



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ALANA AZEVEDO BORGES

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO
DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

MOSSORÓ – RN

2016

ALANA AZEVEDO BORGES

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO
DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira – UFERSA.

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva – UFERSA.

MOSSORÓ – RN

2016

© 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 tornar-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.

B732c Borges, Alana Azevedo.
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE
TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (Pecari tajacu
Linnaeus, 1758) / Alana Azevedo Borges. - 2016.
97 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Coorientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2016.

1. Animais silvestres. 2. Tecido somático. 3.
Crioprotetor. I. Pereira, Alexsandra Fernandes,
orient. II. Silva, Alexandre Rodrigues, co-
orient. III. 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.

ALANA AZEVEDO BORGES

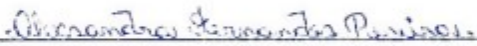
**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO
DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

APROVADA EM: 01 / 11 / 2016

BANCA EXAMINADORA


Alexandra Fernandes Pereira, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente


Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador


Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Prof. Dr. (UECE)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALANA AZEVEDO BORGES – Nascida em Mossoró, RN, no dia 03.07.1990, filha de Armando Borges de Almeida e Elizabeth de Azevedo Silva Borges. Graduiu-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, 2010–2014) com parte cursada na Universidade de Lleida (Espanha). Estagiou nos seguintes laboratórios participando de diferentes programas de iniciação científica: Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *in vitro* de Embriões (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, UFERSA, 2011–2012), Laboratório Básico e Clínico de Imunologia e Endocrinologia (Programa Ciências sem Fronteiras, Universidade de Lleida, 2012–2013) e Laboratório de Biotecnologia Animal (Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica, UFERSA, 2013–2014 e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, UFERSA, 2014–2015). Em dezembro de 2015, foi aprovada no processo seletivo para o Mestrado acadêmico em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA) iniciando assim as atividades no Laboratório de Biotecnologia Animal com bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

As pessoas sem as quais não conseguiria chegar até aqui: Elizabeth de Azevedo Silva Borges, Maxson Ariton Sabino da Mota, Alexsandra Fernandes Pereira, Francisca de Assis Azevedo e Amanda de Azevedo Borges.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) através do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pela formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira), ao Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva), ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA), ao Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir de Oliveira) e ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BIOMOL/UERN, responsável: Prof. Dr. Wolgelsanger Oliveira Pereira) por permitir a utilização de animais, espaço e equipamentos para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira, uma amiga de verdade, um presente em minha vida, um exemplo de profissional, de ser humano, de superação e esforço. Obrigada pela generosidade de sempre estar disposta para contribuir em meu crescimento. Pessoa por quem tenho carinho e enorme respeito.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva, por sempre colaborar para o desenvolvimento deste trabalho e por sua exigência que me fez tomar cada banca examinadora, disciplina e seminário como um desafio para superar meus limites.

Ao Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira, pela confiança em disponibilizar as suas instalações e por me acolher sempre com tanto carinho.

Ao Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pela disponibilidade e aceite ao convite de participação da banca.

A todos do LBA/UFERSA que me mostraram a necessidade de um amadurecimento contínuo. Em nome de Cibelle Anne dos Santos Costa, Francilane Nascimento Costa, Gabriela Pereira de Oliveira Lira, Lucas Emanuel Nascimento, Maria Valéria de Oliveira Santos e Pedro Henrique Fernandes de França, o meu sincero obrigada!

Aos companheiros conquistados durante os experimentos de mestrado e pela ajuda oferecida: Igor Renno Guimarães Lopes, André Vinícius Nunes da Silva, Felipe Venceslau Câmara, Radan Elvis Matias de Oliveira e, especialmente, a Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra, que sempre esteve disposto a contribuir nas análises.

À Marleuza Sabino da Silva que em tantos momentos com sua presença e amizade me fez criar novas forças. Muito obrigada pelo carinho!

Aos meus compadres Rosineide Bezerra dos Reis e Antônio Marcos Bezerra de Almeida que me presentearam com o melhor laço para nossa amizade, esse laço se chama João Firmino Bezerra de Almeida dos Reis.

Às minhas amigas da vida Beatrice Alexandra Borges Bezerra, Márcia Gabriela Costa Ribeiro, Celina Darliane Gomes Pinto e Luiza Bento de Queiroz Neta que em cada momento me mostraram o quão são especiais.

À Tatiana Oliveira Souza por me escutar/aconselhar em tantos momentos e me tratar como uma irmã.

À minha avó Francisca de Assis Azevedo, não há palavras que descreva o amor que sinto pela senhora.

À minha irmã Amanda de Azevedo Borges, por ser o significado das palavras companheirismo, cumplicidade, irmandade e amor.

À minha mãe Elizabeth de Azevedo Silva Borges, que inúmeras vezes sacrificou-se para que nada nos faltasse e sempre tivéssemos o melhor. Que sempre me exigiu tanto e acreditou mais em mim que eu mesma. Muito obrigada pelo amor que a senhora derrama em minha vida, pela paciência e dedicação.

Ao meu amor, Maxson Ariton Sabino da Mota, por tanto companheirismo e paciência em todos os momentos. Por acreditar, me apoiar, ser o meu porto seguro e ser sereno em um mundo veloz.

À Deus, anjos e Santos, por sempre iluminar o meu caminho.

*“A paz vem de dentro de você mesmo.
Não a procure à sua volta.”*

Sidarta Gautama (BUDA)

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

BORGES, Alana Azevedo. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2016.

RESUMO: A criopreservação de tecido somático de catetos representa uma etapa interessante na obtenção e conservação de células para a transferência nuclear (clonagem). Nesse sentido, protocolos de vitrificação tecidual necessitam ser otimizados para garantir a máxima conservação das características viáveis das células. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar histologicamente o sistema tegumentar da região auricular periférica (Etapa 1) e avaliar diferentes crioprotetores na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de catetos (Etapa 2). Para tanto, fragmentos auriculares (9,0 mm³) foram recuperados de dezesseis animais oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Na primeira etapa, amostras teciduais foram avaliadas quanto à caracterização das camadas, seus componentes e atividade proliferativa. Para a segunda etapa, fragmentos teciduais foram criopreservados por vitrificação em superfície sólida em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino e diferentes crioprotetores e concentrações [dimetilsulfóxido (DMSO; 3,0 M), etilenoglicol (EG; 3,0 M) e associação DMSO/EG (1,5 M; 1,5 M) na ausência e presença de sacarose (0,25 M)]. Após duas semanas, fragmentos aquecidos e não criopreservados (controle) foram analisados usando técnicas histológicas. Assim, para ambas as etapas, amostras teciduais foram avaliadas usando colorações hematoxilina-eosina e tricômico de Gomori, quantificação de regiões argirofílicas organizadoras nucleolares (AgNORs) e viabilidade pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Ainda, na primeira etapa, fragmentos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Assim, na primeira etapa, tamanhos de 104,2 µm e 222,6 µm foram observados para epiderme e derme, com uma proporção volumétrica de 36,6% e 58,7%, respectivamente. Além disso, na epiderme, foram evidenciadas as camadas basal (22,5 µm), intermediárias (53,5 µm) e córnea (28,2 µm), com valores médios de 65,3 de células epidermais, 43,4 melanócitos e 14,8 de halos perinucleares. Já a derme apresentou 127 fibroblastos com 2,5 AgNORs por nucléolo. Adicionalmente, a atividade metabólica foi de 0,243. Na segunda etapa, a combinação de 3,0 M de EG com sacarose foi adequada em manter as características teciduais normais quando comparado com os fragmentos não vitrificados, especialmente para a proporção volumétrica da epiderme (61,2 vs. 58,7) e derme (34,5 vs. 36,6), número de fibroblastos (90,3 vs. 127,0) e razão de AgNOR (0,09 vs. 0,17), respectivamente. Em conclusão, o sistema tegumentar auricular periférico de catetos possuiu algumas variações em relação a outros mamíferos, quanto ao número de camadas e espessura da epiderme, quantidade de células epidermais, melanócitos e parâmetros proliferativos. Além disso, 3,0 M de EG com 0,25 M de sacarose resultaram na melhor composição de crioprotetores na vitrificação de tecido somático de catetos.

Palavras-chave: animais silvestres, tecido somático, crioprotetor.

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION AND VITRIFICATION OF SOMATIC TISSUE DERIVED FROM COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

BORGES, Alana Azevedo. HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION AND VITRIFICATION OF SOMATIC TISSUE DERIVED FROM COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2016.

ABSTRACT: The cryopreservation of somatic tissue derived from collared peccaries represents an interesting step in the obtainment and conservation of cells for nuclear transfer (cloning). In this sense, tissue vitrification protocols need to be optimized to ensure maximum preservation of viable cell characteristics. Therefore, the aims of this study were to characterize histologically the peripheral auricular integumentary system (Stage 1) and evaluate different cryoprotectants in the solid-surface vitrification of somatic tissue of collared peccaries (Stage 2). Thun, ear fragments (9.0 mm³) were collected of sixteen animals derived from the Multiplication Center of Wild Animals (CEMAS/UFERSA). In the first stage, tissue samples were evaluated for the characterization of layers, its components and proliferative activity. For the second stage, tissue fragments were cryopreserved by solid-surface vitrification using Dulbecco modified minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and different cryoprotectants and concentrations [dimethylsulfoxide (DMSO, 3.0 M), ethylene glycol (EG; 3.0 M) and association DMSO/EG (1.5 M; 1.5 M) in the absence and presence of sucrose (0.25M)]. After two weeks, warmed and non-vitrified (control) fragments were analyzed using histological techniques. Thus, for both steps, tissue samples were evaluated using hematoxylin-eosin and Gomori Trichrome, quantification of regions argyrophilic nucleolar organizer (AgNORs) and viability by MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Also, in the first stage, fragments were analyzed by transmission electronic microscopy. Thus, in the first stage, sizes of 104.2 µm and 222.6 µm were observed in the epidermis and dermis, with a volumetric ratio of 36.6% and 58.7%, respectively. Moreover, in the epidermis were evidenced the basal layer (22.5 µm), intermediate (53.5 µm) and cornea (28.2 µm), with mean values of 65.3 epithelial cells, 43.4 melanocytes and 14.8 perinuclear halos. Already the dermis has 127 fibroblasts with 2.5 AgNORs by nucleolus. Additionally, the metabolic activity was 0.243. In the second stage, the 3.0 M EG with sucrose was able to maintain normal tissue characteristics compared with non-vitrified (control), especially for the volumetric ratio of epidermis (61.2 vs. 58.7) and dermis (34.5 vs. 36.6), number of fibroblast (90.3 vs. 127.0), and AgNOR ratio (0.09 vs. 0.17), respectively. In conclusion, the peripheral auricular integumentary system derived from collared peccaries possessed some variations compared to other mammals, as the number of layers and thickness of the epidermis, number of epithelial cells, melanocytes and proliferative parameters. Moreover, 3.0 M EG with 0.25 M sucrose resulted in a better cryoprotectant composition in the vitritification for somatic tissue of collared peccaries.

Keywords: wild animals, somatic tissue, cryoprotectant.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que
±	Mais ou menos
×	Vezes
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
°C/min	Grau Celsius por minuto
µg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
abs	Absorbância
AgNOR	Região argirofílica organizadora nucleolar
BIOMOL	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética Animal
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
cm ³	Centímetro cúbico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Tampão fosfato modificado por Dulbecco
EG	Etilenoglicol
EUA	Estados Unidos
FBS	Fetal bovine serum
g/L	Gramas por litro
h	Hora
HE	Hematoxilina-eosina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
Kg	Quilograma
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LN ₂	Liquid nitrogen
M	Molar
m	Minuto
mg/mL	Miligramma por mililitro
Mg ²⁺	Íon magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
nº	Número
O ₂	Oxigênio
PBS	Solução tampão fosfato
PG	Propilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
seg	Segundo
SFB	Soro fetal bovino
SSV	Solid-surface vitrification
SV	Solução de vitrificação
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
UERN	Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VS	Vitrification solution
vs.	Versus
VSS	Vitrificação em superfície sólida

LISTA DE QUADRO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quadro 1. Diferentes fontes de tecidos somáticos visando à conservação e reprodução em alguns mamíferos silvestres.....	23
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO SISTEMA TEGUMENTAR AURICULAR DE CATETO (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Tabela 1. Valores médios de diferentes células da epiderme derivada da região auricular de catetos (<i>P. tajacu</i>) usando a coloração de hematoxilina-eosina..	52
Tabela 2. Avaliação da atividade proliferativa na derme da região auricular de catetos (<i>P. tajacu</i>) usando a quantificação de AgNORs.....	53

CAPÍTULO 3 – COMBINAÇÃO DE ETILENOGLICOL COM SACAROSE AUMENTA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758)

Table 1. Mean number fibroblasts and perinuclear halos of ear skin tissue derived collared peccaries after SSV using different solutions.....	71
Table 2. Comparison of the mean values of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in somatic tissue derived from collared peccary after vitrification with different cryoprotectors.....	72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Biópsias de pele em catetos.....	23
---	----

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO HISTOFOLÓGICA DO SISTEMA TEGUMENTAR AURICULAR DE CATETO (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Figura 1. Fotomicrografias da pele de catetos (<i>P. tajacu</i>).....	54
--	----

Figura 2. Mensuração dos tamanhos das camadas da pele e da epiderme da região auricular de catetos (<i>P. tajacu</i>) usando coloração de hematoxilina-eosina.....	55
---	----

CAPÍTULO 3 – COMBINAÇÃO DE ETILENOGLICOL COM SACAROSE AUMENTA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758)

Figure 1. Skin histological sections using hematoxylin-eosin and Gomori's trichrome and showing epidermis and dermis layers.....	73
---	----

Figure 2. Volumetric ratios of epidermis and dermis at different concentrations of permeable cryoprotectants in combination with sucrose.....	74
--	----

Figure 3. Effect of different concentrations of cryoprotectants in combination with sucrose on the viability of the skin of collared peccary.....	75
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1. IMPORTÂNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS SOMÁTICAS EM MAMÍFEROS SILVESTRES.....	20
2.2. FONTES SOMÁTICAS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO TECIDUAL EM MAMÍFEROS SILVESTRES.....	22
2.3. PROCESSAMENTO E VITRIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SOMÁTICOS EM MAMÍFEROS SILVESTRES.....	24
2.4. CRIOPROTETORES EMPREGADOS NA VITRIFICAÇÃO TECIDUAL.....	26
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. OBJETIVO GERAL.....	32
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO SISTEMA TEGUMENTAR AURICULAR DE CATETO (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758)....	41
CAPÍTULO 3 – COMBINAÇÃO DE ETILENOGLICOL COM SACAROSE AUMENTA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS VITRIFICAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (<i>Pecari tajacu</i> LINNAEUS, 1758).....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	75
ANEXOS.....	76

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) também conhecidos como caititu ou porco-do-mato são pertencente à família Tayassuidae, da ordem Artiodactyla, da subordem Suiformes e da superfamília Suoidea (DESBIEZ et al., 2012). Em geral, possuem alta adaptação a cativeiros e interessantes economicamente pela apreciação da sua carne e couro (BODMER et al., 1990). Além disso, a criação comercial de animais silvestres é uma alternativa para produtores rurais de forma sustentável, possibilitando o aproveitamento de áreas e igualmente configurando-se como uma ferramenta ecológica de conservação desses indivíduos (SANTOS et al., 2009). Em relação ao seu interesse científico, esta espécie pode ser utilizada como modelo experimental por estar filogeneticamente próximo de animais vulnerável, *Tayassu pecari* Link, 1795, ou em risco de extinção, *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930. Por essas razões, a importância da preservação da espécie é proposta, sendo interessante o emprego de estratégias de conservação para a manutenção do ecossistema global (SOUZA et al., 2012) e a otimização do manejo de criação (SILVA et al., 2012).

Dentre as estratégias de conservação a serem aplicada, a formação de bancos genéticos é considerada uma interessante alternativa *ex situ*, visando o armazenamento de recursos genéticos, uma vez que a conservação *in situ* exige a preservação de um habitat inteiro, tornando-se menos exequível (HOLT et al., 1996). Além disso, a formação de um banco de germoplasma pode ser realizada através de diferentes fontes como a conservação de gametas, embriões, tecidos, células somáticas ou DNA (ANDRABI & MAWXELL, 2007).

Uma competente técnica para a conservação genética requer a criopreservação de um número inicial elevado de amostras viáveis oriundas do genótipo do animal de interesse (LEÓN-QUINTO et al., 2009). Nesse contexto, o estabelecimento de bancos de fragmentos de tecido somático para a obtenção de células tem sido indicado como uma abordagem prática para a conservação das espécies (CAAMAÑO et al., 2008, LEÓN-QUINTO et al., 2009). Esta técnica associada à transferência nuclear de células somáticas (clonagem) possibilita a conservação das espécies com maior diversidade genética. Nesse argumento, protocolos de criopreservação de tecidos poderiam melhorar a eficiência da conservação de catetos.

Quanto à técnica de criopreservação tecidual, tem sido demonstrado que a vitrificação é o método promissor e com maior eficiência, apresentando algumas vantagens quando comparada à congelação lenta, como sua brusca mudança de temperatura que evita a

1 formação de cristais de gelo, diminuindo os danos no tecido (SILVESTRE et al., 2004).
2 Assim, para otimizar a vitrificação, diferentes métodos da técnica já foram estudados, sendo a
3 vitrificação em superfície sólida uma interessante proposta (LUNARDI et al., 2012). Esse
4 sistema consiste na sobreposição do fragmento em uma superfície metálica parcialmente
5 submersa em nitrogênio líquido, ocasionando um rápido resfriamento da amostra, para em
6 seguida ser armazenada em criotubos. Tal procedimento em tecido ovariano confirmou-se
7 como um sistema alta exequibilidade e baixo custo (CARVALHO et al., 2011). Em catetos,
8 BORGES et al. (2015a,b) compararam o potencial de conservação deste método com a
9 vitrificação convencional em tecidos auriculares e verificaram resultados satisfatórios da
10 vitrificação em superfície sólida quanto aos parâmetros resultantes da histologia clássica e
11 cultivo *in vitro*.

12 Contudo, ainda alguns fatores podem influenciar na eficiência da vitrificação em
13 superfície sólida, como as concentrações e tipos de crioprotetores (CARVALHO et al., 2011).
14 Desta forma, o equilíbrio entre o tipo de crioprotetor escolhido dentro de suas variáveis [em
15 combinação ou sozinho, intracelular adicionado de extracelular e a combinação ideal das
16 concentrações] torna-se um procedimento interessante. Dentre os crioprotetores intracelulares
17 frequentemente utilizados tem-se o dimetilsufóxido (DMSO) e o etilenoglicol (EG) em
18 combinação ou não com agentes extracelulares como dissacarídeos e proteínas (KIM et al.,
19 2011). A escolha dos crioprotetores é determinante para o sucesso da criopreservação,
20 proporcionando uma maior viabilidade do tecido e o aumento na obtenção de células viáveis.
21 Neste sentido, análises realizadas pós-aquecimento em comparação com tecidos não
22 criopreservados pode fornecer informações se o processo de criopreservação empregado e os
23 requerimentos para este foram satisfatórios para a manutenção das atividades celulares.

24 Além disso, o conhecimento dos diferentes componentes da pele da região auricular
25 poderia favorecer o uso de agentes crioprotetores específicos tanto na criopreservação quanto
26 no cultivo *in vitro* desses tecidos (SANTOS et al., 2016), uma vez que componentes da pele
27 diferem em sua capacidade de transporte (GRABAU et al., 1995). Adicionalmente, pesquisas
28 voltadas para identificação do tecido tegumentar poderiam proporcionar um conhecimento
29 sobre a morfofisiologia desta espécie e daquelas filogeneticamente próximas.

30 Portanto, o presente trabalho objetivou caracterizar o sistema tegumentar auricular
31 periférico, visando com esse conhecimento aprimorar os protocolos de conservação tecidual e
32 avaliar por análises histológicas diferentes crioprotetores na vitrificação em superfície sólida
33 de tecido somático de catetos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância da criopreservação de amostras somáticas em mamíferos silvestres

O estabelecimento de criobancos somáticos tem sido indicado como uma ferramenta apropriada para a conservação de espécies, sendo uma alternativa interessante para a conservação da biodiversidade animal. Além disso, em associação com a transferência nuclear de células somáticas (TNCS, clonagem) permite o resgate de indivíduos ameaçados de extinção (LOI et al., 2001; KIM et al., 2007) ou extintos (FOLCH et al., 2009).

Esses três trabalhos acima citados claramente evidenciam a importância da conservação de amostras somáticas. Em 2001, Loi et al. obtiveram uma cria normal após os procedimentos de TNCS usando citoplastos (oócitos enucleados) derivados de ovinos domésticos e carioplastos (células somáticas doadoras de núcleo) do *Ovis orientalis musimon*. Já em 2007, Kim et al. produziram dois indivíduos clones *Canis lupus* também utilizando citoplastos domésticos e carioplastos somáticos, indicando a clonagem como uma técnica apropriada na conservação de espécies em vias de extinção. Finalmente, em 2009, Folch et al. produziram o primeiro clone de uma subespécie extinta, a *Capra pyrenaica pyrenaica*. Assim, embora a TNCS ainda possua uma baixa eficiência (PEREIRA & FREITAS, 2009), é cada vez mais evidente seu papel promissor na conservação e reprodução animal.

Em geral, a criopreservação de amostras somáticas permite não somente evitar a perda total da biodiversidade de indivíduos que morreram antes do estágio reprodutivo, mas também envolve estudos relacionados à fisiologia básica, genética, toxicologia entre outros (LEÓN-QUINTO et al., 2009; 2011). Ainda, o interesse pela formação de bancos somáticos não se restringe apenas a conservação da biodiversidade, mas também o manejo de criação visando fins econômicos (ARAT et al., 2011).

