



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

LUANNA LORENN VIEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO NA
CONSERVAÇÃO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE *Dasyprocta leporina*
(LINNAEUS, 1758)**

MOSSORÓ-RN

2020

LUANNA LORENN VIEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO NA
CONSERVAÇÃO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE *Dasyprocta leporina*
(LINNAEUS, 1758)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira

MOSSORÓ-RN

2020

© 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.

R696a Rodrigues, Luanna Lorena Vieira.
Avaliação de diferentes soluções de
criopreservação na conservação do pavilhão
auricular apical de *Dasyprocta leporina*
(Linnaeus, 1758). / Luanna Lorena Vieira
Rodrigues. - 2020.
67 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2020.

1. roedores silvestres. 2. cutia. 3.
biobancos. 4. vitrificação tecidual. 5. tecidos
somáticos. I. Pereira, Alexsandra Fernandes,
orient. II. Título.

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.

LUANNA LORENNIA VIEIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO NA
CONSERVAÇÃO DO PAVILHÃO AURICULAR APICAL DE *Dasyprocta leporina*
(LINNAEUS, 1758)**

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

Defendida em: 03/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
(Presidente da Banca e Orientadora)

M.Sc. Alana Azevedo Borges
(Examinadora)

M.Sc. Érica Camila Gurgel Praxedes
(Examinadora)

Dedico a todos aqueles que são minha base, minha força e minha motivação: Maria Vera Lúcia Vieira Diniz, Maria Verônica Vieira Diniz, Maria Vitória Vieira Rodrigues, Antônio Andrade Diniz e Antônia Vieira da Silva.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial: minha mãe, Maria Vera Lúcia Vieira Diniz, que é a luz da minha vida e razão do meu viver, sempre sinônimo de afeto e carinho. À minha amada tia, Maria Verônica Vieira Diniz, minha segunda mãe, sinônimo de afeto e luta. Aos meus avós, Antônio Andrade Diniz e Antônia Vieira da Silva, os quais amo imensamente. Aos meus padrinhos, Maria de Lourdes Filgueira Rodrigues e Antônio Carlos Rodrigues (*in memoriam*), por todo o incentivo e ajuda desde meus primeiros dias de vida. Ao meu pai, Alfredo Rodrigues Neto, agradeço por todo amor. Aos meus irmãos e irmãs, tias, primos e primas, agradeço a todos vocês por terem sido e por continuarem sendo os pilares da minha vida e por serem minhas maiores motivações até o fim dos meus dias.

Aos meus amigos, em especial, Lara Raquel Cunha de Souza, por ter sido sempre o meu refúgio e sinônimo mais verdadeiro de companheirismo e amizade. Além de Maria Diana Cáritas Barros dos Santos, Matheus Oliveira Fernandes, Amanda Estevam Carvalho, Paulo Victor Medeiros de Freitas e Taymon Pires da Silva por terem dividido grande parte do peso desta jornada comigo e a tornado mais leve de ser enfrentada. Agradeço ainda a Mayumi Sadako Yoda de Paula e Leticia Stephane Lopes de Oliveira Ribeiro por terem sido desde sempre um verdadeiro ponto de apoio e amizade incondicional. Ao meu companheiro, amigo e amor, Marcos Jhonata Alves dos Santos, por todo apoio e incentivo. Sem a amizade e o companheirismo de todos tudo seria mais difícil. Obrigada.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Alana Azevedo Borges, por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho e por todas as conversas e apoio. Além de Matheus Barbosa do Nascimento e Leonardo Vitorino Costa de Aquino por toda ajuda nos experimentos e por estarem sempre dispostos a me ajudar e tirar minhas dúvidas. Além disso, agradeço a todos os outros que formam o Laboratório de Biotecnologia Animal fazendo dele uma verdadeira família.

À minha brilhante orientadora, Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, por ser exemplo de determinação, foco, trabalho, gentileza e inspiração. Obrigada por ter visto em mim qualidades e potencial quando eu mesma não via. Obrigada por todos os ensinamentos, os quais levarei para a vida, e por ter sido a melhor orientadora que eu poderia ter.

Agradeço ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), por possibilitar a utilização dos animais para fins científicos, bem como ao Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira, e o Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva, por possibilitarem a utilização de sua infraestrutura durante a realização dos experimentos deste trabalho.

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).

Ainda, agradeço a banca avaliadora formada por Érika Camila Gurgel Praxedes e Alana Azevedo Borges por todas as considerações, sugestões, auxílio e pelo tempo que dedicaram na leitura deste trabalho visando sempre melhorá-lo. Obrigada pela disponibilidade e gentileza de sempre.

Finalmente, agradeço a mim mesma, por toda determinação e coragem que nunca me permitiram desistir. Agradeço a Deus por estar comigo e ser meu guia em todos os momentos da minha vida.

“Você pode até ter medo, mas ande, caminhe e só não pare.”

Rosa de Saron

RESUMO

A *Dasyprocta leporina* é roedor de grande importância para a manutenção da flora, atuando como dispersor de sementes, além de servir como um modelo experimental. Nesse cenário, o desenvolvimento adequado de bancos de tecidos somáticos nesta espécie representa uma ferramenta interessante para a conservação da biodiversidade. Portanto, o objetivo foi avaliar diferentes soluções crioprotetoras na conservação do pavilhão auricular apical de *D. leporina*. Para tanto, foram utilizadas seis fêmeas pertencentes ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). No laboratório, os fragmentos teciduais foram tricotomizados, fragmentados em 9,0 mm³ e divididos em não vitrificado (grupo controle) e grupos vitrificados pelo método em superfície sólida com a solução base sendo meio essencial mínimo modificado por Dulbecco e 10% de soro fetal bovino com as combinações: etilenoglicol (grupo EG), EG + sacarose (grupo EG-SAC), dimetilsulfóxido (grupo DMSO), DMSO + SAC (grupo DMSO-SAC), EG + DMSO (grupo EG-DMSO) e EG + DMSO + SAC (grupo EG-DMSO-SAC). Todos os grupos foram fixados e processados para análise qualitativa ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise histomorfométrica (mensuração das camadas da pele, matriz extracelular, quantificação de halos perinucleares, células e lacunas) pela histologia clássica e avaliação do potencial proliferativo pela marcação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (um animal/uma repetição) e analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey. A análise ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização das camadas da pele, além da identificação do pericôndrio, da cartilagem e suas lacunas. Além disso, uma visualização geral da espessura desses componentes teciduais foi observada. Quanto à análise da espessura da pele, a epiderme foi reduzida em todos os grupos vitrificados quando comparada aos fragmentos do grupo controle ($P < 0,05$). Contudo, a espessura dos fragmentos do grupo EG não foi alterada pela criopreservação. Além disso, a derme foi apenas reduzida nos grupos EG e DMSO-SAC quando comparados ao controle ($P < 0,05$). Quanto à espessura de pele total, observou-se que EG ($110,8 \mu\text{m} \pm 13,6$), DMSO ($143,7 \mu\text{m} \pm 18,7$) e EG-DMSO-SAC ($125,1 \mu\text{m} \pm 17,9$) não foram afetados pela criopreservação, sendo similar ao controle ($122,2 \mu\text{m} \pm 46,9$). Por outro lado, independente da solução crioprotetora, a espessura do pericôndrio e o número de fibroblastos foram alterados pela criopreservação. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os fragmentos do grupo controle ($5,0 \pm 2,0$) e vitrificados com EG-SAC ($5,0 \pm 4,6$), DMSO-SAC ($8,0 \pm 4,8$), EG-DMSO ($5,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($4,0 \pm 1,8$). Quanto aos halos, o grupo controle apresentou $5,0 \pm 2,0$ e dentre os tratamentos, assemelharam-se ao controle os grupos EG-SAC ($5,0 \pm 4,6$), DMSO-SAC ($8,0 \pm 4,8$), EG-DMSO ($5,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($4,0 \pm 1,8$). Quanto à avaliação da cartilagem, independente da solução crioprotetora, a criopreservação alterou o número de lacunas totais e condrócitos normais ($P < 0,05$). Contudo, apenas o grupo EG-DMSO-SAC manteve o número de lacunas vazias ($13,0 \pm 3,8$) similares ao controle ($11,9 \pm 2,6$). Ainda, fragmentos dos grupos EG ($9,0 \pm 1,9$), DMSO-SAC ($9,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($8,0 \pm 2,4$) mantiveram a quantidade de condrócitos degenerados similar ao controle ($9,0 \pm 2,0$). Quanto à avaliação da matriz proteica, todas soluções de criopreservação resultaram em alteração no percentual de fibras colágenas. Para a análise do potencial proliferativo, exceto o grupo EG, os demais grupos vitrificados foram similares ao controle o número de AgNOR/célula. Já para a área de AgNOR/célula, somente o grupo EG-SAC não reduziu a área por célula. Em síntese, a combinação EG-DMSO-SAC resultou na melhor composição de crioprotetores para a conservação do pavilhão auricular apical de *D. leporina*, evidenciando a possibilidade de usar essa amostra como fonte de células para biotecnologias subsequentes, como a transferência nuclear de células somáticas.

Palavras-chave: roedores silvestres, cutia, biobancos, vitrificação tecidual, tecidos somáticos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colheita, processamento, avaliação morfológica e proliferativa do pavilhão auricular apical de <i>D. leporina</i> submetida a diferentes combinações de crioprotetores na vitrificação em superfície sólida.....	35
Figura 2. Eletrofotomicrografia de varredura do pavilhão auricular apical de cutia. As letras indicam A: controle, B: EG, C: EG-SAC, D: DMSO, E: DMSO-SAC, F: EG-DMSO, G: EG-DMSO-SAC.....	42
Figura 3. (A-G) Cortes histológicos do pavilhão auricular apical de cutias corados com hematoxilina-eosina. (A'-G') , cortes corados com tricrômico de Gomori evidenciando a derme e sua matriz proteica (A''-G'') e coloração pelo método de Weigert Van-Gieson, visando a observação das fibras elásticas que compõem essa matriz. As letras indicam, A: controle, B: EG, C: EG-SAC, D: DMSO, E: DMSO-SAC, F: EG-DMSO, G: EG-DMSO-SAC.....	44
Figura 4. Média de fibroblastos presentes na derme do pavilhão auricular apical criopreservado e não criopreservado de cutia.....	45
Figura 5. Média de halos perinucleares presentes na epiderme do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia.....	46
Figura 6. Seções histológicas da cartilagem do pavilhão auricular apical de cutias coradas com hematoxilina-eosina. As letras indicam A: controle, B: EG, C: EG-SAC, D: DMSO, E: DMSO-SAC, F: EG-DMSO, G: EG-DMSO-SAC.....	47
Figura 7. Média da taxa de colágeno presente na matriz extracelular da derme do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia.....	48

Figura 8. Imagem representativa do pavilhão auricular apical de cutias após marcação com nitrato de prata para a quantificação e mensuração de NORs nos fibroblastos dérmicos. **(A):** NOR (seta) **(B)** e **(C)** Potencial proliferativo da pele não criopreservada e criopreservada de cutia..... 49

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Criopreservação de tecidos somáticos em alguns mamíferos domésticos e silvestres.....	25
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espessura da epiderme, derme, pele total e pericôndrio do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutias.....45

Tabela 2. Quantitativo de lacunas totais, lacunas vazias, condrócitos normais e condrócitos degenerados da cartilagem não criopreservada e criopreservada de cutia.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
AgNOR	Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
DMEM	Meio Essencial Mínimo Modificado por Dullbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dra	Doutora
EG	Etilenoglicol
g/mol	Gramas por mol
h	Hora
HE	Hematoilina-Eosina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
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
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M	Mol
mg/kg	Miligrama por quilo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
nº	Número
NORs	Regiões organizadoras nucleolares
°C	Graus Celsius

PBS	Solução tampão fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucleico
SAC	Sacarose
SFB	Soro Fetal Bovino
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VDC	Vitrificação Direta em Criotubos
VSS	Vitrificação em Superfície Sólida
µm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Adição
±	Mais ou menos
<	Menor que
X	Multiplicação
%	Porcentagem
/	Por

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. Importância da conservação de recursos somáticos em roedores silvestres	20
2.2 Fatores que influenciam na conservação de recursos somáticos	22
2.2.1. Técnica de criopreservação tecidual	22
2.2.2. Crioprotetores intracelulares	24
2.2.3. Crioprotetores extracelulares	27
2.3. Métodos de análise da eficiência da conservação de recursos somáticos	28
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Bioética e locais de execução	34
4.2. Animais e desenho experimental	34
4.3. Obtenção e fragmentação das amostras somáticas	35
4.4. Vitrificação em superfície sólida e aquecimento	36
4.5. Processamento histológico	36
4.6. Análises descritivas e semi-quantitativas.....	37
4.6.1. Análise qualitativa ultraestrutural.....	37
4.6.2. Análise histomorfométrica para avaliação das camadas da pele, quantificação de células e halos perinucleares.....	38
4.6.3. Análise histomorfométrica para avaliação da matriz extracelular.....	38
4.6.4. Análise do potencial proliferativo celular.....	39
4.7. Análise estatística	39
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia é a mais numerosa dos mamíferos placentários, sendo constituída por mais de 2.000 espécies, e correspondendo a 40% das espécies de mamíferos (CARLETON; MUSSER, 2005). Em virtude principalmente da sua adaptação em cativeiros e emprego como fonte de renda, a *Dasyprocta leporina* tem sido uma das espécies da América do Sul mais estudadas, sendo “cutia” o termo descrito para todos os animais do gênero *Dasyprocta* (EMMONS; REID, 2016). Em geral, esses indivíduos possuem hábitos diurnos e habitam matas abertas, pouco densas, longe de rios e reservatórios de água (PATTON; EMMONS, 2015). Embora sua população seja considerada pouco preocupante quanto à extinção, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (PATTON; EMMONS, 2015), o papel ecológico, econômico e científico da *D. leporina* tem intensificado a conservação desta espécie.

Ecologicamente, em virtude de seu aspecto frugívoro, esses animais atuam como dispersores de sementes, os quais realizam a separação destas, a partir da planta-mãe, para locais distantes, enterrando-as no solo (JORDANO et al., 2006; MULLER-LANDAU, 2007). Tais características influenciam a disponibilidade nutricional para os demais mamíferos silvestres, além de permitir a germinação e o crescimento de plantas (LAMBERT; GARBER, 1998; ARAÚJO et al., 2008). Economicamente, as cutias atuam como fonte proteica para subsistência da população local (MÜHLEN, 2005). Adicionalmente, elas podem ainda ser empregadas como modelo de estudo para outras espécies ameaçadas de extinção, principalmente para aquelas do gênero *Dasyprocta*, a *Dasyprocta ruatanica*, *Dasyprocta coibae* e *Dasyprocta mexicana*, as quais se encontram, respectivamente, ameaçada à extinção, quase ameaçada à extinção e criticamente ameaçada à extinção (VÁZQUEZ et al., 2008; SCHIPPER; EMMONS; MCCARTHY, 2016; ROACH; NAYLOR, 2019).

