenciam diretamente nos resultados do procedimento.

Em roedores de laboratório e silvestres, bem como em outros mamíferos silvestres, algumas metodologias de criopreservação já foram empregadas, e a eficiência de cada uma delas mostrou-se particular para cada espécie, pois a arquitetura estrutural da pele varia entre os mamíferos (SOUZA et al., 2009), em parâmetros como a espessura das camadas, estimativa quantitativa de colágeno, células e glândulas anexas que compõe a região. Todas essas características histológicas podem influenciar no protocolo de criopreservação e, consequentemente, na recuperação das células após o cultivo *in vitro* dos tecidos (BORGES et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

Portanto, considerando a eficiência variável observada nas técnicas de criopreservação de tecidos somáticos da pele, bem como a particularidade existente neste órgão entre as diferentes espécies, torna-se necessário, inicialmente, avaliá-las em *G. spixii*, buscando elucidar e determinar a melhor técnica de emprego para a espécie em questão.

Quadro 1. Uso de tecidos somáticos de roedores de laboratório e silvestres visando a formação de bancos somáticos.

Espécie	Fonte biológica	Objetivo do estudo	Principais resultados	Referência
<i>D. leporina</i>	Região auricular	Avaliar crioprotetores durante a criopreservação por vitrificação em superfície sólida	Combinação de EG-DMSO-SAC foi considerada a solução crioprotetora ideal para a criopreservação quando comparado ao EG e DMSO sozinhos na ausência e presença de sacarose.	Rodrigues et al. (2021)
<i>D. leporina</i>	Região auricular	Estabelecer e avaliar os efeitos do tempo de cultivo e da criopreservação	Foi possível isolar fibroblastos estáveis a partir de tecidos somáticos da pele, sem alterações morfológicas e com altas taxas de proliferação e metabolismo.	Praxedes et al. (2021)
<i>D. leporina</i>	Região auricular	Comparar duas técnicas de vitrificação (VSS vs. vitrificação direta em criotubos, VDC)	A VSS garantiu melhor conservação morfológica e estrutural da pele quando comparada a VDC.	Costa et al. (2020)
<i>D. prymnolopha</i>	Polpa dentária	Isolar, expandir, diferenciar e caracterizar células progenitoras	Foi possível isolar células da polpa dentária, constituindo uma população de células-tronco.	Carvalho et al. (2015)
<i>C. porcellus</i>	Pele	Estabelecer e caracterizar fibroblastos fetais	O cultivo de fibroblastos fetais foi estabelecido em cultivo aderente e os índices de viabilidade foram favoráveis após criopreservação.	Mehrabani et al. (2014)
<i>M. musculus</i>	Pele e pulmão	Isolar fibroblastos da pele e pulmão	O cultivo fibroblastos da pele e pulmão foi estabelecido adequadamente.	Seluanov et al. (2010)

2.4. Técnicas de criopreservação empregadas na conservação de tecidos somáticos

A criopreservação de tecidos somáticos consiste numa ferramenta de conservação das características estruturais, genéticas e bioquímicas das células por longos períodos, uma vez que a atividade celular é reduzida, e suas funções retornam após o aquecimento (PEREIRA et al., 2013). Como principal vantagem da criopreservação, têm-se a possibilidade de uma maior conservação da biodiversidade genética a partir de criobancos de tecidos e células somáticas (BLACKBURN, 2018), não dependendo de um alto custo (TSAI; LIN, 2012).

Apesar da vantagem citada, é importante enfatizar que durante o emprego da criopreservação, algumas desvantagens ainda são observadas, como os danos causados às amostras biológicas, pois fatores ligados à exposição a baixas temperaturas e crioprotetores podem ocasionar alterações nos padrões estruturais do tecido armazenado (GURRUCHAGA et al., 2018; PRAXEDES et al., 2019). Dentre os principais danos, destaca-se a formação de cristais de gelo que provocam modificações e morte das células (CETINKAYA et al., 2014). Além dos cristais de gelo, a exposição aos crioprotetores podem interferir na qualidade tecidual, uma vez que essas substâncias apresentam efeitos tóxicos ao liberarem metabólitos prejudiciais, não garantindo a sobrevivência celular (CASTRO et al., 2011).

Dentre as metodologias utilizadas na criopreservação dos recursos somáticos de roedores, a congelação lenta (PRAXEDES et al., 2021) e vitrificação (COSTA et al., 2020) são as comumente empregadas. Em geral, a congelação lenta (**Figura 2A**) consiste no armazenamento de tecidos somáticos (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016), envolvendo a redução gradual da temperatura, usando curvas de resfriamento lento (0,3–1,0 °C/min), e baixa concentração de crioprotetores, o que minimiza os danos as estruturas celulares (SILVESTRE et al., 2004). Em mamíferos silvestres, a congelação lenta já foi empregada em várias espécies, tais como lince-ibérico (*Lynx pardinus*, LEÓN-QUINTO et al., 2011) e onça-pintada (*P. onca*, PRAXEDES et al., 2019), embora tenha apresentado uma eficiência variável na conservação de amostras teciduais.

A eficiência variável na congelação lenta é observada porque nesta técnica algumas desvantagens são observadas em relação ao processo de congelação tecidual. Primeiramente, há uma maior formação de cristais de gelo no interior das células, os quais são os principais responsáveis pelos danos gerados durante a criopreservação (BORGES et al., 2017). Em *D. leporina*, Praxedes et al. (2021) observaram um estresse oxidativo nas células causado pelas baixas temperaturas.

Como alternativa a congelação lenta, a vitrificação tem se tornado uma alternativa interessante aos métodos de criopreservação. Essa técnica é baseada na redução da temperatura de forma brusca, em média de 1500 °C/min (ARAV et al., 2018), o que permite minimizar a formação de cristais de gelo (CETINKAYA et al., 2014). Em geral, a vitrificação possui diferentes metodologias (CARVALHO et al., 2011), mas o emprego da vitrificação em superfície sólida (VSS; **Figura 2B**) destaca-se quando comparado as outras utilizadas. Isso ocorre porque a VSS não requer o uso de crioprotetores durante o aquecimento das amostras, evitando a ação tóxica dessas substâncias e seus metabólitos em temperatura ambiente (PRAXEDES et al., 2019).

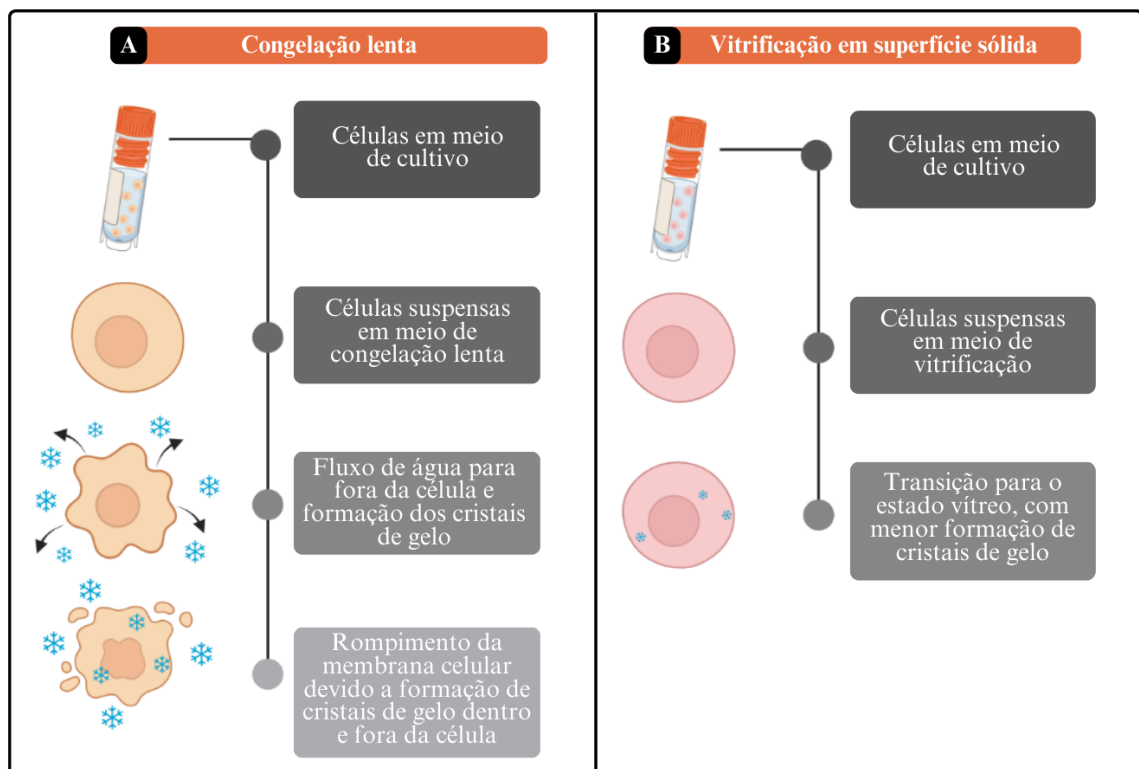


Figura 2. Processo de criopreservação tecidual. (A) Criopreservação por congelamento lento. (B) Criopreservação por vitrificação em superfície sólida. Fonte: Elaborado pela autora.

Na VSS, o tecido somático é exposto a solução crioprotetora, seguido pelo armazenamento direto dos criotubos em nitrogênio líquido (BORGES et al., 2017). Dentre as vantagens observadas a partir da sua utilização estão a baixa quantidade de soluções crioprotetoras, evitando assim a toxicidade dessas substâncias e dos possíveis metabólitos formados durante o aquecimento (PRAXEDES et al., 2019). Contudo, algumas limitações a partir da sua utilização podem ser observadas, como o risco de contaminação do material

biológico, já que a técnica se constitui de um sistema aberto, o qual permite o contato com o vapor do nitrogênio (GROUT, MORRIS, 2009).

Após a criopreservação tecidual, é realizado o aquecimento do tecido somático para que assim sejam avaliados os danos ocasionados a partir das metodologias empregadas. Considerando isso, padrões de avaliações histológicas associado ao cultivo *in vitro* tornam-se métodos essenciais para não só determinar a eficiência da técnica de criopreservação, mas também para qualificar a amostra somática armazenada.

Em estudos com ursos-pardos (*Ursus arctos*), conduzidos por Caamaño et al. (2008), a congelação lenta se destacou como a técnica mais eficiente na criopreservação de tecidos somáticos da pele. Da mesma forma, em pesquisas com onça-pintada, com o intuito de isolar fibroblastos de fragmentos da pele auricular, a congelação lenta foi a abordagem escolhida por Mestre-Citrinovit et al. (2016). No entanto, em contraste, Brockbank et al. (2010) relataram resultados insatisfatórios ao aplicar a congelação lenta em tecidos somáticos de suínos, resultando na formação de cristais de gelo nos condrócitos.

Assim, a VSS surge como uma melhor alternativa de criopreservação. Em 2019, Praxedes et al. observaram que a VSS em comparação com a congelação lenta e a vitrificação direta em criotubos (VDC), mostrou-se mais eficiente na criopreservação da pele auricular da onça-pintada, com base nos resultados obtidos a partir de análises histológicas e no cultivo *in vitro* dos fragmentos. Para cutias (*D. leporina*), Costa et al. (2020) observaram que a VSS foi mais eficiente que a VDC na vitrificação de tecidos somáticos. A espessura epidérmica foi mantida, assim como houve um maior número de condrócitos normais e menor número de condrócitos degenerados, bem como uma quantidade de fibroblastos semelhante ao controle. Portanto, diante desses resultados, a avaliação da viabilidade tecidual após a criopreservação se faz importante.

2.5. Métodos de análise tecidual

A criopreservação pode causar danos celulares (CASTRO et al., 2011), sendo necessário avaliar os padrões estruturais por meio de análises histológicas, bem como o emprego dos tecidos somáticos durante o cultivo celular, para analisar a eficiência e as consequências dos procedimentos sobre a amostra criopreservada (DEMIRCI et al., 2002). A avaliação histológica representa um dos métodos de estudo para determinação da qualidade tecidual após a criopreservação. Dentre as técnicas empregadas, a histologia destaca-se como padrão para determinar a estrutura morfológica e qualidade tecidual. Em geral, é uma técnica de fácil e

rápida execução, necessitando do processamento da amostra e coloração (LUZ et al., 2016). Dentre as etapas observadas, a fixação, a desidratação, a diafanização, a impregnação e a inclusão em parafina, seguido pelo corte, montagem e coloração das lâminas são etapas fundamentais para o sucesso no processo de avaliação.

Após o processamento histológico, é realizada a coloração para determinação dos padrões estruturais da morfologia e quantificação celular. Para tanto, colorações como a hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomori e marcação por nitrato de prata são essenciais. Em geral, a hematoxilina-eosina é uma metodologia baseada no uso de um corante ácido e básico, onde a base que cora em azul ou violeta marca o núcleo das células, enquanto o ácido cora o citosol das células e as estruturas que constituem o tecido em coloração de rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Por essa importante técnica, é possível qualificar o tecido somático após a criopreservação quanto a sua morfologia e viabilidade celular, permitindo selecionar as melhores amostras de serem empregadas ao cultivo celular (COSTA et al., 2016).