Além disso, inúmeras razões justificam o emprego de amostras somáticas, especialmente no que se refere à possibilidade de uma representação máxima da biodiversidade, uma vez que permite a colheita de fragmentos teciduais diferentes em um número maior de indivíduos e a não dependência da idade ou sexo (ANDRABI & MAXWELL, 2007; LEÓN-QUINTO et al., 2014). Um exemplo interessante que evidencia uma representação máxima dessa biodiversidade pôde ser observado em 2009 com o estabelecimento de vários criobancos visando à reprodução e conservação do lince ibérico (*Lynx pardinus*), um dos felinos ameaçados de extinção (LEÓN-QUINTO et al., 2009). Nesse trabalho, os autores obtiveram amostras somáticas de 69 diferentes indivíduos,

1 enquanto apenas sete machos e seis fêmeas tiveram seu material testicular e ovariano
2 recuperado, respectivamente.

3 Finalmente, amostras somáticas podem abranger tanto células quanto tecidos. Embora
4 vários trabalhos já tenham demonstrado a criopreservação de células somáticas (SONG et al.,
5 2007; PEREIRA et al., 2013), é sabido que em algumas regiões onde o sistema de cultivo *in*
6 *vitro* não esteja bem estabelecido ou a área de colheita da amostragem seja distante do
7 laboratório, a utilização de fragmentos teciduais criopreservados poderia ser a metodologia
8 proposta (SILVESTRE et al., 2004).

9 A criopreservação de fragmentos teciduais foi realizada inicialmente pelo método de
10 congelação lenta que já demonstrava sucesso na criopreservação de células somáticas
11 (revisado por LEWIS et al., 2016). Nesse estudo, a congelação lenta foi aplicada em
12 fragmentos teciduais, partindo do princípio que um mililitro de tecido possuía em média 1
13 milhão de células. Nesse contexto, fazia-se necessário uma criopreservação mais efetiva que a
14 congelação lenta para conservar tecidos maiores que 3,0 mm³ (LEWIS et al., 2016). Diante
15 dessa necessidade, surgia-se a vitrificação tecidual somática (KULESHOVA et al., 2007).

16 Em 2008, Caamaño et al. compararam a eficiência da congelação lenta e da
17 vitrificação em tecido somático derivado da pele de urso-pardo (*Ursus arctos*). Os autores
18 observaram que fragmentos teciduais poderiam ser criopreservados por ambos os métodos e
19 longos períodos e a viabilidade das células recuperadas mantidas após cultivo *in vitro*. Ainda
20 nesse estudo, os autores demonstraram que os fragmentos oriundos da vitrificação atingiam a
21 confluência em mais dias quando comparados àqueles fragmentos congelados (19,2 vs. 11,2
22 dias), necessitando assim de mais refinamentos nos protocolos de vitrificação em tecido
23 somático, uma vez que esse método envolvia sistemas mais simples de execução,
24 promovendo a redução de custos.

25 Em 2011, Cetinkaya & Arat compararam a eficiência da congelação lenta e
26 vitrificação em tecido cartilaginoso bovino e demonstraram que a vitrificação seria o método
27 mais indicado na conservação desses tecidos, podendo ser aplicado na formação de
28 criobancos e as células recuperadas na técnica de TNCS. Contudo, alguns pontos críticos
29 ainda necessitam ser elucidados quanto à formação de cristais de gelo, toxicidade osmótica
30 dos crioprotetores e um aquecimento uniforme e rápido (LEWIS et al., 2016). Portanto, o
31 estabelecimento de criobancos tanto em animais domésticos quanto silvestres ainda exige o
32 desenvolvimento de protocolos apropriados (CETINKAYA & ARAT, 2011).

2.2. Fontes somáticas para a criopreservação tecidual em mamíferos silvestres

A habilidade de conservar as funções e viabilidade do tecido *ex vivo* é o principal desafio da conservação. Nesse sentido, as técnicas de conservação de tecidos somáticos devem atender principalmente a três importantes princípios: preservar a funcionalidade e integridade das células constituintes do tecido, permitir o armazenamento prolongado da amostra e em condições de difícil acesso ser de fácil realização (TOVAR et al., 2008).

Para atender todos esses princípios, além dos critérios dos procedimentos de criopreservação, a busca por fontes de tecidos somáticos mais exequíveis tem sido proposta, especialmente em se tratando de mamíferos silvestres onde a contenção dos animais é dificultosa (SANTOS et al., 2015). Nesse contexto, embora existam diferentes fontes de tecido somático, fragmentos derivados da pele ainda são os mais empregados (CAAMAÑO et al., 2008; TOVAR et al., 2008; LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Em mamíferos silvestres, diferentes fontes de tecidos somáticos podem ser obtidas visando à conservação tecidual, como tecido adiposo (ALMEIDA et al., 2014), tecido muscular e cartilaginoso (CAPUTCU et al., 2013), tecido ósseo (BERG et al., 2007) e tecidos epitelial e conjuntivo propriamente dito (LEÓN-QUINTO et al., 2009). O interesse por várias fontes teciduais parte, principalmente, da possibilidade de uso dos tipos celulares como célula doadora de núcleo na TNCS (ARAT et al., 2011). Nesse sentido, amostras derivadas da pele são bastante empregadas para a conservação tecidual, visando além da formação de criobancos, a reprodução por TNCS e estudos de pluripotencialidade (**Quadro 1**).

Em se tratando da colheita da pele (**Figura 1**), a periferia da orelha é bastante empregada em virtude de sua fácil obtenção, onde a retirada dos fragmentos pode ocorrer muitas vezes do próprio procedimento de manejo de identificação dos animais (SANTOS et al., 2016). Além disso, quanto ao tamanho do tecido coletado este pode ser variável, principalmente para atender a técnica de vitrificação que neste tecido será empregado, bem como a quantidade do tecido possível de ser coletado. Assim, o tamanho do tecido utilizado é entre 1,0 mm (SAINI et al., 2015) até 8,0 mm (CAAMAÑO et al., 2008).

Em geral, fragmentos da pele podem ser obtidos por biópsia de animais vivos (BORGES et al., 2015a,) e/ou durante a necropsia (OH et al., 2008). Nesta última situação, a informação sobre a causa e o tempo *post-mortem* é importante para os próximos procedimentos. Além disso, diferentes soluções foram descritas para a colheita de tecidos, como a solução tampão fosfato em espécies nativas do Chile (TOVAR et al., 2008) ou meio de cultivo suplementado utilizado para *P. tajacu* (BORGES et al., 2015a,b).

1 **Quadro 1.** Diferentes fontes de tecidos somáticos visando à conservação e reprodução em alguns mamíferos silvestres.

Espécie	Fonte	Principal finalidade	Autores
<i>Felis silvestris lybica</i>	Pele	TNCS intraespécie	GÓMEZ et al. (2003)
<i>Mustela putorius furos</i>	Fetal	TNCS	LI et al. (2003)
<i>Naemorhedus caudatus</i>	Pele	Análise do ciclo celular	HASHEM et al. (2006)
<i>Cervus elaphus</i>	Perióstio	TNCS	BERG et al. (2007)
<i>Panthera tigris altaica</i>	Pele	Estabelecimento de linhagem	SONG et al. (2007)
<i>Canis lupus</i>	Pele	TNCS intraespécie	OH et al. (2008)
<i>Ursus arctos</i>	Pele	Formação de criobanco	CAAMAÑO et al. (2008)
<i>Lynx pardinus</i>	Pele	Formação de criobanco	LEÓN-QUINTO et al. (2009)
<i>Panthera tigris</i>	Pele	Estabelecimento de linhagem	GUAN et al. (2010)
<i>Mandrillus leucophaeus</i>	Pele	Indução à pluripotência	BEM-NUN et al. (2011)
<i>Panthera uncia</i>	Pele	Indução à pluripotência	VERMA et al. (2012)
<i>Bubalus arnee</i>	Pele	TNCS intraespécie	PRIYA et al. (2014)
	Pele	TNCS intraespécie	SAINI et al. (2015)
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Mucosa bucal	Obtenção de células progenitoras	PRESCOTT et al. (2015)
<i>Dasyprocta leporina</i>	Pele	Formação de criobanco	COSTA et al. (2015)
<i>Pecari tajacu</i>	Pele	Formação de criobanco	BORGES et al. (2015a,b)



Figura 1. Biópsias de pele em catetos. **(A)** Catetos jovens e adultos mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/ UFERSA). **(B)** Captura de cateto jovem com puçá. **(C)** Imobilização do cateto para identificação. **(D)** Identificação de catetos jovens por moxa. **(E)** Fragmentos de pele da região auricular obtido após identificação por moxa. **(F)** Fragmentos de pele armazenados para transporte em meio de cultivo.

2.3. Processamento e vitrificação dos fragmentos somáticos em mamíferos silvestres

O processamento de fragmentos teciduais visa à conservação máxima dos constituintes celulares e estruturais do tecido para que este possa ter a máxima conservação. Durante este processamento, dois fatores são importantes: a fonte tecidual e os requerimentos nutricionais do meio a ser empregado (SANTOS et al., 2015). Em geral, o meio de processamento deverá

1 atender as necessidades do tecido visando manter a máxima viabilidade (CAAMAÑO et al.,
2 2008) e os mesmos meios utilizados na colheita podem ser utilizados.

3 No lince-ibérico (LEÓN-QUINTO et al., 2009; 2011; 2014), os autores coletaram e
4 processaram tecido somático de indivíduos jovens, adultos e fetos em meio essencial mínimo
5 modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com tampão HEPES, antibióticos e
6 antifúngicos usando fragmentos de tamanhos variáveis, de acordo com o sistema de manejo
7 aplicado. Já em goral (*Naemorhedus caudatus*), fragmentos da pele foram processados em
8 solução tampão fosfato acrescido de antibióticos (HASHEM et al., 2006) e em búfalo
9 selvagem (*Bubalus arnee*) usando solução tampão fosfato modificado por Dulbecco (DPBS)
10 com antibióticos (SAINI et al., 2015).

11 O tamanho do fragmento após a colheita é variável e depende da disponibilidade do
12 tecido (TOVAR et al., 2008) e o tipo de vitrificação e materiais empregados (BORGES et al.,
13 2015a,b). Normalmente, fragmentos medindo cerca de 1,0 mm³ ou acima podem ser
14 empregados (SONG et al., 2007). Em *P. tajacu* (BORGES et al., 2015a,b) e *D. leporina*
15 (COSTA et al., 2015), por exemplo, as amostras foram fragmentadas de acordo com o
16 protocolo de vitrificação em 9,0 mm³ (3 x 3 x 1 mm).

17 Em geral, a vitrificação requer condições que levem à parada/redução máxima de
18 todas as atividades biológicas e químicas por períodos prolongados de armazenamento sem
19 afetar a longevidade celular (JOMHA et al., 2002; 2012). Para atingir o estado vítreo é
20 interessante a combinação de três fatores básicos: altas taxas de resfriamento, alta viscosidade
21 do meio de criopreservação e um volume mínimo de crioprotetores (SARAGUSTY &
22 ARAV, 2011). Desta maneira, evita-se a formação de cristais de gelo intracelulares que
23 causam danos irreversíveis, preservando o material desejado sem injúrias e apto a retomar
24 suas funções metabólicas após o aquecimento.

25 Já foram utilizados alguns trabalhos na conservação de tecido somático em mamíferos
26 silvestres. Caamaño et al. (2008) utilizaram a vitrificação convencional usando criotubos para
27 criopreservação de fragmentos somáticos da pele de urso-pardo. Neste protocolo, fragmentos
28 foram inicialmente incubadas em DMEM contendo 20% de DMSO, 20% de EG e soro fetal
29 bovino (SFB) a 20% e colocadas em criotubos. As amostras foram equilibradas durante 10
30 min à temperatura ambiente, mergulhadas e armazenadas em nitrogênio líquido. O
31 aquecimento foi conduzido a 38°C por 2 min, seguindo da remoção do meio e acréscimo de
32 meio de cultivo.

Em *P. tajacu* (BORGES et al., 2015a,b) e *D. leporina* (COSTA et al., 2015), a vitrificação convencional e por superfície sólida já foram empregadas. Nesses estudos, foram demonstradas que ambas as técnicas de vitrificação preservaram as características viáveis dos fragmentos vitrificados, avaliados por histologia clássica e cultivo *in vitro*. O método de vitrificação em superfície sólida consistiu na exposição dos fragmentos em meio DMEM suplementado com 20% de DMSO, 20% de EG, 0,25 M de sacarose e 10% de SFB por 5 min. Posteriormente, o excesso de crioprotetores foi removido e as amostras depositadas em uma superfície de metal cúbico parcialmente colocado em nitrogênio líquido. Ao final, amostras foram transferidas para criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido. Para o aquecimento, os criotubos foram expostos a 37°C por 1 min e o meio de vitrificação retirado por lavagens sucessivas em concentrações decrescentes de sacarose.

Assim, Borges et al. (2015 a,b) através destes estudos que compararam os métodos de vitrificação, concluíram que a vitrificação em superfície sólida proporcionou melhores respostas em termos de manutenção das características histológicas e viabilidade das células em cultivo para o tecido somático de catetos. Contudo, apesar do conhecimento do melhor método de vitrificação, ainda é necessário o estabelecimento de crioprotetores adequados no procedimento, que pode ser melhor elucidado a partir do conhecimento estrutural do tecido tegumentar da espécie.

Além disso, a viabilidade do tecido pós-aquecimento é realizada usualmente pela análise histológica da amostra (COMIZZOLI et al., 2012). A avaliação histológica proporciona um requisito básico para o conhecimento das estruturas (PAULA et al., 2002) que foram afetadas ou mantidas normais durante procedimentos de criopreservação, possibilitando a visualização do tecido como um todo, como na análise dos seus constituintes, epiderme e derme (BORGES et al., 2015a,b).

2.4. Crioprotetores empregados na vitrificação tecidual

A diversidade e a densidade de células presente no tecido afeta a tolerância osmótica e térmica do mesmo (KARLSSON & TONER, 1996). Além disso, a interação entre as células e a matriz celular é outro ponto que deve ser observado durante a criopreservação, que por esta complexidade de fatores se torna mais complicado de permear e equilibrar os crioprotetores (GIWA et al., 2014). Desta forma, tem sido discutido alternativas em torno do crioprotetor ideal para a criopreservação de uma determinada amostra, considerando as variedades do tipo de tecido e espécie que implicam em modificações que requerem um crioprotetor mais

1 adequado (LEWIS et al., 2016). Essa busca por soluções de vitrificação que causem o mínimo
2 efeito citotóxico é recorrente em diversos trabalhos de vitrificação de tecido, com conclusões
3 diferenciadas para cada tipo de tecido e crioprotetores (DA-CROCE et al., 2012; CAPUTCU
4 et al., 2013).

5 Neste contexto, algumas considerações devem ser analisadas para a escolha do
6 crioprotetor a fim de garantir o sucesso na vitrificação. Um dos pontos é o grau de toxicidade
7 que crioprotetor oferece ao tecido. Este parâmetro está relacionado tanto ao seu potencial de
8 difusão no fragmento tecidual, como na diminuição rápida da temperatura, bem como a
9 concentração de crioprotetor utilizada, uma vez que quanto maior a concentração do
10 crioprotetor maior a toxicidade. Farooque et al. (2009) indicaram que o efeito citotóxico pode
11 ser amenizado pelo tempo que o crioprotetor será exposto ao tecido e a temperatura de
12 exposição. Contudo, esta toxicidade também poderá ser bastante influenciada pelo tamanho
13 do tecido, o método de criopreservação e o tempo de exposição dos crioprotetores (AMORIM
14 et al., 2011). Todos esses fatores são determinantes para que a ação do crioprotetor tenha
15 efeito em todo o tecido, em especial a escolha ideal da concentração utilizada e combinação
16 do agente crioprotetor (ABAZZARI et al., 2013). Ainda, a suscetibilidade à toxicidade irá
17 variar de acordo também com o tecido e até mesmo de célula para célula (WUSTEMAN et
18 al., 2004).

19 Desta forma, a eficiência da vitrificação pode estar relacionada a essa capacidade
20 permeável da membrana para a saída da água e difusão dos crioprotetores, como também a
21 tolerância osmótica que o tecido terá ao processo, a concentração utilizada desses agentes sem
22 provocar toxicidade, e a resistência da amostra as temperaturas de congelação e aquecimento,
23 em que a criosensibilidade pode variar de acordo com a espécie (COMIZZOLI et al., 2012).
24 Dentre os crioprotetores estão os intracelulares e extracelulares, em que comumente são
25 utilizados em combinação a fim de diminuir a toxicidade (CARVALHO et al., 2013). Apesar
26 da combinação de crioprotetores apresentar resultados satisfatórios no alcance do estado
27 vítreo (WEISS et al., 2010; BORGES et al., 2015), analisar individualmente a ação de cada
28 crioprotetor pode ser uma informação interessante para conhecer a eficiência da vitrificação
29 de tecido auricular, especialmente àqueles largamente conhecidos, como DMSO, EG e
30 sacarose.

31 O DMSO possui uma boa capacidade de permeabilizar a membrana celular, devido ao
32 seu baixo peso molecular e hidrofiliidade. Seu mecanismo para evitar a formação de cristais
33 de gelo consiste na formação de ligações de hidrogênio, possuindo afinidade pela água e então

1 ele assume a função de desnaturar a membrana (ARAKAWA et al., 1990). A integridade da
2 membrana ao ser lesionada por cristais de gelo ou excesso de soluto presente na célula pode
3 causar a morte da mesma por apoptose ou necrose (CETINKAYA et al., 2014). Já o EG
4 possui o mecanismo de exercer uma força coesiva na água e possuir um efeito
5 desestabilizante na solução de criopreservação (ARAKAWA et al., 1990). Finalmente, a
6 sacarose tem sido utilizada para que a turgidez excessiva e choque osmótico sejam evitados,
7 sendo um crioprotetor não permeável, estabilizando as membranas celulares durante a
8 congelação, através do aumento da tensão superficial (CROWE et al., 1988).

9 Quanto a aplicação destes crioprotetores, Borges et al. (2009) obtiveram resultados
10 mais favoráveis para criopreservação de tecido ovariano suíno com a combinação dos
11 crioprotetores DMSO e EG na presença de sacarose. Amorim et al. (2011) testando diferentes
12 composições de solução de vitrificação concluíram que a vitrificação usando uma combinação
13 de EG, dissacarídeo e uma fonte proteica mostrou melhores resultados que as demais soluções
14 testadas em tecido ovariano humano. Adicionalmente, na criopreservação de tecido
15 pancreático murino, o EG mostrou uma menor toxicidade que o DMSO (SAKONJU et al.,
16 1996).

17 Ainda, seguindo com o objetivo de fixar as melhores condições para a criopreservação
18 e formação do criobancos de tecido somático do lince ibérico, León-Quinto et al. (2011)
19 testaram diferentes concentrações de crioprotetores (5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15% de
20 DMSO) em combinação com duas concentrações de sacarose (0,1 M e 0,2 M) e verificaram
21 que a melhor combinação para a criopreservação de tecido somático seria o DMSO a 10%
22 com 0,2 M de sacarose. O sucesso da adição da sacarose pode ser atribuído ao controle do
23 estresse osmótico que age como um crioprotetor extracelular, aumentando a desidratação e
24 preservando a integridade das membranas celulares (ZHANG et al., 2009).

25 Caputcu et al. (2013) para a vitrificação de tecido somático utilizaram a solução
26 constituída por EG, DMSO e SFB, sendo a adição do soro justificada pelo seu papel no
27 controle da pressão osmótica, provavelmente por conter a albumina em sua composição
28 (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006; JOMHA et al., 2012). Contudo, apesar da proteção que os
29 crioprotetores oferecem para as células, existe o risco de danos em células, especialmente
30 quando é usado em concentrações bastante elevadas (LÉON-QUINTO et al., 2011), uma vez
31 que essas concentrações podem diminuir a força iônica e reduzir o encolhimento celular e
32 extravasamento de eletrólitos (PRAUS et al., 1980).

1 Finalmente, o equilíbrio entre o tipo de crioprotetor escolhido dentro de suas variáveis:
2 em combinação ou sozinho, intracelular adicionado de extracelular, e a combinação ideal das
3 concentrações para que não ofereçam danos ao tecido são fatores determinantes para o
4 sucesso da criopreservação tecidual.
5

3. JUSTIFICATIVA

A vitrificação de tecido somático consiste numa ferramenta que pode ser aplicada com sucesso na conservação da biodiversidade. Essa abordagem de conservação possui várias vantagens, como a possibilidade de obter uma maior amostragem, facilidade na colheita das amostras, não se limitar a um grupo de animais e possuir um baixo custo quando comparado à congelação lenta. Todas essas características tornam a vitrificação de tecido somático uma proposta de relevante interesse, especialmente para catetos, animais silvestres de alta relevância científica, ecológica e econômica.

Nesse sentido, para atingir uma eficiente vitrificação do tecido somático é necessário o conhecimento dos aspectos morfológicos e componentes celulares do material que se pretende criopreservar, bem como o esclarecimento dos protocolos de criopreservação a serem aplicados. Em relação ao método de criopreservação, a vitrificação em superfície sólida tem demonstrado aspectos interessantes para ser aplicada em tecido somático. Nesse aspecto, os parâmetros que influenciam a eficiência da vitrificação devem ser abordados, como o tipo de crioprotetor e a sua concentração. Em diferentes processos de vitrificação, o DMSO e/ou EG em associação com sacarose e adicionado de SFB tem sido uma composição que fornece resultados satisfatórios. Contudo, a fim de melhorar a viabilidade do tecido para posterior obtenção de células somáticas, concentrações e combinações mais adequadas poderiam ser definidas.

Finalmente, a análise de alguns requerimentos para a criopreservação de células somáticas oriundas de tecido auricular de catetos permitirá definir um protocolo mais adequado para a posterior recuperação de células somáticas, bem como auxiliar na conservação do material genético da espécie pela conservação de tecidos e células somáticas.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I – O sistema tegumentar da região auricular periférica de catetos apresenta características estruturais que o diferenciam de algumas espécies mamíferas.

II – A combinação de crioprotetores intracelulares (DMSO a 1,5 M e EG a 1,5 M) é adequada para a criopreservação de tecido somático auricular de catetos, proporcionando a manutenção da viabilidade do tecido.