Assim, diante desse cenário, estratégias de conservação, como a formação de bancos de recursos biológicos, podem ser empregadas visando à manutenção da biodiversidade (COSTA et al., 2016). Especificamente em cutias, alguns estudos voltados para a formação de bancos de recursos biológicos já foram desenvolvidos, como a criopreservação de sêmen (CASTELO et al., 2015) e mais recentemente de tecido ovariano (PRAXEDES et al., 2019) e tecido testicular (SILVA et al., 2019). Nesse sentido, dando continuidade à formação desses biobancos, estudos voltados para a criopreservação de tecidos somáticos são alternativas interessantes para a

conservação (SILVA et al., 2017). Brevemente, a criopreservação consiste na redução da temperatura a valores criogênicos, o qual promove a diminuição do metabolismo celular, conservando as amostras por período indeterminado (JANG et al., 2017). Basicamente, esse processo pode ser realizado por três técnicas, as quais são a congelação lenta (CAAMAÑO et al., 2008), congelação rápida (DONNEZ et al., 2004) e vitrificação (BORGES et al., 2017a), os quais diferem quanto às condições de resfriamento e concentração dos crioprotetores.

Em geral, a otimização destas técnicas busca reduzir a formação de cristais de gelo e demais injúrias geradas pela criopreservação, sendo, nos últimos anos, os protocolos de vitrificação os mais empregados para atender esses aperfeiçoamentos e permitir a redução dos custos sem perder a exequibilidade (PRAXEDES et al., 2019). Nesse sentido, a otimização da vitrificação em diferentes espécies depende da escolha adequada do método de vitrificação e dos crioprotetores empregados (CASTRO et al., 2011).

Em *D. leporina*, os primeiros estudos voltados para a criopreservação de tecidos somáticos consistiram na escolha do método de vitrificação (COSTA et al., 2016; COSTA et al., 2020). Assim, esses autores demonstraram que a vitrificação em superfície sólida (VSS) foi o método mais eficiente de conservação de tecidos somáticos derivados do pavilhão auricular de cutias, quando comparado à vitrificação direta em criotubos (VDC). Nesse estudo, os autores empregaram como solução crioprotetora a combinação de 3,0 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 3,0 M de etilenoglicol (EG), 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,25 M de sacarose.

Portanto, sabendo que algumas concentrações de crioprotetores, quando associadas a um tempo considerável de exposição, podem ser tóxicas para as amostras biológicas (CARVALHO et al., 2011), a presente proposta teve como objetivo avaliar diferentes combinações de crioprotetores intra e extracelulares sobre a criopreservação do pavilhão auricular apical de cutias a fim de obter uma solução crioprotetora otimizada, visando contribuir para a conservação da *D. leporina*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância da conservação de recursos somáticos em roedores silvestres

Nos últimos anos, o emprego de bancos de recursos somáticos visando à conservação da biodiversidade tem se intensificado (COSTA et al., 2016), especialmente em virtude do aumento de espécies ameaçadas de extinção e pelas vantagens do uso dessas amostras na manutenção da população genética (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Entre as vantagens do uso de recursos somáticos, têm-se a obtenção de uma quantidade expressiva de tecidos por indivíduos, não se limitando ao gênero e ao estágio reprodutivo, podendo essas amostras ser empregadas na multiplicação de indivíduos usando a clonagem por transferência nuclear de células somáticas, além de possibilitar estudos de reprogramação celular, objetivando a produção de gametas (LEÓN-QUINTO et al., 2014; PRAXEDES et al., 2018) e pesquisas relacionadas ao conhecimento das espécies por análises morfológicas (BORGES et al., 2017b).

Em geral, recursos somáticos podem ser recuperados de animais *in vivo* por biópsia tecidual (BATISTA, 2013) ou *post-mortem* por necropsia (NASCIMENTO, 2019). Em ambas as situações, tecidos epiteliais, conjuntivos e musculares têm sido obtidos a partir de diferentes órgãos, cavidade oral, membros inferiores, medula espinhal, órgãos digestórios e pele. Este último órgão, principalmente da parte auricular periférica, é amplamente utilizado em virtude de ser uma região menos invasiva para o animal, além disso, caracteriza-se por ser uma região que apresenta diferentes tipos celulares (AQUINO, 2019; NASCIMENTO, 2019).

Especificamente em cutias do gênero *Dasyprocta*, avanços na conservação de recursos somáticos têm ocorrido para a elucidação dos conhecimentos morfológicos e fisiológicos de algumas espécies, visando seu uso como modelo para outros roedores e seres humanos. Inicialmente, Conde Júnior et al. (2012) caracterizaram a morfologia e a morfometria de células sanguíneas de *D. prymnolopha*, visando contribuir para o diagnóstico patológico, identificação de células adultas normais, funcionalidade de órgãos hematopoiéticos, ontogênese e diferenciação celular. Nesse estudo, os autores observaram similaridades morfológicas entre *D. prymnolopha* e outros roedores, não observando variações de acordo com o gênero.

Já Silva et al. (2014) realizaram um estudo descritivo analisando, morfológicamente e de forma macroscópica, a morfologia da laringe de cutias (*Dasyprocta* sp.), órgão envolvido nas

funções de respiração, deglutição e fonação desses animais, onde foi observado que a laringe apresenta cinco cartilagens, com ausência da cartilagem cuneiforme e presença da incisura caudal na cartilagem tireoide. Além disso, o tecido epitelial da laringe varia de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado a não queratinizado e ciliado com células caliciformes.

Ainda nesse aspecto de caracterização para conhecimento da espécie, Bezerra et al. (2016) descreveram macro e microscopicamente a morfologia do ceco de *D. prymnolopha*, o qual consiste na porção do intestino grosso, suprido pela artéria mesentérica superior e veia mesentérica (ELLIS; MAHADEVAN, 2011). De acordo com os referidos autores, estudos acerca da morfologia funcional do ceco desses animais poderão fornecer informações importantes a serem utilizadas para o entendimento dos fatores relacionados à digestão desta espécie, bem como em estudos que visem à manutenção desse roedor em cativeiro ou vida livre.

Também para fins de caracterização e conhecimento de espécies, um trabalho recente realizado pelo nosso grupo caracterizou por meio de avaliações morfológicas, morfométricas, proliferativas e ultraestruturais a porção apical do pavilhão auricular de *D. leporina*, visando conhecer a região de colheita de amostras somáticas desses animais, permitindo o direcionamento e otimização de protocolos de cultivo *in vitro*, bem como de criopreservação desses tecidos. Além disso, foi evidenciado que, mesmo apresentando similaridades histomorfométricas, há parâmetros da pele de *D. leporina* que diferem de outros roedores e de outros mamíferos, denotando a importância de estudos de descrição da pele como uma estratégia de conservação (NASCIMENTO, 2019).

Nesse sentido, a formação de bancos de recursos biológicos surge como uma perspectiva à conservação, uma vez que estes são uma ampla fonte de biodiversidade, podendo ser cruciais para o desenvolvimento de estratégias que busquem salvar espécies raras e em perigo de extinção e, ainda, esses bancos permitem o estudo de características derivadas do processo de evolução a nível celular, em diferentes espécies, sem que haja a necessidade de utilização desses animais em tais pesquisas, isolamento de genes que seriam perdidos em caso de extinção da espécie, bem como o isolamento celular, clonagem, estudos de reprogramação celular, indução de células à pluripotência e obtenção de gametas (PRAXEDES et al., 2019; MAHLER; BESSER, 2020).

Finalmente, independente do objetivo em estudo, a criopreservação eficiente dos recursos somáticos representa uma ferramenta fundamental para manter a qualidade das amostras a serem

utilizadas, bem como dos dados a serem coletados e analisados a partir das mesmas, sendo necessária a otimização e direcionamento dos protocolos de criopreservação.

2.2. Fatores que influenciam na criopreservação de recursos somáticos

2.2.1. Técnica de criopreservação tecidual

A criopreservação de tecidos consiste no armazenamento em temperaturas criogênicas de material biológico, resultando na redução do metabolismo celular e manutenção dos aspectos estruturais e funcionais das amostras, as quais deverão ser viáveis após o aquecimento (PEREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2016). Em geral, as técnicas mais utilizadas são a congelação lenta (CAAMAÑO et al., 2008), congelação rápida (SILVESTRE et al., 2002) e a vitrificação (BORGES et al., 2017b).

Basicamente, a congelação lenta e a congelação rápida são caracterizadas pela redução gradual de temperatura associada ao uso de baixas concentrações de crioprotetores em condições de resfriamento controladas por sistema programado (DONNEZ et al., 2004). Tais aspectos evitam um processo desordenado e permite o correto estabelecimento de curvas de resfriamento lentas ou rápidas (LOUTRADI et al., 2008). Já a vitrificação é caracterizada pela redução rápida de temperatura associada com altas concentrações de crioprotetores (YAMAKI et al., 2002). Tais aspectos permitem a diminuição da formação de cristais de gelo, injúrias que resultam na morte celular (CETINKAYA et al., 2014).

Nos últimos anos, a vitrificação vem sendo empregada como método promissor de criopreservação, uma vez que consiste num procedimento de baixo custo, não requerendo equipamentos sofisticados e podendo ser aplicado em diferentes amostras biológicas (SILVA et al., 2015). Essa técnica pode ser realizada por diferentes métodos, sendo a vitrificação em superfície sólida (VSS) e a vitrificação direta em criotubos (VDC), os métodos mais observados (CARVALHO et al., 2011). A VDC consiste na inserção direta dos tecidos em criotubos contendo meio de conservação (SILVESTRE et al., 2003), enquanto a VSS consiste na sobreposição das amostras em uma superfície metálica cúbica parcialmente submersa em nitrogênio líquido e posterior inserção em criotubos (CARVALHO et al., 2011). Nesse sentido, a vitrificação destaca-se por ser considerada como um método barato, uma vez que não requer o

uso de equipamentos sofisticados, além de poder ser utilizada em diferentes ambientes, inclusive em condições de campo, facilitando sua aplicação em animais silvestres (SILVA et al., 2015). Ainda, a VSS destaca-se por não requerer o uso de crioprotetores durante o aquecimento das amostras, evitando assim uma possível ação tóxica desses componentes aos fragmentos em temperatura ambiente (PRAXEDES et al., 2019).

Alguns estudos (**Quadro 1**) vêm sendo realizados buscando observar a influência destas técnicas, tanto em mamíferos domésticos (CENTIKAYA; ARAT, 2011), quanto mamíferos silvestres (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016). Em ursos-pardos (*Ursus arctos*), Caamaño et al. (2008) observaram que tecidos somáticos da pele poderiam ser melhor criopreservados com a otimização dos protocolos de vitrificação, sendo naquele estudo, a congelação lenta a metodologia mais adequada. Em felídeos silvestres, a congelação lenta também tem sido a técnica de escolha para tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*, SONG et al., 2007), lince-ibérico (*Lynx pardinus*, LEÓN-QUINTO et al., 2011) e onça-pintada (*Panthera onca*, MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016).

Por outro lado, Brockbank et al. (2010) não obtiveram sucesso na congelação lenta de tecidos somáticos da região articular em suínos. Nesse estudo, os autores observaram altas taxas de morte de condrócitos e danos na matriz extracelular. Além disso, Caputcu et al. (2013) reforçaram o custo da congelação lenta e o tempo necessário para sua exequibilidade, o qual este último permite uma exposição maior dos tecidos a toxicidade dos crioprotetores (SANTIS et al., 2011).

Nesse sentido, a vitrificação e suas distintas metodologias crescem como técnicas de escolha para a conservação de recursos biológicos. Em mamíferos domésticos, Silvestre et al. (2004) obtiveram sucesso na criopreservação da pele auricular de caprinos, ovinos e bovinos, com taxas de viabilidade celular de 40–75%. Em mamíferos silvestres, como catetos (*Pecari tajacu*), Borges et al. (2017b), descreveram a VSS como procedimento mais apropriado na conservação da pele, apresentando um perfil de crescimento de células mais adequado que as células oriundas da VDC. Praxedes et al. (2019) observaram que a VSS, quando comparada a congelação lenta e vitrificação direta em criotubos, mostrou-se o método mais adequado para a criopreservação da pele auricular de onça-pintada com base nos resultados encontrados tanto na análise histológica quanto no cultivo *in vitro* dos fragmentos

Especificamente quanto aos protocolos de criopreservação de recursos somáticos de cutias, um estudo desenvolvido pelo nosso grupo (COSTA et al., 2020) avaliou a influência dos tipos de técnicas de vitrificação sobre a conservação de tecido somático de *D. leporina*. Nesse estudo, foi observado que a VSS foi mais eficiente na criopreservação de tecidos somáticos derivados do pavilhão auricular apical, quando comparada a VDC, uma vez que as amostras apresentaram um maior quantitativo de fibroblastos e condrócitos normais, menores médias de halos perinucleares, condrócitos degenerados e lacunas vazias. Além disso, a VSS manteve as características morfológicas e morfométricas das amostras semelhantes aos tecidos não submetidos à vitrificação.

2.2.2. Tipos de crioprotetores intracelulares

Os crioprotetores intracelulares são classificados como agentes de baixo peso molecular que conseguem penetrar nas células e são essenciais para a criopreservação dos sistemas biológicos (FAHY, 1986; RALL et al., 1984). Essas substâncias atuam substituindo parcialmente a água do interior das células, reduzindo o ponto de congelação a partir do aumento da viscosidade da solução de congelação e ligando-se a eletrólitos para evitar uma alta exposição ao próprio eletrólito (JAIN; PAULSON, 2006). Em geral, a eficiência dos crioprotetores intracelulares sobre a conservação de tecidos é influenciada por sua concentração, tempo de exposição, tipo de tecido, e organização molecular entre as espécies (CASTRO et al., 2011).

O EG e DMSO são os crioprotetores intracelulares mais utilizados na criopreservação de tecidos (CASTRO et al., 2011). O EG é um álcool obtido a partir da hidrólise do óxido de eteno, apresenta baixo peso molecular (62,07 g/mol) e baixo ponto de fusão (15,6 °C) (NEWTON et al., 1998; MARTINS; CARDOSO, 2005). Contudo, quando metabolizado pelo retículo endoplasmático, essa substância pode gerar componentes tóxicos, entre eles o ácido glicólico e oxalacetato (CASTRO et al., 2011).

Quadro 1. Criopreservação de tecidos somáticos em alguns mamíferos domésticos e silvestres.