Essa coloração foi utilizada por Isola et al. (2013) para avaliação histológica do tegumento de pacas (*Cuniculus paca*), em que foi possível observar as camadas basal, espinhosa, granular e córnea, além da presença de quatro a seis camadas de células no tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado. Ainda, foi utilizada por Pereira et al. (2021) quando realizaram a descrição ultraestrutural e morfométrica da pele e cartilagem de *D. leporina* e *G. spixii*, em que na epiderme desses roedores, foram observadas três camadas, a basal e espinhosa compoem a porção viável, e a camada córnea compoem a porção inviável.

Já no que se refere a coloração por tricrômico de Gomori, é utilizada para identificar as estruturas que constituem o tecido conjuntivo, especificamente as fibras colágenas (SANTOS et al., 2021). Nessa técnica, há a combinação de duas colorações, o cromotrópico 2R (ou plasma) e a coloração de fibras conectivas (GOMORI, 1950). Após o processo, as fibras musculares adquirem cor vermelha, o colágeno cor azul e o núcleo das células é visualizado em tons de azul a preto (GOMORI, 1950). Essa técnica foi utilizada por Borges et al. (2017) na avaliação da criopreservação de tecido somático auricular de catetos, em que foi possível observar fibras colágenas de espessura aparentemente homogênea. Já no estudo de Praxedes et al. (2020), que buscava avaliar a estrutura, composição e capacidade de cultivo do tecido auricular de onças-pintadas (*P. onca*), foi observado com o uso da coloração de tricrômico de Gomori, uma densidade de colágeno de 67,0% e 49,0% para onças-pintadas de pelagem amarela e preta, respectivamente.

Outro método analítico é a quantificação dos níveis proliferativos das células, especialmente dos fibroblastos que são células de aplicação biotecnológica em virtude de suas

características morfológicas e de crescimento que favorecem seu uso em reprogramação nuclear (ARAKI et al., 2017; AZUMA et al., 2018). Em geral, a marcação das regiões organizadoras nucleolares (AgNOR) permite identificar os danos gerados na atividade proliferativa das células (BORGES et al., 2017). Essa técnica baseia-se na utilização da prata que se liga às regiões organizadoras nucleolares (NORs), que constituem os fragmentos de DNA localizados nos segmentos curtos dos cromossomos (VIEIRA, 2013). Na marcação, o nitrato de prata marca as proteínas específicas ligadas a transcrição dos NORs, denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares, podendo ser visualizadas como pontos escurecidos no núcleo celular (QUEIROZ NETA et al., 2018). O AgNOR foi utilizado por Yang et al. (2013) na quantificação do potencial proliferativo de fibroblastos em área ocular pós-cirúrgica de coelhos, em que foi verificado um perfil de proliferação leve ou moderado.

Já no estudo realizado em catetos por Queiroz Neta et al. (2018), foi observado que houve uma diminuição na quantidade e área de AgNOR nas células somáticas, em consequência do aumento da duração de armazenamento por refrigeração, principalmente para fragmentos armazenados por 30 e 50 dias. Essa diminuição da atividade proliferativa afetou o cultivo *in vitro*, ocasionando um aumento da quantidade de dias de cultivo, bem como um declínio na curva de crescimento das células somáticas e no tempo de duplicação.

Outras avaliações sobre os tecidos após a criopreservação podem ser realizadas. Para tanto, as análises celulares são importantes ferramentas nesses protocolos de criopreservação. Dentre as técnicas utilizadas, pode ser citado o cultivo *in vitro* que permite observar os padrões morfológicos, integridade, confluência, viabilidade celular, potencial proliferativo e metabólico. Diferentes ensaios podem ser realizados, como a coloração por azul de tripan, potencial proliferativo por tempo de duplicação de população (PDT), atividade metabólica das células somáticas por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) ou MTT são metodologias essenciais e amplamente empregadas (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Além disso, a marcação de marcadores fluorescentes pode ser usada para identificar o índice de apoptose, uma abordagem importante na determinação da eficiência da criopreservação.

Portanto, no que se refere ao uso de análises morfológicas, esse é um parâmetro de grande importância para a avaliação da viabilidade celular, pois permite observar diferentes características, como formato, tamanho, número, padrões de adesão e cor das células (KIGER et al., 2003). Já a avaliação de confluência acontece a partir da observação do crescimento celular em cultivo, formando os chamados “tapetes” celulares ou monocamadas que irão ocupar toda a superfície da placa de cultivo (FERREIRA et al., 2005).

Além disso, ensaios por meio de corantes como o azul de tripan utilizado para avaliar a viabilidade celular se destacam, uma vez que é um ensaio de baixo custo, fácil execução e eficiente (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Esse método é baseado no teste de exclusão, onde o corante penetra nas membranas rompidas de células mortas (inviáveis). Já nas células vivas (viáveis) o corante não penetra, já que suas membranas estão íntegras (SANTOS et al., 2016). Adicionalmente, podem ser destacados o ensaio por MTT que foi desenvolvido, inicialmente, por Mosmann (1983). Esse método é empregado durante o cultivo celular e permite avaliar a atividade metabólica das células por meio da redução do sal de tetrazólio de células funcionais, que formam os cristais de azul de formazan e permitem avaliá-los por meio de equipamentos que determinarão seu metabolismo (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Adicionalmente, outro ensaio que pode ser realizado é a marcação por marcadores fluorescentes que permitem identificar os níveis apoptóticos das células somáticas. Essa metodologia é baseada na utilização do brometo de etídio em associação ao laranja de acridina. O laranja de acridina é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA, emitindo assim uma fluorescência verde no núcleo celular. Por sua vez, o brometo de etídio é incorporado principalmente por células não viáveis, intercalando-se ao DNA e emitindo fluorescência laranja, além de ligar-se fracamente ao RNA, revelando coloração avermelhada (MARTINS, 2009). Em um estudo visando a recuperação, caracterização e criopreservação de linhagens celulares de *D. leporina*, Praxedes et al. (2021), utilizaram essa técnica e verificaram que as células somáticas da segunda, quinta e oitava passagem apresentaram baixo percentual de necrose e apoptose, com taxas de viabilidade acima de 90%. Ainda, Silva et al. (2021) buscando avaliar os danos causados no cultivo *in vitro* e criopreservação de fibroblastos de onças-pintadas, observaram apoptose aumentada nas células criopreservadas após dez passagens.

Portanto, a avaliação dos tecidos após a criopreservação é fundamental para determinar a qualidade das amostras e a adequação para aplicações posteriores. A combinação de métodos histológicos e análises celulares proporciona um quadro completo da viabilidade e funcionalidade dos tecidos, permitindo o melhor desenvolvimento de protocolos de criopreservação.

3. HIPÓTESES

I – A vitrificação em superfície sólida garante uma melhor conservação da pele e cartilagem auricular de *G. spixii*, quando comparado com a congelação lenta de acordo com os parâmetros morfológicos e proliferativos;

II – Células derivadas da pele e cartilagem auricular criopreservados de *G. spixii* por vitrificação em superfície sólida possuem melhor qualidade após cultivo *in vitro* quando comparadas àquelas derivadas de tecidos criopreservados por congelação lenta.

4. JUSTIFICATIVA

A biodiversidade dos ecossistemas brasileiros representa um grande potencial natural no mundo contemporâneo. Neste cenário, o *G. spixii* apresenta um papel fundamental na manutenção do ecossistema, auxiliando na dispersão de sementes. Além disso, como sua população é considerada estável, observa-se um potencial científico desses animais como modelo de estudo para outras espécies ameaçadas de extinção. Por essas razões, estratégias voltadas à conservação do *G. spixii* representam importantes avanços científicos.

Nesse cenário, a formação de bancos de amostras somáticas derivadas da pele, mostra-se como uma interessante ferramenta de conservação *ex situ in vitro*. Além de utilizar métodos pouco invasivos e não ser restrito a idade, sexo ou estágio reprodutivo do indivíduo, a criopreservação de recursos somáticos permite o armazenamento de tecidos somáticos por longos períodos. Ainda, como há diferentes métodos de criopreservação para a posterior formação de criobancos, é importante avaliar e identificar qual delas oferece melhores resultados e eficiência na conservação da amostra. Contudo, em *G. spixii*, há uma escassez de estudos relacionados a conservação de tecido somático visando a formação de um criobanco.

Portanto, avaliar diferentes técnicas de criopreservação de tecidos somáticos da pele e cartilagem do pavilhão auricular de *G. spixii*, a partir de técnicas histológicas que possibilitam a avaliação morfológica e proliferativa dessas amostras, bem como avaliar o cultivo *in vitro*, são essenciais para o desenvolvimento de protocolos adequados que garantam a viabilidade dos criobancos de amostras somáticas da espécie.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Comparar a influência das técnicas de criopreservação sobre a conservação da pele e cartilagem auricular de *G. spixii*.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar as alterações na pele e cartilagem das amostras somáticas submetidas às técnicas de criopreservação, utilizando procedimentos de histologia e cultivo *in vitro*;
- Identificar a técnica de criopreservação mais adequada para a conservação de tecidos somáticos de *G. spixii*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Bioética e locais de execução

A presente proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.010566/2017-20), bem como pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no. 60428-1).

O experimento ocorreu no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA) em parceria com o Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA), bem como o Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA).

6.2. Animais e desenho experimental

Quatro *G. spixii* adultos com idade superior a um ano, machos e provenientes do CEMAS/UFERSA, foram utilizados para o experimento. Biópsias de pele e cartilagem do pavilhão auricular foram obtidas e distribuídas em três grupos experimentais (**Figura 3**): fragmentos não-criopreservados (grupo controle) e fragmentos criopreservados por congelamento lento (grupo CL) e por vitrificação em superfície sólida (grupo VSS).

As características morfológicas, morfométricas e proliferativas dos tecidos foram avaliadas a partir de técnicas histológicas. Além disso, o cultivo celular foi empregado para determinar a eficiência das técnicas na recuperação de células somáticas, que puderam ser avaliadas quanto a sua morfologia, viabilidade, proliferação, metabolismo e níveis apoptóticos.

6.3. Obtenção de amostras somáticas por biópsias da pele e cartilagem

Para a obtenção das biópsias da pele e cartilagem, os animais foram anestesiados utilizando cloridato de xilazina (Xilazin[®] 2% na dose de 1 mg/kg) e cloridrato de cetamina (10% na dose de 15 mg/kg), ambos por via intramuscular (PEREIRA et al., 2021). Após confirmado o plano anestésico, foi realizada a coleta de fragmentos (**Figura 4**) provenientes do pavilhão auricular apical utilizando uma tesoura cirúrgica. Em seguida, as amostras foram lavadas em álcool 70% e encaminhadas ao laboratório em tubos cônicos, contendo meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos-antimicótico (COSTA et al., 2020).



Figura 3. Desenho experimental para as avaliações histológicas e celulares derivados do tecido auricular de *G. spixii* antes e após a criopreservação. Fonte: Elaborado pela autora.

No laboratório, as amostras foram novamente lavadas em DMEM, e foi realizada a tricotomia para a remoção dos pelos, bem como a fragmentação das amostras em $9,0 \text{ mm}^3$. Em seguida, os fragmentos foram divididos nos grupos experimentais conforme descrito no desenho experimental.

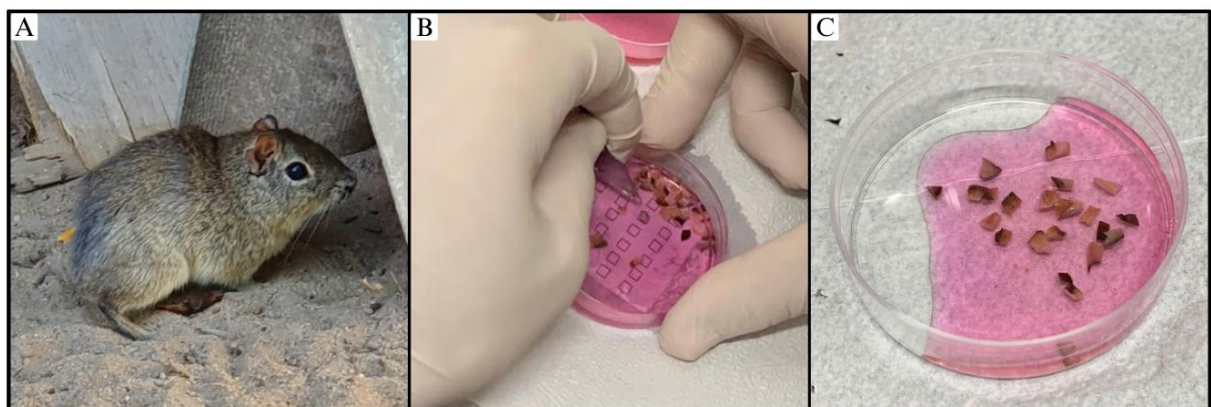


Figura 4. Coleta e processamento de fragmentos derivados da pele de *G. spixii*. (A) *G. spixii* antes do procedimento anestésico. (B) Processamento, esterilização, fragmentação e tricotomia dos tecidos. (C) Fragmentos em $9,0 \text{ mm}^3$. Fonte: Elaborado pela autora.