III – A adição de crioprotetor extracelular (sacarose) aumenta a capacidade de criopreservação da solução de vitrificação, promovendo a conservação das características normais do tecido somático auricular de catetos.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar histologicamente o sistema tegumentar da região auricular periférica e avaliar diferentes crioprotetores na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de catetos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o sistema tegumentar auricular de catetos, visando com esse conhecimento aprimorar os protocolos de conservação tecidual.

- Avaliar o efeito da adição do crioprotetor extracelular (sacarose) em combinação com agentes crioprotetores intracelulares em diferentes concentrações (dimetilsulfóxido e/ou etilenoglicol) na vitrificação em superfície sólida de tecido somático de catetos;

6. REFERÊNCIAS

- ABAZZARI, A.; JOMHA, N.M.; ELLIOTT, J.A.; MCGANN, L.E. Cryopreservation of articular cartilage. **Cryobiology**, v. 66, p. 201–209, 2013.
- ALMEIDA, M.M.; CAIRES, L.C.J.; MUSSO, C.M.; CAMPOS, J.M.S.; MARANDUBA, C.M.C.; MACEDO, G.C.; MENDONÇA, J.P.R.F.; GARCIA, R.M.G. Protocol to cryopreserve and isolate nuclei from adipose tissue without dimethyl sulfoxide. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 10921–10933, 2014.
- AMORIM, C.A.; DAVID, A.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. **Fertility and Sterility**, v. 95, p. 1094–1097, 2011.
- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science** v. 99, p. 223–243. 2007.
- ARAKAWA, T.; CARPENTER, J.F.; KITA, Y.A.; CROWE, J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. **Cryobiology**, v. 27, p. 401–415, 1990.
- ARAT, S.; CAPUTCU, A.T.; AKKOC, T.; PABUCCUOGLU, S.; SAGIRKAYA, H.; CIRIT, U.; NAK, D. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 1012–1023, 2011.
- BEN-NUN, I.F.; MONTAGUE, S.C.; HOUCK, M.L.; TRAN, H.T.; GARITAONANDIA, I.; LEONARDO, T.R.; LORING, J.F. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. **Nature Methods**, v. 8, p. 829–831, 2011.
- BERG, D.K.; LI, C.; ASHER, G.; WELLS, D.N.; OBACK, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 384–394, 2007.
- BODMER, R.E.; BENDAYAN, N.Y.; MOYA, L.; FANG, T.G. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. **Boletín de Lima**, v. 70, p. 49–56, 1990.

- 1 BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; SANTOS, M.L.T.; QUEIROZ NETA, L.B.; PRAXEDES,
2 E.C.G.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Histological
3 evaluation of ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu*) after different vitrification
4 techniques. **Animal Reproduction**, v. 12, p. 230, 2015a.
- 5 BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.Q.; SANTOS, M.V.O.; SANTOS, M.L.T.; LIMA,
6 G.L.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Isolation of somatic cell derived from
7 ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different
8 vitrification techniques. **Animal Reproduction**, v. 12, p. 842, 2015b.
- 9 BORGES, E.N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; ROCHA-JUNIOR, C.M.C.; AMORIM, C.A.;
10 BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different
11 cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v.
12 59, p. 195–200, 2009.
- 13 CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; DE FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ,
14 E. Cryopreservation of Brown bear skin biopsies. **Cell Preservation Technology**, v. 6, p. 83–
15 86, 2008.
- 16 CAPUTCU, A.T.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; ARAT, S. Tissue cryobanking for
17 conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. **Cell and Tissue**
18 **Banking**, v. 14, p. 1–10, 2013.
- 19 CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LOPES, C.A.P.;
20 SANTOS, R.R.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Novel wide-capacity
21 method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal**
22 **Reproduction Science**, v. 138, p. 220–227, 2013.
- 23 CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.M.;
24 ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A. P.
25 R. Influence of vitrification techniques and solutions on themorphology and survival of
26 preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, p.
27 933–941, 2011.
- 28 CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking.
29 **Cryobiology**, v. 63, p. 292–297, 2011.

- 1 CETINKAYA, G; HATİPOĞLU, İ; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without
2 cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, v. 68, p. 65–70, 2014.
- 3 COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; HAGEDORN, M.; WILDT, D.E. Comparative
4 cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife
5 species. **Theriogenology**, v. 78, p. 1666–1681, 2012.
- 6 COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS,
7 M.L.T.; FRANCA, P.H.F.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Aplicação da
8 vitrificação para fins de conservação de tecido somático de cutias (*Dasyprocta leporina*).
9 **Anais da XXI Seminário de Iniciação Científica da UFERSA**, 2015.
- 10 CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; WISTROM, C.A.;
11 SPARGO B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica**
12 **et Biophysica Acta**, v. 947, p. 367–384, 1988.
- 13 DA-CROCE, L.; GAMBARINI-PAIVA, G.H.R.; ANGELO, P.C.; BAMBIRRA, E. A.;
14 CABRAL, A. C. V.; GODARD, A. L. B. Comparison of vitrification and slow cooling for
15 umbilical tissues. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, p. 65–76, 2013.
- 16 FAROOQUE, T.M.; CHEN, Z.; SCHWARTZ, Z.; WICK, T.M.; BOYAN, B.D.;
17 BROCKBANK, K.G. Protocol development for vitrification of tissue-engineered cartilage.
18 **Bioprocessing**, v. 8, p. 1–14, 2009.
- 19 FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ,
20 Y.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica*
21 *pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, v. 71, p. 1026–1034, 2009.
- 22 GIWA, S.; TOCCHIO, A.; ACKER, J.; WOODS, E. Catalyzing cryopreservation
23 breakthroughs to save millions of lives. **Cryobiology**, v. 69, p. 523, 2014.
- 24 GÓMEZ, M.C.; JENKINS, J.A.; GIRALDO, A.; HARRIS, R.F.; KING, A.; DRESSER, B.L.;
25 POPE, C.E. Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated
26 domestic cat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1032–1041, 2003.

- 1 GRABAU, J.H.; DONG, L.; MATTIE, D.R.; JEPSON, G.W.; MCDOUGAL, J.N.
2 Comparison of anatomical characteristics of the skin for several laboratory animals: **Geo-**
3 **Centers Inc Newton Centre Ma**, 1995.
- 4 GUAN, W.J.; LIU, C.Q.; LI, C.Y.; LIU, D.; ZHANG, W.X.; MA, Y. H. Establishment and
5 cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*).
6 **CryoLetters**, v. 31, p. 130–138, 2010.
- 7 HASHEM, M.A.; BHANDARI, D.P.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; SUK, H.W. Cell cycle
8 analysis of *in vitro* cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. **Cell**
9 **Biology International**, v. 30, p. 698–703, 2006.
- 10 HOLT, W.V; BENNETT, P.M; VOLOBOUEV, V. Genetic resource banks in wildlife
11 conservation. **Journal of Zoology**, v. 238, p. 531–544, 1996.
- 12 JOMHA, N.M.; ANOOP, P. C.; BAGNALL, K.; MCGANN, L.E. Effects of increasing
13 concentrations of dimethyl sulfoxide during cryopreservation of porcine articular cartilage.
14 **Cell Preservation Technology**, v. 1, p. 111–120, 2002.
- 15 JOMHA, N.M.; ELLIOTT, J.A.; LAW, G.K.; MAGHDOORI, B.; FRASER FORBES, J.;
16 ABAZARI, A.; MCGANN, L.E. Vitrification of intact human articular cartilage.
17 **Biomaterials**, v. 33, p. 6061–6068, 2012.
- 18 KARLSSON, J.O.M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical
19 issues. **Biomaterials**, v. 17, p. 243–256, 1996
- 20 KIM, Y.; KIM, M.R.; AHN, J.H.; KIM, S.J.A Simple method for cryopreservation of human
21 periodontal ligament cells in a vitrification solution containing 20% ethylene glycol and 20%
22 dimethyl Sulfoxide. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 8, p. 415–421,
23 2011.
- 24 KIM, M.K.;JANG, G.; OH, H.J.; YUDA, F.; KIM, H.J.; HWANG, W.S.; HOSSEIN, M.S.;
25 KIM, J.J.; SHIN, N.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Endangered wolves cloned from adult
26 somatic cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 130–137, 2007.
27
- 28 KULESHOVA, L.L.; GOUK, S.S.; HUTMACHER, D.W. Vitrification as a prospect for
29 cryopreservation of tissue-engineered constructs. **Biomaterials**, v. 28, p. 1585–1596, 2007.

- 1 LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-
2 HERNANDEZ, F.J.; MORENO, J.M.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a
3 supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the *Iberian lynx* bank as a model
4 for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 347–361, 2009.
- 5 LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, Á.; SERNA, A Different
6 cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal,
7 the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, p. 227–233, 2014.
- 8 LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking
9 the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin
10 biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and
11 cells. **Cryobiology**, v. 62, p. 145–151, 2011.
- 12 LEWIS, J.K.; BISCHOF, J.C.; BRASLAVSKY, I.; BROCKBANK, K.G.; FAHY, G.M.;
13 FULLER, B.J.; RABIN, Y.; TOCCHIO, A.; WOODS, E.J.; WOWK, B.G.; ACKER, J.P.
14 GIWA, S. The grand challenges of organ banking: proceedings from the first global summit
15 on complex tissue cryopreservation. **Cryobiology**, v. 72, p. 169–182, 2016.
- 16 LI, Z.; SABET, M.R.; ZHOU, Q.; LIU, X.; DING, W.; ZHANG, Y.; RENARD, J.P.;
17 Developmental capacity of ferret embryos by nuclear transfer using G0/G1-phase fetal
18 fibroblasts. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2297–2303, 2003.
- 19 LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA, J.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue
20 of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells.
21 **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 962–964, 2001.
- 22 LUNARDI, F.O.; ARAÚJO, V.R.; FAUSTINO, L.R.; CARVALHO, A.A.; GONÇALVES,
23 R.F.B.; BASS, C.S.; BÁO, S.N.; NAME, K.P.O.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.;
24 RODRIGUES, A.P.R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep
25 preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v. 107, p. 121–130,
26 2012.
- 27 MARCO-JIMÉNEZ, F.; GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-
28 CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Cryopreservation of

- 1 European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum
2 supplementation, and cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 53, p. 51–57, 2006.
- 3 OH, H.J.; KIM, M.K.; JANG, G.; KIM, H.J.; HONG, S.G.; PARK, J.E.; PARK, K.; PARK,
4 C.; SOHN, S.H.; KIM, D.Y.; SHIN, N.S.; LEE, B.C. Cloning endangered gray wolves (*Canis*
5 *lupus*) from somatic cells collected postmortem. **Theriogenology**, v. 70, p. 638–647, 2008.
- 6 PAULA, T.A.R.; COSTA, D.S.; MATTA, S.L.P. Avaliação histológica quantitativa do
7 testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. **Bioscience Journal**, v. 18, p.
8 121–136, 2002.
- 9 PEREIRA, A.F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K.C.; CARNEIRO, I.S.; AVELARA, S.R.G.;
10 ALCÂNTARA NETO, A.S.; SOUSA, F.C.; MELO, C.H.S.; MOURA, R.R.; TEIXEIRAA,
11 D.I.A.; BERTOLINI, L.R.; FREITAS, V.J.F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors
12 contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos
13 (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 163–
14 172, 2013.
- 15 PEREIRA, A.F.; FREITAS, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas
16 atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 118–128, 2009.
- 17 PRAUS, R.; BÖHM, F.; DVOŘÁK, R. Skin cryopreservation: I. Incorporation of radioactive
18 sulfate as a criterion of pig skin graft viability after freezing to –196°C in the presence of
19 cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 17, p. 130–134, 1980.
- 20 PRESCOTT, H.M.; MANNING, C.; GARDNER, A.; RITCHIE, W.A.; PIZZI, R.; GIRLING,
21 S.; PIZZI, R.; GIRLING, S.; VALENTINE, I.; WANG, C.; JAHODA, C.A. Giant Panda
22 (*Ailuropoda melanoleuca*) buccal mucosa tissue as a source of multipotent progenitor cells.
23 **PloS One**, v. 10, p. e0138840, 2015.
- 24 PRIYA, D.; SELOKAR, N.L.; RAJA, A.K.; SAINI, M.; SAHARE, A.A.; NALA, N.;
25 SINGLA, S.K. Production of wild buffalo (*Bubalus arnee*) embryos by interspecies somatic
26 cell nuclear transfer using domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Reproduction in**
27 **Domestic Animals**, v. 49, p. 343–351, 2014.
- 28 SAINI, M.; SELOKAR, N.L.; RAJA, A.K.; SAHARE, A.A.; SINGLA, S.K.; CHAUHAN,
29 M.S.; MANIK R.S.; PALTA, P. Effect of donor cell type on developmental competence,

1 quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using
2 cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. **Theriogenology**, v. 84, p. 101–
3 108, 2015.

4 SAKONJU, I.; TAURA, Y.; INAYOSHI, Y.; SUZUKI, T.; TAKIMOTO, K.; NAKAICHI,
5 M.; NAKAMA, S. Cryopreservation of isolated rat islets of Langerhans in the presence of
6 ethylene glycol or dimethyl sulfoxide: evaluation of toxicity and the dynamic pattern of
7 subsequent insulin release *in vitro*. **Cryobiology**, v. 33, p. 354–362, 1996.

8 SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.D.C.; NOGUEIRA FILHO, S.L.G. Criação
9 comercial de caítilus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira**
10 **de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 1–10, 2009.

11 SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; NETA, L.Q.; OLIVEIRA, M.F.;
12 SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos
13 silvestres – estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, p. 382–386,
14 2015.

15 SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA,
16 M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.R. *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue
17 of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements.
18 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no prelo, 2016.

19 SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by
20 slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1–19, 2011.

21 SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.;
22 PAIVA, A.L.C.; PAULA, V.V.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccaries
23 (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus
24 various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v. 78, p. 605–611, 2012.

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

- 1 SONG, J.; HUA, S.; SONG, K.; ZHANG, Y. Culture, characteristics and chromosome
2 complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. **In Vitro Cellular &**
3 **Developmental Biology-Animal**, v. 43, p. 203–209, 2007.
- 4 SOUZA, J.M.G.; BATISTA, R.I.T.P.; MELO, L.M.; FREITAS, V.J.F. Reproductive
5 biotechnologies applied to the conservation of endangered ruminant – Past, Present and
6 Future. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 31–38, 2012.
- 7 TOVAR, H.; NAVARRETE, F.; RODRÍGUEZ, L.; SKEWES, O.; CASTRO, F.O. Cold
8 storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and
9 subsequent isolation of primary culture cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental**
10 **Biology**, v. 44, p. 309–320, 2008.
- 11 VERMA, R.; HOLLAND, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency
12 in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid.
13 **Theriogenology**, v. 77, p. 220–228, 2012.
- 14 WEISS, A.D.; FORBES, J.F.; SCHEUERMAN, A.; LAW, G.K.; ELLIOTT, J.A.;
15 MCGANN, L.E.; JOMHA, N.M. Statistical prediction of the vitrifiability and glass stability
16 of multi-component cryoprotective agent solutions. **Cryobiology**, v. 61, p. 123–127, 2010.
- 17 WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric
18 warming: biological problems and some approaches to their solution. **Cryobiology**, v. 48, p.
19 179–189, 2004.
- 20 ZHANG, J.M.; LI, L.X.; LIU, X.L.; YANG, Y.X.; WAN, X.P. Sucrose affecting successful
21 transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction**
22 **and Genetics**, v. 26, p. 137–142, 2009.
- 23

**CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO SISTEMA
TEGUMENTAR AURICULAR DE CATETO (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Artigo Experimental N° 01:

Título: Histological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system.

Periódico de submissão: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Qualis Medicina Veterinária A2).

Data de aceite: 19.10.2016.

Caracterização histomorfológica do sistema tegumentar auricular de cateto (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

*[Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system]*

RESUMO

A criopreservação de tecido somático derivado da pele de catetos consiste numa alternativa para a conservação da biodiversidade através da associação com a transferência nuclear. Neste contexto, a manipulação de tecidos da pele é uma etapa crucial para o sucesso desta biotécnica. Portanto, o objetivo foi caracterizar o sistema tegumentar auricular periférico de catetos, visando aprimorar a conservação tecidual. Para tanto, fragmentos auriculares de oito animais foram avaliados quanto às camadas teciduais, componentes, atividade proliferativa e viabilidade metabólica, usando as colorações hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, quantificação de AgNORs e microscopia eletrônica de transmissão. Assim, tamanhos de 104,2 μm e 222,6 μm foram observados para epiderme e derme, com uma proporção volumétrica de 36,6% e 58,7%, respectivamente. Além disso, na epiderme, foram evidenciadas as camadas basal (22,5 μm), intermediárias (53,5 μm) e córnea (28,2 μm), com valores médios de 65,3 células epidermais, 43,4 melanócitos e 14,8 halos perinucleares. Já a derme apresentou 127 fibroblastos com 2,5 AgNORs/nucléolo. Adicionalmente, a atividade metabólica foi de 0,243. Em conclusão, o sistema tegumentar auricular periférico de catetos possuiu algumas marcantes variações em relação a outros mamíferos, quanto ao número de camadas e espessura da epiderme, quantidade de células epidermais, melanócitos e parâmetros proliferativos.

Palavras-chave: animais silvestres, avaliação histológica, quantificação celular.

ABSTRACT

The cryopreservation of somatic tissue derived from skin of collared peccaries is an alternative for biodiversity conservation through association with the nuclear transfer. In this context, tissue manipulation of skin is a critical step for the success of this biotechnology. Therefore, the aim was to characterize the peripheral ear integumentary system derived from collared peccaries, directing to improve tissue conservation. Thus, ear fragments of eight animals were evaluated for tissue layers, components, proliferative activity and metabolic

1 viability, using hematoxylin-eosin and Gomori Trichrome, AgNORs quantification and
2 transmission electronic microscopy. Hence, sizes of 104.2 μm and 222.6 μm were observed in
3 the epidermis and dermis, with a volumetric ratio of 36.6% and 58.7%, respectively.
4 Moreover, in the epidermis were evidenced the basal layer (22.5 μm), intermediate (53.5 μm)
5 and cornea (28.2 μm), with mean values of 65.3 epidermal cells, 43.4 melanocytes and 14.8
6 perinuclear halos. Already the dermis has 127 fibroblasts with 2.5 AgNORs/nucleolus.
7 Additionally, the metabolic activity was 0.243. In conclusion, the peripheral ear
8 integumentary system derived from collared peccaries possessed some important variations
9 compared to other mammals, as the number of layers and thickness of the epidermis, number
10 of epidermal cells, melanocytes and proliferative parameters.

11 **Keywords:** wild animals, histological evaluation, cell quantification.

12 13 INTRODUÇÃO

14 O cateto (*P. tajacu*), pertencente à família Tayassuidae, subordem Suiformes, ordem
15 Aritodactyla (Groves e Grubb, 1993), é uma espécie com comprimento de 84–106 cm, altura
16 de 30–50 cm e peso de 18–30 kg (Desbiez *et al.*, 2009). Em geral, os animais possuem
17 pelagem castanho-cinza com uma faixa branca no pescoço, uma glândula próxima à cauda e
18 são considerados bons dispersores de sementes (Morales *et al.*, 2015). Também como
19 representantes da família Tayassuidae, tem-se o queixada (*Tayassu pecari*) e o tágua
20 (*Catagonus wagneri*), os quais, ao contrário dos catetos, se encontram em níveis
21 populacionais decrescentes (IUCN, 2016).

22 Além disso, a família Tayassuidae está relacionada com a Suidae, uma vez que pertencem à
23 mesma ordem (Bosma *et al.*, 2004), resultando esta proximidade entre as espécies em um
24 maior interesse pelos catetos, uma vez que a pele de suínos é a mais comumente utilizada
25 como modelo na medicina regenerativa humana (Morimoto *et al.*, 2015). Adicionalmente, os
26 catetos podem ser empregados como modelo experimental (Argôlo-Neto *et al.*, 2016) para
27 espécies da mesma família com níveis populacionais reduzidos. Ainda, os catetos em virtude
28 da apreciação de sua carne e couro podem ser empregados na criação comercial pela produção
29 e renda de produtores rurais, especialmente em regiões que não possuem condições de
30 suportar as necessidades domésticas (Santos *et al.*, 2009).

31 Assim, dentre as estratégias de conservação desta espécie, a criopreservação de germoplasma
32 pela conservação de tecido somático derivado da pele consiste numa alternativa interessante,
33 uma vez que permite uma maior facilidade na obtenção e uma ampla amostragem por

população (León-Quinto *et al.*, 2009). Além disso, tecidos somáticos criopreservados são fontes importantes de células doadoras de núcleo para a transferência nuclear ou clonagem. Contudo, há poucas informações sobre as características do sistema tegumentar auricular de catetos, o que dificulta o estabelecimento de protocolos de manipulação e criopreservação de maneira objetiva. O esclarecimento dos diferentes componentes da pele da região auricular poderia favorecer o uso de agentes específicos tanto na criopreservação quanto no cultivo *in vitro* desses tecidos (Santos *et al.*, 2016), uma vez que componentes da pele diferem em sua capacidade de transporte (Grabau *et al.*, 1995). Adicionalmente, pesquisas voltadas para identificação do tecido tegumentar poderiam proporcionar um conhecimento sobre a morfofisiologia desta espécie e daquelas filogeneticamente próximas. Portanto, o presente trabalho objetivou descrever o sistema tegumentar da região auricular periférica de catetos, usando técnicas histológicas e ultraestruturais.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos usados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.001072/2015-92), em conformidade com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no. 48633-1). Para tanto, um total de oito animais (3–6 meses), entre machos e fêmeas, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, no. IBAMA 1478912) foi usado. As amostras de pele da região auricular periférica foram recuperadas de maneira asséptica, de acordo com o sistema de manejo de identificação dos indivíduos e fragmentos (9,0 mm³) foram submetidos às diferentes análises. Assim, para a histologia clássica e quantificação de regiões argirofílicas organizadoras nucleares (AgNORs), fragmentos foram fixados em 4% de paraformaldeído, seccionados em 5,0 µm, corados com hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Gomori ou marcados com AgNOR e visualizados usando microscopia de luz (Leica DM500, Leica Microsystems, Alemanha) com câmara acoplada (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Alemanha) para a obtenção das imagens. Para a avaliação da HE, 20 campos aleatórios (magnitude 40×) foram selecionados em cada lâmina e analisados usando o software Image J (US National Institutes of Health, EUA) para a quantificação das células, halos perinucleares e proporção volumétrica da epiderme e derme, segundo a fórmula abaixo de Sharpe *et al.* (1989):

$$\text{Proporção volumétrica} = \frac{\text{somatório de sobreposição da estrutura aos pontos} \times 100}{\text{total de pontos contados}}$$

Já para a avaliação do Tricrômico de Gomori, imagens foram obtidas quanto à identificação de fibras colágenas e fibroblastos. Para a análise da atividade proliferativa, foram contabilizados 100 núcleos (magnitude 100×) em lâminas da marcação de AgNORs e avaliados conforme Yang *et al.* (2013).