Espécie	Técnica empregada	Análises usadas	Principais resultados	Autores
MAMÍFEROS DOMÉSTICOS				
Bovina (<i>Bos taurus</i>), caprina (<i>Capra aegagrus hircus</i>) e ovina (<i>Ovis aries</i>)	Vitrificação direta em palhetas	Confluência, subconfluência, aderência e viabilidade celular.	Taxas de viabilidade de 40 a 75%.	Silvestre et al. (2004)
Bovina (<i>Bos taurus</i>)	Congelação lenta e vitrificação em palhetas	Avaliação morfológica, proliferativa e funcional.	Não houve diferença significativa entre os métodos de criopreservação. Após a vitrificação, 51% do tecido de cartilagem foram viáveis, bem como 61% da suspensão de células primárias de cartilagem.	Cetinkaya; Arat (2011)
MAMÍFEROS SILVESTRES				
Urso-pardo (<i>Ursus arctos</i>)	Congelação lenta e vitrificação direta em criotubos	Aderência, confluência a taxa de proliferação.	Vitrificação resultou numa menor proliferação e maior número de dias para atingir a subconfluência quando comparado a congelação. Portanto, a vitrificação necessita de aperfeiçoamentos.	Caamaño et al. (2008)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	Vitrificação em superfície sólida e vitrificação direta em criotubos	Análises do cultivo, viabilidade, análise proliferativa e funcional.	Vitrificação em superfície sólida apresentou maiores taxas de viabilidade.	Borges et al. (2017b)
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>)	Vitrificação em superfície sólida e vitrificação direta em criotubos	Análise morfológica da epiderme, derme, cartilagem e quantificação de células.	Vitrificação em superfície sólida foi mais eficiente que a vitrificação direta em criotubos, apresentando um maior quantitativo de fibroblastos e condrócitos normais.	Costa et al. (2020)
Onça-pintada (<i>Pantera onca</i>)	Congelação lenta, vitrificação direta em criotubos e vitrificação em superfície sólida	Análise histológica, cultivo <i>in vitro</i> e análise proliferativa, análise de viabilidade e atividade metabólica.	Vitrificação em superfície sólida foi mais adequada com base nos resultados encontrados tanto na análise histológica quanto no cultivo <i>in vitro</i> .	Praxedes et al. (2019)

Quanto ao DMSO, este apresenta peso molecular mais elevado (78,00 g/mol), quando comparado ao EG, e temperatura de congelação de 18,5 °C (BRAYTON, 1986). As vias metabólicas utilizadas pelo DMSO na sua metabolização ainda não são completamente elucidadas, assim como os efeitos que causam em sistemas biológicos (OTSUKI et al., 2002).

Silvestre et al. (2002) vitrificaram com sucesso amostras somáticas de leporinos e suínos utilizando solução composta por 3,58 M de EG e 2,82 M de DMSO. Posteriormente, Silvestre et al. (2004), usando a mesma solução de vitrificação, obtiveram taxas de sobrevivência de 75%, 70% e 40%, respectivamente, para a criopreservação de tecido somático auricular de caprinos, ovinos e bovinos. Nesses estudos, os autores concluíram que essa solução poderia ser utilizada na criopreservação de tecido somático de mamíferos domésticos.

Já com relação aos estudos de criopreservação de amostras somáticas em mamíferos silvestres a solução de vitrificação composta por EG e DMSO também se mostrou eficaz, como foi descrito no trabalho de Caamãno et al. (2008), os quais utilizaram solução de criopreservação composta por 3,58 M de EG, 2,82 M de DMSO e 20% de SFB na criopreservação de pele de urso-pardo.

Por outro lado, Borges et al. (2018a,b) testaram distintos crioprotetores intracelulares, individualmente (3,0 M de EG e 3,0 M de DMSO) em associação com crioprotetores extracelulares (0,25 M de sacarose e 10% de SFB) na vitrificação de tecido somático de catetos, e concluíram que a solução de criopreservação composta por 3,0 M EG e 0,25 M de sacarose com 10% de SFB permitiu a conservação de diversas características do tecido após o aquecimento, corroborando com Borges et al. (2017b), que relataram que os crioprotetores mais utilizados para vitrificação tecidual são EG e DMSO, associados ou não a açúcares e proteínas.

Especificamente em *Dasyprocta leporina*, Costa et al. (2020) realizou o único trabalho em que se observa criopreservação em tecido somático nessa espécie, onde nesse estudo foi utilizado somente uma solução crioprotetora composta por 3,0 M de EG, 3 M de DMSO e 0,25 M de SAC, ou seja, não foram analisadas e comparadas diferentes composições de solução de vitrificação. Nesse sentido, testar e comparar o efeito de diferentes soluções crioprotetoras sobre a conservação da pele auricular desses animais seria de grande importância na busca pelo desenvolvimento de protocolos mais otimizados e direcionados visando a conservação da espécie e utilização da mesma como um modelo de estudo experimental. Ainda, esses trabalhos evidenciam a utilização de crioprotetores extracelulares, denotando sua importância.

2.2.3. Tipos de crioprotetores extracelulares

O desempenho de crioprotetores intracelulares pode ser melhorado quando associados à crioprotetores de ação extracelular (DENNISTON et al., 2000). Os crioprotetores extracelulares são compostos de alto peso molecular que atuam induzindo o aumento da osmolaridade do meio externo fazendo com que a água passe do interior da célula para o meio extracelular, evitando assim a formação de cristais de gelo. Açúcares como a sacarose, lipoproteínas e aminoácidos são exemplos de crioprotetores extracelulares (GONZALES, 2004).

Em geral, a sacarose estabiliza a bicamada lipídica das células fazendo a manutenção dos lipídios na ausência de água e mantendo o transporte de cálcio, além de evitar o estresse osmótico (CROWE; CROWE, 1988). Há vários estudos que relatam o uso da sacarose como agente crioprotetor; contudo, os resultados obtidos variam a depender do protocolo utilizado, do desenho experimental adotado e da espécie (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Nesse sentido, Borges et al. (2018a) analisaram por meio de técnicas histológicas o efeito do uso individual ou associado de EG nas concentrações (3,0 M e 1,5 M) e DMSO nas concentrações (3,0 M e 1,5 M) suplementados com SFB a 10%, acrescidos ou não de sacarose (0,25 M), em tecido somático de catetos. Neste trabalho, 3,0 M de EG acrescido de 10% de SFB e 0,25 M de sacarose foi capaz de manter as características do tecido após a vitrificação, o qual permanecia semelhante ao grupo controle não vitrificado por ter permitido a estabilização das membranas celulares e a inibição da formação de cristais de gelo durante a vitrificação da pele.

Esses autores destacam ainda que o SFB e a sacarose, ambos crioprotetores extracelulares, causam desidratação celular, pois não penetram nas membranas e colaboram para aumento da osmolaridade, o que possibilita atenção especial ao papel do soro em soluções de vitrificação (VAJTA et al., 1999). De forma adicional, para fins de cultivo de células, Cetinkaya; Arat (2011) e Pereira et al. (2013) destacaram a suplementação com 10% de SFB como o protocolo mais utilizado em diferentes linhagens de células somáticas.

Além disso, Caputcu et al. (2013) vitrificaram amostras de cartilagem auricular e tecidos musculares dos membros locomotores bovinos e ovinos, cujos resultados indicaram que a vitrificação pode ser recomendada para criopreservação de tecidos musculares e cartilaginosos.

Os referidos autores utilizaram solução de vitrificação composta por 3,58 M de EG, 2,82 M de DMSO e 20% de SFB, sendo realizada a adição deste último devido ao seu papel relevante no controle do equilíbrio da pressão osmótica da amostra, provavelmente por conter a proteína albumina em sua composição. Portanto, demonstra-se a variedade de resultados que os trabalhos alcançam de acordo com o tipo de crioprotetor que pode ser mais adequado ou não dependendo da espécie em estudo.

2.3. Eficiência da conservação de recursos somáticos usando análises descritivas e semi-quantitativas

Após a criopreservação, é necessário analisar a eficiência e consequências dos procedimentos sobre a amostra criopreservada, já que esta foi submetida a temperaturas criogênicas, podendo apresentar danos celulares que podem comprometer membrana, citoplasma e núcleo (DEMIRCI et al., 2002). Assim, por meio dessas análises tem sido possível compreender os danos e as vantagens da criopreservação na conservação das amostras.

Desse modo, a preparação de lâminas histológicas associadas à análise em microscópico óptico é um procedimento fundamental, de baixo custo e simples para análise da amostra, que pode ser realizado pela própria histologia clássica, considerado o método mais empregado (MATOS et al., 2007). As colorações mais empregadas podem ser classificadas em três classes: corantes que distinguem componentes ácidos e básicos; marcações por sais metálicos que se precipitam nos tecidos e corantes especializados que diferenciam os componentes fibrosos da matriz extracelular (GARTNER; HIATT, 1999).

A hematoxilina e eosina (HE) é a coloração mais utilizada e pertence a primeira classe de corantes, sendo a hematoxilina uma base que é responsável pela coloração em tons de azul escuro de componentes ácidos, principalmente DNA e RNA, e a eosina um ácido responsável pela coloração de constituintes básicos das células em tons de rosa, principalmente o citoplasma (GARTNER; HIATT, 1999). Borges et al. (2017a,b) utilizaram a HE para mensuração das camadas da pele e da epiderme da região auricular de catetos, bem como para a quantificação da presença de diferentes células, como células epidermais, melanócitos e fibroblastos. Ainda nestes trabalhos, a HE permitiu a observação de apêndices cutâneos como arteríolas e capilares

sanguíneas, além de ter sido observado que o tecido segue o padrão normal de mamíferos, apresentando derme, epiderme, camada córnea, intermediária e basal.

Praxedes et al. (2019), utilizando essas mesmas ferramentas na análise na pele de onça-pintada e onça-pintada melânica (*Panthera onca*), observaram a epiderme de ambos os animais apresentando três camadas evidentes e uma camada basal compreendendo uma única camada de células de forma cubóide. A camada espinhosa era geralmente vista com apenas uma camada de células e a camada córnea como uma camada de células mortas e achatadas, sem núcleo.

A referida coloração foi utilizada também por Isola et al. (2013) na avaliação histológica do tegumento de pacas (*Cuniculus paca*), uma espécie de roedor, onde foi observado a presença de quatro a seis camadas celulares na epiderme, bem como tecido muscular evidente, camada basal e a córnea bem delimitados e as camadas intermediárias sendo constituídas pela granulosa e espinhosa não apresentando muita distinção entre si. Além disso, na derme foi observada distinção entre as camadas papilar e reticular. Ainda, Nascimento (2019) utilizou a referida coloração para a mensuração das camadas da pele, bem como para a caracterização de tipos celulares da epiderme e derme, como melanócitos, queratinócitos e fibroblastos e, ainda, para análise da cartilagem quanto as suas lacunas totais, lacunas vazias, condrócitos normais e condrócitos degenerados em pele de *D. leporina*.

Além disso, são utilizadas marcações histoquímicas, como regiões organizadoras nucleolares impregnadas por nitrato de prata (AgNOR), o qual pertence a segunda classe citada dos métodos de coloração. Essa técnica recebe essa denominação por marcar as regiões organizadoras nucleolares (NORs), que constituem os fragmentos de DNA localizados nos braços curtos dos cromossomos e por possuírem afinidade pelos sais de prata (Ag), podendo ser identificados em lâminas histológicas como pontos castanhos ou pretos que possibilitam a avaliação da atividade proliferativa celular (VIEIRA, 2013). Yang et al. (2013) utilizaram o AgNOR para quantificar o potencial proliferativo de fibroblastos em área ocular pós-cirúrgica de coelhos, o qual revelou um perfil de proliferação leve ou moderada de acordo com o número de NORs. Borges et al. (2017a) utilizaram o AgNOR na avaliação proliferativa e foi relatado que o número de AgNORs em catetos foi 2,48 com área de 1,15 μm , sendo similar ao evidenciado em pele humana (JAAFARI-ASHKAVANDI; FATEMI, 2013).

Ainda, Praxedes et al. (2019) avaliaram o potencial proliferativo de fragmentos auriculares obtidos a partir de onça-pintada e de onça-pintada melânica (*Panthera onca*), onde os

referidos autores observaram um quantitativo que variou entre $1,2 \pm 0,2$ e $1,3 \pm 0,2$ de número de AgNOR por célula para as onça-pintada e melânica, respectivamente. Quanto a área de AgNOR por célula, foi observado um quantitativo de $0,8 \pm 0,4$ e $1,9 \pm 0,8 \mu\text{m}^2$ para a onça-pintada e onça-pintada melânica, respectivamente.

Aquino (2019) utilizou a referida coloração na avaliação do potencial proliferativo de preás (*Galea spixii*) e foi observado um quantitativo de $1,36 \pm 0,15$ para número de NORs/célula e $1,01 \pm 0,13$ de NORs de área/célula. Já Nascimento (2019), especificamente em cutias, observou um número de AgNOR por célula de 1,69 bem como uma área de AgNOR de 1,85 na pele do pavilhão auricular desses animais através da referida marcação histoquímica.

Outro exemplo de coloração é o tricrômico de Gomori, o qual possibilita a diferenciação de componentes fibrosos da matriz extracelular e caracteriza-se como um método que consiste em um único passo combinando duas colorações: cromotrópico 2R (ou plasma) e coloração de fibras conectivas (GOMORI, 1950). O processo é realizado em solução de ácido fosfotúngstico acrescida de ácido acético glacial. Depois de realizado, as fibras musculares irão adquirir cor vermelha, o colágeno irá adquirir a cor verde e o núcleo das células será visualizado em tons de azul a preto (GOMORI, 1950). Borges et al. (2017a) utilizaram esta técnica para caracterização de tecido somático auricular periférico de catetos, onde foram observadas fibras colágenas de espessura homogênea. Oliveira Júnior (2014) utilizou a mesma coloração para avaliar a caracterização da morfologia das glândulas salivares maiores em cutias.

Especificamente em *D. leporina*, Nascimento (2019) utilizou o Tricrômico de Gomori para avaliação da matriz colágena da pele do pavilhão auricular desses animais, onde foi possível observar uma taxa de 32% de matriz proteica e uma baixa quantidade de fibras elásticas. Adicionalmente, a coloração de Weigert Van-Gieson tem sido empregada para a quantificação de fibras elásticas e os dados de fibras colágenas e elásticas permite a caracterização mais precisa da matriz extracelular.

Borges et al. (2018a) utilizaram a HE, Tricrômico de Gomori para análise morfométrica e AgNOR para avaliação do potencial proliferativo de tecidos somáticos de catetos após a vitrificação utilizando diferentes concentrações e combinações de DMSO, EG e sacarose, os quais obtiveram resultados significativos. Ainda, Queiroz-Neta et al. (2018) utilizaram HE para avaliação da espessura da epiderme e derme, número de halos perinucleares na epiderme, e

número de fibroblastos na derme, além de AgNOR para avaliação da atividade proliferativa de tecido somático refrigerado por diferentes períodos na mesma espécie.