6.4. Criopreservação dos fragmentos auriculares

6.4.1. Congelação lenta

Para a CL, os fragmentos foram adicionados a criotubos contendo a solução de criopreservação, composta por DMEM acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% SFB e 0,25 M de sacarose (SAC) (CAAMAÑO et al., 2008). Em seguida, os criotubos foram encaminhados ao Mr. Frosty, permanecendo por 15 min a 4 °C. Em seguida, o Mr. Frosty contendo os criotubos foi armazenado em um freezer -80 °C por 12 h, em que a taxa de resfriamento foi de 1 °C/min. Ao final das 12 h, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C).

6.4.2. Vitrificação em superfície sólida

Para a VSS, os fragmentos foram adicionados a criotubos contendo a solução de criopreservação composta por DMEM suplementado com 3,0 M de DMSO, 3,0 M de etilenoglicol (EG) em associação com 0,25 M de SAC e 10% de SFB (RODRIGUES et al., 2021). Para essa etapa, os fragmentos foram expostos a 1,8 mL de solução de criopreservação por um período de 5 min. Em seguida, as amostras foram secas e encaminhadas individualmente a uma superfície metálica parcialmente submersa em nitrogênio líquido (-196 °C). Uma vez vitrificadas, as amostras foram transferidas para criotubos devidamente identificados e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

6.4.3. Aquecimento

Após duas semanas de criopreservação, os fragmentos criopreservados foram aquecidos. Para tanto, os criotubos foram mantidos por 1 min a 25 °C, e em seguida, submersos em banho-maria por mais 5 min a 37 °C. Posteriormente, os fragmentos foram lavados três vezes em solução de DMEM acrescido de 10% de SFB e SAC em concentrações decrescentes (0,50; 0,25 e 0 M), por 5 min cada (COSTA et al., 2020).

6.5. Processamento histológico

Para a confecção das lâminas e análises histológicas, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído tamponado a 4% em PBS por 7 dias. Após a fixação, os fragmentos foram submetidos a desidratação a partir de sucessivas lavagens em soluções crescentes de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%). Em seguida, foi realizada a diafanização em xilol (xilol I e II), para remoção do álcool dos tecidos.

Posteriormente, os fragmentos foram banhados em parafina três vezes, em um período de 1 h cada banho, para a formação dos blocos histológicos (PEREIRA et al., 2021). Os blocos foram cortados em uma espessura de 5,0 μm utilizando um micrótomo. Em seguida, as lâminas foram montadas e desparafinadas em estufa à 60 °C, e posteriormente submetidas às colorações de hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomori e marcação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR).

6.6. Avaliação morfológica, morfométrica e proliferativa usando técnicas histológicas

Para a avaliação morfológica e morfométrica, as lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina, seguindo protocolo padrão para a coloração (COSTA et al., 2020). Após a coloração, foram obtidas 20 fotomicrografias em campos aleatórios das lâminas, em magnitude de 40 $\times$, utilizando um fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica DFC3000 FX; Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, a partir das imagens obtidas, foi realizada a identificação e mensuração da epiderme e suas camadas, derme e pele total (em μm), bem como fibroblastos e halos perinucleares (PEREIRA et al., 2021). Adicionalmente, na cartilagem foram quantificados os condrócitos normais, degenerados e células em lacunas totais e vazias (COSTA et al., 2020). Todas as análises foram realizadas no software Image J.

Para a análise e quantificação das fibras colágenas, foi realizada a coloração de Tricrômico de Gomori, em que os tecidos foram expostos a solução de Bouin, seguido pela coloração de hematoxilina férrica de Weigert associada a solução tricrômica, permitindo a visualização da matriz colágena em azul. Com as lâminas coradas, foram obtidas 10 fotomicrografias em campos aleatórios das lâminas, em magnitude de 40 $\times$, usando um fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica DFC3000 FX; Wetzlar, Alemanha). A partir das imagens obtidas, foi mensurada a proporção volumétrica do tecido em função da área total do tecido, submetido ao cálculo de percentual para obtenção da quantidade total de colágeno por área do tecido analisado (MORAIS et al., 2017). Todas as análises foram realizadas no software Image J.

Para a avaliação da atividade metabólica, as lâminas foram coradas por meio da solução de prata, a qual foi preparada com uma parte de gelatina a 1% em ácido fórmico aquoso e duas partes de 50% de solução aquosa. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução de tiosulfato de sódio (3%) e uma solução de metabissulfeto (3%) durante 30 min. Assim, foram obtidas 12 fotomicrografias em campos aleatórios das lâminas, em magnitude de 100×, usando um fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica DFC3000 FX; Wetzlar, Alemanha). Para avaliar a área de AgNOR/célula (μm^2) e o número de AgNOR/célula, foram selecionados 100 núcleos com o auxílio do software Image Pro Plus (RODRIGUES et al., 2021).

6.7. Cultivo *in vitro* e avaliações

O cultivo *in vitro* foi mantido em solução composta por DMEM suplementado com 10% de SFB e 2% de antibiótico-antimicótico, a 38,5 °C e 6,5% de CO₂. A cada 24 h, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento e confluência celular, e tiveram o meio de cultivo trocado por completo. Ao atingir 70% de confluência, foi realizado o subcultivo celular, por meio da exposição das células a solução enzimática (0,25% tripsina e 0,05% EDTA) por 7 min.

6.7.1. Avaliação morfológica e viabilidade celular

Para a avaliação morfológica, as células foram avaliadas diariamente quanto a sua morfologia, aderência e subconfluência sob fluxo laminar e microscópio invertido (Nikon TS100, Tokyo, Japan) (PRAXEDES et al., 2021).

Para a avaliação da viabilidade celular, uma alíquota de células (20 μL) foi corada com 0,4% de azul de tripan, em que as células não coradas em azul foram consideradas viáveis, enquanto as não-viáveis foram aquelas que se tornaram azuis devido a penetração do corante. A quantificação foi realizada em uma câmera de Neubauer (PRAXEDES et al., 2019). Para a mensuração da taxa de viabilidade, foi utilizada a seguinte fórmula: (nº de células vivas/nº total de células contadas) * 100.

6.7.2. Avaliação da atividade proliferativa e metabólica

Para a análise da atividade proliferativa, uma concentração de $1,0 \times 10^4$ células/mL foi incubada em placas de vinte e quatro poços para elaboração da curva de crescimento e

determinação do tempo de duplicação da população (PDT). As células foram tripsinizadas e contadas em intervalos de 24 a 168 h (ou 7 dias) de cultivo. A cada 24 h as médias das contagens eram registradas.

O PDT foi estimado de acordo com a fórmula: $PDT = T \ln 2 / \ln(Xe/Xb)$,

Onde: T é o tempo de incubação, Xb é o número de células no início do tempo de incubação, Xe é o número de células ao final do tempo de incubação, e ln é o logaritmo neperiano.

Por sua vez, para a avaliação da atividade metabólica, foi realizado o ensaio de MTT, que se baseia na redução metabólica do MTT por desidrogenases ligadas ao NADH e ao NADPH que cliva o sal tetrazólio para cristais de formazan, por células metabolicamente ativas. Para isso, uma concentração de $5,0 \times 10^4$ células/mL foram incubadas a 38,5 °C e 6,5% de CO₂, por 5 dias. Passado esse período, a solução de MTT foi adicionada e as placas foram incubadas por um período de 3 h a 38,5 °C. Em seguida, a solução de MTT foi removida e foi acrescido 1,0 mL de DMSO, sendo realizada uma agitação manual constante por 5 min para solubilização dos cristais de formazan. Finalmente, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro a uma absorbância de 595 nm (PRAXEDES et al., 2019).

6.7.3. Avaliação dos níveis apoptóticos

Quanto à avaliação dos níveis de apoptose, foi realizado por meio da ligação de dois marcadores fluorescentes ao DNA: laranja de acridina (1,0 µg/mL), que penetra a membrana das células viáveis e não-viáveis, além de formar uma fluorescência esverdeada ao reagir com a cromatina, e o brometo de etídio (1,0 µg/mL), que penetra a membrana das células não-viáveis e ao interagir com a cromatina, emite fluorescência vermelha (KOSMIDER et al., 2004).

Após a marcação com marcadores, as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência e as imagens obtidas foram avaliadas no software Image J, para a quantificação das características das células. As células foram consideradas viáveis quando apresentavam núcleo verde claro com características uniformes; em apoptose precoce ou inicial quando o núcleo se mostrasse verde e com aspectos não uniformes; em apoptose tardia quando apresentassem áreas alaranjadas brilhantes e em necrose quando o núcleo fosse laranja uniforme.

6.8. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão, considerando um animal/uma repetição e analisados no software GraphPad (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, EUA). Todos os dados foram avaliados para normalidade com o uso do teste de Shapiro-Wilk, bem como foi aplicado o Teste de Levene para avaliação da homoscedasticidade. Como dados referentes ao teste azul de tripan e atividade metabólica não mostraram uma distribuição normalmente, estes foram transformados em arco-seno. Todos os dados de cultivo *in vitro* foram analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. Já os dados provenientes das análises histológicas de quantificação do AgNOR, quantificação das células e halos perinucleares, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Para todas as análises estatísticas foi considerado $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Análises morfológicas, morfométricas e proliferativas da pele e cartilagem auricular de *G. spixii* após a criopreservação

7.1.1. Avaliação da pele e cartilagem por histologia clássica

Para a avaliação das camadas da pele, as características morfológicas do tecido auricular antes e após a criopreservação por VSS e CL podem ser demonstradas na **Figura 5**. Nesse sentido, pôde-se observar que a pele de *G. spixii* foi constituída por algumas das camadas epidérmicas, bem como por uma camada dérmica e a presença de cartilagem na região. Na região epidérmica, células que constituem a região foram observadas neste estudo, e por isso foram quantificadas. Além disso, considerando as características morfológicas desse tecido, permitiu-se concluir que era uma pele do tipo delgada (fina).

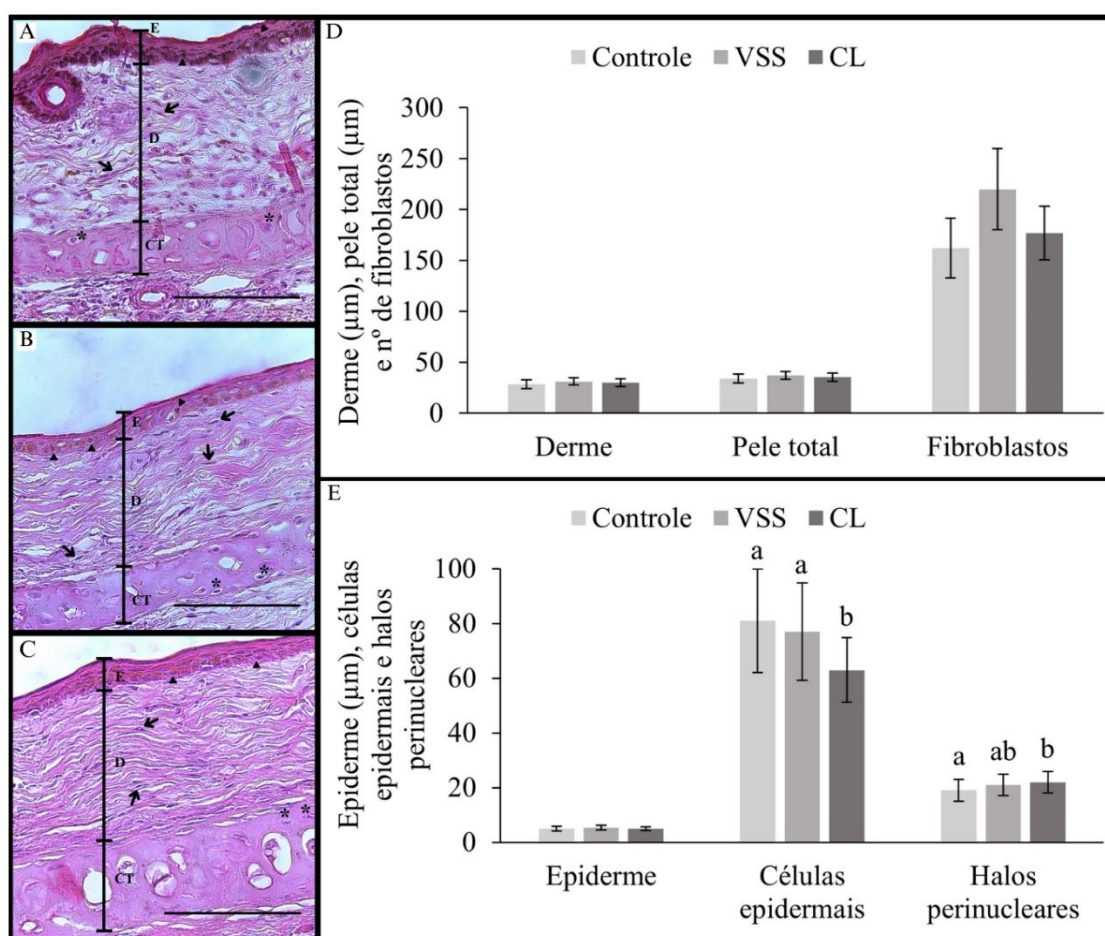


Figura 5. Avaliação histológica de fragmentos teciduais derivados do pavilhão auricular de *G. spixii* corados com hematoxilina-eosina antes e após a criopreservação. (A) Região auricular