Para a microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% e contrastados com acetato de uranila sob câmara escura. Na desidratação, foram realizados banhos crescentes de etanol, óxido de propileno, óxido de propileno-resina Spurr e somente resina. Após a inclusão e polimerização da resina, os blocos foram seccionados em 60 nm, contrastados com acetato de uranila 2% e em citrato de chumbo 0,5% para posterior visualização em microscopia (EM-94S2, Carl Zeiss, Alemanha).

Para a avaliação metabólica, fragmentos teciduais foram analisados pelo método calorimétrico brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Boekema *et al.* (2015). Brevemente, amostras foram incubadas em meio essencial mínimo por 30 min a 37°C e, posteriormente, em solução de MTT (2 mg/mL) por 3 h a 37°C. Os cristais formados após a incubação foram dissolvidos em dimetilsulfóxido e, em seguida, mensurações foram realizadas usando uma absorbância de 595 nm. Finalmente, os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e avaliados descritivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a pele da região auricular periférica de catetos apresentou uma estrutura histológica semelhante ao padrão de mamíferos (Junqueira e Carneiro, 2013) quanto à divisão em duas camadas, epiderme e derme (Fig. 1A) com diferenças celulares e estruturais visualizadas entre as mesmas, evidenciando suas origens embrionárias distintas, ectodérmica e mesodérmica, respectivamente. Além disso, a epiderme e a derme apresentaram uma proporção volumétrica de 36,6% e 58,7%, respectivamente. Numa classificação apresentada por Grabau *et al.* (1995) para mamíferos como suínos, murinos e primatas, a epiderme pode ser dividida em epiderme viável que contém células nucleadas (camada granular, espinhosa e basal) e a não viável que consiste de uma camada não nucleada queratinizada (camada córnea). Em catetos, a denominação viável foi identificada pelas camadas basal e intermediárias (Fig. 1B), as quais foram caracterizadas como mitogênicas. Já a epiderme não viável de catetos foi identificada como sendo a camada córnea (Fig. 1B), a qual possuía uma

forte queratinização. Todas essas características observadas na epiderme foram similares aos demais mamíferos (Grabau *et al.*, 1995).

Diferenças quanto ao número de camadas da epiderme podem ser evidenciadas em mamíferos. Em catetos, apenas três camadas foram visíveis na epiderme basal (22,5 μm), intermediárias (53,5 μm) e córnea (28,2 μm), apresentando um tamanho total de 104,2 μm (Fig. 2) e com tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado. Similaridade dessa divisão de camadas da epiderme também foi descrita em cervídeos (*Axis axis*, Nagaraju *et al.*, 2012). Em mamíferos em geral as camadas da epiderme podem ser divididas em córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal (Junqueira e Carneiro, 2013) e este padrão também pode ser observado em suínos (Jacobi *et al.*, 2005). Adicionalmente, Grabau *et al.* (1995) apresentaram o tamanho total da epiderme de alguns mamíferos e observaram camundongos (*Mus musculus*) com 46,7 μm , ratos (*Rattus norvegicus*) com 86,0 μm , cobaias (*Cavia porcellus*) com 115,4 μm , suínos (*Sus domesticus*) com 79,5 μm e macacos (*Macaca mulata*) com 35,7 μm . Em suínos Yucatan, a epiderme foi mensurada em 84,0 μm , num valor menor ao observado na epiderme de catetos (104,2 μm). Contudo, variações dessa espessura também são esperadas em raças da mesma espécie (Eggleston *et al.*, 2000) e talvez em outras raças suínas, os valores sejam mais similares aos catetos.

Além disso, a camada córnea apresentou células pavimentosas características dessa camada já evidenciada em diferentes espécies (Doran *et al.*, 1980). Já como camadas intermediárias foram consideradas a granulosa e a espinhosa, as quais foram de difícil distinção, conforme também observado em pacas (*Cuniculus paca*) por Isola *et al.* (2013) e em suínos por Turner *et al.* (2014).

Ainda, o sistema tegumentar auricular periférico de catetos apresentou algumas peculiaridades quando comparadas aos demais mamíferos, especialmente quanto ao número de células presentes e os parâmetros proliferativos quantificados por AgNOR. Especificamente quanto à camada basal (Fig. 1B), a mesma apresentou células cúbicas com núcleos esféricos e forte coloração em virtude da alta quantidade de melanina. A quantidade de melanócitos evidenciada na camada basal foi de 43,4 (Tab. 1) e a alta produção de melanina já era esperada em virtude da coloração escura que os catetos possuem. Para suínos Yorkshire, a quantidade média de melanócitos é de 6–15 (Navarro *et al.*, 2001).

Independente das camadas teciduais, variações nas camadas de células epidermais dentro das camadas basal, intermediárias e córnea puderam ser observadas. Adicionalmente, foram evidenciadas quatro camadas de células epidermais nos catetos, diferindo de pacas que

possuíram seis camadas (Isola *et al.*, 2013), cervídeos com três camadas e bovinos com cinco camadas (Nagaraju *et al.*, 2012), mas similar aos suínos (Monteiro-Riviere *et al.*, 1990) e caprinos (Nagaraju *et al.*, 2012).

Quanto à derme, a mesma apresentou um tamanho de 222,6 µm com os seguintes apêndices cutâneos: arteríolas e capilares sanguíneos (Fig. 1A), fibras colágenas (Fig. 1C), folículo piloso observado na papila dérmica e glândula sebácea localizada abaixo do folículo (Fig. 1E). Essa localização da glândula sebácea se assemelhou à identificada em cervídeos (Nagaraju *et al.*, 2012), pacas (Isola *et al.*, 2013) e suínos (Vardaxis *et al.*, 1997). Na coloração com Tricrômico de Gomori, foram observadas fibras colágenas de espessura aparentemente homogênea. Já por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar cada fibrila formada por bandas claras e escuras, delimitadas por estriações transversais, possuindo espaço entre elas e constituído de matriz extracelular (Fig. 1D).

Além disso, a derme de catetos apresentou um alto perfil proliferativo evidenciado pela quantificação de AgNORs (Tab. 2). Especificamente, as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são unidades estruturais e funcionais do nucléolo, nas quais estão localizadas as proteínas necessárias para a síntese de RNA ribossomal e, por isso, que a quantificação de AgNORs evidencia a atividade transcricional e proliferação celular (Mondal *et al.*, 2015). Nesse sentido, a avaliação dos padrões de AgNORs para um epitélio saudável e sem nenhum tratamento, permitirá em catetos a padronização para futuras análises. O número de AgNORs em catetos (2,48 com área de 1,15 µm, Tab. 2) foi similar ao evidenciado em epitélio humano (Jaafari-Ashkavandi e Fatemi, 2013), no qual esses autores obtiveram um número de 2,38 AgNORs numa área de 1,36 µm. Para suínos, o número de AgNORs foi de 1,22 e a área foi de 4,39 µm (Leong e Gilham, 1989; Preziosi *et al.*, 2000). Adicionalmente, os valores relacionados à área do AgNOR foram de acordo com a biogênese do ribossoma (Derenzini, 2000).

A atividade metabólica pelo ensaio de MTT permitiu inferir um padrão de 0,243 para a pele não submetida a nenhum tratamento nos catetos avaliados. Esta informação poderá ser útil em outras análises para quantificação de resposta metabólica após o processo de criopreservação. Além disso, o número de halos perinucleares evidenciados no tecido não submetido à criopreservação foi de $14,8 \pm 10,1$ (0–56). Esses halos são estruturas que sinalizam o início da apoptose e são formados quando o núcleo é separado do citoplasma (Boekema *et al.*, 2015), o que caracteriza um parâmetro também interessante na análise de um protocolo de conservação tecidual.

CONCLUSÃO

O presente estudo caracterizou-se como o primeiro trabalho de descrição da estrutura histológica do sistema tegumentar da região auricular periférica de catetos. Apesar de algumas similaridades, há parâmetros que variam marcadamente entre as espécies mamíferas e os catetos, especialmente quanto ao número de camadas e espessura da epiderme, quantidade de células epidermais, melanócitos e atividade proliferativa. O conhecimento obtido permitirá o direcionamento de protocolos de conservação de tecido somático da pele, visando à clonagem nesta espécie e daquelas filogeneticamente próximas, bem como oferecerá informações sobre o desenvolvimento e comportamento deste tecido.

REFERÊNCIAS

- ARGÔLO-NETO, N.M.A.; FEITOSA, M.L.T.; SOUSA, S.S. et al. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Sci. Vet.*, v.44, p.1-11, 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.
- BOSMA, A.A.; DE HAAN, N.A.; ARKESTEIJN, G.J.A. et al. Comparative chromosome painting between the domestic pig (*Sus scrofa*) and two species of peccary, the collared peccary (*Tayassu tajacu*) and the white-lipped peccary (*T. pecari*): a phylogenetic perspective. *Cytogenet. Genome. Res.*, v.105, p.115-121, 2004.
- DESBIEZ, A.L.J.; SANTOS, S.A.; KEUROGHLIAN, A.; BODMER, R.E. Niche partitioning among white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*), collared peccaries (*Pecari tajacu*), and feral pigs (*Sus scrofa*). *J. Mammal.*, v.90, p.119-128, 2009.
- DERENZINI, M. The AgNORs. *Micron.*, v.31, p.117-120, 2000.
- DORAN, T.I.; VIDRICH, A.; SUN, T.T. Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell*, v.22, p.17-25, 1980.
- EGGLESTON, T.A.; ROACH, W.P.; MITCHELL, M.A. et al. Comparison of two porcine (*Sus scrofa domestica*) skin models for *in vivo* near-infrared laser exposure. *Comp. Med.*, v.50, p.391-397, 2000.
- GRABAU, J.H.; DONG, L.; MATTIE, D.R. et al. Comparison of anatomical characteristics of the skin for several laboratory animals. EUA: Geo-Centers Inc Newton Centre, 1995. 35p.

1 GROVES, C.P.; GRUBB, P.; The suborder Suiformes. In: OLIVER, W.L.R. (Ed.), Pigs,
2 Peccaries and Hippos. Suíça: IUCN, The World Conservation Union, 1993. p.1-4.

3 ISOLA, J.G.; MORAES, P.C.; RAHAL, S.C.; MACHADO, M.R. Morfologia, ultraestrutura e
4 morfometria do tegumento da paca (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) criada em cativeiro.
5 *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p. 674-682, 2013.

6 IUCN: Red List of Threatened Species. Gland: IUCN. Disponível em: <[http://](http://www.iucnredlist.org)
7 www.iucnredlist.org>. Acessado em: 21 jun. 2016.

8 JAAFARI-ASHKAVANDI, Z.; FATEMI, F.S. Evaluation of proliferation activity in
9 dysplastic and nondysplastic oral lichen planus through the analysis of argyrophilic nucleolar
10 organizer regions. *J. Craniofac. Surg.*, v.24, p.788-791, 2013.

11 JACOBI, U.; TOLL, R.; AUDRING, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. The porcine snout–
12 an *in vitro* model for human lips?. *Exp. Dermatol.*, v.14, p.96-102, 2005.

13 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.
14 *Histologia Básica: Texto & Atlas*. Brasil: GUANABARA KOOGAN, 2013. p.354-365.

15 LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R. et al. Developing biological resource
16 banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as
17 a model for other endangered species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.112, p.347-361, 2009.

18 LEONG, A.S.Y.; GILHAM, P. Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant
19 melanoma and melanotic nevi. *Hum. Pathol.*, v.20, p.257-262, 1989.

20 MONDAL, N.K.; ROYCHOUDHURY, S.; RAY, M.R. Higher AgNOR expression in
21 metaplastic and dysplastic airway epithelial cells predicts the risk of developing lung cancer
22 in women chronically exposed to biomass smoke. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, v.34,
23 p.35-51, 2015.

24 MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; BRISTOL, D.G.; MANNING, T.O. et al. Interspecies and
25 interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow
26 measurements at five cutaneous sites in nine species. *J. Invest. Dermatol.*, v.95, p.582-586,
27 1990.

28 MORALES, J.C.G.; GUADARRAMA, V.M.F.; BLASIO, A.L. et al. Regionalización
29 histológica de la glándula dorsal del pecarí de collar (*Artiodactyla*, *Tayassuidae*: *Pecari*
30 *tajacu*). *Ciencia ergo-sum.*, v.22, p.225-232, 2015.

31 MORIMOTO, N.; MAHARA, A.; SHIMA, K. et al. The rapid inactivation of porcine skin by
32 applying high hydrostatic pressure without damaging the extracellular matrix. *Biomed. Res.*
33 *Int.*, v.2015, p.1-9, 2015.

1 NAGARAJU, G.N.; PRASAD, R.V.; JAMUNA, K.V.; RAMKRISHNA, V.
2 Histomorphological features in the differentiation of skin of spotted deer (*Axis axis*), Cattle
3 (*Bos indicus*) and Goat (*Capra hircus*). *Ind. J. Vet. Anat.*, v.24, p.10-12, 2012.

4 NAVARRO, F.A.; STONER, M.L.; LEE, H.B.; PARK, C.S.; WOOD, F.M.; ORGILL, D.P.
5 Melanocyte repopulation in full-thickness wounds using a cell spray apparatus. *J. Burn. Care.*
6 *Res.*, v.22, p.41-46, 2001.

7 PREZIOSI, R.; SARLI, G.; MARCATO, P.S. Cell proliferation and apoptosis in the
8 pathogenesis of oesophagogastric lesions in pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.68, p.189-196, 2000.

9 SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.S.D.C.; NOGUEIRA FILHO, S.L.G. Criação
10 comercial de caíatis (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. *Rev. Bras. S. Prod.*
11 *Anim.*, v.10, p.1-10, 2009.

12 SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B. et al. *In vitro* culture of somatic
13 cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium
14 with different requirements. *Pesqui. Vet. Bras.*, no prelo, 2016.

15 SHARPE, K.L.; EILER, H.; CULLEN, W.C.; HOPKINS, F.M. Morphometric analysis of
16 collagen in gestational and retained bovine placentomes. *Theriogenology*, v.32, p.485-491,
17 1989.

18 TURNER, N.J.; PEZZONE, D.; BADYLAK, S.F. Regional variations in the histology of
19 porcine skin. *Tissue Eng. Part C Methods.*, v.21, p.373-384, 2014.

20 VARDAXIS, N.J.; BRANS, T.A.; BOON, M.E. et al. Confocal laser scanning microscopy of
21 porcine skin: implications for human wound healing studies. *J. Anatomy.*, v.190, p.601-611,
22 1997.

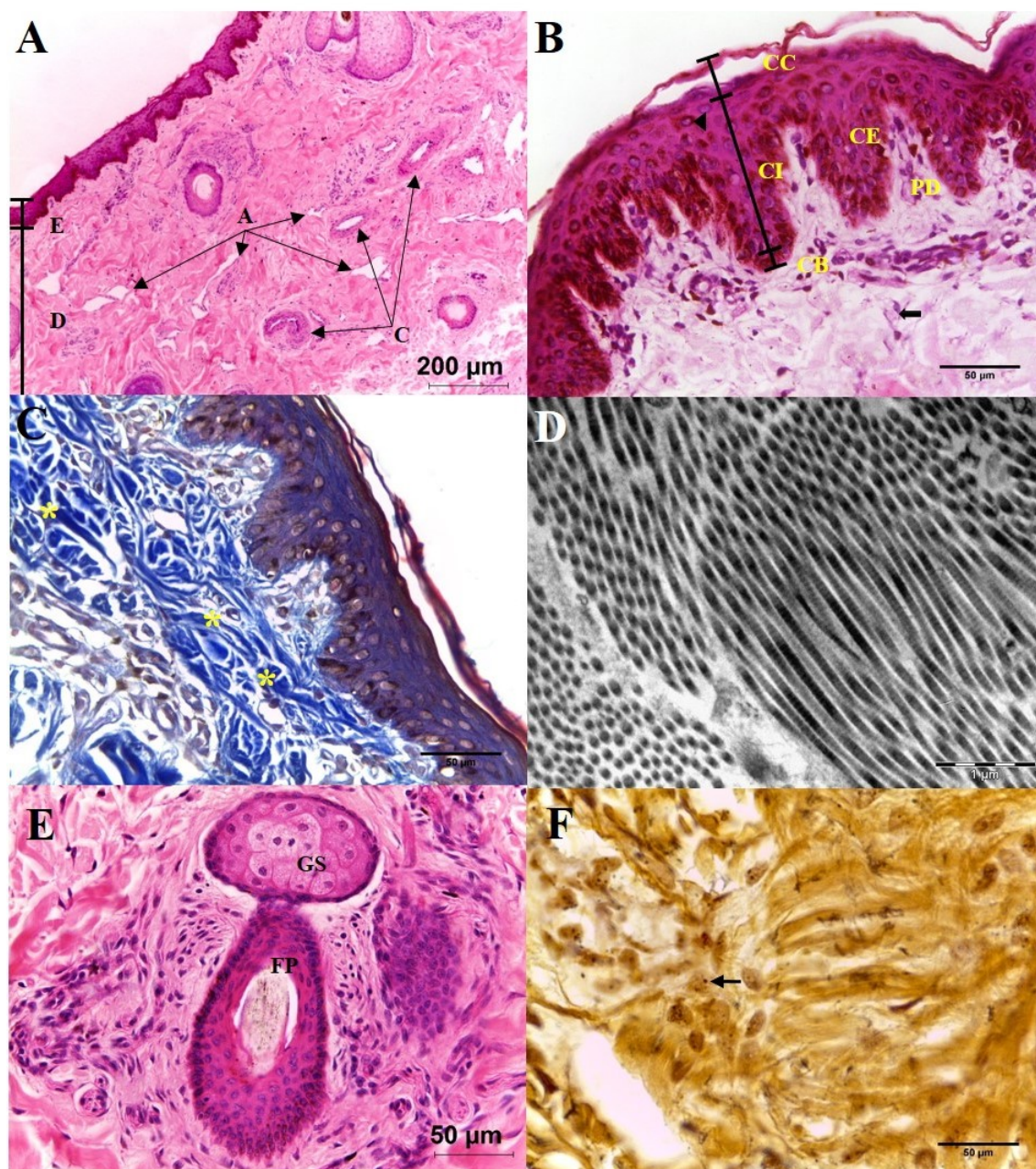
23 YANG, J.G.; DENG, Y.; ZHOU, L.X. et al. Overexpression of CDKN1B inhibits fibroblast
24 proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma filtration surgery when CDKN1B
25 inhibits fibroblast proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.54, p.343-352, 2013.

Tabela 1. Valores médios de diferentes células da epiderme derivada da região auricular de catetos (*P. tajacu*) usando a coloração de hematoxilina-eosina.

Parâmetros	Média $\pm$ desvio padrão	Variação
Células epidermais	65,3 $\pm$ 18,3	14 – 193
Melanócitos	43,4 $\pm$ 16,4	10 – 94
Fibroblastos	127,0 $\pm$ 41,1	54 – 275

Tabela 2. Avaliação da atividade proliferativa na derme da região auricular de catetos (*P. tajacu*) usando a quantificação de AgNORs.

Quantificação de AgNOR (média ± desvio padrão)				
Número		Área (µm)		
AgNORs	AgNORs/núcleo	AgNORs	Núcleo	AgNOR/ núcleo
2,48 ± 0,95	0,02 ± 0,01	1,15 ± 0,60	14,47 ± 6,09	0,14 ± 0,44



2

3 **Figura 1.** Fotomicrografias da pele de catetos (*P. tajacu*). **A:** Cúteis corada com HE. Epiderme
 4 (E), derme papilar (D), arteríola (A), capilares sanguíneos (C); **B:** Corte perpendicular de pele
 5 corada com HE. Camada córnea (CC), camadas intermediárias (CI), camada basal (CB),
 6 fibroblastos presentes na derme (seta), halos perinucleares (triângulo), (CE) cristas epiteliais,
 7 (PD) papilas dérmicas; **C:** Pele corada com tricrômico de Gomori. Fibras colágenas (*); **D:**
 8 Micrografia eletrônica de transmissão de fibras colágenas em cortes transversais e
 9 longitudinais; **E:** Estrutura do folículo piloso (FP) e glândula sebácea (GS); **F:** Quantificação
 10 de AgNORs. Pontos marcados do nucléolo (seta).