Já Silva (2015) utilizou o Tricrômico de Gomori na avaliação da matriz de fibras colágenas presente no tegumento de ratas Wistar, onde foi observada uma taxa de 45% desse componente. Ainda, em mamíferos domésticos, gatos e cães, foi observado uma taxa de colágeno de 87% a partir de análises feitas com a referida coloração por Souza et al. (2009).

Outra ferramenta que auxilia na análise de amostras é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual possibilita observar as superfícies dessas amostras através de aproximação da ordem de centenas de milhares de vezes a partir de feixes de elétrons possibilitando a avaliação da estrutura, forma e integridade das mesmas, bem como de possíveis danos que tenham sido causados, como deformações ou outras anormalidades. Além de ser uma técnica de análise bastante precisa devido a grande quantidade de informações que podem ser colhidas a partir da amostra analisada, a MEV também é tida como imprescindível em diversas áreas de estudo (TELES et al., 2017; AQUINO, 2019; SILVA et al., 2019). Nesse sentido, em se tratando especificamente de amostras oriundas de cutias, diversos trabalhos trazem a MEV como ferramenta de análise, como por exemplo, o trabalho de Ciena et al. (2013), os quais analisaram a estrutura do epitélio da língua desses animais, bem como obtiveram a visualização da superfície dorsal desse órgão. Já Silva et al. (2013) utilizaram a referida técnica de análise ultraestrutural na descrição do dente de cutias da espécie *prymnolopha*.

Posteriormente, Oliveira Júnior (2016) utilizando a MEV para a descrição da estrutura morfológica das glândulas salivares maiores de animais da espécie *leporina* para fins de manutenção da mesma em cativeiro. Mais recentemente, Nascimento (2019) utilizou a MEV para aproximação das estruturas de fragmentos de pele auricular apical de *Dasyprocta leporina* sem que houvesse perda da qualidade das imagens obtidas, tendo sido possível a visualização de todos os lados dos fragmentos e de suas camadas constituintes (epiderme, derme, tecido cartilaginoso e fibras da matriz extracelular), bem como uma visão de sua espessura.

Ainda, se tratando de outros mamíferos, Isola et al. (2013) denotaram a possibilidade de avaliação da epiderme, derme, tecido cartilaginoso e glândulas anexas presentes na pele do pavilhão auricular apical de pacas (*Cuniculus paca*). Já Bakeeva et al. (2019) utilizaram a MEV na descrição de células do coração de ratos. No mesmo ano, Aquino (2019), no estudo do pavilhão auricular apical de preás utilizou a ultraestrutura para descrever a pele de preás (*Galea*

spixii) onde foi possível distinguir as camadas a formam (epiderme e derme) bem como o tecido cartilaginoso.

Portanto, a partir das técnicas histológicas e de avaliação de ultraestrutura citadas é possível avaliar a morfologia, potencial proliferativo e viabilidade de tecidos somáticos vitrificados, bem como realizar a caracterização destes, o que é primordial para o sucesso e elucidação da técnica, uma vez que pode proporcionar um maior conhecimento sobre a morfofisiologia da espécie e daquelas filogeneticamente próximas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes crioprotetores na vitrificação em superfície sólida do pavilhão auricular apical de *D. leporina*.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar diferentes crioprotetores intracelulares (DMSO e/ou EG) na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de *D. leporina*;
- Avaliar o efeito da adição de sacarose em combinação com agentes crioprotetores intracelulares em diferentes concentrações (DMSO e/ou EG) na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de *D. leporina*.

4. METODOLOGIA

4.1. Bioética e locais de execução

A presente proposta de trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semiárido (CEUA/UFERSA, no. 23091.001072/2015-92), em conformidade com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no 48633-1).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira) em parceria com o Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira), Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva), Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira) e Laboratório de Microscopia Eletrônica (responsável: Prof. Dr. Jeferson Luiz Dallabona Dombroski).

4.2. Animais e desenho experimental

Um total de seis fêmeas adultas (2 anos de idade) provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, no. IBAMA 1478912) foram utilizados. Esses animais foram mantidos em condições padrões de cativeiro científico e a seleção destes foi realizada em concomitância aos demais experimentos do CEMAS.

Após a colheita e processamento do pavilhão auricular apical, fragmentos foram distribuídos em sete grupos experimentais (**Figura 1**), como descritos a seguir: fragmentos não vitrificados (grupo controle) e fragmentos vitrificados em solução base contendo meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) e as combinações: 3,0 M de EG (grupo EG), 3,0 M de EG e 0,25 M de SAC (grupo EG-SAC), 3,0 M de DMSO (grupo DMSO), 3,0 M de DMSO e 0,25 M de SAC (grupo DMSO-SAC), 1,5 M de EG e 1,5 M de DMSO (grupo EG-DMSO) e 1,5 M de EG, 1,5 M de DMSO e 0,25 M de SAC (grupo EG-DMSO-SAC). Finalmente, amostras vitrificadas e não vitrificadas foram avaliadas para análise

ultra estrutural pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise histomorfométrica (mensuração das camadas da pele, matriz extracelular, quantificação de halos perinucleares, células e lacunas) pela histologia clássica, e avaliação do potencial proliferativo pela marcação das regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR).

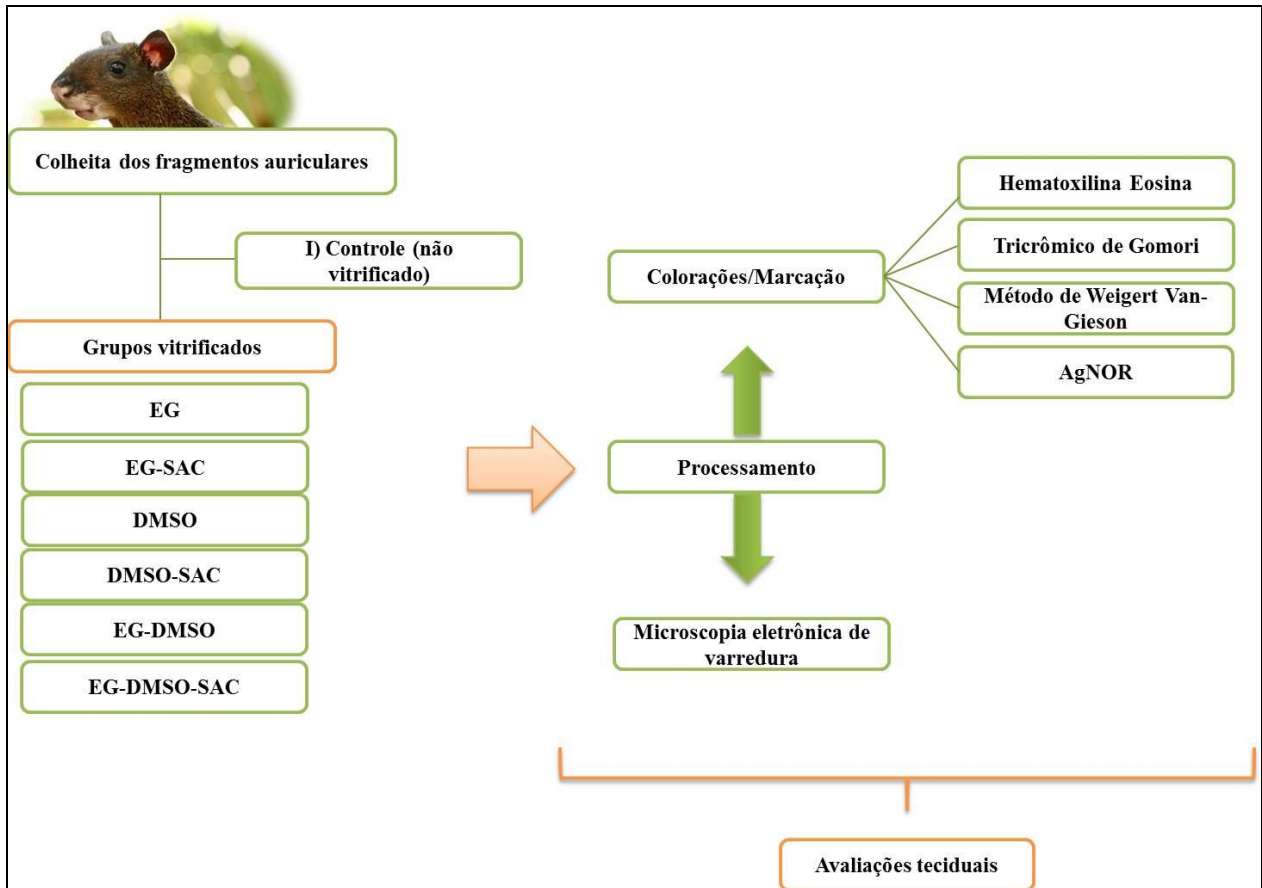


Figura 1. Colheita, processamento, avaliação morfológica e proliferativa do pavilhão auricular apical de *D. leporina* submetida a diferentes combinações de crioprotetores na vitrificação em superfície sólida.

4.3. Obtenção e fragmentação das amostras somáticas

A colheita do pavilhão auricular apical foi realizada após os animais serem submetidos ao protocolo anestésico, usando ketamina-xilazina (1,0 mg/kg) por via intramuscular (CASTELO et al., 2015). Posteriormente, os animais foram eutanasiados a partir da administração de cloreto de potássio por via intracardíaca. A eutanásia desses indivíduos fez-se necessária para atender a

demanda de todos os experimentos realizados por vários discentes da área de Morfofisiologia e Biotecnologia animal que utilizaram tais animais do CEMAS.

As amostras teciduais foram coletadas com auxílio de uma tesoura cirúrgica, em condições assépticas, a partir da região auricular periférica dos animais. Os explantes foram transportados ao laboratório em tubos de 50 mL contendo 25 mL de DMEM a 4°C em um período de até 30 min.

Após o transporte das amostras para o laboratório, estas foram dispostas em placas de Petri contendo DMEM para serem tricotomizadas e logo após foram fragmentadas com lâmina de bisturi em tamanhos de 9,0 mm³ de modo regular para que não houvesse influencia devido a uma possível diferença de tamanho entre esse material. Em seguida, esses fragmentos foram lavados em DMEM para a retirada dos pelos remanescentes (NASCIMENTO, 2019).

4.4. Vitrificação em superfície sólida e aquecimento

Para a vitrificação em superfície sólida, a solução de vitrificação foi elaborada de acordo com os grupos definidos no desenho experimental e todos os procedimentos foram realizados conforme Costa et al. (2020). Assim, 2,0 mL dessa solução foram transferidos para placa de 24 poços, e quatro fragmentos foram inseridos em cada poço, onde permaneceram por 5 min. Após esse período, foi retirado o excesso da solução com papel absorvente. Posteriormente, os fragmentos foram depositados em uma superfície metálica parcialmente submersa em nitrogênio líquido de forma brusca. Finalmente, as amostras vitrificadas foram transferidas para criotubos devidamente identificados, os quais foram armazenados em nitrogênio líquido.

Após duas semanas foi realizado o aquecimento das amostras. Brevemente, os criotubos foram mantidos por 1 min a 25°C e imersos em banho-maria a 37°C. Para remoção dos crioprotetores, os fragmentos foram lavados em DMEM acrescido de 10% de SFB e sacarose em concentrações decrescentes (0,5 M; 0,25 M; 0,0 M) por um período de 5 min em cada solução.

4.5. Processamento histológico

Inicialmente, os fragmentos foram separados naqueles que seriam submetidos ao processamento para a MEV e os que seriam submetidos ao processamento para a histologia.

Assim, estes últimos foram fixados em paraformaldeído a 4% tamponado em PBS por 21 dias, visando interromper o processo de autólise pelo qual qualquer tecido passa ao ser retirado de seu organismo de origem. Após o período de fixação, os fragmentos foram submetidos a banhos em graduação crescente de etanol (70%, 80%, 95% e 100%), para que ocorresse a desidratação do tecido.

Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol, necessário para que o álcool que foi absorvido pelas peças na etapa anterior, insolúvel na parafina, fosse substituído por uma substância apolar e que possuísse afinidade com a parafina, promovendo uma clarificação do tecido. Após a diafanização, os tecidos foram impregnados em parafina, que ao adentrarem nos espaços vazios dos mesmos e solidificar, os deram rigidez suficiente para a realização dos cortes. Em seguida, foram emblocados em parafina líquida para que ela envolvesse o exterior da peça e, após esfriar e endurecer resultasse em um bloco que foi submetido à microtomia (PICULO et al., 2014). Para que fosse possível analisar o tecido em microscópio óptico, foi necessário que estivesse disposto na lâmina uma secção de 5,0 μm do mesmo.

Já os fragmentos submetidos a MEV passaram pelo processamento onde os fragmentos foram fixados em solução de glutaraldeído (2,5%) diluído em 5 mL de PBS (0,1 M e pH 7,4) tamponado por um período de 14 dias. Em seguida, esses fragmentos foram lavados em água da torneira e submetidos a banho de imersão em PBS (0,1 M e pH 7,4) por 10 min, sendo esse procedimento repetido por duas vezes e logo após foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%) até que adquirissem a cor preta, após esse processo os fragmentos foram submetidos a concentrações crescentes de álcool etílico (de 15 a 100%) por 5 min em cada solução para que fossem desidratados.

4.6. Análises descritivas e semi-quantitativas

4.6.1. Análise qualitativa ultraestrutural

Após a desidratação das amostras estas foram depositadas no suporte porta amostras do MEV (“stub”) a fim de serem metalizadas com uma fina camada de ouro (20–30 nm de espessura) para melhorar a condução dos elétrons. Ao final desse procedimento as amostras foram levadas ao microscópio de varredura (Type – VEGA 3 LMU) para visualização e obtenção

das fotoeletromicrografias da pele, a qual foi analisadas quanto as camadas que a formam bem como quanto as estruturas anexas que a compõem. (NASCIMENTO, 2019).

4.6.2. Análise histomorfométrica para avaliação das camadas da pele, quantificação de células e halos perinucleares

Os cortes histológicos foram submetidos a banhos em solução de hematoxilina e, em seguida, na solução de eosina. A hematoxilina por possuir caráter básico, tem atração por substâncias ácidas presentes nos tecidos, como os núcleos e ácidos nucleicos, corando-os em azul-púrpura. Já a eosina, sendo ácida, cora o citoplasma, as fibras colágenas e outras estruturas compostas por substâncias com caráter básico (acidófilas), corando-os em vermelho.

Para as análises, foram obtidos 20 registros fotográficos de campos aleatórios de cada lâmina em aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha). Em cada lâmina (uma lâmina/ um animal) foi realizada a identificação e mensuração da epiderme, derme e pele total (em μm). Além disso, na derme e epiderme, respectivamente, foram contabilizados os fibroblastos e os halos perinucleares, os quais surgem nos estágios iniciais da apoptose, quando o núcleo se separa do citoplasma (BOEKEMA et al., 2015).