controle. **(B)** Região auricular após VSS. **(C)** Região auricular após CL. **(D)** Avaliação da derme (μm), pele total (μm) e quantificação dos fibroblastos. **(E)** Avaliação da epiderme (μm), células da epiderme e halos perinucleares. Epiderme (E). Derme (D). Tecido cartilaginoso (CT). Fibroblastos (seta preta). Células da epiderme (triângulo). Condrócitos (*). Magnitude: 40 $\times$. Barras: 100 μm . Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Inicialmente, sobre as camadas da epiderme, foi verificada apenas a presença da camada córnea, espinhosa e basal. Assim, sobre a camada córnea, uma maior espessura foi verificada na técnica por VSS ($0,99 \pm 0,31 \mu\text{m}$) quando comparado ao controle ($0,81 \pm 0,16 \mu\text{m}$) e CL ($0,92 \pm 0,19 \mu\text{m}$). Apesar disso, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada na camada espinhosa (Controle: $1,69 \pm 0,40 \mu\text{m}$; VSS: $1,92 \pm 0,37 \mu\text{m}$; CL: $1,69 \pm 0,42 \mu\text{m}$) e basal (Controle: $2,23 \pm 0,51 \mu\text{m}$; VSS: $2,10 \pm 0,42 \mu\text{m}$; CL: $2,23 \pm 0,36 \mu\text{m}$). Além disso, nenhuma diferença foi observada após a avaliação da morfometria epidérmica (**Figura 5E**), dérmica e pele total (**Figura 5D**) entre os grupos experimentais.

Além da espessura das camadas da pele, foi realizada a quantificação do número de células presentes na região epidérmica e dérmica, bem como observado o número de halos perinucleares. Portanto, foi verificado que houve uma diminuição no quantitativo celular da epiderme após o emprego da técnica por CL ($63 \pm 11,8$) quando comparado a técnica por VSS ($77 \pm 17,8$) e controle ($81 \pm 18,93$) (**Figura 5E**). Ainda, nesta mesma região, foi observado que a criopreservação por VSS ($21 \pm 3,9$) foi similar ao controle ($19 \pm 4,0$) e CL ($22 \pm 3,9$) quanto a presença de halos perinucleares (**Figura 5E**).

Já no que se refere ao quantitativo populacional de células presentes na região dérmica da pele de *G. spixii*, o número de fibroblastos foi verificado em virtude do seu papel biotecnológico para técnicas *in vitro* na conservação deste roedor silvestre. Contudo, nenhuma diferença significativa pôde-se observar antes e após as técnicas de criopreservação (**Figura 5D**; Controle: $162 \pm 29,3$; VSS: $220 \pm 39,9$; CL: $177 \pm 26,5$).

Finalmente, foi avaliado o quantitativo de condrócitos presentes na região cartilaginosa observado no pavilhão auricular de *G. spixii* (**Figura 6**). Portanto, foi observado que após a criopreservação, a técnica por CL ($10 \pm 1,92$) apresentou um menor quantitativo de condrócitos normais quando comparado ao controle ($14 \pm 2,49$), enquanto a VSS ($11 \pm 2,51$) foi similar ao controle e CL. Ainda, a criopreservação por CL ($7 \pm 1,94$) apresentou um menor número de condrócitos degenerados quando comparado a VSS ($10 \pm 2,32$) e similar ao controle ($9 \pm 2,06$). Apesar disso, a técnica por VSS demonstrou conservar melhor as células presentes em suas

lacunas (Controle: $29 \pm 5,46$; VSS: $32 \pm 4,69$; CL: $23 \pm 4,32$), enquanto a CL apresentava um maior número de lacunas vazias (Controle: $2 \pm 1,56$; VSS: $2 \pm 1,87$; CL: $5 \pm 1,59$) (**Figura 6**).

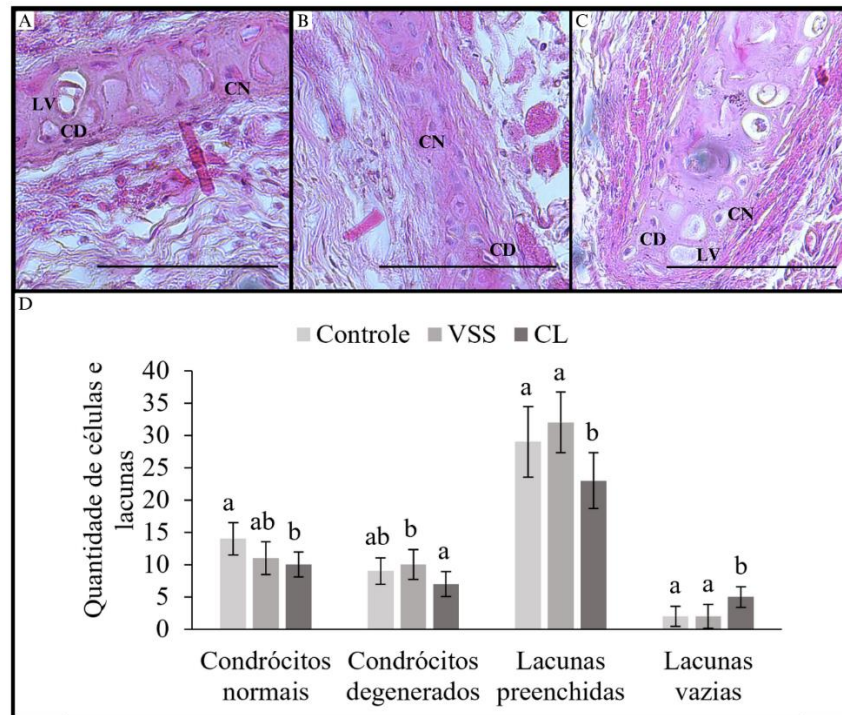


Figura 6. Quantificação de condrócitos e lacunas presentes na cartilagem de fragmentos derivados do pavilhão auricular de *G. spixii* antes e após a criopreservação. (A) Cartilagem da região auricular controle. (B) Cartilagem da região auricular após VSS. (C) Cartilagem da região auricular após CL. (D) Quantificação de condrócitos e lacunas. Vitrficação em superfície sólida (VSS). Congelação lenta (CL). Condrócitos normais (CN). Condrócitos degenerados (CD). Lacuna vazia (LV). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Magnitude: $40\times$. Barras: $100\ \mu\text{m}$. Fonte: Elaborado pela autora.

7.1.2. Avaliação das fibras colágenas e potencial proliferativo de fibroblastos

Para a análise e quantificação das fibras colágenas (**Figura 7**), foi possível observar que a CL ($78,0\% \pm 3,0$) apresentou um menor percentual de fibras colágenas quando comparado a VSS ($85,0\% \pm 3,0$) e controle ($88,0\% \pm 4,0$).

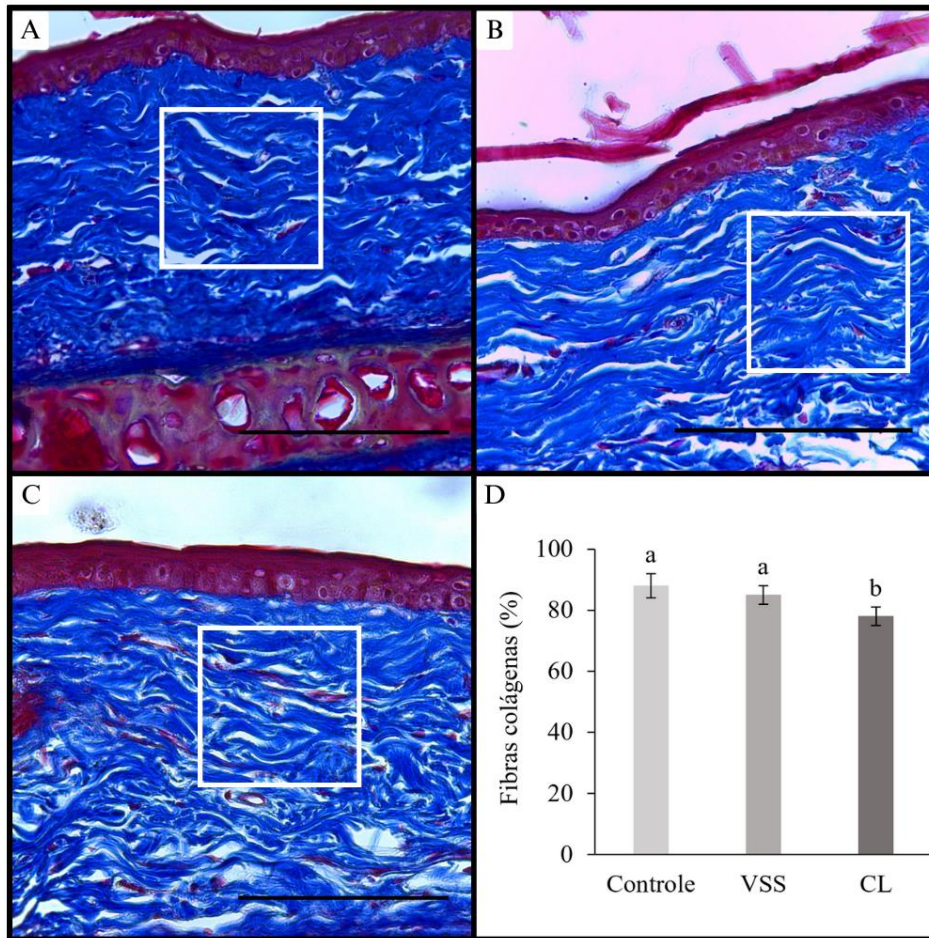


Figura 7. Quantificação de fibras colágenas de fragmentos derivados do pavilhão auricular de *G. spixii* corados com tricrômico de Gomori antes e após a criopreservação. (A) Região auricular controle. (B) Região auricular após VSS. (C) Região auricular após CL. (D) Porcentagem de fibras colágenas antes e após a criopreservação. Vitrificação em superfície sólida (VSS). Congelação lenta (CL). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Magnitude: 40 $\times$. Barras: 100 μ m. Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto à análise da atividade proliferativa, o número (**Figura 8A**), e área de AgNOR/célula (**Figura 8B**) foi avaliada. Inicialmente, foi observado que o número de AgNOR/célula não variou entre os grupos experimentais (Controle: $4,08 \pm 0,17$; VSS: $3,70 \pm 0,32$; CL: $4,08 \pm 0,22$), enquanto para a área de AgNOR/célula a CL ($1,65 \pm 0,47 \mu\text{m}^2$) foi superior ao controle ($1,07 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$) e a VSS ($1,30 \pm 0,31 \mu\text{m}^2$).

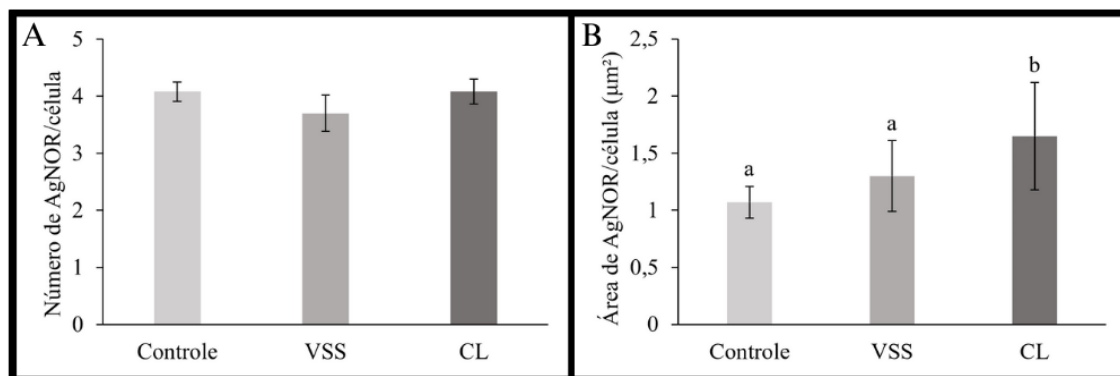


Figura 8. Análise das regiões organizadoras de nucléolos de fragmentos derivados do pavilhão auricular de *G. spixii* antes e após a criopreservação. (A) Número de AgNOR/célula. (B) Área de AgNOR/célula (µm²). Vitricificação em superfície sólida (VSS). Congelação lenta (CL). Média ± erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

7.2. Análise do cultivo primário de tecidos somáticos de *G. spixii* após a criopreservação

Para a avaliação do cultivo *in vitro* de células derivadas do tecido auricular de *G. spixii*, foram encaminhados quatro fragmentos por placa, para todos os grupos experimentais. Assim, quanto ao cultivo, as amostras aderiram a placa no primeiro dia, não havendo diferença na capacidade de adesão tecidual entre os grupos controle e criopreservados (**Tabela 2**). Em geral, quanto ao tempo necessário para crescimento celular em volta de todos os fragmentos (**Figura 9**), o grupo CL necessitou de 8,3 dias, sendo similar ao controle que levou 6,0 dias. O grupo VSS, por sua vez, diferiu dos outros grupos experimentais, precisando de 18,8 dias. Ainda, foi observado um período total de subconfluência para o grupo controle de 20 dias, para a VSS de 32 dias e para a CL de 23 dias.