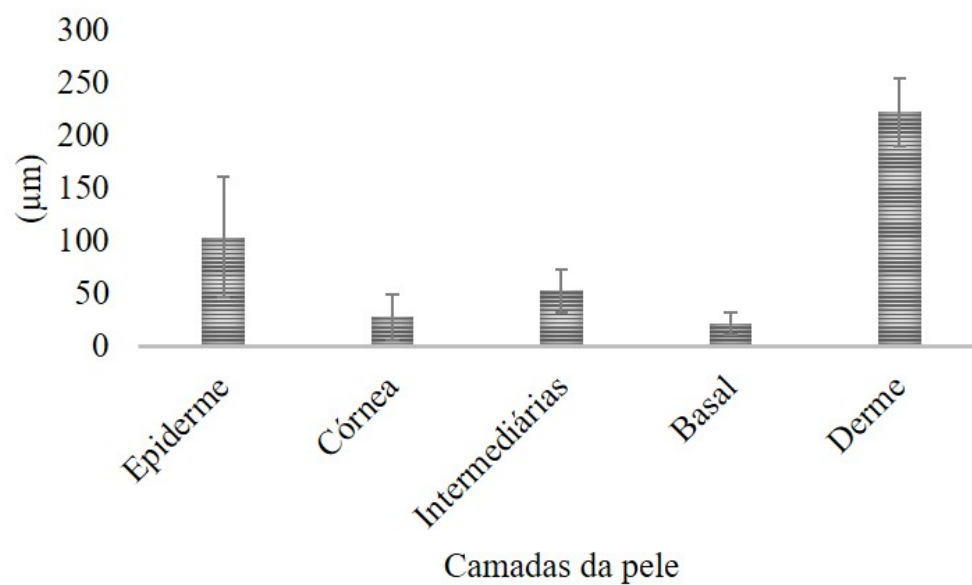


Figura 2. Mensuração dos tamanhos das camadas da pele e da epiderme da região auricular de catetos (*P. tajacu*) usando coloração de hematoxilina-eosina.

**CAPÍTULO 3 – COMBINAÇÃO DE ETILENOGLICOL COM SACAROSE
AUMENTA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS VITRIFICAÇÃO DE TECIDO
SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758)**

Artigo Experimental Nº 02:

Título: Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).

Periódico de submissão: Acta Histochemica (Qualis Medicina Veterinária B1).

Data de submissão: 02.10.2016.

Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Alana Azevedo Borges^a, Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra^b, Francilane Nascimento Costa^a, Luiza Bento de Queiroz Neta^a, Maria Valéria de Oliveira Santos^a, Moacir Franco de Oliveira^b, Alexandre Rodrigues Silva^c, Alexsandra Fernandes Pereira^{a*}

^aLaboratory of Animal Biotechnology. ^bLaboratory of Applied Animal Morphophysiology. ^cLaboratory of Animal Germplasm Conservation. Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoró, RN, Brazil.

*Corresponding author: Alexsandra Fernandes Pereira

Federal Rural University of Semi-Arid

Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil

Phone: +55 84 3317 8361

E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Abstract

The cryopreservation of somatic tissue in collared peccary promotes an alternative source of genetic material of this specie. The solid-surface vitrification (SSV) is a great option for preserving tissue; nevertheless, the optimization of SSV requirements is necessary, especially when referred to cryoprotectants that will compose the vitrification solution. Therefore, the aim was to evaluate the effect of the presence of 0.25 M sucrose in addition to different combinations (only or association) and concentrations (1.5 M or 3.0 M) of ethylene glycol (EG) and/or dimethyl sulfoxide (DMSO) in the somatic tissue vitrification of collared peccaries. Subsequently, we tested six combinations of cryoprotectants with or without sucrose in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) plus 10% fetal bovine serum. Thus, the 3.0 M EG with sucrose was able to maintain normal tissue characteristics compared with non-vitrified (control), especially for the volumetric ratio of epidermis (61.2 vs. 58.7) and dermis (34.5 vs. 36.6), number of fibroblast (90.3 vs. 127.0), and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) ratio (0.09 vs. 0.17), respectively. In conclusion, 3.0 M EG with

0.25 M sucrose resulted in a better cryoprotectant composition in the SSV for somatic tissue of collared peccaries.

Keywords: cryobanking, permeable cryoprotectant, non-permeable cryoprotectant

1. Introduction

The conservation of somatic tissue of collared peccaries is an alternative tool in the biodiversity maintenance and can be applied aiming your use in the reproductive biotechnologies both for the preservation and the breeding management. The sampling of animals for the cryopreservation is a procedure that can be used for the transportation and storage after collection of the genetic material, maintaining high quality of the tissues and being applied for different purposes (Wong et al., 2012), as the formation of biological resource banks (León-Quinto et al., 2014) and use in somatic cell nuclear transfer (Folch et al., 2009).

In particular, the collared peccary can be used as an experimental model for phylogenetic proximity to white-lipped peccary (*Tayassu peccary* Link, 1795) that according to International Union for Conservation of Nature (2016) was listed as vulnerable, having few specimens of this population. Thus, the obtaining of samples of collared peccary, classified as a species least concern and greater accessibility, could be proposed. Additionally, in some situations, the somatic tissue is the only sample of genetic material which possible to collect, to cryopreserve, and notably skin fragments are easy to access (Singh and Ma, 2014).

In general, the cryopreservation is a strategy for genetic conservation of domestic or wild animals, (Benkeddache et al., 2012) and vitrification strategies are superior to conventional cryopreservation by freezing (Brockbank et al., 2010). In the vitrification, the solution is rapidly cooled and transformed into a glassy, vitrified state, not by ice crystallization, but because of extreme elevation in viscosity during cooling (Amorim et al., 2011). The choice of the vitrification is due to the shorter time consumed to perform the technique; it is more economical and easy to be performed in any laboratory (Ting et al., 2013). For optimum conditions, a small volume of the vitrification solution that is in contact with the tissue cryopreserved is required. Thus, the solid-surface vitrification (SSV) provides the use of a small amount of a cryoprotectant consisting of direct exposure of the tissue to a pre-cooled solid surface (Carvalho et al., 2011). In previous study, we demonstrated that the

SSV was more able to preserve somatic tissue of collared peccary than conventional vitrification (Borges et al., 2015).

Although cell cryopreservation methodologies are applied to tissues, an adaptation of protocols is necessary in order to adjust the requirements of the tissue (Zieger et al., 1996) due to the complexity of many cell types causing water permeability variation in different tissue types (Gandolfi et al., 2006). Therefore, there is the need for development of species-specific protocols of cryopreservation (Agca et al., 2005). The vitrification protocols may improve by varying the composition and concentration of cryoprotectants, which will prevent the rate of formation of ice crystals. Thus, it is necessary to study the effects of different cryoprotectants in somatic tissue of collared peccaries, since the vitrification protocol for somatic tissue of this species is not well established.

Several requirements are specific to different components in the cryopreservation medium; being among these specifications the action mechanism of cryoprotectants that may be intracellular (permeable) or extracellular (non-permeable) (Da-Croce et al., 2013). The permeable cryoprotectants as ethylene glycol (EG) and dimethyl sulfoxide (DMSO) are small molecules that enter the cell and bind with water molecules, limiting the amount of intracellular and extracellular water which protect intracellular organelles (Prentice and Anzar, 2010). Moreover, the permeable cryoprotectants are used in combination with non-permeable cryoprotectants and they are divided in groups: disaccharides (sucrose) and proteins (fetal serum bovine, FBS). These non-permeable cryoprotectants cause cellular dehydration because they do not penetrate the membranes and collaborate for increased osmolality (Sieme et al., 2016). Based on this information, this study aimed to evaluate the effect of the presence of the non-permeable cryoprotectant (sucrose) with different combinations and concentrations of permeable cryoprotectants (EG and/or DMSO) on the somatic tissue vitrification of collared peccaries.

2. Materials and methods

The reagents, media, and solutions were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco-BRL (Carlsbad, CA, USA), and Labimpex (São Paulo, SP, Brazil).

2.1. Animal ethics and care

The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA/UFERSA; no. 23091.001072/2015-92) and the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation

(ICMBio; no. 48633-2). Eight animals (3–6 months) obtained from the Centre for Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA, no. 1478912) were used.

2.2. Skin biopsy and experimental design

Initially, in the management of systems of the peccaries, their identification is recorded by ear sections and these fragments (1–2 cm²) were recovered for the experiment. This, skin tissues were transported to the laboratory in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) of 2.2 g/L sodium bicarbonate and 2% antibiotic–antimycotic solution at 37°C for 30 min. At the laboratory, the tissue fragments were washed in 70% ethanol and DMEM. Subsequently, 28 fragments derived from each animal were distributed equally into seven groups among non-vitrified (control) and vitrification solutions, which resulted in four fragments per group of each animal that were divided equally for in histological analysis and viability assay. Each fragment represented a repetition.

Somatic tissues were cryopreserved using vitrification solution proposed by Borges et al. (2009), Lunardi et al. (2012) and Santos et al. (2007) with some modifications. Thus, DMEM composed of 2.2 g/L sodium bicarbonate and 10% FBS (DMEM⁺) was supplemented with sucrose, EG, and/or DMSO to produce the following six vitrification solutions (VS): EG (DMEM⁺ + 3.0 M EG), EG-SUC (DMEM⁺ + 3.0 M EG + 0.25 M sucrose), DMSO (DMEM⁺ + 3.0 M DMSO), DMSO-SUC (DMEM⁺ + 3.0 M DMSO + 0.25 M sucrose), EG-DMSO (DMEM⁺ + 1.5 M EG + 1.5 M DMSO), and EG-DMSO-SUC (DMEM⁺ + 1.5 M EG + 1.5 M DMSO + 0.25 M sucrose). After 2 weeks, fragments were warmed and evaluated by integrity analysis, as described in the following.

2.3. Vitrification and warming

Fragments were dissected into dimensions of 9.0 mm³ and randomly allocated for each group. Somatic tissues were cryopreserved by SSV according to Borges et al. (2015) and Carvalho et al. (2011) for collared peccary somatic and caprine ovarian tissues, respectively. Briefly, four fragments were exposed to 1.8 mL VS for 5 min, tissues were then dried. Thus, the fragments were individually placed on a cubic metal surface partially in liquid nitrogen (LN₂), transferred to cryovials, and stored in LN₂. Posteriorly, the cryovials were maintained for 1 min at room temperature and immersed in a water bath at 37°C for 30 sec. For removal of cryoprotectants, all fragments were washed three times for 5 min in DMEM⁺ with sucrose at 0.50 M, 0.25 M, and no sucrose, in order to reduce the osmotic shock.

2.4. Morphometric analysis

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for embedding in paraffin. Sections of 5.0 μm thickness were stained with hematoxylin-eosin and Gomori Trichrome dyes. The histological analysis and morphometry were analyzed using the ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and calculated as the following: the volumetric ratio of the epidermis and dermis, calculated by: $[(\text{number of overlapping structure (dermis or epidermis) to points} / \text{total tissue points}) \times 100]$ (Mota et al. 2014); and quantified the number of fibroblast and perinuclear halos.

2.5. AgNOR and quantification

The histochemical staining of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in the slides was performed in silver solution prepared in 1 part of 2% gelatin in 1% aqueous formic acid and 2 parts of 50% aqueous silver nitrate solution and the slides were exposed in a dark room for 30 min. Subsequently, the slides were washed in 5% thiosulfate solution for 10 min (Jaafari-Ashkavandi and Fatemi, 2013). For analyses of each slide (animal/group), AgNOR dots were counted in 100 fibroblasts by ImageJ software in 1000 $\times$ magnification. The quantification of AgNOR was performed as: AgNOR area/cell, AgNOR number/cell, nucleus area, and AgNOR ratio (AgNOR area/cell divided by the nucleus area) in accordance to Yang et al. (2013).

2.6. Viability assay

Tissue samples were pre-incubated in DMEM⁺ for 30 min (37 °C, 95% O₂, 5% CO₂) to allow the cells to adapt to new conditions. Afterward, the samples were incubated in MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay 2 mg/mL for 3 h (Boekema et al., 2015). Next, the samples were dissolved by DMSO and measured at 595 nm. The mean values of non-vitrified fragments were considered 100% as compared to the other groups.

2.7. Statistical analyses

Data of eight animals were expressed as mean $\pm$ standard deviation (one animal/one repetition) and analyzed using the GraphPad Prisma 6.0 software (Graph-Pad Software Incorporation; La Jolla, CA, USA) to a significance of $P < 0.05$. All values were verified for normality by the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity by Levene’s test. Subsequently,

when necessary, an arcsine transformation was performed for percentage data. The data of morphometric analysis by volumetric ratio and viability assay were analyzed by ANOVA (multiple comparisons) followed by Tukey test. Already the results of AgNOR quantification and fibroblast and perinuclear halo numbers were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn (multiple comparisons) tests.

3. Results

Morphological features in non-vitrified somatic tissue (control) or after vitrification using six different solutions are shown in Fig. 1. For the volumetric ratio of epidermis and dermis (Fig. 2), the vitrified fragments in solutions composed of EG without (EG: epidermis: $34.0 \pm 9.2\%$; dermis: $58.9 \pm 9.3\%$) and with sucrose (EG-SUC: epidermis: $34.5 \pm 9.0\%$; dermis: $61.2 \pm 9.1\%$) and DMSO without sucrose (DMSO: epidermis: $33.8 \pm 8.7\%$; dermis: $61.6 \pm 9.2\%$) were similar ($P > 0.05$) to control (epidermis: $36.6 \pm 10.5\%$; dermis: $58.7 \pm 10.7\%$). The other groups DMSO with sucrose (DMSO-SUC: epidermis: $32.1 \pm 9.8\%$; dermis: $62.5 \pm 9.8\%$) and EG-DMSO without (EG-DMSO: epidermis: $33.4 \pm 10.0\%$; dermis: $62.9 \pm 9.6\%$) and with sucrose (EG-DMSO-SUC: epidermis: $32.7 \pm 9.2\%$; dermis: $62.3 \pm 8.7\%$) differed from the non-vitrified group ($P < 0.05$).

Likewise, none of the vitrified fragments in different solutions were able to maintain the number of fibroblasts similar to non-vitrified fragments (Table 1). Additionally, tissues vitrified in solution composed of EG with and without sucrose, DMSO with sucrose and EG-DMSO without sucrose were those that presented a greater number of fibroblasts. In relation to the number of perinuclear halos (Table 1), vitrified fragments with EG-DMSO-SUC presented least apoptotic characteristics of epidermal cells when compared to other groups ($P < 0.05$); however, this group did not maintain fibroblast number. Additionally, EG-SUC, DMSO-SUC and EG-DMSO groups showed a good number of fibroblasts and a reduced amount of perinuclear halos.

For the number of AgNOR number/cell, only the vitrified fragments with EG-DMSO-SUC were similar to the control (Table 2). The higher values of the core area were in the groups of combination of cryoprotectants either in the absence or presence of sucrose (EG-DMSO and EG-DMSO-SUC). Regarding the AgNOR rate, EG group was the only which differed from control. Through the metabolic viability assay, all groups were similar to the control (Fig. 3, $P > 0.05$) denoting a cell turgidity. For AgNOR ratio, only the EG group

1 differed from the control; however, the EG-SUC showed a great result which highlights the
2 benefit of sucrose addition.

4 **4. Discussion**

5 The results indicated that the best combination of cryoprotectants was 0.25 M sucrose
6 with 3.0 M EG and 10% FBS for the SSV of the somatic tissue derived from collared
7 peccaries. This vitrification solution was more able for most of the evaluated histological
8 parameters. The EG-SUC combination showed an increase in tissue survival when compared
9 the others vitrification solutions with satisfactory results in terms of volumetric ratio of the
10 dermis and epidermis, AgNOR ratio, preserving fibroblasts and presenting a low amount of
11 perinuclear halos. Thus, the association of a permeable cryoprotectant in lower individual
12 concentrations combined with non-permeable agent can facilitate a reduction of the toxicity of
13 a specific individual cryoprotectant (Amorim et al., 2011). Thereby, the SSV in a mixture of
14 sucrose and EG, followed by washes in medium containing sucrose, has the best results also
15 in caprine preantral follicles (Santos et al., 2007), can influence the properties of the solution,
16 and can reduce the toxicity of EG (Orief et al., 2005).

17 The DMSO and EG are the most commonly used permeable cryoprotectants (Kagawa
18 et al., 2009). For articular cartilage, the vitrification DMSO and EG were permeable
19 cryoprotectants among the other tested that showed less damage to the sample, and the
20 recovery of chondrocytes with reduced doses of 6 M DMSO and 7 M EG (Fahmy et al.,
21 2014). In previous study, it was verified that the DMSO induced a higher decrease in the
22 number of fibroblasts in swine ovarian tissue, resulting in DMSO being more toxic than EG
23 (Borges et al., 2009), confirming the data from the volume ratio of epidermis and dermis to
24 the EG-SUC (EG and sucrose) has a greater ability to preserve tissue that is DMSO-SUC
25 (DMSO and sucrose). Thus, EG is used more in vitrification due to rapid diffusion into cells
26 and low toxicity (Dhali et al., 2000; Orief et al., 2005). It is one of the reasons that may have
27 caused lower damages to the tissue ensuring optimal values of volume ratio in DMSO
28 absence. Additionally, EG has a low molecular weight than DMSO that allows its rapid influx
29 during equilibration and dilution (Bautista and Kanagawa, 1998).

30 The combination EG, sucrose, and FBS improved the vitrification solution for somatic
31 tissue. Corroborating the best result of this work, Lunardi et al. (2012) got best result solid-
32 surface vitrified with 0.25 M sucrose and 10% FBS for ovine ovarian tissue. Positive results
33 can be obtained from the addition of sugars in the vitrification solution which has the property

1 to maintain the structural and functional integrity of the membranes in low water activity
2 (Hotamisligil et al., 1996). Moreover, the most efficient method for vitrifying of caprine
3 ovarian tissue was the SSV using 0.25 M sucrose and 10% FBS with EG (Carvalho et al.,
4 2011). Low toxicity is linked to sugars that promote the stable formation of the glassy state at
5 low temperatures, water permeability, and control viscosity increase of the solution and,
6 consequently, require a lower concentration of penetrating cryoprotectants (Bautista and
7 Kanagawa, 1998). In this work, the absence of sucrose with EG (EG) compared to its
8 presence (EG-SUC) has been denoted in AgNOR ratio that sucrose potentialized the EG.
9 Other work using the vitrification solution containing 40% EG, 18% Ficoll, and 0.3 M
10 sucrose demonstrated that vitrification can be applied to cryopreservation of bovine cartilage
11 (Cetinkaya and Arat, 2011). Thus, as predicted by Kuleshova et al. (1999), the properties of
12 the solution must be taken into consideration when you want to develop a solution for a
13 specific tissue, thus the addition of sugar contributes to the general properties of the solution.
14 Also, they can modify the physical properties of the solution by decreasing the cooling rate
15 (Sutton, 1992).

16 In volume ratio, the EG in combination or not with sucrose was the best preserved
17 tissue in this feature and is more appropriate cryoprotectant that increase the cell permeability
18 and reduce osmotic changes directed to cell volume exposure to cryoprotectants in the cooling
19 or warming (Agca et al., 2005). Thus, the benefit generated by the sucrose was due to cell
20 dehydration caused by osmotic pressure, which provides decrease of intracellular ice
21 (Tanpradit et al., 2015). The mixture of permeable cryoprotectants (EG-DMSO and EG-
22 DMSO-SUC) was less efficient in vitrification solution for preservation of the volumetric
23 ratio of epidermis and dermis. Thus, we can say that for other cellular components as in this
24 study, the combination EG and DMSO showed a high level of toxicity. In this study, we used
25 the concentration of 21.2% DMSO when used individually and 10.6% DMSO when applied
26 in combination; these results corroborate Brockbank et al. (2010) that DMSO concentrations
27 of 8%–20% were unsatisfactory in penetrating the cells that do not have the formation of
28 intracellular ice. Silvestre et al. (2003) used rabbit and porcine skin samples, vitrified with
29 solution containing 3.58 M (20%) EG and 2.82 M DMSO in F-PBS, as well as the brown bear
30 skin that used the combination of 20% FBS, 20% EG, 20% DMSO; however suggested that
31 vitrification skin still needs more improvement (Caamaño et al., 2008). For monkeys ovarian
32 tissue, the use of 18% DMSO and EG increased to degrade the damaged cytoplasmic
33 organelles (Hashimoto et al., 2010).

Alternatively, the combination of DMSO with EG showed a high toxicity which has proposed replacements for a combination by the propylene glycol (PG), which is in replacement of the combination of DMSO and EG, both of EG and PG (Nohalez et al., 2015) as DMSO and PG (Somfai et al., 2015) showed less toxic. Additionally, comparing DMSO, EG only, or combination, EG has been used as a permeable cryoprotectant preferably for its control of the cooling rate (Tsuribe et al., 2009). Although all groups were different from the control for the halos, no difference was observed for the MTT test as the tissue viability.

For AgNOR, it allows to analyze possible changes in the tissue and its ability to ribosome biogenesis indicates in the cells through AgNOR data (Mondal et al., 2015), that was maintained in EG-SUC for AgNOR ratio, but was different for EG. This result, displaying a potentiation of cryoprotectants in the presence of non-permeable cryoprotectants, may be due to the use of permeable cryoprotectants with penetration can cause structural damage to tissue by experimental analysis (Bullen et al., 2014).

The successful vitrification combined with extra and intracellular cryoprotectants may be investigated by two mechanisms, by the permeabilization of the cell and to promote intracellular vitrification or at the withdrawal of intracellular water by osmosis before cooling. In murine oocytes and embryos, the main mechanism involved in the vitrification is water removal, on average 85% of intracellular water allowing to achieve 90% viability after warming (Jin and Mazur, 2015). Thus, it can be combined with sucrose addition which stabilizes the lipid membranes and protein during dehydration of the cells by hydrogen bonding to polar residues in the dry macromolecular (Crowe et al., 1998).

In conclusion, the best result for SSV in somatic tissue of *P. tajacu* was the combination of 3.0 M EG and 0.25 M sucrose with 10% FBS that allowed the preservation of several characteristics of the tissue after warming, providing the possibility of using this sample for subsequent reproductive biotechnologies, such as nuclear transfer.

Acknowledgement

This study was supported by CNPq and CAPES. The authors thank the CEMAS/UFERSA for providing the animals. AR Silva and MF Oliveira were recipients of CNPq grants.

References

1 Agca, Y., Mullen, S., Liu, J., Johnson-Ward, J., Gould, K., Chan, A., Critser, J., 2005.
2 Osmotic tolerance and membrane permeability characteristics of rhesus monkey (*Macaca*
3 *mulatta*) spermatozoa. *Cryobiology*. 51, 1–14.

4 Amorim, C.A., David, A., Van Langendonckt, A., Dolmans, M.M., Donnez, J., 2011.
5 Vitrication of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertil.*
6 *Steril.* 95, 1094–1097.

7 Bautista, J.A.N, Kanagawa, H., 1998. Current status of vitrication of embryos and oocytes in
8 domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn. J. Vet.*
9 *Res.* 45, 183–191.