Na cartilagem, foram contabilizados condrócitos, os quais foram considerados normais quando apresentavam formato arredondado e degenerados quando apresentavam aspecto necrótico sem distinção entre núcleo e citoplasma, bem como suas lacunas, sejam elas totais e vazias, além da mensuração do pericôndrio (em μm). Para todas as análises, foi utilizado o software Image J (BORGES et al., 2017a).

4.6.3. Análise histomorfométrica para avaliação da matriz extracelular

A análise da matriz extracelular foi realizada conforme a quantificação das fibras colágenas e elásticas. Brevemente, cortes histológicos foram expostos à solução de Bouin, constituído por ácido pícrico, formol e ácido acético glacial. Em seguida, núcleos foram corados com hematoxilina férrica de Weigert. Com a solução tricrômica, o citoplasma foi corado em vermelho e o colágeno foi corado em azul. Finalmente, uma solução de ácido acético foi usada

para enxaguar as seções após a coloração, produzindo um tom mais delicado de coloração do tecido.

Já a quantificação de fibras elásticas foi realizada por coloração de Weigert Van-Gieson (Método de Weigert), onde foi possível visualizar as fibras elásticas em tom azul escuro, os núcleos celulares em tons de azul a preto, o colágeno em tons de róseo a vermelho e outros elementos corados em amarelo.

Para as análises, foram obtidos 10 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha). Em cada lâmina (uma lâmina/um animal) foi analisada a proporção volumétrica da matriz proteica. Para todas as análises, foi utilizado o software Image J para mensuração da proporção volumétrica do tecido onde foi subtraído do valor de área total da imagem o valor de área com matriz proteica, obtendo-se o percentual (MORAIS et al., 2017).

4.6.4. Análise do potencial proliferativo celular

Inicialmente, os cortes histológicos foram colocados em solução de coloração de prata preparada em 1 parte de gelatina a 2% em ácido fórmico aquoso a 1% e 2 partes de solução aquosa a 50% de nitrato de prata em câmara escura, lavados e expostos à solução de metabissulfito de sódio e tiosulfato de sódio. Finalmente, foram avaliados os pontos escuros marcados pelo nitrato de prata ligado a proteínas do núcleo e contabilizados de acordo com a localização que a célula foi marcada (BORGES et al., 2018a).

Para as análises, foram obtidos 20 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 100x por meio de fotomicroscópio (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha). Nas oito lâminas (uma lâmina/um animal), foram contados, em cada grupo, 100 núcleos de células corados e selecionados aleatoriamente, onde serão calculadas as médias da área de AgNOR/célula e quantidade de AgNOR/célula. Para todas as análises, foi utilizado o software Image Pro-Plus para contabilização dos núcleos (YANG et al., 2013).

4.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Para cada comparação foi considerado um animal/ uma repetição. Para todas as análises foi utilizado o software Graphpad Instat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Todos os resultados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA (comparações múltiplas) seguido pelo teste de Tukey. A significância foi considerada quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise qualitativa ultraestrutural

Para a análise qualitativa ultraestrutural do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutias foi realizada a MEV dos fragmentos teciduais, a qual permitiu uma aproximação das estruturas sem perda da qualidade da imagem, visualização das camadas que formam a pele, visualização da cartilagem e suas lacunas, as quais foram caracterizadas como estruturas onde localizam os condrócitos, sendo estes as principais células do tecido cartilaginoso. Além disso, foi possível uma visualização geral da espessura desses componentes teciduais. Ainda, em algumas imagens foi possível observar a presença de pelos, um dos anexos da pele, em seus locais de saída a partir da epiderme.

Em se tratando das características morfológicas observadas nas amostras de cada grupo experimental foi possível observar a presença de danos no tecido, como separação e retração das camadas celulares, bem como o desprendimento de células, o que pode ser mais observado na imagem B, podendo esses danos terem sido causados em virtude das etapas do processamento pelo qual as amostras são submetidas antes da visualização (fixação, pós-fixação, desidratação e metalização em ouro) ou devido a técnica de vitrificação empregada na criopreservação dessas amostras. Deste modo, a análise ultraestrutural desse tecido permitiu uma análise morfológica descritiva do tecido (**Figura 2**).

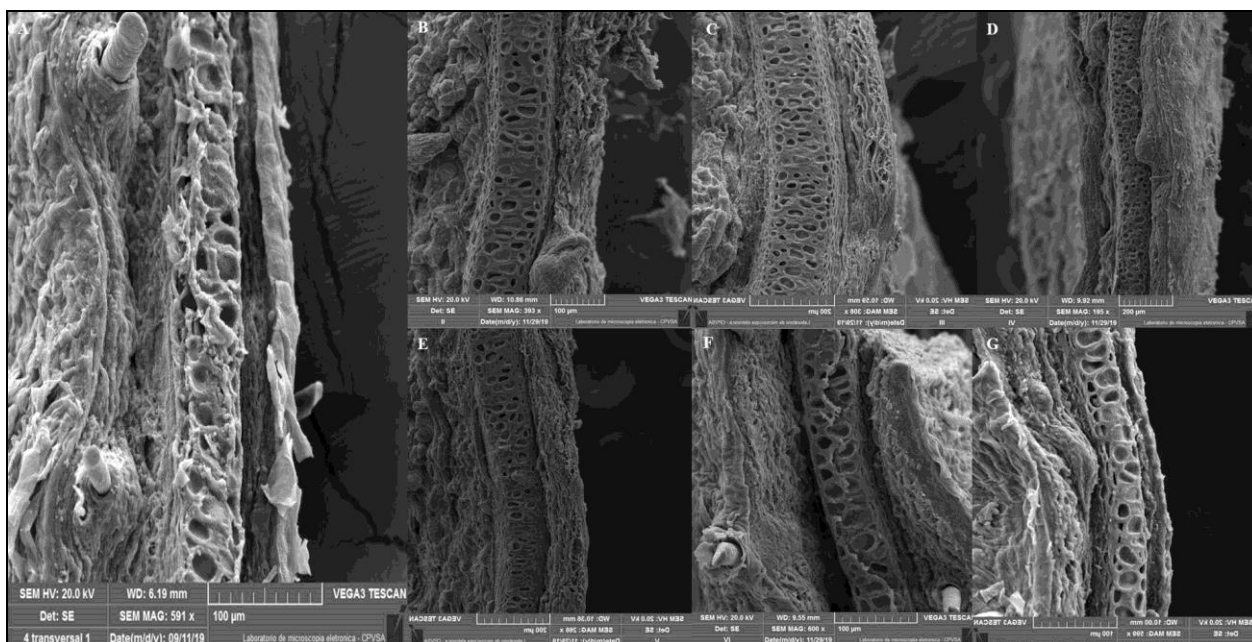


Figura 2. Eletrofotomicrografia de varredura do pavilhão auricular apical de cutia. As letras indicam **A:** controle, **B:** EG, **C:** EG-SAC, **D:** DMSO, **E:** DMSO-SAC, **F:** EG-DMSO, **G:** EG-DMSO-SAC.

5.2. Análise histomorfométrica para avaliação das camadas da pele, quantificação de células e halos perinucleares

Quanto à avaliação das camadas da pele, a partir da microscopia de luz foi possível nitidamente identificar a epiderme e derme da pele não criopreservada (controle) e criopreservada em diferentes aspectos histológicos (**Figura 3**). Assim, o grupo controle apresentou como espessura em micrômetros da epiderme, derme e pericôndrio, respectivamente: $16,4 \mu\text{m} \pm 1,9$; $104,6 \mu\text{m} \pm 46,9$ e $15,2 \mu\text{m} \pm 3,4$. Ainda, com relação à pele total foi observada uma espessura de $122,2 \mu\text{m} \pm 46,9$.

Dentre os tratamentos, a epiderme foi reduzida em todos os grupos vitrificados quando comparada aos fragmentos do grupo controle (**Tabela 1**). Contudo, a espessura dos fragmentos do grupo EG não foi alterada pela criopreservação ($P > 0,05$). Já com relação à derme, sua espessura foi apenas reduzida nos grupos EG e DMSO-SAC quando comparados ao controle (**P Tabela 1**). Quanto à espessura de pele total, observou-se que EG ($110,8 \mu\text{m} \pm 13,6$), DMSO

(143,7 $\mu\text{m} \pm 18,7$) e EG-DMSO-SAC (125,1 $\mu\text{m} \pm 17,9$) não foram afetados pela criopreservação, sendo similar ao controle (122,2 $\mu\text{m} \pm 46,9$).

Por outro lado, independente da solução crioprotetora empregada, a espessura do pericôndrio (**Tabela 1**) e o número de fibroblastos (**Figura 4**) foram alterados pela criopreservação. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os fragmentos do grupo controle ($5,0 \pm 2,0$) e vitrificados com EG-SAC ($5,0 \pm 4,6$), DMSO-SAC ($8,0 \pm 4,8$), EG-DMSO ($5,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($4,0 \pm 1,8$). Quanto aos halos, o grupo controle apresentou $5,0 \pm 2,0$ e dentre os tratamentos, assemelharam-se estatisticamente ao grupo controle os grupos EG-SAC ($5,0 \pm 4,6$), DMSO-SAC ($8,0 \pm 4,8$), EG-DMSO ($5,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($4,0 \pm 1,8$) (**Figura 5**).

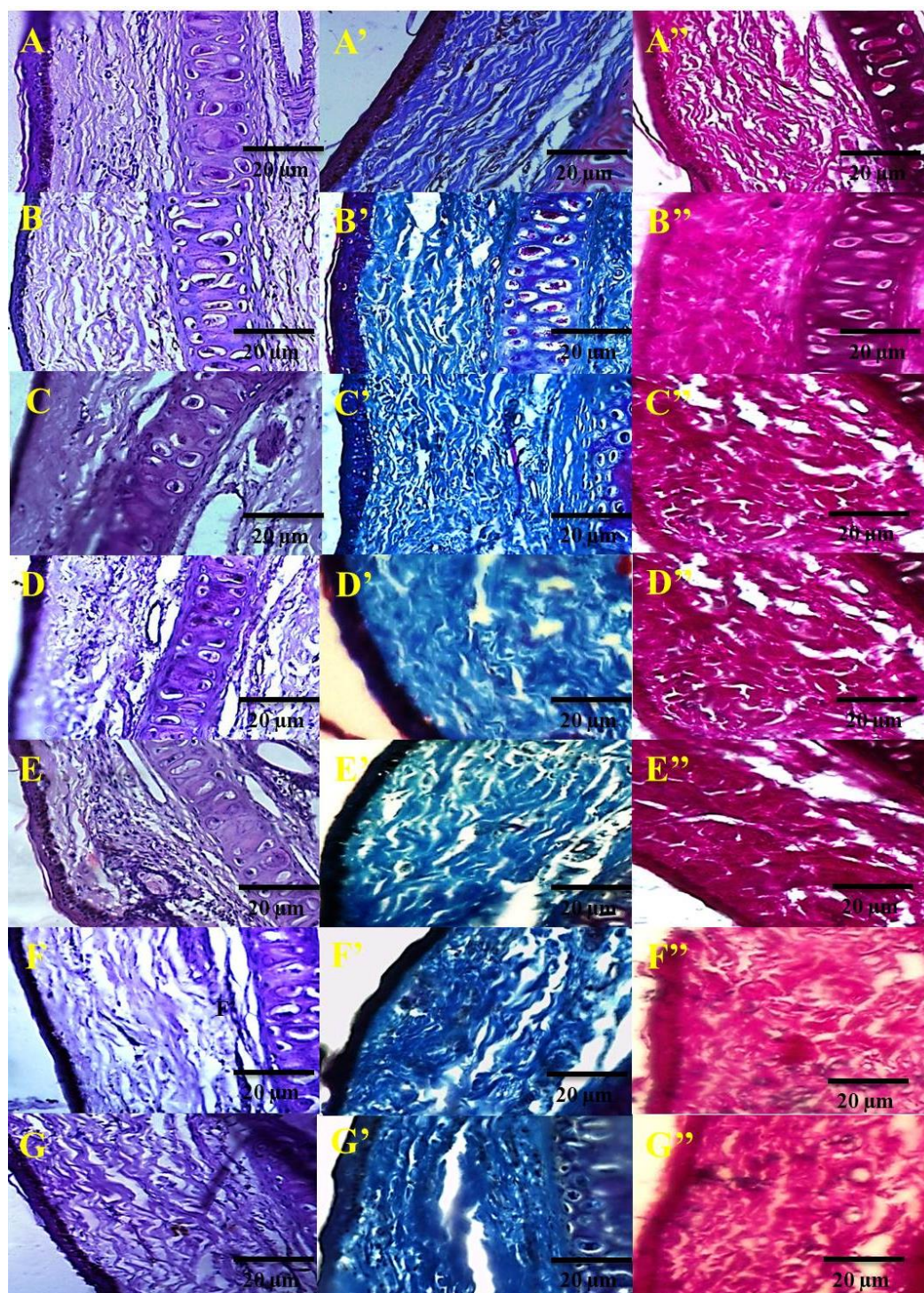


Figura 3. (A-G) Cortes histológicos do pavilhão auricular apical de cutias corados com hematoxilina-eosina. (A'-G'), cortes corados com tricrômico de Gomori evidenciando a derme e sua matriz proteica (A''-G'') e coloração pelo método de Weigert Van-Gieson, visando a observação das fibras elásticas que compõem essa matriz. As letras indicam, A: controle, B: EG, C: EG-SAC, D: DMSO, E: DMSO-SAC, F: EG-DMSO, G: EG-DMSO-SAC.

Tabela 1. Espessura da epiderme, derme, pele total e pericôndrio do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia.

Grupos	Epiderme	Derme	Pele total	Pericôndrio
Controle	16,4 ± 1,9 ^a	104,6 ± 46,9 ^a	122,2 ± 46,9 ^a	15,2 ± 3,4 ^a
EG	14,7 ± 2,4 ^a	97,3 ± 13,8 ^b	110,8 ± 13,6 ^a	9,9 ± 1,5 ^b
EG-SAC	12,2 ± 1,5 ^b	110,1 ± 15,4 ^{ab}	121,9 ± 15,6 ^b	10,5 ± 1,8 ^b
DMSO	12,7 ± 1,8 ^b	125,1 ± 18,7 ^a	143,7 ± 18,7 ^a	11,6 ± 1,9 ^b
DMSO-SAC	11,9 ± 2,0 ^b	85,2 ± 12,8 ^b	98,1 ± 12,9 ^b	12,2 ± 1,4 ^b
EG-DMSO	11,9 ± 1,2 ^{bc}	106,2 ± 12,8 ^{ab}	117,5 ± 13,0 ^b	12,3 ± 1,7 ^b
EG-DMSO-SAC	10,6 ± 1,2 ^c	113,8 ± 17,6 ^a	125,1 ± 17,9 ^{ab}	10,2 ± 1,6 ^b

^{a,b,c}: diferem na mesma coluna (P < 0,05).