Além disso, quanto à morfologia celular (**Figura 9**), durante o cultivo primário de todos os grupos experimentais, as células mostraram aspecto fusiforme com prolongamentos citoplasmáticos, além de núcleo central, grande e oval, demonstrando características típicas de fibroblastos.

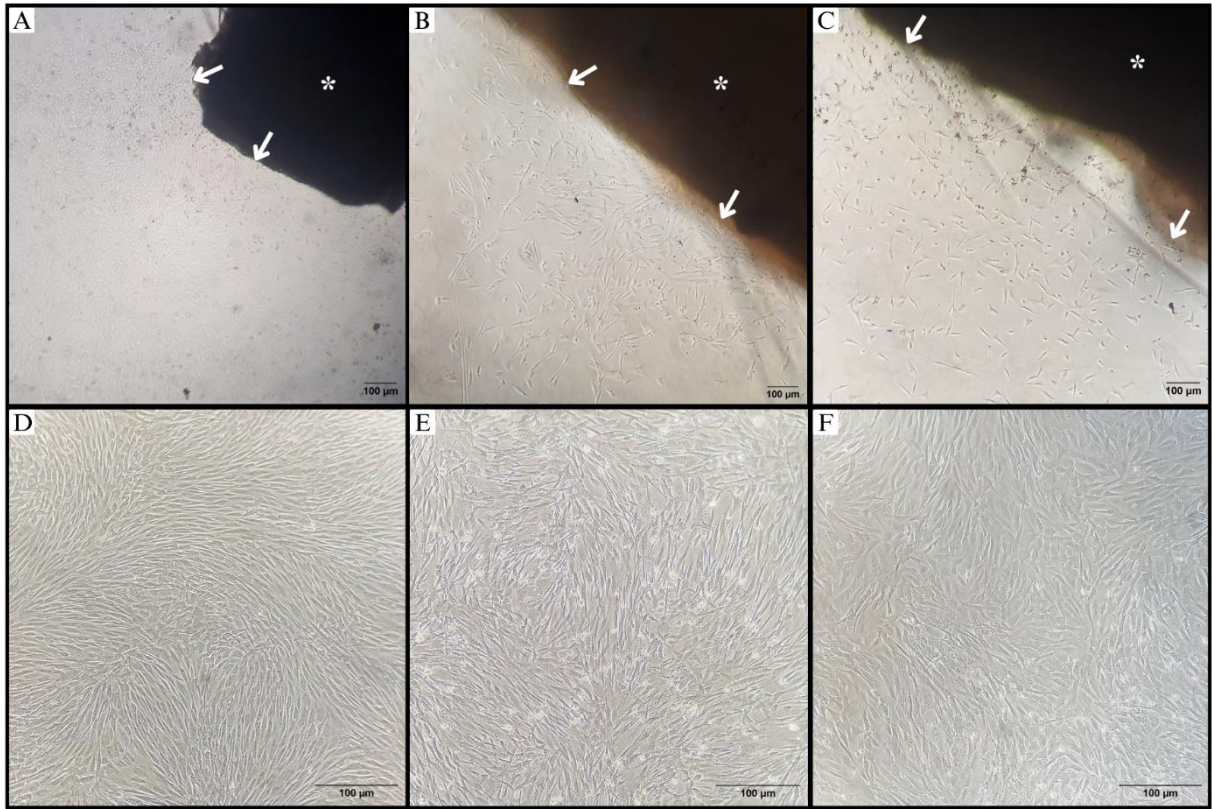


Figura 9. Cultivo *in vitro* de fragmentos derivados do tecido auricular de *G. spixii*. **(A)** Cultivo primário da região auricular controle. **(B)** Cultivo primário da região auricular após VSS. **(C)** Cultivo primário da região auricular após CL. **(D)** Subcultivo celular proveniente de tecido do grupo não-criopreservado (controle). **(E)** Subcultivo celular proveniente de tecido após VSS. **(F)** Subcultivo celular proveniente de tecido após CL. (*) Fragmento tecidual. Seta indica o início do desprendimento celular do tecido no cultivo primário. 4× (A, B, C), 10× (D, E, F).
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1. Estabelecimento de cultivo primário e secundário de células somáticas derivados do tecido auricular de *G. spixii* após criopreservação por vitrificação em superfície sólida (VSS) e congelação lenta (CL).

Grupos	Número de amostras iniciais	Número de fragmentos aderidos (%)	Dia que todos os fragmentos aderiram	Fragmentos com subconfluência	Dia com crescimento celular ao redor de todos os fragmentos	Tempo total de subconfluência	Tempo total de cultivo
Controle	16	16/16 (100)	$1,0 \pm 0,0$	16/16 (100 $\pm$ 0,0)	$6,0 \pm 0,0^a$	$20,0 \pm 0,0^a$	$23,0 \pm 0,0^a$
VSS	16	16/16 (100)	$1,0 \pm 0,0$	16/16 (100 $\pm$ 0,0)	$18,8 \pm 0,3^b$	$32,3 \pm 4,3^c$	$32,3 \pm 4,3^b$
CL	16	16/16 (100)	$1,0 \pm 0,0$	16/16 (100 $\pm$ 0,0)	$8,3 \pm 0,8^a$	$23,0 \pm 0,8^b$	$32,3 \pm 4,3^b$

Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b,c}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$).

7.2.1. Avaliação da viabilidade, potencial proliferativo e metabolismo celular

Quanto à avaliação da viabilidade pelo ensaio de azul de tripan (**Figura 10A**), não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e criopreservados (Controle: $93,8 \pm 0,5\%$; VSS: $81,1 \pm 5,2\%$; CL: $81,5 \pm 5,2\%$), demonstrando então que as técnicas de criopreservação não interferiram na viabilidade das células.

Em relação a atividade proliferativa das células, todos os grupos experimentais apresentaram forma típica de “S”, com presença de uma fase lag, fase exponencial e fase estacionária (**Figura 10B**). Nas primeiras 24 h, o grupo VSS ($17,4 \pm 0,3$) e CL ($24,4 \pm 11,5$) mostraram uma maior concentração celular quando comparado ao controle ($9,3 \pm 1,8$). O mesmo aconteceu no período de 48 h, com o grupo VSS ($33,8 \pm 1,8$) e CL ($42,5 \pm 6,7$) se mostrando superior a concentração do controle ($18,7 \pm 3,5$). Ainda, em 120 h o grupo controle ($66,9 \pm 21,8$) mostrou similaridade com os grupos VSS ($46,8 \pm 2,5$) e CL ($86,9 \pm 30,1$).

Além disso, sobre o PDT (**Figura 10C**), foi avaliado por um período de sete dias, em que foi possível observar um aumento do tempo de duplicação após a VSS ($34,1 \text{ h} \pm 2,9$) quando comparado ao controle ($19,6 \text{ h} \pm 4,3$) e a CL ($24,4 \text{ h} \pm 2,9$). Em relação a atividade metabólica pelo ensaio de MTT (**Figura 10D**), não houve diferença entre os grupos controle e criopreservados (Controle: $94,0 \pm 3,6\%$; VSS: $96,2 \pm 3,6\%$; CL: $87,0 \pm 4,5\%$), sendo mantido o metabolismo celular.

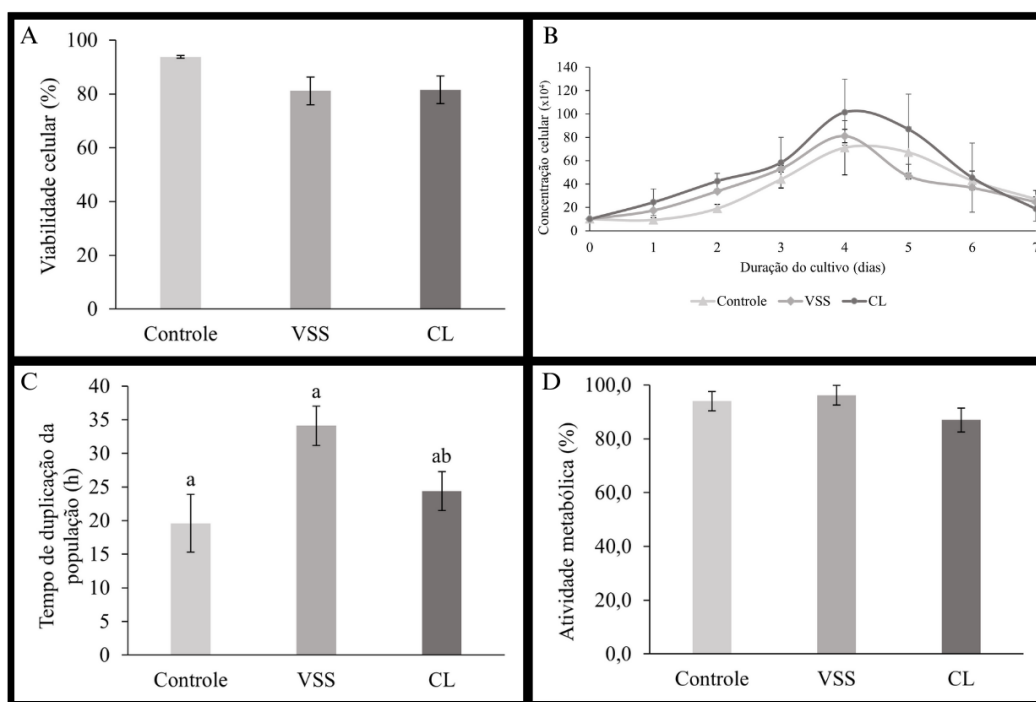


Figura 10. Análise da viabilidade celular, curva de crescimento, PDT e atividade metabólica de células somáticas derivadas da pele auricular de *G. spixii* antes e após a criopreservação. (A)

Viabilidade usando o ensaio de azul de tripan. **(B)** Curva de crescimento das células. **(C)** Tempo de duplicação da população (h). **(D)** Atividade metabólica usando o ensaio de MTT. Vitrificação em superfície sólida (VSS). Congelação lenta (CL). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

7.2.2. Quantificação dos níveis apoptóticos

Finalmente, em relação aos níveis de apoptose das células **(Figura 11)**, foi observada uma redução na porcentagem de células viáveis após a criopreservação (grupo VSS: $48,4 \pm 11,5$; grupo CL: $48,1 \pm 3,0$), quando comparado ao controle ($70,9 \pm 6,3$). Ainda, foi observado um aumento do número de células em apoptose inicial após a criopreservação, em que o grupo CL ($24,0 \pm 6,0$) foi similar ao grupo controle ($13,3 \pm 2,2$) e VSS ($45,4 \pm 9,7$). Por fim, quanto as porcentagens de apoptose tardia e necrose, os grupos criopreservados mostraram-se similar ao grupo controle.

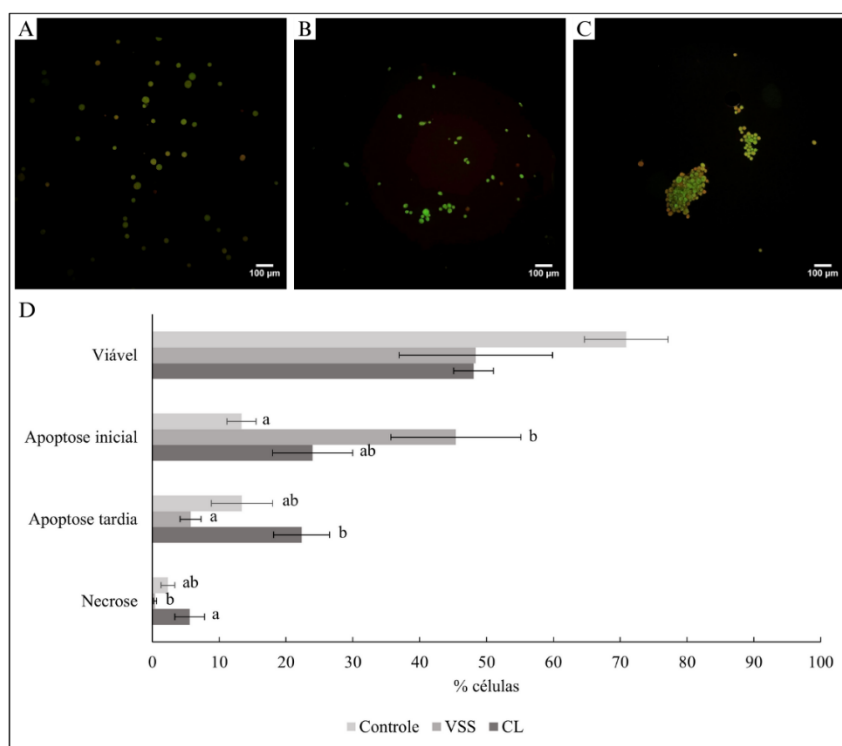


Figura 11. Níveis de apoptose de células somáticas derivadas da pele auricular de *G. spixii* antes e após a criopreservação. **(A)** Células provenientes do grupo controle. **(B)** Células após VSS. **(C)** Células após CL. **(D)** Níveis apoptóticos. Vitrificação em superfície sólida (VSS). Congelação lenta (CL). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão. ^{a,b}: valores com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

8. DISCUSSÃO

A criopreservação tecidual é uma técnica que vêm sendo frequentemente empregada na formação de biobancos em roedores silvestres. Nessa técnica, diferentes protocolos são utilizados com intuito de maximizar a redução dos danos ocasionados pelas baixas temperaturas, garantindo uma melhor viabilidade celular e, portanto, garantindo a possibilidade de uso e desenvolvimento destas células recuperadas em tecnologias reprodutivas independentemente do tempo e espaço (ZACARIOTTI et al., 2013). Para garantir o sucesso no emprego da criopreservação tecidual, é necessário definir o melhor método a ser empregado para a espécie, visando manter a conservação estrutural da amostra criopreservada.