10 Benkeddache, D., Bodinier, P., Joly, T., Berchiche, M., Vignon, X., 2012. Recovery of viable
11 cells from rabbit skin biopsies after storage at– 20°C for up to 10 days. *Cell Tissue Bank.*
12 13, 479–486.

13 Boekema, B.K.H.L., Boekestijn, B., Breederveld, R.S., 2015. Evaluation of saline, RPMI and
14 DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns*. 41, 848–852.

15 Borges, A.A., Neta, L.Q., Santos, M.V.O., Santos, M.L.T., Lima, G.L., Oliveira, M.F., Silva,
16 A.R., Pereira, A.F., 2015. Isolation of somatic cell derived from ear tissue of collared
17 peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different vitrication techniques.
18 *Anim. Reprod.* 12, 842.

19 Borges, E.N., Silva, R.C., Futino, D.O., Rocha-Junior, C.M.C., Amorim, C.A., B  o, S.N.,
20 Lucci, C.M., 2009. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different
21 cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*.
22 59, 195–200.

23 Brockbank, K.G., Chen, Z.Z., Song, Y.C., 2010. Vitrication of porcine articular cartilage.
24 *Cryobiology*. 60, 217–221.

25 Bullen, A., Taylor, R.R., Kachar, B., Moores, C., Fleck, R.A., Forge, A., 2014. Inner ear
26 tissue preservation by rapid freezing: improving fixation by high-pressure freezing and
27 hybrid methods. *Hear. Res.* 315, 49–60.

28 Caamaño, J.N., Rodriguez, A., Salas, A., Munoz, M., Diez, C., Prather, R.S., Gomez, E.,
29 2008. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured brown bear fibroblast cells. *Cell.*
30 *Biol. Int.* 32, 855–859.

31 Carvalho, A.A., Faustino, L.R., Silva, C.M.G., Castro, S.V., Luz, H.K.M., Rossetto, R.,
32 Lopes, C.A.P., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., Costa, A.P.R., 2011. Influence of

1 vitrification techniques and solutions on themorphology and survival of preantral follicles
2 after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. Theriogenology. 76, 933–941.

3 Cetinkaya, G., Arat, S., 2011. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking.
4 Cryobiology. 63, 292–297.

5 Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis.
6 Annu. Rev. Physiol. 60, 73–103.

7 Da-Croce, L., Gambarini-Paiva, G.H.R., Angelo, P.C., Bambirra, E.A., Cabral, A.C.V.,
8 Godard, A.L.B., 2013. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues.
9 Cell Tissue Bank. 14, 65–76.

10 Dhali, A., Manik, R.S., Das, S.K., Singla, S.K., Palta, P., 2000. Post-vitrification survival and
11 *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol
12 concentration and exposure time. Anim. Reprod. Sci. 63, 159–165.

13 Fahmy, M.D., Almansoori, K.A., Laouar, L., Prasad, V., McGann, L.E., Elliott, J.A.W.,
14 Jomha, N.M., 2014. Dose–injury relationships for cryoprotective agent injury to human
15 chondrocytes. Cryobiology, 68, 50–56.

16 Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Vignon, X.,
17 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by
18 cloning. Theriogenology. 71, 1026–1034.

19 Gandolfi, F., Paffoni, A., Brambilla, E.P., Bonetti, S., Brevini, T.A., Ragni, G., 2006.
20 Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of
21 ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. Fertil. Steril. 85,
22 1150–1156.

23 Hashimoto, S., Suzuki, N., Yamanaka M, Hosoi Y, Ishizuka B, Morimoto Y., 2010. Effects of
24 vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian
25 tissues. Reprod. Biomed. Online. 21, 501–509.

26 Hotamisligil, S., Toner, M., Powers, R.D., 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal
27 structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene
28 glycol. Biol. Reprod. 55, 161–168.

29 International Union for Conservation of Nature (IUCN), 2016. IUCN Red List of Threatened
30 Species. Version 2015.4. <http://www.iucnredlist.org> (accessed 03.2016).

31 Jaafari-Ashkavandi, Z., Fatemi, F.S., 2013. Evaluation of proliferation activity in and
32 nondysplastic oral lichen planus through the analysis of nucleolar organizer regions. J.
33 Craniofac. Surg. 24, 788–791.

- 1 Jin, B., Mazur, P., 2015. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without
2 permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci.*
3 *Rep.* 5, 1–6.
- 4 Kagawa, N., Silber, S., Kuwayama, M., 2009. Successful vitrification of bovine and human
5 ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online.* 4, 568–577.
- 6 Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O., Shaw, J.M., 1999. Sugars exert a major
7 influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low
8 toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology.* 38, 119–130.
- 9 León-Quinto, T., Simón, M.A., Cadenas, R., Martínez, Á., Serna, A., 2014. Different
10 cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered
11 mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology.* 68, 227–233.
- 12 Lunardi, F.O., Araújo, V.R., Faustino, L.R., Carvalho, A.A., Gonçalves, R.F.B., Bass, C.S.,
13 Bão, S.N., Name, K.P.O., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2012.
14 Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles
15 enclosed in ovarian tissue. *Small. Rumin. Res.* 107, 121–130.
- 16 Mondal, N.K., Roychoudhury, S., Ray, M.R., 2015. Higher AgNOR expression in metaplastic
17 and dysplastic airway epithelial cells predicts the risk of developing lung cancer in women
18 chronically exposed to biomass smoke. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 34, 36–51.
- 19 Mota, C.A., Leão, R.A.C., Xavier, P.R., Júnior, A.M., 2014. Volumetric proportions of
20 placentome structural components of the crossbred Holstein-Zebu according to the
21 delivery order. *Rev. Brasil. Reprod. Anim.* 38, 165–169.
- 22 Nohalez, A., Martinez, C.A., Gil, M.A., Almiñana, C., Roca, J., Martinez, E.A., Cuello, C.,
23 2015. Effects of two combinations of cryoprotectants on the *in vitro* developmental
24 capacity of vitrified immature porcine oocytes. *Theriogenology.* 84, 545–552.
- 25 Orief, Y., Schultze-Mosgau, A., Dafopoulos, K., Al-Hasani, S., 2005. Vitrification: will it
26 replace the conventional gamete cryopreservation techniques? *Middle. East. Fertil. Soc. J.*
27 10, 171–184.
- 28 Prentice, J.R., Anzar, M., 2010. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of
29 animal genetics. *Vet. Med. Int.* 2011, 1–11.
- 30 Santos, R.R., Tharasanit, T., Van Haeften, T., Figueiredo, J.R., Silva, J.R.V., Van den Hurk,
31 R., 2007. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using
32 conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell. Tissue. Res.* 327, 167–176.

- 1 Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm
2 preservation. *Anim. Reprod. Sci.* 169, 2–5.
- 3 Silvestre, M.A., Saeed, A.M., Cervera, R.P., Escriba, M.J., García-Ximénez, F. 2003. Rabbit
4 and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole
5 ear extirpated immediately after death. *Theriogenology*. 59, 1469–1477.
- 6 Singh, M., Ma, X., 2014. *In vitro* culture of fibroblast-like cells from sheep ear skin stored at
7 25-26°C for 10 days after animal death. *Inter. J. Biol.* 6, 96–102.
- 8 Somfai, T., Men, N.T., Kaneko, H., Noguchi, J., Haraguchi, S., Nagai, T., Kikuchi, K., 2015.
9 Comparison of sugars, combinations of permeable cryoprotectants, and equilibration
10 regimens for the solid surface vitrification of immature porcine oocytes. *Reprod. Fertil.*
11 *Dev.* 27, 124–124.
- 12 Sutton, R.L., 1992. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars
13 and polysaccharides. *Cryobiology*. 29, 585–598.
- 14 Tanpradit, N., Comizzoli, P., Srisuwatanasagul, S., Chatdarong, K., 2015. Positive impact of
15 sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability,
16 follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology*. 83, 1553–1561.
- 17 Ting, A.Y., Yeoman, R.R., Campos, J.R., Lawson, M.S., Mullen, S.F., Fahy, G.M., Zelinski,
18 M.B., 2013. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after
19 vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Hum. Reprod.* 28, 1267–1279.
- 20 Tsuribe, P.M., Gobbo, C.A.M., Landim-Alvarenga, F.C., 2009. Viability of primordial
21 follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. *Fertil. Steril.* 91, 1976–
22 1983.
- 23 Wong, P.B., Wiley, E.O., Johnson, W.E., Ryder, O.A., O'Brien, S.J., Haussler, D., Koepfli,
24 K.P., Houck, M.L., Perelman, P., Mastromonaco, G., Bentley, A.C., Venkatesh, B., Zhang,
25 Y., Murphy, R.W., 2012. Tissue sampling methods and standards for vertebrate genomics.
26 *Giga. Science*. 1, 1–12.
- 27 Yang, J.G., Deng, Y., Zhou, L.X., Li, X.Y., Sun, P.R., Sun, N.X., 2013. Overexpression of
28 CDKN1B inhibits fibroblast proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma
29 filtration surgery when CDKN1B inhibits fibroblast proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis.*
30 *Sci.* 54, 343–352.
- 31 Zieger, M.A.J., Tredget, E.E., McGann, L.E., 1996. Mechanisms of cryoinjury and
32 cryoprotection in split-thickness skin. *Cryobiology*. 33, 376–389.

1 **Table 1.** Mean number fibroblasts and perinuclear halos of ear skin tissue derived collared peccaries after SSV using different solutions.

Vitrification solutions	Number of fibroblast		Number of perinuclear halos	
	Mean $\pm$ S.D.	Range	Mean $\pm$ S.D.	Range
Control (non-vitrified)	127.0 $\pm$ 41.1 ^a	93-151.5	14.8 $\pm$ 10.1 ^a	7-21
EG	85.7 $\pm$ 23.0 ^b	59-84	37.8 $\pm$ 16.6 ^b	24-51
EG-SUC	90.3 $\pm$ 24.6 ^b	72-106	29.3 $\pm$ 16.4 ^c	17-37
DMSO	70.9 $\pm$ 17.6 ^c	68-101	30.5 $\pm$ 18.3 ^c	18-40
DMSO-SUC	88.2 $\pm$ 25.3 ^b	69-104	32.3 $\pm$ 21.8 ^c	12-48
EG-DMSO	88.3 $\pm$ 23.0 ^b	73-104	28.6 $\pm$ 19.6 ^c	15-38.5
EG-DMSO-SUC	78.6 $\pm$ 23.8 ^c	63-92	20.5 $\pm$ 18.9 ^d	7-28

2 ^{a,b,c,d}: different (P < 0.05) in the same column.

3
4
5
6
7
8
9
10
11

1 **Table 2.** Comparison of the mean values of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in somatic tissue derived from collared peccary
2 after vitrification with different cryoprotectors.

Vitrification solutions	Index AgNOR, mean $\pm$ S.D.			
	AgNOR area/cell, μm^2	AgNOR number/cell, μm^2	Nucleus area, μm^2	AgNOR ratio (%)
Control (non-vitrified)	1.1 $\pm$ 0.6 ^{a,b}	2.5 $\pm$ 1.0 ^a	14.5 $\pm$ 6.1 ^a	0.17 $\pm$ 0.53 ^a
EG	1.0 $\pm$ 0.6 ^a	1.7 $\pm$ 0.7 ^c	16.8 $\pm$ 8.7 ^a	0.07 $\pm$ 0.04 ^b
EG-SUC	1.1 $\pm$ 0.9 ^a	1.6 $\pm$ 0.7 ^c	15.4 $\pm$ 8.7 ^a	0.09 $\pm$ 0.08 ^{a,b}
DMSO	1.1 $\pm$ 0.6 ^a	1.9 $\pm$ 0.8 ^b	14.5 $\pm$ 5.5 ^a	0.08 $\pm$ 0.06 ^a
DMSO-SUC	1.0 $\pm$ 0.7 ^a	2.0 $\pm$ 0.7 ^b	15.4 $\pm$ 8.5 ^a	0.08 $\pm$ 0.05 ^{a,b}
EG-DMSO	1.5 $\pm$ 0.9 ^b	1.8 $\pm$ 0.7 ^b	20.9 $\pm$ 8.8 ^b	0.08 $\pm$ 0.05 ^{a,b}
EG-DMSO-SUC	1.4 $\pm$ 0.8 ^b	2.3 $\pm$ 0.9 ^a	20.0 $\pm$ 9.1 ^b	0.08 $\pm$ 0.04 ^{a,b}

3 ^{a,b,c}: different (P < 0.05) in the same column.

4

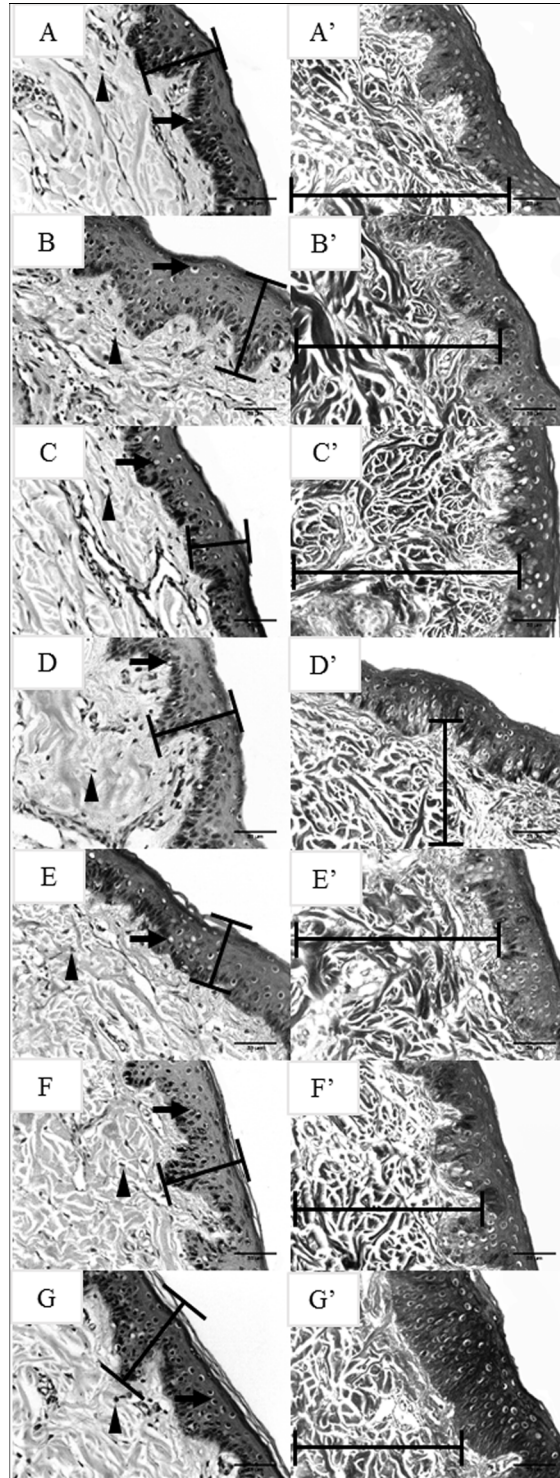


Fig. 1. Skin histological sections using hematoxylin-eosin (A, B, C, D, E, F, G) and (A', B', C', D', E', F', G') Gomori's Trichrome and showing epidermis and dermis layers. Letters indicate, A: control, B: EG, C: EG-SUC, D: DMSO, E: DMSO-SUC, F: EG-DMSO and G: EG-DMSO-SUC. Bars indicate epidermal area in hematoxylin-eosin and dermal area in Gomori's Trichrome; halos (arrow) and (triangle) fibroblast.

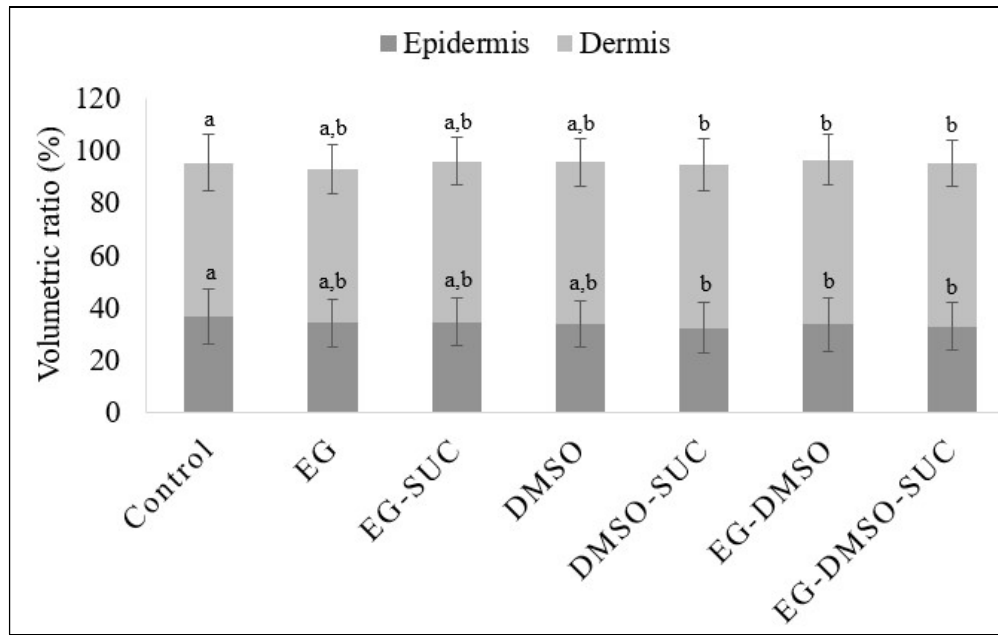


Fig. 2. Volumetric ratios of epidermis and dermis at different concentrations of permeable cryoprotectants in combination with sucrose. Control, EG, EG-SUC, DMSO, DMSO-SUC, EG-DMSO and EG-DMSO-SUC. Bars indicate standard deviations. ^{a,b}: different ($P < 0.05$) in the same skin layer (epidermis or dermis).

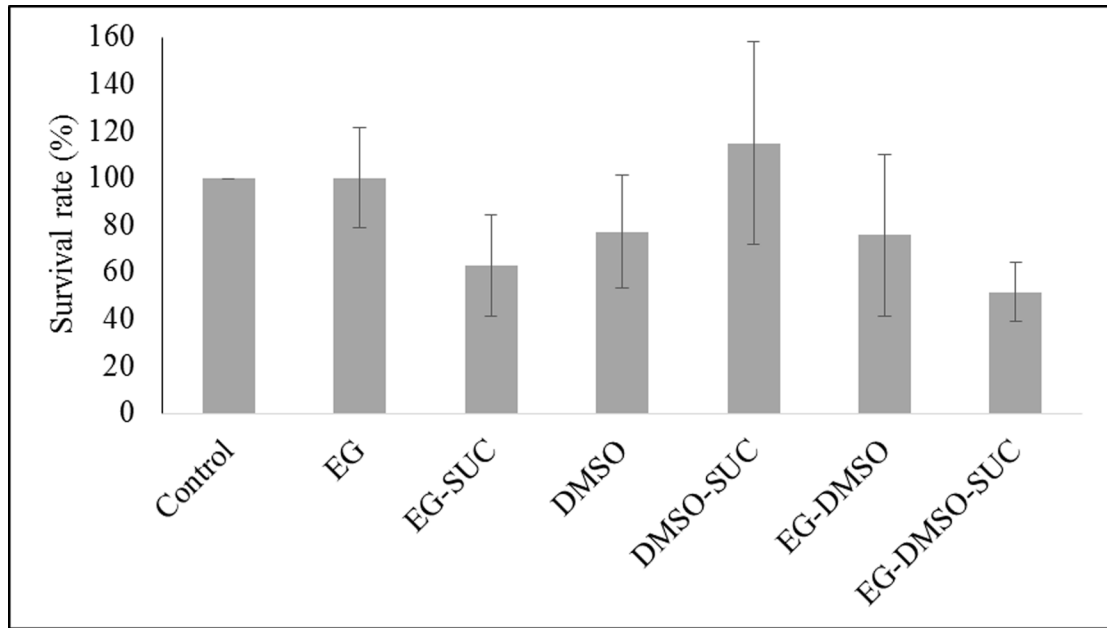


Fig. 3. Effect of different concentrations of cryoprotectants in combination with sucrose on the viability of the skin of collared peccary. Control, EG, EG-SUC, DMSO, DMSO-SUC, EG-DMSO and EG-DMSO-SUC. Bars indicate standard deviations. $P > 0.05$.

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

2
3 A presente pesquisa descreveu o tecido tegumentar da região auricular periférica de
4 catetos e evidenciou que o mesmo possuiu algumas variações em relação a outros mamíferos,
5 quanto ao número de camadas e espessura da epiderme, quantidade de células epidermais,
6 melanócitos e parâmetros proliferativos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um
7 protocolo de vitrificação com crioprotetores que atendam as especificidades do tecido e a
8 quantidade de células que o compõe. Neste sentido, a solução de vitrificação mais adequada
9 para o tecido somático derivado da pele desta espécie foi composta por 3,0 M de etilenoglicol
10 acrescida de 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino.

11 Portanto, as informações obtidas permitirá a utilização do tecido somático como fonte
12 de germoplasma, visando à obtenção de células a serem empregadas na transferência nuclear
13 de células somáticas, possibilitando além da conservação genética o manejo reprodutivo desta
14 espécie. Adicionalmente, estas informações podem ser aplicadas a espécies próximas
15 filogeneticamente, como o *Tayassu pecari* Link, 1795 e o *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31

ANEXOS

1 ANEXO A – CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO EM MAMÍFEROS:
2 PROGRESSOS E PERSPECTIVAS

3
4
5
6 **Artigo de Revisão:**

7
8 **Título:** Criopreservação de tecido somático em mamíferos: progressos e perspectivas).

9
10 **Periódico de submissão:** Semina: Ciências Agrárias (Qualis Medicina Veterinária B1).