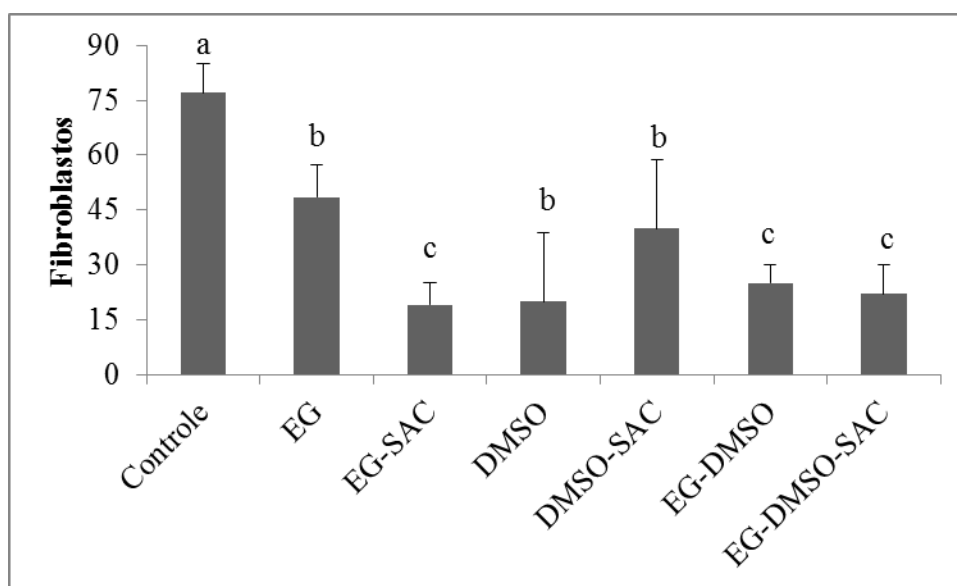


Figura 4. Média de fibroblastos presentes na derme do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia. Barras representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05).

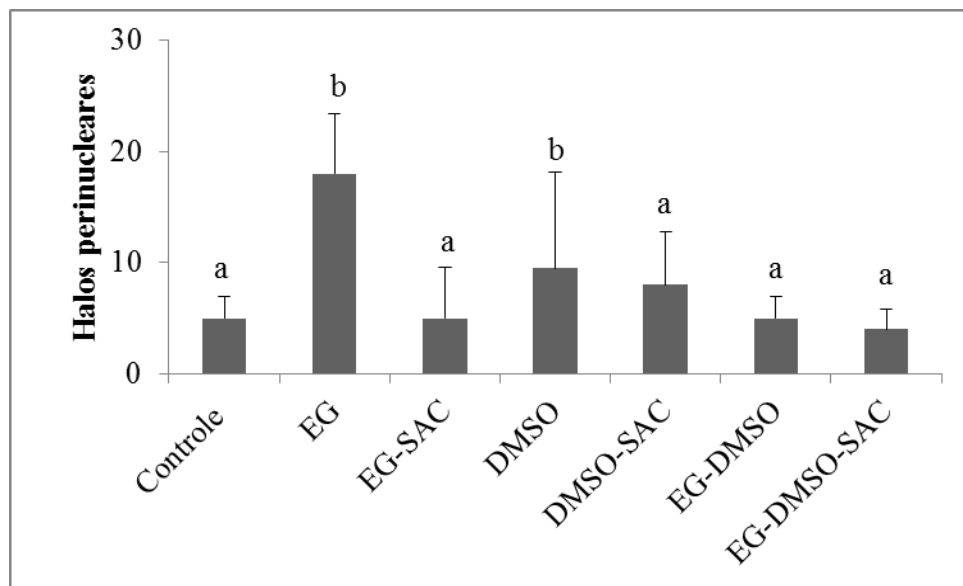


Figura 5. Média de halos perinucleares presentes na epiderme do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia. Barras representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

A figura 6 mostra a cartilagem e suas lacunas, sejam elas totais ou vazias (**LV**), incluindo seus condrócitos, sejam eles normais (**CN**) ou degenerados (**CD**) e o pericôndrio (**P**). Quanto à avaliação da cartilagem (**Tabela 2**), independente da solução crioprotetora, a criopreservação alterou o número de lacunas totais e condrócitos normais ($P < 0,05$). Contudo, apenas o grupo EG-DMSO-SAC manteve o número de lacunas vazias ($13,0 \pm 3,8$) similares ao controle ($11,9 \pm 2,6$). Ainda, fragmentos dos grupos EG ($9,0 \pm 1,9$), DMSO-SAC ($9,0 \pm 2,0$) e EG-DMSO-SAC ($8,0 \pm 2,4$) mantiveram a quantidade de condrócitos degenerados similar ao controle ($9,0 \pm 2,0$).

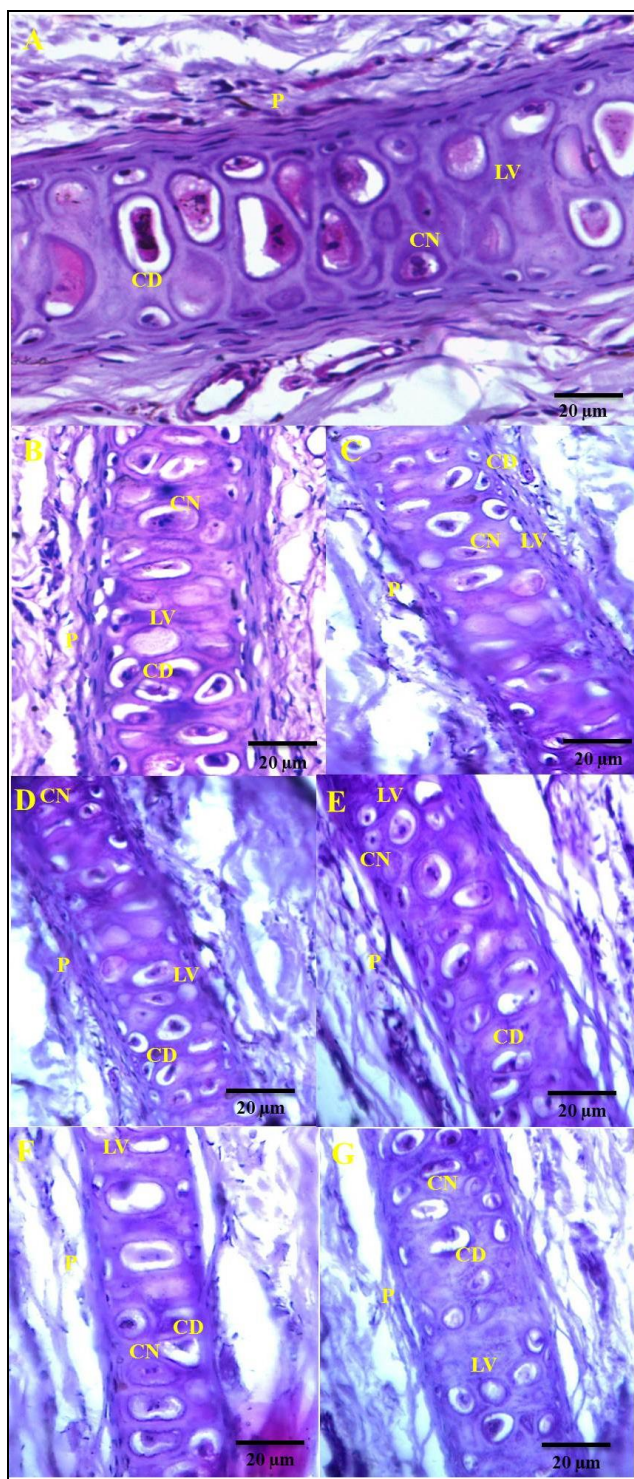


Figura 6. Seções histológicas da cartilagem do pavilhão auricular apical de cutias coradas com hematoxilina-eosina. As letras indicam A: controle, B: EG, C: EG-SAC, D: DMSO, E: DMSO-SAC, F: EG-DMSO, G: EG-DMSO-SAC. Condrócito normal (CN), condrócito degenerado (CD), lacuna vazia (LV), pericôndrio (P).

Tabela 2. Quantitativo de lacunas totais, lacunas vazias, condrócitos normais e condrócitos degenerados da cartilagem do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia.

Grupos	Lacunas totais	Lacunas vazias	Condrócitos normais	Condrócitos degenerados
Controle	44,0 ± 8,4 ^a	11,0 ± 2,9 ^a	28,0 ± 7,2 ^a	7,0 ± 1,8 ^a
EG	30,0 ± 3,0 ^b	9,0 ± 2,0 ^b	11,0 ± 3,2 ^b	9,0 ± 1,9 ^a
EG-SAC	26,0 ± 3,2 ^b	7,0 ± 1,6 ^b	7,0 ± 1,7 ^c	11,0 ± 2,1 ^b
DMSO	24,5 ± 3,8 ^b	8,0 ± 1,8 ^b	10,0 ± 2,2 ^b	10,0 ± 1,7 ^b
DMSO-SAC	29,5 ± 5,2 ^b	10,0 ± 2,3 ^b	10,0 ± 2,4 ^b	9,0 ± 2,0 ^a
EG-DMSO	30,0 ± 5,8 ^b	9,0 ± 3,2 ^b	10,0 ± 2,4 ^b	10,0 ± 1,9 ^b
EG-DMSO-SAC	26,5 ± 6,9 ^b	13,0 ± 3,8 ^a	4,0 ± 1,7 ^c	8,0 ± 2,4 ^a

^{a,b,c}: diferem na mesma coluna ($P < 0,05$).

5.3. Análise histomorfométrica para análise da matriz extracelular

Para a análise da matriz extracelular foram avaliadas as fibras colágenas e fibras elásticas. Quanto à avaliação da matriz colágena, todas soluções de criopreservação resultaram em alteração no percentual de fibras que a compõe (**Figura 5**).

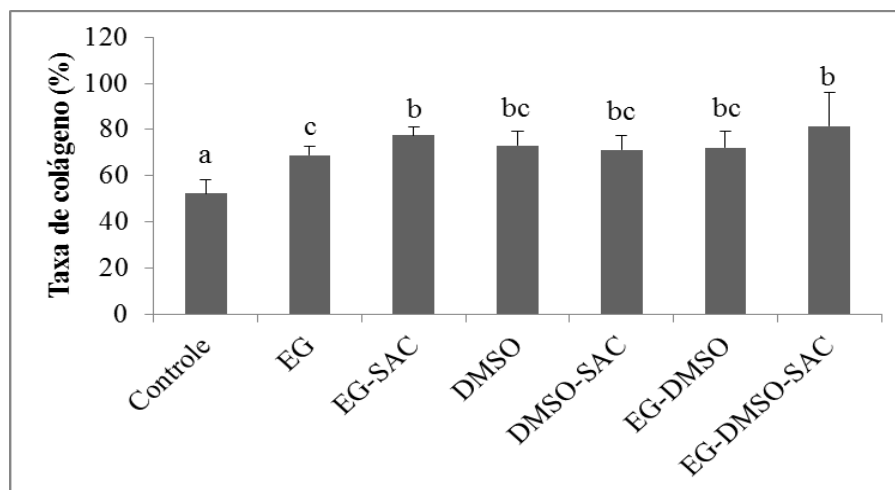


Figura 7. Média da taxa de colágeno presente na matriz extracelular da derme do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de cutia. Barras representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Já com relação às fibras elásticas foi observada uma baixa quantidade dessa matriz, tanto no grupo controle quanto nos demais tratamentos, não tendo sido possível a realização da quantificação das mesmas (**Figura 3**).

5.4 Análise do potencial proliferativo celular

Para a análise do potencial proliferativo foram avaliados os pontos escuros marcados pelo nitrato de prata ligado a proteínas do núcleo de fibroblastos (**Figura 8**). Para a análise do potencial proliferativo, com exceção do grupo EG ($1,0 \pm 0,1$), os demais grupos vitrificados foram similares ao controle quanto ao número de AGNOR/célula. Já para a área de AGNOR/célula, somente o grupo EG-SAC ($1,4 \pm 0,6$) não reduziu esse parâmetro.

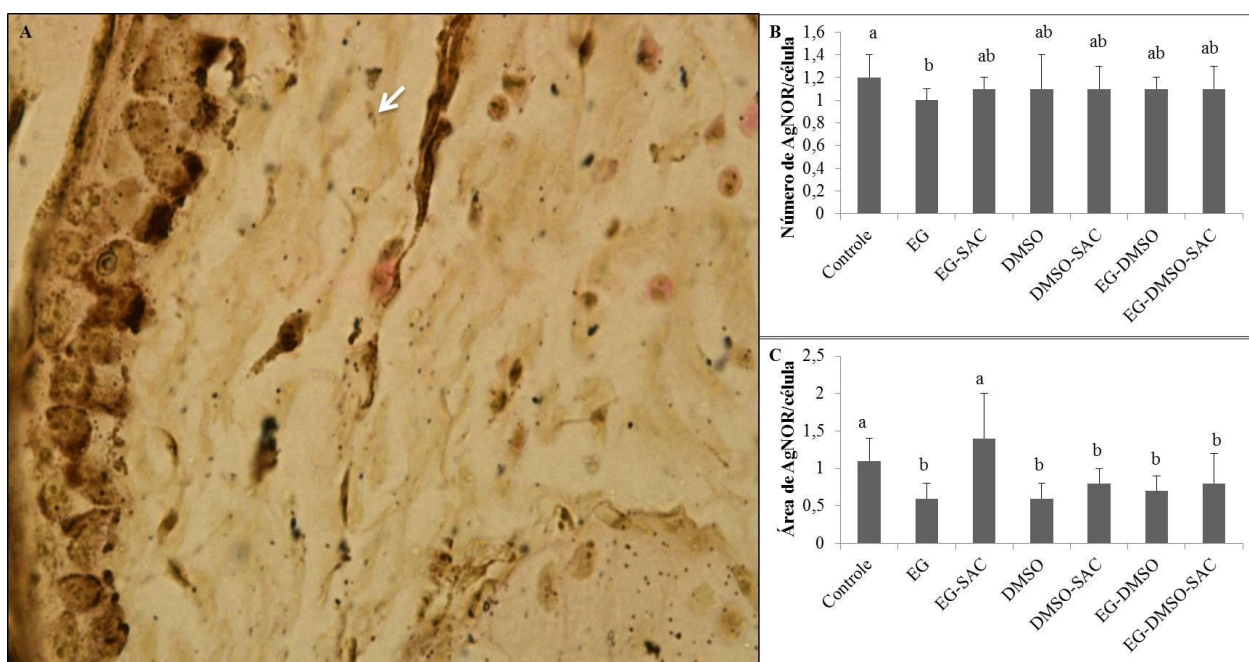


Figura 8. Imagem representativa do pavilhão auricular apical de cutias após marcação com nitrato de prata para a quantificação e mensuração de NORs nos fibroblastos dérmicos. NOR (seta) (A). Potencial proliferativo da pele não criopreservada e criopreservada de cutia. Barras representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) (B) e (C).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada a avaliação do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de *D. leporina*, após a VSS, utilizando diferentes soluções crioprotetoras com o objetivo de avaliar a eficiência dessas soluções no que se refere à proteção das amostras a partir da análise das características histomorfológicas, histomorfométricas, ultraestruturais e do potencial proliferativo celular. Nesse sentido, foi observado que a combinação EG-DMSO-SAC mostrou-se a mais eficiente quanto à manutenção das características do tecido durante a vitrificação.