Nesse contexto, em nosso estudo, estabelecemos e comparamos pela primeira vez as técnicas de criopreservação mais empregadas em roedores de laboratório e silvestres (COSTA et al., 2020; TERRACIANO et al., 2020; PERIS-FRAU et al., 2023), como modelo, para a conservação de tecidos somáticos derivados de *G. spixii*, e com base nos resultados obtidos, observamos que a VSS é a técnica mais promissora. Isso ocorre porque além da VSS ter mantido uma melhor qualidade tecidual quando comparado a criopreservação por CL, por meio dessa técnica pôde-se também recuperar células somáticas de *G. spixii* viáveis. Além disso, a VSS é uma técnica que possui uma taxa rápida de resfriamento devido o contato direto com a superfície do metal, permitindo, portanto, uma boa condução de calor, e garantindo a formação do estado vítreo (COSTA et al., 2020). Além disso, a VSS se destaca por ser de fácil execução, baixo custo e possibilidade de utilização em campo quando comparado a CL, sendo um fator essencial para a aplicação da tecnologia de criopreservação tecidual.

Portanto, considerando as análises morfológicas, bem como quantificações celulares, morfometria e potencial proliferativo do tecido somático de *G. spixii*, verificamos que a VSS garantiu uma maior conservação da epiderme e sua camada córnea, um menor quantitativo de halos perinucleares, bem como uma melhor manutenção das lacunas presentes no tecido cartilaginoso. Isso demonstra que a VSS efetivamente reduz a formação de cristais de gelo, pois o acúmulo de cristais de gelo no tecido pode causar danos às células e à estrutura tecidual (PEGG, 1987; BISCHOF et al., 1997), o que não foi observado após a VSS. Além disso, estudos têm demonstrado que a vitrificação evita a distorção do tecido em virtude do gelo (FAHY; WOWK, 2015).

Inicialmente, dentre as camadas da epiderme observadas nesse estudo, verificou-se que apenas na camada córnea houve diferença significativa. Essa é a camada mais superficial da epiderme, sendo composta de células anucleadas, achatadas e ricas em queratina (GARTNER,

2007). Em virtude da sua localização, é vista como uma barreira para proteção da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), atuando também na hidratação tecidual (WANCZINSKI, BARROS, FERRACIOLI, 2007). De modo geral, a camada córnea apresenta espessura muito variável, e em peles finas, como a que é observada em *G. spixii*, é comum encontrarmos uma córnea reduzida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), o que está de acordo com os dados obtidos em nosso estudo. Já em relação as células presentes na epiderme, observou-se que a VSS foi capaz de preservar essas células de maneira mais eficiente em comparação à CL. A manutenção desse quantitativo faz-se importante, pois o decaimento do número de células após a criopreservação pode influenciar no uso dessas células em estudos de interesse biotecnológico (MOCHIDUKI; OKITA, 2012). Por sua vez, quanto aos halos perinucleares, foi observada uma similaridade entre os grupos controle e VSS. A formação de halos perinucleares são indicativos de células em início de apoptose, representando a separação do núcleo celular (BOEKEMA et al., 2015). Portanto, a semelhança encontrada entre esses grupos, sugere que a técnica de VSS foi eficaz na manutenção dessa região.

Na derme, foi realizada a quantificação dos fibroblastos, que são de grande importância para a manutenção dessa camada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017) e são amplamente utilizados em estudos de TNCS e indução de células à pluripotência (PRAXEDES et al., 2020b). Foi observado um elevado número de fibroblastos na região auricular de *G. spixii*, mesmo após a criopreservação, evidenciando a eficácia das técnicas de criopreservação utilizadas. No que diz respeito ao tecido cartilaginoso, foi realizada a quantificação de condrócitos, que representam o principal tipo celular da região, responsáveis pela formação da matriz cartilaginosa e localizadas em lacunas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Através da avaliação de sua morfologia, foi possível identificar condrócitos viáveis e inviáveis. O grupo submetido à VSS mostrou melhor manutenção dessas células, apresentando uma quantidade similar ao grupo controle de condrócitos normais e de lacunas preenchidas e vazias. A eficiente manutenção de fibroblastos e condrócitos são de grande importância, uma vez que esses grupos celulares podem ser empregados como doadores de núcleos para a clonagem por meio da TNCS (COSTA et al., 2016; CETINKAYA et al., 2011), bem como podem ser aplicados em estudos de medicina regenerativa e celular (MIYAMOTO, 2023).

Em relação à quantificação de fibras colágenas, o grupo CL (78%) mostrou um decaimento, enquanto o grupo VSS (85%) mostrou valor similar ao controle (88%). Apesar disso, todos os grupos experimentais mostraram valores superiores ao quantificado por Pereira et al. (2021), para a mesma espécie (72%). Ainda, esses valores foram superiores ao encontrados para *Cuniculus pacas* (50%) por Isola et al. (2013). O decaimento observado no

grupo CL pode estar associado ao tempo em que o crioprotetor leva para penetrar o tecido, causando maiores danos (MARTINS et al., 2020). Por sua vez, o sucesso da VSS pode estar ligado a não exposição dos fragmentos a soluções crioprotetoras durante o aquecimento da amostra (BORGES et al., 2018). Além disso, a variação encontrada na quantidade de fibras colágenas está interligada com a diferença encontrada na quantidade de fibroblastos, uma vez que esses são responsáveis pela síntese de colágeno (ESTEVES; BRANDÃO, 2022).

Ainda, foi realizada a avaliação da atividade proliferativa por AgNOR, que em geral, representam um indicativo de qualidade do material. Quanto ao número de AgNOR/célula, os valores encontrados antes e após a criopreservação não diferiram significativamente, e se mostraram superior ao encontrado para *G. spixii* e *D. leporina* no estudo de Pereira et al. (2021). Já quanto a área de AgNOR/célula (μm^2), o grupo VSS mostrou similaridade ao grupo controle, e ambos corroboram com os resultados encontrados por Pereira et al. (2021) para *G. spixii*, e apresentam área menor quando comparado com o encontrado para *D. leporina* no mesmo estudo. Do mesmo modo, os resultados estão de acordo com o encontrado por Bezerra (2018), ao avaliar células da placenta de *G. spixii*. Os dados obtidos a partir da quantificação de AgNORs indicam o potencial proliferativo (SILVA et al., 2003) das células obtidas do tecido somático de *G. spixii*.

Em síntese, as amostras histológicas submetidas ao grupo VSS demonstraram uma maior similaridade com o grupo controle em comparação ao grupo CL. Assim, foi possível observar uma preservação adequada das camadas da pele, bem como das células da epiderme, fibroblastos e halos perinucleares. Além disso, observou-se a conservação dos condrócitos normais, e das lacunas preenchidas e vazias, bem como da matriz colágena e da área de AgNOR/célula. Deste modo, ao prosseguir para o cultivo *in vitro*, foram obtidas altas taxas de viabilidade e atividade metabólica em ambos os grupos (VSS e CL) após a criopreservação. Ainda, quanto ao tempo de duplicação celular, o grupo VSS diferiu significativamente do grupo controle, enquanto o grupo CL mostrou-se similar. Por outro lado, o grupo VSS apresentou um menor quantitativo de células em apoptose tardia e em necrose, quando comparado ao grupo controle e CL.

Assim, para o cultivo primário, os fragmentos encaminhados ao cultivo aderiram no primeiro dia, dado interessante quando comparado com o observado por Praxedes et al. (2021) em *D. leporina*, em que foi evidenciada a necessidade de 3,7 dias para a adesão dos fragmentos na placa. Para outros animais silvestres, tais como *Leopardus pardalis*, Viana et al. (2023) verificaram a adesão dos fragmentos também no primeiro dia de cultivo. Já quanto aos dias necessários para o crescimento celular ao redor de todos os fragmentos, observou-se que o

grupo VSS necessitou de mais dias para o crescimento celular ao redor de todos os fragmentos, com uma média de 18,8 dias, em comparação ao grupo controle (6 dias) e ao grupo CL (8,3 dias). Contudo, esse maior período não afetou de forma negativa no cultivo *in vitro* em termos de viabilidade e metabolismo. Ainda, é importante destacar que essa média está próximo ao relatado por Seluanov et al. (2010), em que o crescimento de fibroblastos a partir de explantes de diferentes roedores exigiu, em média, 14 dias. Além disso, as células em todos os grupos experimentais apresentaram uma morfologia semelhante à dos fibroblastos.

No que se refere a avaliação da viabilidade celular com o corante azul de tripan, esse ensaio é geralmente utilizado para avaliar o impacto do cultivo *in vitro* na integridade da membrana plasmática das células (MEHRABANI et al., 2014). Nesse método, apenas as células que tiveram sua membrana rompida são coradas em azul (SANTOS et al., 2016). No presente estudo, taxas de viabilidade superiores a 80% foram observadas tanto antes quanto após a criopreservação, indicando que ambas as técnicas contribuíram para a manutenção da viabilidade celular. Resultados semelhantes foram encontrados em células derivados de *D. leporina* por Praxedes et al. (2021). A manutenção da membrana pode estar associada aos crioprotetores extracelulares utilizados, os quais possuem a capacidade de estabilizar as proteínas da membrana, mitigando os efeitos da pressão osmótica durante a criopreservação (SILVA et al., 2017d).

Já na avaliação do metabolismo celular, costuma-se utilizar o ensaio colorimétrico de MTT (GHASEMI et al., 2023), em que o valor de absorbância obtido está diretamente relacionado ao número de células metabolicamente viáveis (OLIVEIRA et al., 2021). Neste estudo, as células recuperadas do cultivo *in vitro* não apresentaram alterações significativas no metabolismo, sendo que o grupo VSS se destacou ao mostrar uma taxa semelhante ao grupo controle, enquanto o grupo CL apresentou uma diminuição na atividade metabólica. A conservação da atividade metabólica também foi observada em *D. leporina*, em diferentes passagens celulares (PRAXEDES et al., 2021). Essa preservação da atividade metabólica está em concordância com as altas taxas de viabilidade celular encontradas nesta pesquisa.

Durante o cultivo *in vitro*, foi gerada a curva de crescimento celular ao longo de sete dias. A curva obtida mostrou um padrão sigmoide consistente antes e após a criopreservação, com fases distintas de crescimento, incluindo uma fase de adaptação, uma fase exponencial e uma fase estacionária. Mesmo após a criopreservação, as células conseguiram aumentar sua concentração celular desde o primeiro dia. Contudo, o grupo VSS apresentou um tempo de duplicação celular maior ($34,1 \text{ h} \pm 2,9$) em comparação ao grupo controle ($19,6 \text{ h} \pm 4,3$) e grupo CL ($24,4 \text{ h} \pm 2,9$). Em um estudo com porquinho-da-índia realizado por Mehrabani et al. (2014),

foi observado um aumento no tempo de duplicação para fibroblastos fetais após a oitava passagem (30 h), mantendo-se, no entanto, uma viabilidade acima de 70%. De forma semelhante, no estudo de Praxedes et al. (2021), as células de *D. leporina* na quinta passagem apresentaram um aumento no tempo de duplicação ($30,8 \text{ h} \pm 3,1$), sem comprometer sua viabilidade (acima de 80%) e atividade metabólica (acima de 90%). No nosso estudo, o grupo VSS manteve a viabilidade acima de 80% e o metabolismo acima de 95%, indicando que, apesar do maior tempo necessário para duplicação da população, as células permaneceram saudáveis e aptas para aplicação em biotecnologias futuras. Dessa forma, a criopreservação por VSS ainda se mostra uma opção mais interessante, especialmente pela sua praticidade de execução em campo.