11
12 **Data de submissão:** 19.04.2016.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Criopreservação de tecido somático em mamíferos: progressos e perspectivas

Somatic tissue cryopreservation in mammals: progress and perspectives

A.A. Borges, L.B. Queiroz Neta, M.V.O. Santos, M.F. Oliveira, A.R. Silva, A.F. Pereira

Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Av. Francisco Mota 572, Mossoró-RN, Brasil.

Resumo

A criopreservação de tecido somático representa uma ferramenta interessante para a conservação da biodiversidade animal. Nesse contexto, diferentes protocolos já foram empregados e ajustes metodológicos, especialmente quanto ao tipo e concentração dos crioprotetores, são constantemente desenvolvidos tanto para espécies domésticas quanto silvestres. Embora ambos os métodos de criopreservação, congelamento e vitrificação, tenham sido utilizados na conservação tecidual, este último é atualmente o mais usual e o tecido somático derivado da pele é a fonte proposta. Além disso, métodos de análise para a averiguação da eficiência da técnica são necessários para garantir que o tecido criopreservado mantenha suas características viáveis após o aquecimento. Em geral, a criopreservação permite o armazenamento adequado tanto durante o transporte até o processamento no laboratório quanto em longo prazo visando à formação de bancos de germoplasma. As células somáticas recuperadas desses tecidos podem ser empregadas também para estudos da fisiologia da espécie, diferenciação e reprogramação celular, clonagem reprodutiva e terapêutica. Adicionalmente, esta última aplicação pode evitar o desaparecimento de espécies ameaçadas e favorecer a reintrodução de genes perdidos. Portanto, a presente revisão objetiva apresentar os aspectos técnicos da criopreservação em tecido somático, com ênfase sobre a eficiência dos métodos empregados em mamíferos e sua aplicação em biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: biodiversidade, células somáticas, conservação, vitrificação.

Abstract

The cryopreservation of somatic tissue is an interesting tool for the conservation of animal biodiversity. In this context, different protocols have been employed and methodological

adjustments, especially on the type and the concentration of the cryoprotectants, are constantly being developed for both domestic and wild species. Although both methods of cryopreservation, freezing and vitrification, have been used for tissue preservation, the latter is the most common and the somatic tissue derived from skin is the proposed source. Moreover, analysis methods for the investigation of technical efficiency are required to ensure that the cryopreserved tissue will maintain their viable characteristics after warming. In general, the cryopreservation allows proper storage both during transport to the processing in the laboratory as in long time in order to cryobank formation. The somatic cells recovered these tissues can also be used also for physiology studies of the species, cell differentiation and reprogramming, reproductive and therapeutic cloning. Additionally, the latter application can prevent the disappearance of endangered species and promote the reintroduction of lost genes. Therefore, the present review aims to present the technical aspects of cryopreservation in somatic tissue, with emphasis on the efficiency of methods employed in mammals and its application in reproductive biotechnologies.

Key words: biodiversity, conservation, somatic cells, vitrification.

Introdução

A criopreservação de tecido somático permite a conservação até -196 °C por períodos de tempo elevados, promovendo o mínimo efeito deletério sobre a estrutura e a funcionalidade das células recuperadas. Em geral, esta técnica pode ser utilizada em programas de conservação animal a partir da formação de criobancos, sendo uma alternativa viável para a conservação de um maior número de indivíduos de cada população (ARAT et al., 2011). Anteriormente, a conservação da biodiversidade animal era mantida por biobancos de gametas e embriões. Com o advento da transferência nuclear de células somáticas (TNCS, clonagem), o uso de tecidos e células somáticas tornou-se uma escolha interessante para os programas de conservação (SILVA et al., 2015). Em geral, bancos de tecidos criopreservados é uma técnica efetiva e de baixo custo para a manutenção da biodiversidade tanto de espécies selvagens quanto domésticas (CAPUTCU et al., 2013). Além disso, este recurso pode oferecer estratégias de identificação de uma raça específica a partir do desenvolvimento de marcadores genéticos, a possibilidade de transplante e a transgenia (NA et al., 2010).

Dentre as vantagens do uso da criopreservação de tecido somático, destaca-se a facilidade na obtenção/criopreservação de amostras teciduais em regiões de difícil acesso, a

1 abrangência de um maior número de animais por não restringir a idade e o sexo do indivíduo,
2 permitindo um número ilimitado de amostras e a extrapolação das características celulares
3 destes animais para toda a população (LEÓN-QUINTO et al., 2009). Este é um aspecto
4 interessante, especialmente em se tratando de espécies, na qual é dificultosa a obtenção de
5 gametas. Contudo, o estabelecimento de criobancos exige o desenvolvimento de protocolos
6 apropriados (CETINKAYA; ARAT, 2011). Nesse contexto, para garantir a eficiência dos
7 procedimentos de criopreservação alguns fatores são importantes, desde a exposição às baixas
8 temperaturas e os mecanismos desencadeados pelo armazenamento com os crioprotetores
9 (COMIZZOLI et al., 2012).

10 Embora alguns estudos já tenham mostrado a eficiência de protocolos de vitrificação
11 de tecidos somáticos (BORGES et al., 2015a; SILVESTRE et al., 2002), é sabido que os
12 ajustes adequados em cada procedimento podem influenciar na atividade metabólica e
13 desempenho celular (HARDING et al., 2006). Assim, esta revisão oferece alguns
14 esclarecimentos sobre os aspectos técnicos da criopreservação em tecido somático, com
15 ênfase sobre a eficiência e progressos dos protocolos empregados em mamíferos domésticos e
16 silvestres e as aplicações do tecido criopreservado em biotecnologias reprodutivas.

18 **Procedimentos técnicos da criopreservação em tecidos somáticos**

19 A criopreservação consiste das etapas de exposição ao crioprotetor, resfriamento
20 armazenamento, aquecimento e remoção do crioprotetor dos fragmentos teciduais (SILVA et
21 al., 2015). Anteriormente a essas etapas, faz-se necessário a obtenção dos fragmentos dentro
22 de condições assépticas e previamente estabelecidas. Em geral, fragmentos teciduais
23 somáticos podem ser obtidos da região auricular (LEÓN-QUINTO et al., 2011), abdominal
24 (DARIOLLI et al., 2013), couro cabeludo (KAJIURA et al., 2015) ou origem fetal (LEÓN-
25 QUINTO et al., 2014).

26 Após a obtenção dos fragmentos teciduais, estes podem ser submetidos à congelação
27 lenta (KUMAR et al., 2015), rápida (USTA et al., 2013) ou vitrificação (BORGES et al.,
28 2015a). Para todos os processos, o uso de crioprotetores penetrantes e não penetrantes faz-se
29 necessário e diferentes respostas podem ser observadas quanto ao seu uso. Em tecido adiposo
30 murino (*Rattus norvegicus*), a ausência de dimetilsulfóxido (DMSO) é vantajosa, pois seu uso
31 gera danos ao DNA, como fragmentação da cromatina (ALMEIDA et al., 2014). Já em javalis
32 (*Sus scrofa*), foi observado que fragmentos de pele congelados sem a presença de
33 crioprotetores apresentaram células cultiváveis (ZHANG et al., 2012). Por outro lado, Borges

et al. (2015a), usando fragmentos da região auricular de catetos (*Pecari tajacu*) criopreservados por dois sistemas de vitrificação e na presença da associação de crioprotetores (DMSO, etilenoglicol – EG e sacarose) obtiveram células viáveis após o cultivo *in vitro*. Assim, a presença do crioprotetor e a escolha do mesmo são fatores importantes para a eficiência da criopreservação (EHRlich et al., 2015; GADJA et al., 2007).

Durante a criopreservação a etapa de exposição ao agente crioprotetor e o resfriamento é onde se evidencia as principais diferenças entre os tipos de criopreservação, congelamento e vitrificação (YAMAKI et al., 2002) bem como pelo tipo da amostra (Tabela 1). Em geral, a congelamento tem como princípio a redução gradativa da temperatura, havendo uma desidratação gradual dos tecidos e células, necessitando de uma baixa concentração de crioprotetores para evitar a formação de cristais de gelo (SHAW et al., 2000). Já na vitrificação, há a redução súbita da temperatura onde os tecidos alcançam um estado vítreo (YEOMAN et al., 2005) e para que haja uma proteção da amostra em virtude dessa rápida mudança de temperatura, aumenta-se a concentração de crioprotetores, obtendo uma maior viscosidade (CRUZAN et al., 2004). Ambos os procedimentos já foram empregados na conservação de tecido somático em diferentes espécies domésticas e silvestres, como ovinos (*Ovis aries*, SMIT et al., 2015), murinos (*R. norvegicus*, USTA et al., 2013), caprinos (*Capra hircus*, SINGH et al., 2012), suínos (*Sus scrofa domesticus*, BROCKBANK et al., 2010) e taiassuídeos (*P. tajacu*, BORGES et al., 2015a).

A congelamento pode ser classificada em dois tipos, a rápida e a lenta. Especificamente, para a congelamento rápida um modelo de protocolo é a exposição de amostras a uma solução de criopreservação resfriada por 10 min, seguida de imersão em nitrogênio líquido (JOMHA et al., 2004). Em *R. norvegicus*, tanto células nervosas (SEGGIO et al., 2008) quanto hepatócitos (USTA et al., 2013) já foram conservadas por congelamento rápida. Já a congelamento lenta consiste numa solução de criopreservação a ser equilibrada por 4 °C durante 30 min, seguido de equilíbrio a -80 °C por 12 h e posteriormente em nitrogênio líquido (NA et al., 2010). Como exemplo do uso desta última técnica, tem-se a criopreservação de folículos pilosos murinos, a qual se evidenciou o DMSO a 10% como melhor agente crioprotetor (CAO et al., 2015). Contudo, a criopreservação lenta exige equipamentos com temperaturas de congelamento controladas, ocasionando um maior custo (SILVESTRE et al., 2002).

Por outro lado, a vitrificação consiste na incubação de tecidos em solução com alta concentração de crioprotetores com uma ultrarrápida diminuição de temperatura e um aquecimento rápido para que não ocorra a formação de cristais de gelo nas mudanças de

temperaturas (YAMAKI et al., 2002). Em geral, o uso da vitrificação tem sido proposto como técnica para criopreservação de tecidos somáticos, sendo caracterizada como uma ferramenta de baixo custo e sem interferência na eficiência final (SAEED, 2000). Von Bomhard et al. (2016), avaliando a vitrificação e a congelação lenta de tecido endotelial e diferentes crioprotetores (DMSO, EG, propilenoglicol – PG, glicerol), observaram que a vitrificação alcançou melhores taxas com DMSO e glicerol. Já Caputcu et al. (2013) observaram que o tecido auricular bovino e ovino resfriado por até 216 h *post-mortem*, ainda podem manter a viabilidade celular após a vitrificação.

Além disso, a vitrificação pode ser de diferentes tipos de acordo com algumas variações durante os procedimentos (CARVALHO et al., 2012). Dentre estes tipos podem ser citados a vitrificação direta em criotubos que consiste na exposição ao crioprotetor durante 15 seg em temperatura ambiente e o armazenamento direto dos criotubos em nitrogênio líquido (BORGES et al., 2015b); e a vitrificação em superfície sólida, na qual o fragmento é exposto aos crioprotetores durante 5 min, em seguida retirado o excesso dos crioprotetores e as amostras colocadas sobre uma superfície cúbica de metal parcialmente colocada em nitrogênio líquido e, finalmente, transferido para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido (BORGES et al., 2015a). O uso dessas ambos os tipos de vitrificação já foram observados com sucesso na criopreservação de tecido somático de *P. tajacu* (BORGES et al. 2015a, 2015b).

Eficiência da vitrificação de tecidos somáticos

Além dos fatores relacionados à escolha do crioprotetor e tipo de técnica, outras características podem interferir na eficiência da criopreservação tecidual, como o tamanho do tecido, o qual pode ser determinante para o sucesso da técnica, uma vez que este interage diretamente com a capacidade de troca de calor, influenciando assim na velocidade de resfriamento. Em tecidos com maiores dimensões são necessárias maiores concentrações de crioprotetores (ABAZARI et al., 2013), uma vez que a perfusão do crioprotetor no tecido ocorre de acordo com o tamanho da amostra, refletindo em um maior tamanho do tecido uma maior quantidade de crioprotetores (FAHY et al., 2013). Portanto, quanto maior o tamanho do tecido maior será a facilidade de formação de cristais de gelo tanto no resfriamento quanto durante o aquecimento, já que as periferias do tecido irão responder mais rapidamente a modificação da temperatura enquanto que o núcleo do tecido irá permanecer virificado, o que provoca maiores chances de danos (WUSTEMAN et al., 2004).

Outro limitante do sucesso da vitrificação é formação dos cristais de gelo intracelulares que ao estarem conectados a um tecido começam a formar danos na arquitetura deste pela pressão exercida (FAHY et al., 2013). Desde 2005, foi demonstrado que a formação de gelo intracelular difere significativamente entre a conservação de células e tecidos, tanto em termos quantitativos como qualitativos (IRIMIA; KARLSSON, 2005). Assim, a melhor forma de evitar a formação de cristais de gelo está relacionada a altas concentrações de crioprotetores com um resfriamento ultrarápido (vitrificação); contudo, a cristalização pode ser apresentada durante o aquecimento (KIRICHEK et al., 2015). Farooque et al. (2009) verificaram uma visível formação de gelo durante a refrigeração em taxas < -10 °C/min em tecido cartilaginoso. Adicionalmente, relacionando a formação de cristais de gelo com o tamanho do fragmento, Fahy et al. (2009) apresentaram que para o tecido renal a formação desses cristais apesar de não ser esperada no córtex pode estar presente na medula do tecido. Deste modo, para o tecido renal a medula delimita o sucesso da vitrificação de acordo com a capacidade penetrante do crioprotetor e o seu potencial de evitar a formação de cristais.

Em síntese, diante dos fatores que influenciam a eficiência da criopreservação, é importante destacar que existem danos causados pelos crioprotetores e pela taxa de resfriamento em si (FAHY, 2010) e a toxicidade dos crioprotetores é ainda o principal limitante da criopreservação (ABAZARI et al., 2013). Assim, quando agentes químicos tem baixa taxa de toxicidade deve-se verificar se este possui a capacidade de penetrar na membrana celular e alcançar todas as células que se pretende criopreservar (FAHY, 2010). Nesse contexto, para avaliar experimentalmente a toxicidade dos crioprotetores Davidson et al. (2015) avaliaram a resposta do glicerol dependente da temperatura de exposição, observando que para tecidos aderentes, o uso de 17 M de glicerol promove uma eficiência de 81% em termos de viabilidade.

Avaliação da eficiência da criopreservação de tecidos somáticos

Apesar dos danos não serem muito difundidos pelo tecido, alguns artefatos da criopreservação podem ser observados por técnicas histológicas (COMIZZOLI et al., 2012). Assim, os danos podem ser visualizados na forma de perfuração nos tecidos que podem ter sido causados pelos cristais de gelo, como também por reticulações do núcleo de algumas células durante o processo (BULLEN et al., 2014). Em geral, a avaliação histológica proporciona um requisito básico para o conhecimento das estruturas que foram afetadas ou

mantidas normais durante a criopreservação, possibilitando a visualização do tecido como um todo, como na análise dos seus constituintes, epiderme e derme (BORGES et al., 2015c).

Alguns parâmetros são então estabelecidos, como o aumento da permeabilidade no tecido durante a criopreservação que conduz à formação de edemas e vacúolos em células epiteliais (DA-CROCE et al., 2013). Por outro lado, no início da apoptose os núcleos são separados do citoplasma que resulta em halos perinucleares, o que pode ser uma forma de caracterizar a redução da viabilidade do tecido (BOEKEMA et al., 2015). Outras técnicas mais específicas, como proteínas argirófilas relacionadas às regiões organizadoras de nucléolo, permitem o reconhecimento da atividade proliferativa celular (CRESTA; ALVES, 2007). Além disso, com a evolução das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar imagens ultra estruturais da amostra após a criopreservação (BUELLEN et al., 2014). Já a microscopia eletrônica de varredura permitiu a análise de alterações moleculares provocadas pela criopreservação (JOMHA et al., 2004). Por essa técnica é possível verificar alterações na matriz de colágeno e na rede de proteoglicanos, visualizando um alargamento dos poros e ruptura de cadeias proteicas (LAOUAR et al., 2007).

Outras ferramentas interessantes consistem na análise do tecido durante o cultivo *in vitro* pelo desprendimento das células somáticas e avaliação da qualidade dessas células (PEREIRA et al., 2013). Assim, o isolamento das células proliferativas a partir de tecido criopreservado e o cultivo são análises essenciais para o estabelecimento de criobancos, principalmente para fins de clonagem (PEREIRA et al., 2014). Em geral, fibroblastos são aceitos como o tipo de célula doadora adequada para a clonagem (PEREIRA; FREITAS, 2009). Neste contexto, a avaliação morfológica realizada através de microscopia de luz é o parâmetro mais importante para análise qualitativa do tecido epidérmico (MEHRABANI et al., 2014). Além disso, outras análises quanto à qualidade, viabilidade, atividade proliferativa, funcional das células são empregadas (CONCEIÇÃO et al., 2008; MEHRABANI et al., 2014).

Uso em outras biotecnologias

O armazenamento através da criopreservação de material genético tanto de espécies extintas ou ameaçadas simboliza uma reserva genética para situações de perda ou diminuição de uma determinada população, garantindo a conservação da biodiversidade pela aplicação em biotécnicas reprodutivas. Nesse contexto, diferentes espécies já tiveram seu material somático criopreservado, como *Ursus arctos* (CAAMAÑO et al., 2008), *P. tajacu* (BORGES

et al., 2015a), *Panthera uncia* (VERMA et al., 2012), *Capra pyrenaica pyrenaica* (FOLCH et al., 2009) e *Dasyprocta leporina* (COSTA et al., 2015), visando sua possível utilização da TNCS.

Além disso, já foram demonstrados que vários tipos celulares somáticos podem ser usados como doadores de núcleo na técnica de TNCS, como o tecido da mucosa bucal (PRESCOTT et al., 2015), tecido muscular e cartilaginoso (CAPUTCU et al., 2013), tecido do sistema urinário (MADHESHIYA et al., 2015), tecido epitelial auricular (PEREIRA et al., 2015), podendo resultar no nascimento de crias viáveis. Deste modo, os bancos de tecidos somáticos podem ser empregados como bancos para as células doadoras para TNCS, tendo a capacidade de ressurgir espécies ameaçadas (LI et al., 2009). Finalmente, criobancos de tecidos somáticos não somente possuem a capacidade de preservar o material genético, mas também de promover um recurso excelente para pesquisas biológicas.

Considerações finais

A criopreservação de tecidos somáticos pode ser considerada como fonte relevante na formação de criobancos de germoplasma animal, possuindo vantagens da facilidade de obtenção e de suas diversas aplicações na recuperação de recursos genéticos, elucidações da diferenciação celular e sua capacidade de aplicação em clonagem. Além disso, ainda são necessários maiores esclarecimentos sobre todos os processos que a criopreservação engloba bem como os mecanismos desencadeados devido à exposição a baixas temperaturas, além de serem necessários mais estudos objetivando compreender a ação dos crioprotetores, sendo um dos principais fatores que afetam a eficiência da criopreservação.

Finalmente, os recursos genômicos podem ser conservados para que em caso de genes peculiares a determinada raça e/ou espécies em caso de extinção ou ameaça destes animais possa haver uma forma de desvendar os mecanismos celulares e moleculares, contribuindo para o entendimento do processo de reprogramação celular.

Referências bibliográficas

- ABAZARI, A.; JOMHA, N. M.; ELLIOTT, J. A.; MCGANN, L. E. Cryopreservation of articular cartilage. *Cryobiology*, London, v. 66, n. 3, p. 201-209, 2013.
- ALMEIDA, M. M.; CAIRES, L. C.; MUSSO, C. M.; CAMPOS, J. M.; MARANDUBA, C. M.; MACEDO, G. C.; GARCIA, R. M. Protocol to cryopreserve and isolate nuclei from

- 1 adipose tissue without dimethyl sulfoxide. *Genetics and Molecular Research: GMR*,
2 Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 10921-10933, 2014.
- 3 ARAT, S.; CAPUTCU, A. T.; AKKOC, T.; PABUCCUOGLU, S.; SAGIRKAYA, H.;
4 CIRIT, U.; NAK, D. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native
5 domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction*,
6 *Fertility and Development*, Melbourne, v. 23, n. 8, p. 1012-1023, 2011.
- 7 BOEKEMA, B. K. H. L.; BOEKESTIJN, B.; BREEDERVELD, R. S. Evaluation of saline,
8 RPMI and DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns*, London, v. 41, n.
9 4, p. 848-852, 2015.
- 10 BORGES, A. A.; LIMA, G. L.; SANTOS, M. L. T.; QUEIROZ NETA, L. B.; PRAXEDES,
11 E. C. G.; SANTOS, M. V. O.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F.
12 Histological evaluation of ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu*) after different
13 vitrification techniques. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 12, p. 230, 2015a.
- 14 BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. B.; LIMA, G. L.; SANTOS, M. V. O.; SANTOS, M.
15 L. T.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Atividade proliferativa de
16 células provenientes de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu*) após distintas técnicas
17 de vitrificação. *Anais do XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia*, Fortaleza, 2015b.
- 18 BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. Q.; SANTOS, M. V. O.; SANTOS, M. L. T.; LIMA,
19 G. L.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Isolation of somatic cell derived
20 from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different
21 vitrification techniques. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 12, n. 3, p. 842, 2015c.
- 22 BROCKBANK, K. G. M.; CHEN, Z. Z.; SONG, Y. C. Vitrification of porcine articular
23 cartilage. *Cryobiology*, London, v. 60, n. 2, p. 217-221, 2010.
- 24 BULLEN, A.; TAYLOR, R. R.; KACHAR, B.; MOORES, C.; FLECK, R. A.; FORGE, A.
25 Inner ear tissue preservation by rapid freezing: Improving fixation by high-pressure
26 freezing and hybrid methods. *Hearing Research*, Boston, v. 315, p. 49-60, 2014.
- 27 CAAMAÑO, J. N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; DE FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ,
28 E. Cryopreservation of Brown bear skin biopsies. *Cell Preservation Technology*, New
29 Rochelle, v. 6, n. 1, p. 83-86, 2008.
- 30 CAO, W.; LI, L.; TRAN, B.; KAJIURA, S.; AMOH, Y.; LIU, F.; HOFFMAN, R. M.
31 Extensive Hair Shaft Growth after Mouse Whisker Follicle Isolation, Cryopreservation and
32 Transplantation in Nude Mice. *PloS one*, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0145997, 2015.