Esse resultado é atribuído às propriedades dos crioprotetores extracelulares e intracelulares que compõem essa solução de vitrificação. Com relação aos crioprotetores extracelulares, sacarose e SFB, sua ação crioprotetora deve-se a diferentes fatores intrínsecos a bioquímica desses compostos. Quanto à sacarose, esta atua equilibrando proteínas intracelulares e estabilizando as membranas celulares, prevenindo a ruptura das mesmas (BORGES et al., 2017b). Quanto ao SFB, este promove uma maior viscosidade à solução de criopreservação, além disso, o conteúdo lipídico e proteico que o constituem atuam favorecendo a elasticidade da membrana plasmática, consequentemente promovendo uma proteção contra as injúrias causadas pela possível formação de cristais de gelo (BORGES et al. 2018b; COSTA et al., 2020).

Já com relação aos crioprotetores intracelulares, EG e DMSO, pode-se atribuir essa capacidade crioprotetora às características físico-químicas de ambos. Quanto ao EG, este possui um baixo peso molecular (62,07 g/mol) além de baixo ponto de fusão (-15,6 °C) e por essas razões tem sido empregado com sucesso na criopreservação de amostras de diferentes mamíferos, como catetos (BORGES et al., 2018) e onça-pintada (SANTOS, 2019). Já quanto ao DMSO, de acordo com Bhattacharya et al. (2018), este é definido como um solvente polar capaz de dissolver compostos polares e não polares, além de ser facilmente miscível em uma ampla gama de solventes orgânicos, inclusive a água. Além disso, possui baixo custo e menor citotoxicidade, o que o torna um dos compostos mais escolhidos para a criopreservação de diferentes amostras teciduais. Geralmente, o DMSO é utilizado em combinação com o EG, pois quando combinados promovem uma ação protetora mais completa à amostra (COSTA et al., 2020).

Nesse sentido, a partir dessas informações pode-se atribuir o sucesso da combinação EG-DMSO-SAC à utilização de ambos os crioprotetores intracelulares, onde um atua

complementando a função do outro, bem como à adição de crioprotetores extracelulares que, de forma adicional, aumentam o poder crioprotetor da solução utilizada. Além disso, pode-se sugerir que esta solução se mostrou mais eficiente, quando comparada as soluções EG, EG-SAC, DMSO e DMSO-SAC, justamente por combinar dois dos crioprotetores intracelulares mais utilizados, ao invés de serem utilizados de forma isolada (SANTOS et al., 2007). Já quando comparada a solução EG-DMSO, a solução EG-DMSO-SAC pode ter sua maior eficiência atribuída à adição da sacarose como um protetor extracelular, a qual demonstrou efeitos positivos sobre as amostras, principalmente por atuar, juntamente com o SFB, na redução do choque osmótico (KULESHOVA et al., 1999).

Nesse sentido, o presente resultado corrobora com o trabalho de Costa et al. (2020), qual demonstrou resultados satisfatórios ao utilizar a solução crioprotetora composta por EG (3,0 M) e DMSO (3,0 M) em combinação com a sacarose (0,25 M) e SFB (10%) na criopreservação por VSS de amostras teciduais auriculares de *D. leporina*. Ainda, vale destacar que, no presente trabalho, a concentração dos crioprotetores intracelulares utilizados foi reduzida pela metade (1,5 M EG + 1,5 M DMSO + 0,25 SAC e 10% SFB) quando comparada ao referido trabalho de Costa et al. 2020 o que pode ser considerado positivo, visto que altas concentrações dessas soluções podem provocar danos às amostras (CARVALHO et al., 2011). Além disso, previamente, a eficiência da combinação EG-DMSO-SAC e SFB já havia sido observada pelo nosso grupo, onde Borges et al. (2017b) utilizaram esta solução na VSS de amostras teciduais de catetos (*Pecari tajacu*), evidenciando que essa combinação promoveu uma redução do choque osmótico, turgidez e outros estresses gerados devido a formação de cristais de gelo durante a VSS. Deste modo, a partir desses resultados pode-se evidenciar que essa combinação de crioprotetores atua de maneira eficiente na conservação de pele auricular de cutias e que, além disso, promove um efeito benéfico na conservação de tecidos somáticos de mamíferos silvestres, bem como de mamíferos domésticos, como leporinos, suínos, caprinos, ovinos e bovinos (SILVESTRE et al., 2002; SILVESTRE et al., 2004).

Com relação aos resultados obtidos pelo presente trabalho quanto à análise qualitativa ultraestrutural das amostras por meio da MEV, foi possível observar as camadas que formam a pele, bem como a cartilagem, suas lacunas e condrócitos, corroborando com o que foi relatado por Nascimento (2019) ao analisar ultraestruturalmente a pele do pavilhão auricular de animais do mesmo gênero e espécie. Ainda, Aquino (2019) e Isola et al. (2013) utilizaram a referida

microscopia na avaliação da pele de preás (*G. spixii*) e pacas (*C. paca*), respectivamente, denotando a presença das camadas da pele e componentes do tecido cartilaginoso. A avaliação ultraestrutural tem sua importância atribuída principalmente a capacidade de ser uma técnica de análise bastante precisa devido a grande quantidade de informações que podem ser colhidas a partir da amostra analisada (SILVA, 2019). Além disso, uma análise morfológica descritiva do tecido facilita a otimização de protocolos de criopreservação especialmente quanto à solução crioprotetora empregada, uma vez que é possível comparar as imagens dos diferentes tratamentos, observando aquela que apresente menos dano em sua estrutura, possibilitando a escolha da solução crioprotetora correspondente.

À cerca da pele total, epiderme, derme e pericôndrio, foi observado que houve uma redução na espessura desses parâmetros por parte da maioria dos grupos vitrificados quando comparados ao grupo controle, o que pode ser explicado pelo próprio protocolo de VSS, onde a amostra tecidual é submetida bruscamente a uma superfície em temperatura criogênica, podendo resultar em uma contração tecidual (CASTRO et al. 2011; COSTA et al., 2020). Ainda, vale ressaltar que alguns parâmetros, como a espessura da pele, podem variar entre os animais, mesmo que estes sejam pertencentes a uma mesma ordem e tenham tido suas amostras coletadas em um mesmo local (NASCIMENTO, 2019; COSTA et al., 2020). Especificamente em cutias (*D. leporina*) as camadas que formam a pele, como epiderme e derme, mostram-se menos espessas se comparadas a outros mamíferos, como preás (AQUINO, 2019), camundongos, ratos e ratos Wistar (GRABAU et al., 1995; SILVA, 2015). Dessa forma, a pele de cutias estaria mais susceptível a injúrias resultantes da VSS, visto que essa técnica promove grande impacto a este órgão devido à redução brusca da temperatura. Além disso, a eficiência dos crioprotetores intra e extracelulares depende também de fatores como as características teciduais intrínsecas da amostra onde estão sendo aplicados, como a espessura da pele e camadas da pele, pois estas podem influenciar o transporte de substâncias, sendo necessária uma combinação de crioprotetores que proteja de forma eficiente essas amostras (GRABAU et al., 1995; COSTA et al., 2020).

Ainda sobre a caracterização da pele não criopreservada e criopreservada de cutia, foram quantificados os halos perinucleares, os quais se caracterizam como estruturas onde ocorre uma separação do núcleo em relação ao citoplasma, o que pode ser considerado indicativo do início do processo de apoptose celular bem como de perda da viabilidade (QUEIROZ-NETA et al., 2018; COSTA et al., 2020). Nesse sentido, foi observado que as soluções compostas por EG-

SAC, DMSO-SAC, EG-DMSO e EG-DMSO-SAC promoveram uma maior proteção ao tecido, uma vez que foram similares estatisticamente ao quantitativo de halos observados no grupo controle, indicando uma baixa degeneração celular. Esses resultados podem ser explicados devido a adição de crioprotetores extracelulares (não penetrantes) a solução, visto que estes atuam funcionando como tampão osmótico e redutor do efeito hiperosmótico, além disso, atuam desidratando a célula, evitando turgidez excessiva. Ainda, o EG é tido como o crioprotetor mais permeável e sua combinação com a sacarose é capaz de manter a integridade da membrana celular durante o processo de vitrificação, bem como atuar sobre a viabilidade celular, deste modo, a presença de ambos nas soluções EG-SAC e EG-DMSO-SAC promovem o efeito benéfico observado sobre os halos perinucleares (SILVESTRE et al., 2002; BORGES et al., 2018). Deste modo, é evidente que a combinação desses compostos contribui de forma positiva nas propriedades gerais das técnicas de vitrificação (KULESHOVA et al., 1999). Esse efeito também foi observado em diferentes trabalhos como na criopreservação de pele fetal humana (ERDAG et al., 2002), posteriormente em criopreservação com tecido ovariano de mamíferos como cabras (SANTOS et al., 2010) e mais recentemente em equinos (GASTAL et al., 2017).

Com relação aos fibroblastos, estes caracterizam-se como células responsáveis por produzir a matriz colágena extracelular e promover sua manutenção (SAMUELSON, 2007). No presente estudo não foi observado semelhança estatística entre o grupo controle e os demais tratamentos. É necessário destacar que a importância de se avaliar esse tipo celular se deve, principalmente, ao fato de que os fibroblastos são células amplamente aplicadas na clonagem por transferência nuclear de células somáticas, bem como, na utilização para fins de indução de células à pluripotência (PRAXEDES et al., 2018).

Quanto à avaliação da cartilagem, pode-se destacar que os fragmentos criopreservados com a solução composta por EG-DMSO-SAC assemelharam-se ao grupo controle em relação ao quantitativo de lacunas vazias e condrócitos degenerados, corroborando com Costa et al. (2020) que, ao utilizar essa mesma composição de solução crioprotetora, evidenciou um quantitativo de 9,6 de destes, sendo um valor semelhante ao que foi observado no presente trabalho. Assim, os resultados das análises da cartilagem e seus componentes remetem a uma possível ação protetora dessa solução de criopreservação com relação aos condrócitos, os quais encontram-se localizados nas lacunas que compõem a cartilagem. Essas células têm sua importância, em parte, atribuída ao fato de que atuam como responsáveis por formar a matriz cartilaginosa do tecido. Ainda, destaca-

se que o quantitativo de condrócitos normais do grupo controle foi similar ao observado por Aquino (2019) ($27,51 \pm 4,72$) em preás (*Galea spixii*) e por Nascimento (2019) ($32,73 \pm 9,04$) em cutias (*D. leporina*), ambos pertencentes a ordem *Rodentia*.

Além das características estruturais da pele e células que a constituem também foi realizada a avaliação da matriz extracelular no que se refere às fibras colágenas e fibras elásticas. Com relação à matriz colágena não foi observado semelhanças estatísticas entre o grupo controle ($52,3 \pm 6,0$) e os demais tratamentos, assim como observado também na quantificação dos fibroblastos. Contudo, a taxa de colágeno dos tratamentos experimentais não se mostrou menor que a taxa apresentada pelo grupo controle. Isso pode ser explicado pela própria técnica de VSS, a qual não expõe o fragmento tecidual a soluções crioprotetoras durante o processo de aquecimento da amostra visando, principalmente, evitar uma ação tóxica desses componentes em temperatura ambiente (BORGES et al., 2018a). Ainda, a taxa de colágeno obtida no grupo controle mostrou-se um pouco mais reduzida se comparada ao trabalho de Nascimento (2019), o qual obteve uma porcentagem de 68,00% de colágeno em cutia, bem como com a taxa de colágeno relatada por Aquino (2019) em preás (72%), no entanto mostrou-se um valor aproximado do que foi observado por Isola et al. (2013) na pele de pacas (50%) e, ainda, um pouco acima do que foi quantificado em ratas Wistar (45%) por Silva (2015).

De forma adicional, para uma caracterização mais completa da matriz extracelular, foi realizada a coloração de Weigert Van-Gieson para a visualização das fibras elásticas, as quais não são evidenciadas pelo Gomori, visto que este não é capaz de distinguir as fibras colágenas das fibras elásticas. Assim como no trabalho de Nascimento (2019) não foi possível realizar uma quantificação desse componente na pele da região do pavilhão auricular apical de cutias devido a sua baixa quantidade, no entanto, é inegável a sua importância na composição desse tecido, uma vez que promove a elasticidade do mesmo, bem como auxilia na fixação da pele sobre as estruturas adjacentes (KHIAO et al., 2019). Em alguns mamíferos, como na onça-pintada (*Panthera onca*), o percentual de fibras elásticas chega a aproximadamente 15% na região auricular.

Finalmente, seguindo nesse parâmetro de avaliação do pavilhão auricular apical não criopreservado e criopreservado de *D. leporina*, foi avaliado o potencial proliferativo celular de todos os grupos experimentais. A partir da análise dos resultados observou-se que a VSS, em 90% dos diferentes tratamentos vitrificados, não promoveu diminuição do potencial proliferativo

celular no que se refere ao número de AgNOR por célula, tendo sido essa diminuição observada somente no grupo EG, sendo esse resultado similar ao encontrado por Nascimento (2019) em animais da mesma espécie ($1,69 \pm 0,6$). Já com relação a área de AgNOR por célula, somente o grupo criopreservado com EG-SAC ($1,4 \pm 0,6$) mostrou que a VSS não alterou esse parâmetro após o descongelamento das amostras. Ainda, pode-se observar que a utilização do etilenoglicol individualmente, na avaliação de ambos os parâmetros, promoveu uma redução dos mesmos, o que pode ser explicado devido a produção de compostos tóxicos como ácido glicólico e oxalacetato quando o EG é metabolizado pelo retículo endoplasmático das células (CASTRO et al., 2011).

Os resultados do potencial proliferativo são fundamentais para determinar a funcionalidade metabólica dos fibroblastos, visto a importância do uso dessas células em técnicas para fins conservacionistas (PRAXEDES et al., 2018). Além das avaliações de potencial proliferativo, outros estudos podem ser feitos com a mesma finalidade, como o trabalho de Praxedes et al. (2017), os quais realizaram o cultivo *in vitro* dessas células após a VSS e obtiveram uma viabilidade acima de 90%, demonstrando que essa técnica de vitrificação não alterou a atividade metabólica dos fibroblastos.