Quanto aos níveis apoptóticos, os grupos submetidos à criopreservação apresentaram semelhança com o grupo controle em relação às células viáveis. O grupo CL mostrou uma taxa menor de células em apoptose inicial em comparação ao grupo VSS. No entanto, houve um aumento significativo no número de células em apoptose tardia e em necrose no grupo CL, enquanto o grupo VSS apresentou taxas menores do que o grupo controle nesses parâmetros. A formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação pode levar a danos na membrana celular, resultando em morte celular por apoptose ou necrose (CENTIKAYA et al., 2014). Essa explicação justifica as taxas mais elevadas de apoptose e necrose observadas no grupo CL, uma vez que essa técnica favorece uma maior formação de cristais de gelo dentro das células. Esses resultados destacam que as células submetidas à técnica VSS são adequadas para futuras aplicações, uma vez que são viáveis e não apresentaram taxas elevadas de apoptose tardia e necrose, reafirmando a VSS como uma técnica mais interessante.

Portanto, o presente estudo forneceu informações importantes sobre o cultivo *in vitro* e a criopreservação de células somáticas derivadas da pele e cartilagem auricular de *G. spixii*. Ambas as técnicas de criopreservação avaliadas realizaram a manutenção do tecido e possibilitaram a recuperação de células aptas para futuras aplicações biotecnológicas. Dentre as técnicas, a VSS obteve destaque em mais parâmetros, uma vez que proporcionou uma melhor preservação das células da epiderme, fibroblastos, condrócitos normais e fibras colágenas, além de manter altas taxas de viabilidade celular, e apresentar uma menor taxa de apoptose tardia e necrose. Além disso, a VSS pode ser realizada em campo, facilitando a coleta de amostras de animais silvestres como *G. spixii* ou de espécies ameaçadas de extinção, e possui um custo inferior em comparação com a técnica CL.

9. CONCLUSÕES

Ambas as técnicas de criopreservação, VSS e CL, demonstraram eficiência na conservação da pele e cartilagem auricular de *G. spixii*. No entanto, a técnica de criopreservação por VSS se destaca não apenas pela sua facilidade de execução em campo e baixo custo, mas também pela eficiência na manutenção das características morfológicas e morfométricas do tecido auricular de *G. spixii*. Além disso, obteve um bom desempenho no cultivo primário desses fragmentos, permitindo a recuperação de células com altas taxas de viabilidade e metabolismo, e com menor ocorrência de apoptose tardia e necrose. Essas características trazem possibilidades para a utilização dessas células somáticas em biotécnicas, tais como a transferência nuclear de célula somática.

Portanto, os dados obtidos neste estudo representam os primeiros passos para a criação de um biobanco da espécie, o que pode contribuir para a conservação de *G. spixii*, além de permitir o uso desses animais como modelo experimental para espécies filogeneticamente próximas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHO, C.J. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos avançados**, v. 26, p. 151–166, 2012.

AMSTISLAVSKY, S.; BRUSENTSEV, E.; KIZILOVA, E.; IGONINA, T.; ABRAMOVA, T.; ROZHKOVA, I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). **Theriogenology**, v. 83, p. 1056–1063, 2015.

ANDRESEN, E. Ecological roles of mammals: the case of seed dispersal. **Conservation Biology Series**, p. 11–26, 2000.

ARAKI, R.; MIZUTANI, E.; HOKI, Y.; SUNAYAMA, M.; WAKAYAMA, S.; NAGATOMO, H.; ABE, M. The number of point mutations in induced pluripotent stem cells and nuclear transfer embryonic stem cells depends on the method and somatic cell type used for their generation. **Stem Cells**, v. 35, p. 1189–1196, 2017.

ARAV, A.; NATAN, Y.; KALO, D.; KOMSKY-ELBAZ, A.; ROTH, Z.; LEVI-SETTI, P.E.; LEONGS, M.; PATRIZIO, P. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, p. 1161–1168, 2018.

ARRIEIRA, R.L.; MOTA, T.F.M.; FILHO, H.O. Análise cienciométrica da ordem Rodentia (Mammalia: Erethizontidae) como ferramenta para o delineamento de área prioritárias à conservação. **Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 320–355, 2013.

AZUMA, R.; MIYAMOTO, K.; OIKAWA, M.; YAMADA, M.; ANZAI, M. Combinational treatment of trichostatin A and vitamin C improves the efficiency of cloning mice by somatic cell nuclear transfer. **Journal of Visualized Experiments**, v. 134, p. e57036, 2018.

BARBOSA, F.B.C. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 69–94, 2001.

BARCELOS, D.C. Efeitos da atividade turística sobre a fauna de mamíferos terrestres em um parque nacional brasileiro. 2018. 88 f. **Dissertação (Mestrado em Ecologia)** – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

BEZERRA, A.M.R. Revisão taxonômica do gênero *Galea* Meyen, 1832 (Rodentia, Caviidae, Caviinae). 2008. 132p. **Tese (Doutorado em Biologia Animal)** – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BEZERRA, F.V.F.; FAVARON P.O.; MESS, A.M.; JÚNIOR, H.N.A.; OLIVEIRA, G.B.; PEREIRA, A.F.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.F. Subplacental development in *Galea spixii*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, p. 2175–2182, 2018.

BISCHOF, J.C.; RYAN, C.M.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L.; TONER, M. Ice formation in isolated human hepatocytes and human liver tissue. **ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)**, v. 43, n. 4, p. 271–278, 1997.

BLACKBURN, H.D. Biobanking genetic material for agricultural animal species. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 6, p. 69–82, 2018.

BOEKEMA, B.K.H.L.; BOEKESTIJN, B.; BREEDERVELD, R.S. Evaluation of saline, RPMI and DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. **Burns**, v. 41, n. 4, p. 848–852, 2015.

BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. **Cytotechnology**, v. 69, p. 643–654, 2017.

BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 350–356, 2018.

BROCKBANK, K.G.M.; CHEN, Z.Z.; SONG, Y.C. Vitrification of porcine articular cartilage. **Cryobiology**, v. 60, p. 217–221, 2010.

CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ, E. Cryopreservation of brown bear skin biopsies. **Cell Preservation Technology**, v. 6, p. 83–86, 2008.

CAMPOS, L.B.; SILVA, M.A.; BEZERRA, J.A.B.; CASTELO, T.S.; PRAXEDES, E.C.G.; BEZERRA, L.G.P.; LINS, T.L.B.; MENEZES, V.G.; SILVA, A.R. Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 91, p. 77–83, 2019.

CARLETON, M.D.; MUSSER, G.G. Order Rodentia in Wilson, D.E., Reeder, D.M. **Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference**. Johns Hopkins University Press, Baltimore, v. 2, p. 745–752, 2005.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian females in cryobanking. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 236–248, 2011.

CARVALHO, Y.K.P.; ARGÔLO-NETO, N.M.; AMBRÓSIO, C.E.; OLIVEIRA, L.D.J.D.; ROCHA, A.R.; SILVA, J.B.; CARVALHO, M.A.M.; ALVES, F.R. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 590–598, 2015.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Intracellular cryoprotectant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1–17, 2011.

CATZEFLIS, F.; PATTON, J.; PERCEQUILLO, A.; WEKSLER, M. 2016. *Galea spixii*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T8825A22189453.en>> Acesso em: 18 de Junho de 2023.

CETINKAYA, G.; HATİPOĞLU, I.; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, v. 68, p. 65–70, 2014.

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Tools for evaluation of the somatic cells and tissues after cryopreservation in mammals. A review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 820–829, 2016.

COSTA, C.A.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of vitrification techniques on the somatic tissue preservation of agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, p. 165–170, 2020.

DA SILVA SANTOS, S.; BONIFÁCIO, K.M.; DE LUCENA, R.F.P. Use and traditional management of *Galea spixii* (Wagler 1831) and *Kerodon rupestris* (Wied-Neuwied 1820) in the municipalities of Pau dos Ferros, Encanto, and Francisco Dantas (northeastern Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, p. 12446–12462, 2021.

DEMIRCI, B.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing thawing of ovarian cortex in sheep. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 595–600, 2002.

ESTEVES, M.L.D.A.B.; BRANDÃO, B.J.F. Collagen and skin aging. **BWS Journal**, v. 5, p. 1–10, 2022.

FAHY, G.M.; WOWK, B. Principles of cryopreservation by vitrification. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**, p. 21–82, 2015.

FERREIRA, C.F.; CARRIEL GOMES, M.C.; FILHO, J.S.; GRANJEIRO, J.M.; OLIVEIRA SIMÕES, C.M.; MAGINI, R.D.S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, p. 456–460, 2005.

FUKUDA, T.; LINO, Y.; EITSUKA, T.; ONUMA, M.; KATAYAMA, M.; MURATA, K.; MURAYAMA, M.I.; HARA, K.; ISOGAI, E.; KYONO, T. Cellular conservation of

endangered midget buffalo (Lowland Anoa, *Bubalus quarlesi*) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1937–1947, 2016.

GARTNER, L.P. **Tratado de histologia em cores**. Elsevier Brasil, 2007.

GHASEMI, M.; LIANG, S.; LUU, Q.M.; KEMPSON, I. The MTT Assay: A Method for Error Minimization and Interpretation in Measuring Cytotoxicity and Estimating Cell Viability. **Methods in Molecular Biology**, v. 2644, p. 15–33, 2023.

GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 20, p. 661–664, 1950.

GROUT, B.W.W.; MORRIS, G.J. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. **Theriogenology**, v. 71, p. 1079–1082, 2009.

GURRUCHAGA, H.; BURGO, S.; HERNANDEZ, R.M.; ORIVE, L.; SELDEN, C.; FULLER, B.; CIRIZA, J.; PEDRAZ, J.L. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, v. 281, p. 119–138, 2018.

HOU, P.; LI, Y.; ZHANG, X.; LIU, C.; GUAN, J.; LI, H.; ZHAO, T.; YE, J.; YANG, W.; LIU, K.; GE, J.; XU, J.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; DENG, H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. **Science**, v. 341, n. 6146, p. 651–654, 2013.

ISOLA, J.G.M.P.; MORAES, P.C.; RAHAL, S.C.; MACHADO, M.R.F. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 674–682, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. Editorial Médica Panamericana, ed. 13, 2017.

KIGER, A.A.; BAUM, B.; JONES, S.; JONES, M.R.; COULSON, A.; ECHEVERRI, C.; PERRIMON, N. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. **Journal of Biology**, v. 2, p. 27, 2003.

KERBER, L. Imigrantes em um continente perdido: O registro fossilífero de roedores Caviomorpha (Mammalia: Rodentia: Ctenohystrica) do Cenozoico do Brasil. **Terra Didática**, v. 13, p. 185–211, 2017.

KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 563, n. 1, p. 61–70, 2004.

LACHER, T.E. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidae. 1981.

LIMA, J.R.F.; SANTOS, S.S.; LUCENA, R.F.P. Uso de recursos faunísticos em uma comunidade rural do semiárido da Paraíba-Brasil. **Etnobiología**, v. 16, n. 3, p. 36–53, 2018.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**, v. 62, p. 145–151, 2011.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, Á.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, p. 227–233, 2014.

LUZ, V.B.; PIRES, C.; MATIAS, M.; AZEVEDO, H.C. Protocolo para caracterização histológica do ovário de ovinos. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

MACÊDO, L.B.; MOURA, C.E.B.; OLIVEIRA, M.F.; PAULA, V.V.; BEZERRA, F.V.; QUEIROZ, G.F. Immunolocalization of leptin receptor of Spix's Yellow-toothed Cavy (*Galea spixii* Wagler, 1831) ovary. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 558–564, 2018.

MARKOULAKI, S.; MEISSNER, A.; JAENISCH, R. Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse. **Methods**, v. 45, p. 101–114, 2008.

MARTINS, J.C.J.; PRAXEDES, É.A.; DO NASCIMENTO, M.B.; DE AQUINO, L.V.C.; ALVES, N.D.; DE OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Estudo comparativo de técnicas de criopreservação em tecido somático de *Felis silvestres catus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e969986686–e969986686, 2020.

MARTINS, G.V.F. Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. 2009. 125 f. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)** – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2009.

MEHRABANI, D.; MAHBOOBI, R.; DIANATPOUR, M.; ZARE, S.; TAMADON, A.; HOSSEINI, S.E. Establishment, culture, and characterization of Guinea pig fetal fibroblast cell. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, 2014.

MESTRE-CITRINOVITZ, A.C.; SESTELO, A.J.; CEBALLOS, M.B.; BARAÑAO, J.L.; SARAGÜETA, P. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 116, p. 28.7.1–28.7. 14, 2016.

MOCHIDUKI, Y.; OKITA, K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 6, p. 789–797, 2012.

MORAIS, G.B.; VIANA, D.A.; SILVA, F.M.O.; XAVIER JÚNIOR, F.A.F.; FARIAS, K.M.; PESSOA, C.D.Ó.; SILVEIRA, J.A.M.; ALVES, A.P.N.N.; MOTA, M.R.L.; SILVA, F.D.O.; SAMPAIO, C.M.S.; VERDUGO, J.M.G.; EVANGELISTA, J.S.A.M. Polarization microscopy as a tool for quantitative evaluation of collagen using picosirius red in different stages of CKD in cats. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, p. 543–550, 2017.