- 1 CAPUTCU, A. T.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; ARAT, S. Tissue cryobanking for
2 conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. *Cell and Tissue*
3 *Banking*, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2013.
- 4 CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.;
5 COSTA, A. P. R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material
6 genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, v. 5, n.
7 3, p. 236-248, 2012.
- 8 CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking.
9 *Cryobiology*, Luon, v. 63, n. 3, p. 292-297, 2011.
- 10 COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; HAGEDORN, M.; WILDT, D. E. Comparative
11 cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from
12 wildlife species. *Theriogenology*, New York, v. 78, n. 8, p. 1666-1681, 2012.
- 13 CONCEIÇÃO, R. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.;
14 FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A.
15 Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca
16 (*Agouti paca*) e cutia (*Dasyprocta aguti*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro,
17 v. 28, n. 5, p. 253-259, 2008.
- 18 COSTA, C. A. S.; BORGES, A. A.; SANTOS, M. L. T.; QUEIROZ NETA, L. B.; SANTOS,
19 M. V. O.; FRANÇA, P. H. F.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F.
20 Aplicação da vitrificação para fins de conservação de tecido somático de cutias
21 (*Dasyprocta leporina*). *Anais do XXI Seminário de Iniciação Científica (SEMIC) da*
22 *UFERSA*, Mossoró, 2015.
- 23 CRESTA, F. B.; ALVES, M. R. Evaluation of the corneal epithelium kinetics using cell
24 proliferation markers. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, São Paulo, v. 70, n. 6, p. 953-
25 960, 2007
- 26 CRUZAN, G.; CORLEY, R. A.; HARD, G. C.; MERTENS, J. J.; MCMARTIN, K. E.;
27 SNELLINGS, W. M.; DEYO, J. A. Subchronic toxicity of ethylene glycol in Wistar and F-
28 344 rats related to metabolism and clearance of metabolites. *Toxicological Sciences*,
29 Reston, v. 81, n. 2, p. 502-511, 2004.
- 30 DA-CROCE, L.; GAMBARINI-PAIVA, G. H. R.; ANGELO, P. C.; BAMBIRRA, E. A.;
31 CABRAL, A. C. V.; GODARD, A. L. B. Comparison of vitrification and slow cooling for
32 umbilical tissues. *Cell and Tissue Banking*, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2013.

- 1 DARIOLLI, R.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J.S.; OMAE, S.V.; CAMPOS, L.C.G.;
2 KRIEGER, J.E. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their
3 proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term
4 cryopreservation. *PloS one*, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67939, 2013.
- 5 DAVIDSON, A. F.; GLASSCOCK, C.; MCCLANAHAN, D. R.; BENSON, J. D.; HIGGINS,
6 A. Z. Toxicity minimized cryoprotectant addition and removal procedures for adherent
7 endothelial cells. *PloS one*, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0142828, 2015.
- 8 EHRLICH, L. E.; FEIG, J. S.; SCHIFFRES, S. N.; MALEN, J. A.; RABIN, Y. Large thermal
9 conductivity differences between the crystalline and vitrified states of DMSO with
10 applications to cryopreservation. *PloS one*, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0125862, 2015.
- 11 FAHY, G. M.; GUAN, N.; DE GRAAF, I. A.; TAN, Y.; GRIFFIN, L.; GROOTHUIS, G. M.
12 Cryopreservation of precision-cut tissue slices. *Xenobiotica*, London, v. 43, n. 1, p. 113-
13 132, 2013.
- 14 FAHY, G. M.; WOWK, B; PAGOTAN, R.; CHANG, A.; PHAN, J.; THOMSON, B.; PHAN,
15 L. Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis*, London, v. 5, n. 3,
16 p.167-175, 2009.
- 17 FAHY. G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, London, v. 60, n. 3, p.
18 S45-S53, 2010.
- 19 FAROOQUE, T. M.; CHEN, Z.; SCHWARTZ, Z.; WICK, T. M.; BOYAN, B. D.;
20 BROCKBANK, K. G. Protocol development for vitrification of tissue-engineered
21 cartilage. *Bioprocessing*, Williamsbg, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2009.
- 22 FOLCH, J.; COCERO, M. J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J. L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIE,
23 Y.; ECHEGOYEN, E. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra*
24 *pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, New York, v. 71, n. 6, p. 1026-1034,
25 2009.
- 26 GAJDA, B.; KAŹSKA-KSIAŻKIEWICZ, L.; RYŃSKA, B.; BOCHENEK, M.; SMORAĞ,
27 Z. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *CryoLetters*, Lewes,
28 v. 28, n. 4, p. 271-279, 2007.
- 29 GE, L.; SUN, L.; CHEN, J.; MAO, X.; KONG, Y.; XIONG, F.; WU, J.; WEI, H. The
30 viability change of pigskin *in vitro*. *Burns*, London, v. 36, n. 4, p. 533-538, 2010.
- 31 HARDING, C. O.; GILINGHAM, M. B.; SCOTT, B.; ELLIOTT, D. Metabolic control
32 during exercise with and without medium-chain triglycerides (MCT) in children with long-

- chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) or trifunctional protein (TFP) deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, New York, v. 89, n. 1, p. 58-63, 2006.
- IRIMIA, D.; KARLSSON, J. O. Kinetics of intracellular ice formation in one-dimensional arrays of interacting biological cells. *Biophysical Journal*, Heidelberg, v. 88, n. 1, p. 647-660, 2005.
- JOMHA, N. M.; ANOOP, P. C.; MCGANN, L. E. Intramatrix events during cryopreservation of porcine articular cartilage using rapid cooling. *Journal of Orthopaedic Research*, Maharashtra, v. 22, n. 1, p. 152-157, 2004.
- KAJIURA, S.; MII, S.; AKI, R.; HAMADA, Y.; ARAKAWA, N.; KAWAHARA, K.; LI, L.; KATSUOKA, K.; HOFFMAN, R. M.; AMOH, Y. Cryopreservation of the hair follicle maintains pluripotency of nestin-expressing hair follicle-associated pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, New Rochelle, v. 21, n. 8, p. 825-831, 2015.
- KIRICHEK, O.; SOPER, A.; DZYUBA, B.; CALLEAR, S.; FULLER, B. Strong isotope effects on melting dynamics and ice crystallisation processes in cryo vitrification solutions. *Plos one*, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0120611, 2015.
- KUMAR, B. K.; COGER, R. N.; SCHRUM, L. W.; LEE, C. Y. The effects of over expressing aquaporins on the cryopreservation of hepatocytes. *Cryobiology*, London, v. 71, n. 2, p. 273-278, 2015.
- LAOUAR, L.; FISHBEIN, K.; MCGANN, L. E.; HORTON, W. E.; SPENCER, R. G.; JOMHA, N. M. Cryopreservation of porcine articular cartilage: MRI and biochemical results after different freezing protocols. *Cryobiology*, London, v. 54, n. 1, p. 36-43, 2007.
- 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*, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 347-361, 2009.
- LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology*, London, v. 62, n. 2, p.145-151, 2011.
- LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, Á.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an

- 1 endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, London, v. 68, n. 2,
2 p. 227-233, 2014.
- 3 LI, L. F.; YUE, H.; MA, J.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Establishment and characterization of a
4 fibroblast line from Simmental cattle. *Cryobiology*, London, v. 59, n. 1, p. 63-68, 2009.
- 5 MADHESHIYA, P. K.; SAHARE, A. A.; JYOTSANA, B.; SINGH, K. P.; SAINI, M.;
6 RAJA, A. K.; SURESH K. S.; MANMOHAN S. C.; RADHEY S. M.; PALTA, P.
7 Production of a cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) calf from somatic cells isolated from
8 urine. *Cellular Reprogramming*, San Francisco, v. 17, n. 3, p. 160-169, 2015.
- 9 MEHRABANI, D.; MAHBOOBI, R.; DIANATPOUR, M.; ZARE, S.; TAMADON, A.;
10 HOSSEINI, S. E. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast
11 cell. *Veterinary Medicine International*, Nasr City, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- 12 NA, R. S.; ZHAO, Q. J.; SU, X. H.; CHEN, X. W.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Establishment
13 and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. *Cytotechnology*, Dordrecht,
14 v. 62, n. 1, p. 43-52, 2010.
- 15 PEREIRA, A. F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K. C.; CARNEIRO, I. S.; AVELARA, S. R. G.;
16 ALCÂNTARA NETO, A. S.; SOUSA, F. C.; MELO, C. H. S.; MOURA, R. R.;
17 TEIXEIRAA, D. I. A.; BERTOLINI, L. R.; FREITAS, V. J. F.; BERTOLINI, M. Analysis
18 of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat
19 embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research*,
20 Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 163-172, 2013.
- 21 PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas
22 atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128,
23 2009.
- 24 PEREIRA, A. F.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F.; SALAMONE, D. F. Phosphorylated
25 H2AX in parthenogenetically activated, *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos.
26 *Zygote*, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 485-493, 2015.
- 27 PEREIRA, A. F.; SANTOS, M. L. T.; BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. B.; SANTOS,
28 M. V. O.; FEITOSA, A. K. N. Isolamento e caracterização de células doadoras derivadas
29 da pele para a transferência nuclear. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, v. 8, p. 311-316,
30 2014.
- 31 PRESCOTT, H. M.; MANNING, C.; GARDNER, A.; RITCHIE, W. A.; PIZZI, R.;
32 GIRLING, S.; VALENTINE, I.; WANG, C.; JAHODA, C. A. Giant panda (*Ailuropoda*

- 1 *melanoleuca*) buccal mucosa tissue as a source of multipotent progenitor cells. *PloS one*,
2 San Francisco, v. 10, n. 9, p. e0138840, 2015.
- 3 SAEED, A. M. Vitrication and rapid-freezing of *cumulus* cells from rabbits and pigs.
4 *Theriogenology*, New York, v. 54, n. 9, p. 1359-1371, 2000.
- 5 SEGGIO, A. M.; ELLISON, K. S.; HYND, M. R.; SHAIN, W.; THOMPSON, D. M.
6 Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. *Journal of*
7 *Neuroscience Methods*, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 67-73, 2008.
- 8 SHAW J. M.; COX S. L.; TROUNSON A. O.; JENKIN G. Evaluation of the long-term
9 function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human
10 applications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, London, v. 161, n. 1, p. 103-110,
11 2000.
- 12 SILVA, A. R.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C, X.; SOUZA, A. L. P. Cryopreservation in
13 mammalian conservation biology: current applications and potential utility. *Research and*
14 *Reports in Biodiversity Studies*, Macclesfield, v. 2015, n. 4, p. 1-8, 2015.
- 15 SILVESTRE, M. A.; SAEED, A. M.; ESCRIBA, M. J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Vitrication
16 and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs.
17 *Theriogenology*, New York, v. 58, n. 1, p. 69-76. 2002.
- 18 SILVESTRE, M. A.; SÁNCHEZ, J. P.; GÓMEZ, E. A. Vitrication of goat, sheep, and cattle
19 skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage
20 times and temperatures. *Theriogenology*, New York, v. 49, n. 3, p. 221-229, 2004.
- 21 SINGH, M.; MA, X.; SHARMA, A. Effect of postmortem time interval on *in vitro* culture
22 potential of goat skin tissues stored at room temperature. *In Vitro Cellular &*
23 *Developmental Biology-Animal*, New York, v. 48, n. 8, p. 478-482, 2012.
- 24 SMIT, F. E.; BESTER, D.; VAN DEN HEEVER, J. J.; SCHLEGEL, F.; BOTES, L.;
25 DOHMEN, P. M. Does prolonged post-mortem cold ischemic harvesting time influence
26 cryopreserved pulmonary homograft tissue integrity? *Cell and Tissue Banking*, Dordrecht,
27 v. 16, n. 4, p. 531-544, 2015.
- 28 USTA, O. B.; KIM, Y.; OZER, S.; BRUINSMA, B. G.; LEE, J.; DEMIR, E.; BERENDSEN,
29 A. T.; PUTS, C. F.; IZAMIS, M. L.; UYGUN, K.; UYGUN, B. E.; YARMUSH, M. L.
30 Supercooling as a viable non-freezing cell preservation method of rat hepatocytes. *PloS*
31 *one*, San Francisco v. 8, n. 7, p. e69334, 2013.

- 1 VERMA, R.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency
2 in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid.
3 *Theriogenology*, New York, v. 77, n. 1, p. 220-228. e2, 2012.
- 4 VON BOMHARD, A.; ELSÄSSER, A.; RITSCHL, L. M.; SCHWARZ, S.; ROTTER, N.
5 Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and media–
6 vitrification versus slow freezing methods. *PloS one*, San Francisco, v. 11, n. 2, p.
7 e0149660, 2016.
- 8 WANG, L.; PEGG, D. E.; LORRISON, J.; VAUGHAN, D.; ROONEY, P. Further work on
9 the cryopreservation of articular cartilage with particular reference to the liquidus tracking
10 (LT) method. *Cryobiology*, London, v. 55, n. 2, p. 138-147, 2007.
- 11 WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric
12 warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology*,
13 London, v. 48, n. 2, p. 179-189, 2004.
- 14 YAMAKI, S. B.; PEDROSO, A. G.; ATVARIS, T. D. Z. O estado vítreo dentro da perspectiva
15 do curso de graduação em Química (Físico-Química). *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n.
16 2, p. 330-334, 2002.
- 17 YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases
18 survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and Sterility*, Tehran v. 83, p.
19 1248-1254, 2005.
- 20 ZHANG, Y. L.; LIU, F. J.; ZHUANG, Y. F.; WANG, X. A.; ZHAI, X. W.; LI, H. X.;
21 ZHANG, W. C. Blastocysts cloned from the Putian Black pig ear tissues frozen without
22 cryoprotectant at – 80 and – 196 degrees Celsius for 3 yrs. *Theriogenology*, New York, v.
23 78, n. 5, p. 1166-1170, 2012.
- 24

1 **Tabela 1.** Conservação de material genético usando diferentes técnicas de criopreservação de tecido somático em mamíferos.

Espécie	Técnica	Tecido/Região	Crioprotetores	Referência
<i>S. scrofa domesticus</i>	Congelação rápida	Cartilaginoso/Articular	1, 3, 5, 6 ou 7M DMSO	Jomha et al. (2004)
<i>S. scrofa domesticus</i>	Congelação lenta	Epitelial/Auricular	1,41 M DMSO	Ge et al. (2010)
<i>S. scrofa domesticus</i>	Vitrificação	Epitelial/Auricular	3,58 M EG e 2,82 M DMSO	Silvestre et al. (2002)
<i>O. aries</i>	Congelação lenta	Cartilaginoso/ Articular	10 ou 15M DMSO	Wang et al. (2007)
<i>O. aries</i>	Vitrificação	Epitelial/Auricular	3,58 M EG e 2,82 M DMSO	Silvestre et al. (2004)
<i>Bos taurus</i>	Congelação lenta	Epitelial/Auricular	1,41M DMSO	Cetinkaya e Arat (2011)
<i>P. tajacu</i>	Vitrificação	Epitelial/Auricular	3M DMSO, 3M EG e 0,25 M sacarose	Borges et al. (2015a)
<i>R. norvegicus</i>	Vitrificação	Tecido adiposo	1,41M DMSO	Almeida et al. (2014)
<i>U. arctos</i>	Congelação lenta	Epitelial/Auricular	1,41M DMSO	Caamaño et al. (2008)

2 DMSO: dimetilsulfóxido. EG: etilenoglicol.

3

4

5

6

7

- 1 ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: **CRIOPRESERVAÇÃO**
 2 **DE TECIDO SOMÁTICO EM MAMÍFEROS: PROGRESSOS E PERSPECTIVAS À**
 3 **REVISTA SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS 19 – ABR – 2016**

4

Capa > Usuário > Autor > Submissões > #25559 > **Avaliação**

#25559 Avaliação

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

Submissão

Autores	Alana Azevedo Borges, Luiza Bento de Queiroz Neta, Maria Valéria de Oliveira Santos, Moacir Franco de Oliveira, Alexandre Rodrigues Silva, Alexsandra Fernandes Pereira
Título	Criopreservação de tecido somático em mamíferos: progressos e perspectivas
Seção	Artigos de revisões
Editor	Selwyn Headley

Avaliação

Rodada 1

Versão para avaliação	25559-113791-1-RV.DOC	2016-04-19
Iniciado	2016-05-30	
Última alteração	2016-07-15	
Arquivo enviado	Nenhum(a)	

Decisão Editorial

Decisão	—
Notificar editor	Comunicação entre editor/autor Sem comentários
Versão do editor	Nenhum(a)
Versão do autor	Nenhum(a)
Transferir Versão do Autor	Escolher arquivo Nenhum arquivo selecionado Transferir

Semina: Ciências Agrárias
 Londrina - PR
 E-ISSN 1679-0359

1 ANEXO C – COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO: **CARACTERIZAÇÃO**
 2 **HISTOMORFOLÓGICA DO SISTEMA TEGUMENTAR AURICULAR DE CATETO**
 3 **(*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) À REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA**
 4 **VETERINÁRIA E ZOOTECNIA 19 – OUT – 2016**

Profa. Dra. Aleksandra Fernandes Pereira Departamento de Ciências Animais - DCAN Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA Av. Francisco Mota, 572, Costa e Silva, 59.625-900, Mossoró-RN, Brasil Fone: (84) 8608 6509/ (85) 9903 6715

Em Quarta-feira, 19 de Outubro de 2016 19:22, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia <onbehalfof+ampinho.editor@gmail.com@manuscriptcentral.com> escreveu:

19-Oct-2016

Dear Prof. Pereira:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Caracterização histomorfológica do sistema tegumentar auricular de cateto (<i></i>Pecari tajacu<i></i> Linnaeus, 1758)

[Histomorphological characterization of collared peccary (<i></i>Pecari tajacu<i></i> Linnaeus, 1758) ear integumentary system]" in its current form for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Dr. Antonio de Pinho Marques Jr
 Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
ampinho.editor@gmail.com

Associate Editor
 Comments to the Author:
 (There are no comments.)

Entire Scoresheet:

5

6

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: COMBINATION OF ETHYLENE GLICOL WITH SUCROSE INCREASES SURVIVAL RATE AFTER VITRIFICATION OF SOMATIC TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) À REVISTA ACTA HISTOCHEMICA 02 – OUT – 2016




Alexsandra Pereira | Log Out | Help
EVISE[★]

Home
Reports



ACTHIS_2016_161 | Research paper

Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Alexsandra Pereira | Av. Francisco Mota, 572, Brazil.

Status: **With Editor (0 days)** | Submitted: 02/Oct/2016



Overview
Files
Messages

Other Authors
Show Details

Alana Azevedo Borges (UFERSA), Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra (UFERSA), Francilane Nascimento Costa (UFERSA), Luiza Bento de Queiroz Neta (UFERSA), Maria Valéria de Oliveira Santos (UFERSA), Moacir Franco de Oliveira (UFERSA), Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)

Contact Editorial Team

Abstract

The cryopreservation of somatic tissue in collared peccary promotes an alternative source of genetic material of this specie. The solid-surface vitrification (SSV) is a great option for preserving tissue; nevertheless, the optimization of SSV requirements is necessary, especially when referred to cryoprotectants that will compose the vitrification solution. Therefore, the aim was to evaluate the effect of the presence of 0.25 M sucrose in addition to different combinations (only or association) and concentrations (1.5 M or 3.0 M) of ethylene glycol (EG) and/or dimethyl sulfoxide (DMSO) in the somatic tissue vitrification of collared peccaries. Subsequently, we tested six combinations of cryoprotectants with or without sucrose in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) plus 10% fetal bovine serum. Thus, the 3.0 M EG with sucrose was able to maintain normal tissue characteristics compared with non-vitrified (control), especially for the volumetric ratio of epidermis (61.2 vs. 58.7) and dermis (34.5 vs. 36.6), number of fibroblast (90.3 vs. 127.0), and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) ratio (0.09 vs. 0.17), respectively. In conclusion, 3.0 M EG with 0.25 M sucrose resulted in a better cryoprotectant composition in the SSV for somatic tissue of collared peccaries.

Keywords

cryobanking; permeable cryoprotectant; non-permeable cryoprotectant

1 ANEXO E – AUTORIZAÇÕES DE USO DOS CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS,
2 1758) PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA

Parecer Nº 03/2015 PROCESSO Nº n. 23091.001072/2015-92

Data de Entrada: 06/02/2015

Aprovado: 24/03/2015

1. *Pessoal Responsável:*

Alexandra Fernandes Pereira

2. *Título do Projeto:*

Avaliar técnicas de conservação de tecidos e células somáticas, visando à conservação de material genético de catetos (*Pecari tajacu*).

3. *Considerações:*

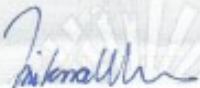
Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que o projeto tem relevância científica e está dentro das especificações da CEUA. Durante os procedimentos, os animais serão submetidos a estresse ou sofrimento mínimos. Todo o procedimento de manipulação dos animais será realizado com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado.

4. *Parecer final:*

FAVORÁVEL à aprovação do projeto

Mossoró, 21 de maio de 2015

Atenciosamente,


Milena Wachlewski Machado
Presidente CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 48633-2	Data da Emissão: 29/04/2016 09:14	Data para Revalidação*: 29/05/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Alexsandra Fernandes Pereira	CPF: 913.071.983-68
Título do Projeto: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO PARA A CONSERVAÇÃO DE TECIDOS E CÉLULAS SOMÁTICAS DE CATETOS (Pecari tajacu, Linnaeus, 1758)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Envio de documentos regulatórios	04/2015	05/2015
2	Pré-experimentos	05/2015	07/2015
3	Comparação das condições de criopreservação	07/2015	03/2020
4	Obtenção de amostras	07/2015	03/2020

1

2