Finalmente, observou-se que, dentre os tratamentos experimentais analisados, a solução EG-DMSO-SAC foi a que se mostrou mais semelhante aos grupos controles dos parâmetros avaliados, sendo eles: espessura da derme e pele total, quantificação de halos perinucleares, número de AgNOR/célula, quantidade de lacunas vazias e condrócitos degenerados.

Portanto, a partir dos resultados demonstra-se que a VSS, utilizando como solução crioprotetora a combinação EG-DMSO-SAC, evidencia uma solução de criopreservação que promove a manutenção eficiente do tecido durante a criopreservação, permitindo o uso de amostras criopreservadas para fins de conservação da espécie ou de outras filogeneticamente próximas que estejam ameaçadas ou em risco de extinção.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, a combinação de ambos os crioprotetores intracelulares acrescida de sacarose (EG-DMSO-SAC) mostrou-se a melhor solução de criopreservação para a conservação do pavilhão auricular apical de *D. leporina*, evidenciando a possibilidade de uso dessa amostra para biotecnologias subsequentes, como transferência nuclear de células somáticas. As informações denotadas por este trabalho buscam contribuir para a conservação da cutia (*D. leporina*), bem como possibilitar a utilização da mesma como um modelo experimental para espécies do mesmo gênero que encontram-se em perigo de extinção, vulnerável à extinção e criticamente em perigo de extinção, sendo elas, respectivamente, *Dasyprocta ruatanica*, *Dasyprocta coibae* e *Dasyprocta mexicana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, L.V.C. Descrição morfológica, morfométrica, ultraestrutural e proliferativa do pavilhão auricular apical de preás, *Galea spixii* (WAGLER, 1831). 61p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Biotecnologia, UFERSA), 2019.

ARAÚJO, R.M.; SOUZA, M. B.; RUIZ-MIRANDA, C.R. Densidade e tamanho populacional de mamíferos cinegéticos em duas unidades de conservação do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Série Zoologia**, v.98, p.391-396, 2008.

BAKEEVA, L; VAYS, V; VANGELI, I; EL DAROV, C; HOLTZE, S; HILDEBRANDT, T; SKULACHEV, V. Delayed onset of age-dependent changes in ultrastructure of myocardial mitochondria as one of the neotenic features in naked mole rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–11, 2019.

BATISTA, Juliana dos Santos. Parasitoses de roedores do Cerrado: um estudo de caso sobre a leishmaniose. 2013. 55 f., il. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BHATTACHARYA, Sankha. *et al.* **Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences**. London, United Kingdom: IntechOpen, 2018.

BEZERRA, D. O.; CARVALHO, M. A. M.; CONDE-JÚNIOR, A. M.; VIEIRA, A. A. R.; SOUSA, R. P.; MONTEIRO, H. M. A.; SILVA, M. L. G.; SOARES, L. L. S. Estudo morfológico do ceco de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) criadas em cativeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38, p.181-186, 2016.

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, p.848-852, 2015.

BORGES, A.A.; BEZERRA, F.V.F.; COSTA, F.N.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, p.948-954, 2017a.

BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.Q.; 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, 2017b.

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, 2018a.

BORGES, A.A.; LIRA, G.P.O.; NASCIMENTO, L.E.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Influence of cryopreservation solution on the in vitro culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, v.16, p.77-81, 2018b.

BRAYTON C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v.76, p.76-90, 1986.

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.

CAPUTCU, A.T.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; ARAT, S. Tissue cryobanking for conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. **Cell Tissue Bank**, v.14, p.1-10, 2013.

CARLETON, M. D., MUSSER, G. G. (2005). 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.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.M, ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R.

Influence of vitrification techniques and solutions on themorphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.76, p.933-941, 2011.

CASTELO, T. S.; SILVA, A. M.; BEZERRA, L. G. P.; COSTA, C. Y. M.; LAGO, A. E. A.; BEZERRA, J. A. B.; SILVA, A. R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). **Cryobiology**, v.71, p.442–447, 2015.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.957-962, 2011.

CETINKAYA. G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, v.63, p.292–297, 2011.

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

CIENA, A.P.; SANTOS, A.C.D.; VASCONCELOS, B.G.; RICI, R.E.G.; ASSIS NETO, A.C.; ALMEIDA, S.R.Y.; MIGLINO, M.A.; WATANABE, I. S. Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of guinea pig (*Cavia porcellus*). **Acta Zoologica**, v. 100, p. 53-60, 2019.

CONDE JÚNIOR, A.M.; FORTES, E.A.M.; MENEZES, D.J.A.; LOPES, L.O.; CARVALHO, M.A.M. Morphological and morphometric characterization of agoutis peripheral blood cells (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler, 1831) raised in captivity. **Microscopy research and technique**, v.75, p.374-378, 2012.

COSTA, C.A.S.; BORGES, A. A.; NASCIMENTO, M. B.; AQUINO, L. V. C.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. Effects of Vitrification Techniques on the Somatic Tissue Preservation of Agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, 2020.

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Ferramentas para a avaliação de células e tecidos somáticos após a criopreservação em mamíferos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, p.820-829, 2016.

CROWE, L.M.; CROWE J.H. Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v.946, p.193-201, 1988.

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.

DENNISTON. R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of Cryopreservation, In. TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge: World Aquaculture Society**, p.59-74, 2000.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C., SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v.364, p.16-22, 2004.

ELLIS, H.; MAHADEVAN, V. Anatomy of the caecum, appendix and colon. **Basic Science: Surgery**, v. 32, p. 155-158, 2011.

EMMONS, L.; REID, F. *Dasyprocta leporina* - The IUCN Red List of Threatened Species, 2016: e.T89497102A22197762.

ERDAG, G.; EROGLU, A.; MORGAN, JR. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. **Cryobiology**, v.44, p.218–228, 2002.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

GARBER, P.A.; LAMBERT, J.E. Primates as seed dispersers: Ecological processes and directions for future research, **American Journal of Primatology**, v.45, p.3-8, 1998.

- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- GASTAL G. D. A.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G. Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. **Theriogenology**, v.97, p.139–147, 2017.
- GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v.20, p.661-664, 1950.
- GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelção e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- GRABAU, J.H.; DONG, L.; MATTIE, D.R.; JEPSON, G.W.; MCDUGAL, J.N. **Comparison of anatomical characteristics of the skin for several laboratory animals**. Geo-Centers Inc Newton Centre MA, 1995.
- ISOLA, J.G.; MORAES, P.C.; RAHAL, S.C.; MACHADO, M.R. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 674-682, 2013.
- JAAFARI-ASHKAVANDI, Z.; FATEMI, F.S. Evaluation of proliferation activity in dysplastic and nondysplastic oral lichen planus through the analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions. **Journal of Craniofacial. Surgery**, v.24, p.788-791, 2013.
- JAIN K. J.; PAULSON R. J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1037-1046, 2006.
- JANG, T.H.; PARK, S.C.; YANG, J.H.; KIM, J.Y.; SEOK, J.H.; PARK, U.S.; CHOI, C.W.; LEE, S.R.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v.6, p.12-18, 2017.
- JORDANO, P.; GALETTI, M.; PIZO, M.A.; SILVA, W.R. Ligando Frugivoria e Dispersão de Sementes à Biologia da Conservação. In: DUARTE, C.F.; BERGALLO, H.G., SANTOS, M.A., e V., A.E. (eds.). **Biologia da conservação: essências**, p.411-436, 2006.

KHIAO, M; RICHARDSON, K.C; LOEWA, A; HEDTRICH, S; KAESSMEYER, S;PLENDL, J. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia, Histology and Embryology*, v. 3. p. 207–217, 2019.

KULESHOVA, L. L.; MACFARLANE, D. R.; TROUNSON, A. O. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.119–130, 1999.

LAMBERT J.E.; GARBER, P.A. Primates as seed dispersers: Ecological processes and directions for future research. **American Journal of Primatology**, v.45, p.6-8, 1998.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F.J.; MORENO, J.M.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.347-361, 2009.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; 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.

LEÓN-QUINTO, T., SIMÓN, M.A., SÁNCHEZ, A., 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.

LOUTRADI, K.E.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; PAPANIKOLAOU, E.G.; PADOS, G.; TARLATZIS, B.C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v.90, p.186-193, 2008.

MAHLER, S., BESSER, D. The German stem cell network GSCN - a nationwide network with many tasks. **Stem Cell Research**, v.42, p.2-4, 2020.

MARTINS L.; CARDOSO, D. Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas de óxido de eteno. **Química Nova**, v.28, p.264-273, 2005.

MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.433-442, 2007.

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**, p.28–37, 2016.

MORAIS, G.B.; VIANA, D.A.; SILVA, F.M.O.; XAVIER JÚNIOR, F.A.F.; FARIAS, K.M.; PESSOAS, D.D.O.; 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 picrosirius red in different stages of CKD in cats. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, p. 543-550, 2017.

MÜHLEN, E.M. Consumo de proteína animal em aldeias de terra firme e de várzea da terra indígena Uaçá, Amapá, Brasil. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal do Pará, Belém. 2005.

MULLER-LANDAU, H. C. Predicting the Long-Term Effects of Hunting on Plant Species Composition and Diversity in Tropical Forests, **Biotropica**, v.39, p.372-384, 2007.

NASCIMENTO, M. B. Estudo morfológico, morfométrico, ultraestrutural e proliferativo do pavilhão auricular apical de cutias, *Dasyprocta leporina* (LINNAEUS, 1758). Trabalho de Conclusão de Curso. (Biotecnologia, UFERSA), 2019.

NEWTON H.; FISHER J.; ARNOLD, J. R. P.; PEGG, D. E., FADDY, M. J.; GOSDEN, R. G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v.13, p.376-380, 1998.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. M. Morfologia das glândulas salivares maiores em cutias (*Dasyprocta agouti*, Linnaeus, 1766). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rura do Semi-Árido, Mossoró. 2014.

OTSUKI, S.; QUITINA, W.; ISHIHARA, A.; KAE, T. Elicidation of dimethylsulfone metabolism in rat using a 35S radioisotope tracer method. **Nutrition Research**, v.22, p.313-322, 2002.

PATTON, J.; EMMONS, L. H. Family Dasypodidae Bonaparte, 1838, 2015.

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.

PICULO, Fernanda et al. **Guia ilustrado da morfologia do tecido uretral de ratas**. [S. l.]: UNESP, 2014.

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

PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, H.V.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.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.; QUEIROZ NETA, L. B.; BORGES, A. A.; SILVA, M. B.; SANTOS, M. V. O.; RIBEIRO, L. 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.00, p.1-9, 2019.

PRAXEDES, É. C. G.; LIMA, G. L.; DA SILVA, A. M.; CAMPOS, L. B., DE SOUZA, C. M. P., MOREIRA, S. S. J.; SILVA, A. R. Comparison of Different Intracellular Cryoprotectants on the Solid Surface Vitrication (SSV) of Red-Rumped Agouti (*Dasypodcta Leporina* Lichtenstein, 1823) Ovarian Tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, 2019.

QUEIROZ-NETA, L.B.; LIRA, G.PO.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; 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.

RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v.21, p.106-121, 1984.

ROACH, N., NAYLOR, L. **Dasyprocta coibae**. The IUCN Red List of Threatened Species, 2019.

SAMUELSON, Don A. Tratado de histologia veterinária. Trad. Newton da Cruz Rocha. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2007.

SANTIS, L.; COTICCHIO, G.; PAYTER S.; ALBERTINI D.; HUTT, K.; CINO, I.; IACCARINO, M.; GAMBARDELLA, A.; FLAMIGNI, C.; BORINI, A. Permeability of human oocytes to ethylene glycol and their survival and spindle configurations after slow cooling cryopreservation. **Human Reproduction**, v.22, p.2776-2783, 2011.

SANTOS, M. D. C. B. Avaliação histológica da pele auricular, femoral e caudal de onça-pintada *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758) e sua qualidade após a vitrificação. Trabalho de Conclusão de Curso. (Biotecnologia, UFERSA), 2019.

SANTOS, R. R.; AMORIM, C.; CECCONI, S. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.151–163, 2010.

SCHIPPER, J., EMMONS, L., McCARTHY, T. *Dasyprocta ruatanica*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2016.

SILVA, A.R.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X; SOUZA, A.L.P. Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Dove Press Journal, Research and Reports in Biodiversity Studies**, v.4, p.1-8, 2015.

SILVA, A.B.S.; SANTOS T.M.V., CARVALHO M.A.M., GUERRA, P.S.L.; RIZZO, M.S., ARAÚJO, W.R., TORRES C.B.; CONDE-JÚNIOR A.M. Morphology of the larynx of agouti (*Dasyprocta* sp). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 593-598, 2014.

SILVA, A. M.; BEZERRA, L. G. P.; PRAXEDES, E. C. G.; MOREIRA, S. S. J.; SANTOS, C. S.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F.; SILVA, A. R. Influência dos crioprotetores intracelulares sobre a conservação de tecido testicular de cutias (*Dasyprocta leporina*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 702, 2019.

SILVA, A.R.; CAMPOS, L.B.; MAIA, K.M.; BORGES, A.A. Biotécnicas reprodutivas aplicadas à reprodução de catetos (Pecari tajacu Linnaeus, 1758) – uma estratégia experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 110-115, 2017.

SILVA, D.C.B.; FAGUNDES, N.C.F.; TEIXEIRA, F.B.; PENHA, N.E.A.; SANTANA, L.N.S.; MENDES-OLIVEIRA, A.C.; LIMA, R.R. Características anatômicas e histológicas dos dentes em agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 51-57, 2013.

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

SILVA, R.S. **Histomorfometria tegumentar de ratas wistar ooforectomizadas**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2015.

SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; CERVERA, R.P.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA X. 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.; SAEED, A.M.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA-XIMÉNES, F. Vitrifaction and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. **Theriogenology**, v.58, p.69-76, 2002.

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, p.221-229, 2004.

SIMIONE, F.P. Thermo scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. **Thermo Fisher Scientific Incorporation**, New York, 2009.

SONG, J.; HUA, S.; SONG, K.; ZHANG, Y. Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v.43, p.203-209, 2007.

SOUZA, M.T.; FIGHERA, A.R.; KOMMERS, D.G.; BARROS S.L.C. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 177-190, 2009.

TELES, V.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. Uso de microscopia de luz e eletrônica como técnicas de análise morfológica. Embrapa Agroenergia – Circular Técnica (INFOTECA-E), 2017.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939-948, 1999.

VÁZQUEZ, E., EMMONS, L., REID, F., CUARÓN, A. D. *Dasyprocta mexicana*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2008.

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

YAMAKI, S.B.; PEDROSO, A.G.; ATVARIS, T.D.O. Estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (Físico-Química). **Química nova**, v.22, p.330-334, 2002.

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