MOREIRA, S.S.J.; DA SILVA, A.M.; SOUZA, A.L.P.; PRAXEDES, E.C.G.; DE SOUZA JUNIOR, J.B.F.; PEREIRA, A.F.; SILVA, A.R. Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris-and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or *Aloe vera*. **Cryobiology**, v. 99, p. 40–45, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

MIYAMOTO, Y. Cryopreservation of cell sheets for regenerative therapy: application of vitrified hydrogel membranes. **Gels**, v. 9, n. 4, p. 321, 2023.

NARCISO, L.C.; MOREIRA-SÁ, H.; SALVADOR, C.H. **Preá-de-Moleques-do-Sul: Plano de Ação para Conservação [Species Action Plan]**. Florianópolis: Naturalistas, 2020. 48 p.

OLIVEIRA, G.B.; OLIVEIRA, R.E.M.; BEZERRA, F.V.F.; CÂMARA, F.V.; JÚNIOR, H.N.A.; OLIVEIRA, M.F.D. Origem e distribuição da artéria celiaca em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Ciências Animal Brasileira**, v. 18, p. 1–9, 2017.

OLIVEIRA, L.R.D.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, M.B.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.; PEREIRA, A.F. Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20190314, 2021.

PAIVA, S.R.; MCMANUS, C.M.; BLACKBURN, H. Conservation of animal genetic resources—A new tact. **Livestock Science**, v. 193, p. 32–38, 2016.

PEGG, D.E. Ice crystals in tissues and organs. In: **The biophysics of organ cryopreservation**. Boston, MA: Springer US, 1987. p. 117–140.

PEREIRA, A.F.; AQUINO, L.V.C.; NASCIMENTO, M.B.; BEZERRA, F.V.; BORGES, A.A.; PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, M.F. Ultrastructural and morphometric description of the ear skin and cartilage of two South American wild histricognate rodents (*Dasyprocta leporina* and *Galea spixii*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06775, 2021.

PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, A.R. Use of somatic banks for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals-a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 42, p. 104–108, 2018.

PEREIRA, A.F.; SILVA, A.R.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M. Somatic and gonadal tissue cryopreservation: An alternative tool for the germplasm conservation in wild mammals. **Germplasm: Characteristics, Diversity and Preservation**. 2016.

PEREIRA, A.F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K.C.; CARNEIRO, I.S.; AVELARA, S.R.G.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; SOUSA, F.C.; MELO, C.H.S.; MOURA, R.R.; TEIXEIRA, D.I.A.; BERTOLINI, L.R.; FREITAS, V.J.F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 163–172, 2013.

PERIS-FRAU, P.; BENITO-BLANCO, J.; MARTÍNEZ-NEVADO, E.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; PEQUEÑO, B.; MARTINEZ-MADRID, B.; ESTESO, M.C.; 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.

PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.; PEREIRA, A.F. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo Biology**, v. 37, n. 4, p. 258–263, 2018a.

PRAXEDES, É.C.G.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.M.; SILVA, A.R. Reproduction in agouti (*Dasyprocta spp.*): A review of reproductive physiology for developing assisted reproductive techniques. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 1181–1192, 2018b.

PRAXEDES, É.C.G.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; APOLINÁRIO, C.A.C.; BEZERRA, J.A.B.; SOUZA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.F.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, A.R. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 3, p. 594–602, 2017.

PRAXEDES, É.C.G.; LIMA, G.L.; DA SILVA, A.M.; CAMPOS, L.B.; DE SOUZA, C.M.P.; MOREIRA, S.S.J.; DE OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Comparison of different intracellular cryoprotectants on the solid surface vitrification of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*

Lichtenstein, 1823) ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, p. 154–161, 2020a.

PRAXEDES, É.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; SILVA, M.B.; SANTOS, M.V.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 49, n. 1, p. 121–129, 2020b.

PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin—An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). **Cryobiology**, v. 88, p. 15–22, 2019.

PRAXEDES, É.A.; SILVA, M.B.; DE OLIVEIRA, L.R.M.; DA SILVA VIANA, J.V.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)—A study in a wild rodent. **Cryobiology**, v. 98, p. 63–72, 2021.

QUEIROZ NETA, L.B.; LIRA, G.P.O.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; PEREIRA, A.F. Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 54, p. 486–495, 2018.

RAMOS, A.F.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; MARIANTE, A.S. Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 104–107, 2011.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Sobre os mamíferos do Brasil. **Mamíferos do Brasil**, p. 17–26, 2006.

REIS, F.S.; BARROS, M.C.; FRAGA, E.D.C.; DA PENHA, T.A.; TEIXEIRA, W.C.; DOS SANTOS, A.C.G.; DE C, R.D.M.S. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 69–74, 2008.

ROACH, N. 2016. *Cavia intermedia*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T136520A22189125.en>> Acesso em: 18 de Junho de 2023.

RODRIGUES, L.L.V.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.; SANTOS, M.D.C.B.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Evaluation of different cryoprotectant solutions for cryopreservation of somatic tissues of *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758). **Cryoletters**, v. 42, p. 210–219, 2021.

RODRIGUES, M.N.; DE OLIVEIRA, G.B.; DE ALBUQUERQUE, J.F.G.; DE MENEZES, J.D.A.; DE ASSIS NETO, A.C.; MIGLINO, M.A.; DE OLIVIERA, M.F. Aspectos anatômicos do aparelho genital masculino de preás adultos (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Biotemas**, v. 26, n. 1, p. 181–188, 2013.

SALVADOR, C.H. 2021. *Cavia intermedia* (Green Status assessment). **The IUCN Red List of Threatened Species 2021**. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/136520/22189125#green-assessment-information>> Acesso em: 14 de Julho de 2023.

SALVADOR, C.H.; FERNANDEZ, F.A. Population dynamics and conservation status of the insular cavy *Cavia intermedia* (Rodentia: Caviidae). **Journal of Mammalogy**, v. 89, p. 721–729, 2008.

SAMPAIO, D.T.; RUIZ-MIRANDA, C.R.; BELLAN, D.O. Aspectos da caça comercial de preás-gênero *Cavia* Pallas, 1766-em Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Vértices**, v. 14, n. 3, p. 21–36, 2012.

SANTOS, P.R.D.S.; OLIVEIRA, M.F.D.; ARROYO, M.A.M.; SILVA, A.R.; RICI, R.E.G.; MIGLINO, M.A.; ASSIS NETO, A.C.D. Ultrastructure of spermatogenesis in Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction**, v. 147, n. 1, p. 13–9, 2014a.

SANTOS, A.C.; BERTASSOLI, B.M.; VIANA, D.C.; VASCONCELOS, B.G.; DE OLIVEIRA, M.F.; MIGLINO, M.A.; NETO, A.C.D. The morphology of female genitalia in *Galea spixii* (Caviidae, Caviinae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1793–802, 2014b.

SANTOS, A.C.; VIANA, D.C.; BERTASSOLI, B.M.; OLIVEIRA, G.B.; OLIVEIRA, D.M.; BEZERRA, F.V.F.; OLIVEIRA, M.F.; ASSIS NETO, A.C. Characterization of the estrous cycle in *Galea spixii* (Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 89–94, 2015.

SANTOS, A.C.; VIANA, D.C.; OLIVEIRA, G.B.; SILVA, R.S.; OLIVEIRA, M.F.; ASSIS-NETO, A.C. Follicular development and morphological changes in the vaginal epithelium during the estrous cycle of *Galea spixii*. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 2, p. 167–176, 2017.

SANTOS, A.S.R. Vida selvagem: Importância e proteção jurídica. **Programa Ambiental: A Última Arca de Nôe**, p. 1–4, 2011.

SANTOS, K.R.P.D.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.D.; ANTONIO, E.A.; SILVA, F.R.D.; SILVA, K.T.D.; MARINHO, K.S.D.N.; LIMA JUNIOR, N.B.D. Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. 2021.

SANTOS, M.L.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1194–1202, 2016.

SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.; NETA, L.Q.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos silvestres-estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 4, p. 382–386, 2015.

SANTOS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; NETO, A.A. Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 6, p. 877–885, 2012.

SANTOS, S.S.; SOARES, H.K.L.; SOARES, V.M.S.; LUCENA, R.F.P. Conhecimento tradicional e utilização da fauna silvestre em São José da Lagoa Tapada, Paraíba, Brasil. **Etnobiologia**, v. 17, n. 1, p. 31–48, 2019.

SELUANOV, A.; VAIDYA, A.; GORBUNOVA, V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 44, p. e2033, 2010.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; NASCIMENTO, E.F.; NUNES, V.A.; RIBEIRO, A.F.C.; OCARINO, N.M. Quantification of the nucleolar organizer regions (NORs) as a parameter to measure proliferation of granulosa cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 113–116, 2003.

SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.; SOUZA, A.L.P. Assisted Reproductive Techniques on South American Wild Mammals. In: **Insights from Animal Reproduction**. IntechOpen, 2016.

SILVA, A.R.; SILVA, A.M.; PRAXEDES, E.C.G.; PEREIRA, A.F. Conservação de Roedores Histricognatos Silvestres da América do Sul Utilizando Estratégias Reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 231–236, 2017a.

SILVA, A.M.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, É.C.G.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods. **Acta Zoologica**, v. 98, n. 3, p. 285–291, 2017b.

SILVA, A.M.; SOUSA, P.C.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, J.A.B.; DE ARAÚJO LAGO, A.E.; DE OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Comparison of different extenders on the recovery and longevity of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Zygote**, v. 25, n. 2, p. 176–182, 2017c.

SILVA, A.R.; SILVA, M.A.; LIMA, G.L.; SOUZA, A.L.P.; CASTELO, T.S. Strategies for the conservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu* in the caatinga biome Linnaeus, 1758) germplasm. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p. 118–123, 2017d.

SILVA, A.M.; PEREIRA, A.G.; PRAXEDES, E.C.G.; MOREIRA, S.S.J.; OLIVEIRA, M.F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A.R. Vitrification of testicular tissue from adult Spix's yellow-toothed caviés (*Galea spixii*) using different cryoprotectants. In: **Proceedings of the Society for the Study of Reproduction 2019 Annual Meeting**. 2019.

SILVA, M.B.; PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; NASCIMENTO, M.B.; SILVA, H.V.R.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Evaluation of the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. **Zoo Biology**, v. 40, n. 4, p. 288–296, 2021.

SILVA, A.R.; SOUZA, A.L.P.; SANTOS, E.A.A.D.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, P.C.; CASTELO, T.S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, p. 219–234, 2012.

SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; CERVERA, R.P.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. **Theriogenology**, v. 59, p. 1469–1477, 2003.

SILVESTRE, M.A.; SÁNCHEZ, J.P.; GÓMEZ, E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. **Cryobiology**, v. 49, n. 3, p. 221–229, 2004.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S. Histological aspects of canine and feline skin as a tool for dermatopathology. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 177–190, 2009.

TERRACIANO, P.B.; GARCEZ, T.A.; BERGER, M.; DURLI, I.; KUHL, C.P.; BATISTA, V.O.; SCHNEIDER, R.A.; FESTA, J.; PILAR, E.; FERREIRA, C.; PASSOS, E.P.; LIMA, E.C. Ovarian tissue vitrification is more efficient than slow freezing to preserve ovarian stem cells in CF-1 mice. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 13, 2020.

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 425–434, 2012.

TUNSTALL, T.; KOCK, R.; VAHALA, J.; DIEKHANS, M.; FIDDES, I.; ARMSTRONG, J.; PATEN, B.; RYDER, O.A.; STEINER, C.C. Evaluating recovery potential of the northern white rhinoceros from cryopreserved somatic cells. **Genome Research**, v. 28, n. 6, p. 780–788, 2018.

VIANA, J.V.S.; MOURA, L.F.M.P.; PRAXEDES, E.A.; AQUINO, L.V.C.; NASCIMENTO, M.B.; PRAZERES JUNIOR, F.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of vitrification techniques on the formation of skin cryobank of the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Cryoletters**, v. 44, n. 1, p. 47–56, 2023.

VIEIRA, A.C.S.R. Utilização da técnica do AgNOR em Patologia: Uma Revisão de Literatura, 2013.

WAGLER, J. Einige mittherilngen uber thierte mexicos. **Isis**, v. 14. p. 510–535, 1831.

WANCZINSKI, B.J.; BARROS, C.A.D.R.; FERRACIOLI, D.D.L. Hidratação do tegumento cutâneo. **Revista Uningá**, v. 12, n. 1, 2007.

WAKAYAMA, S.; ITO, D.; HAYASHI, E.; ISHIUCHI, T.; WAKAYAMA, T. Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3666, 2022.

YANG, J.G.; DENG, Y.; ZHOU, L.X.; LI, X.Y.; SUN, P.R.; SUN, N.X. Overexpression of CDKN1B inhibits fibroblast proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma filtration surgery. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, p. 343–352, 2013.

ZACARIOTTI, R.L.; BONDAN, E.; DURRANT, B. A importância da conservação *ex-situ* para a preservação de espécies ameaçadas de extinção e/ou endêmicas. **Herpetologia Brasileira**, v. 2, p. 33–35, 2013.