



Progressos e perspectivas da criopreservação da pele de mamíferos como estratégia de conservação da biodiversidade. Uma Revisão

Progress and perspectives of mammalian skin cryopreservation as a biodiversity conservation strategy. Review

Revisão

Alana Azevedo Borges¹, Aleksandra Fernandes Pereira^{2*}

Resumo: A criopreservação da pele 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 a concentração dos crioprotetores, são constantemente desenvolvidos, tanto para mamíferos domésticos quanto silvestres. Embora ambos os métodos de criopreservação, congelamento e vitrificação, tenham sido utilizados na conservação tecidual, este último é atualmente o mais usual. Além disso, métodos de análise para a averiguação da eficiência da técnica são necessários para garantir que a pele criopreservada 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 criobancos. As células somáticas recuperadas da pele podem ser empregadas também para estudos da fisiologia da espécie, diferenciação e reprogramação celular, clonagem reprodutiva e terapêutica. Portanto, a presente revisão objetiva apresentar os aspectos técnicos da criopreservação da pele, com ênfase sobre a eficiência dos métodos empregados em mamíferos e sua aplicação em biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: bancos de recursos biológicos, células somáticas, vitrificação.

Abstract: The cryopreservation of skin 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 mammals. Although both methods of cryopreservation, freezing and vitrification, have been used for tissue preservation, the latter is the most common. Moreover, analysis methods for the investigation of technical efficiency are required to ensure that the cryopreserved skin 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. Therefore, the present review aims to present the technical aspects of cryopreservation of skin, with emphasis on the efficiency of methods employed in mammals and its application in reproductive biotechnologies.

Key words: biological resource banks, somatic cells, vitrification.

* Autor para correspondência: aleksandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebido em 20.0m.2019. Aceito em 30.06.2019

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20190022>

¹ Mestre em Ciência Animal, Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), E-mail: alanaazevedob@gmail.com. ² Professora, Doutora em Ciências Veterinárias, Bolsista de Produtividade do CNPq (nível 2), Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), * Autor para correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

1. Introdução

A criopreservação da pele 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 (PRAXEDES et al., 2018).

Previamente, 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 (MOULAVI et al., 2017).

Em geral, bancos de pele criopreservada é uma técnica efetiva para a manutenção da biodiversidade, tanto de mamíferos silvestres quanto domésticos (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 da pele, destaca-se a facilidade na obtenção/criopreservação de amostras teciduais em regiões de difícil acesso, a abrangência de um maior número de animais por não restringir a idade e o gênero do indivíduo, permitindo um número ilimitado de amostras e a extrapolação das características celulares destes animais para toda a população (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Este é um aspecto interessante, especialmente em se tratando de espécies, na qual é dificultosa a obtenção de gametas. Contudo, o estabelecimento de criobancos exige o desenvolvimento de protocolos apropriados (CETINKAYA & ARAT, 2011). Nesse contexto, para garantir a eficiência dos procedimentos de criopreservação alguns fatores são importantes, desde a exposição às baixas temperaturas e os mecanismos desencadeados pelo crioprotetores (COMIZZOLI et al., 2012).

Embora alguns estudos já tenham mostrado a eficiência de protocolos de vitrificação da pele (BORGES et al., 2017b; SILVESTRE et al., 2002), é sabido que os ajustes adequados em cada procedimento podem influenciar na atividade proliferativa e desempenho celular (COSTA et al., 2016). Assim, esta revisão oferece alguns esclarecimentos sobre os aspectos técnicos da criopreservação da pele, com ênfase sobre a eficiência e progressos dos protocolos empregados em mamíferos domésticos e silvestres e as aplicações do tecido criopreservado em biotecnologias reprodutivas.

2. Procedimentos técnicos da criopreservação da pele

A criopreservação consiste das etapas de exposição ao crioprotetor, resfriamento, armazenamento, aquecimento e remoção do crioprotetor da pele (ALMEIDA et al., 2014). Anteriormente a essas etapas, faz-se necessário a obtenção da pele dentro de condições assépticas e previamente estabelecidas. Em geral, a pele podem ser obtidos da região auricular (SANTOS et al., 2016), abdominal (DARIOLLI et al., 2013), couro cabeludo (KAJIURA et al., 2015) ou origem fetal (LÉON-QUINTO et al., 2014).

Após a obtenção da pele, estes podem ser submetidos à congelação lenta

(KUMAR et al., 2015), rápida (USTA et al., 2013) ou vitrificação (BORGES et al., 2018b). Para todos os processos, o uso de crioprotetores penetrantes e não penetrantes faz-se necessário e diferentes respostas podem ser observadas quanto ao seu uso. Em javalis (*Sus scrofa*), foi observado que fragmentos de pele congelados sem a presença de crioprotetores apresentaram células cultiváveis (ZHANG et al., 2012). Por outro lado, Borges et al. (2017b), usando fragmentos da pele 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 (BORGES et al., 2018a).

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, congelação e vitrificação (YAMAKI et al., 2002) bem como pelo tipo da amostra (**Tabela 1**). Em geral, a congelação tem como princípio a redução gradativa da temperatura, havendo uma desidratação gradual dos tecidos e células, necessitando de uma baixa concentração de crioprotetores para reduzir 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 da pele 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., 2018a).

A congelação pode ser classificada em dois tipos, a rápida e a lenta. Especificamente, para a congelação 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 (USTA et al., 2013; JOMHA et al., 2004). Em *R. norvegicus*, células nervosas (SEGGIO et al., 2008) já foram conservadas por congelação rápida. Já a congelação 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 congelação controladas, ocasionando um maior custo (SILVESTRE et al., 2002).

Por outro lado, a vitrificação consiste na incubação de fragmentos de pele 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 da pele, sendo caracterizada como uma ferramenta de baixo custo e sem interferência na eficiência final (SAEED, 2000; VON BOMMARD et al., 2016). Adicionalmente, Caputcu et al. (2013) observaram que a pele auricular bovina e ovina resfriada 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 (PEREIRA et al., 2019). 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., 2017b); 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., 2018a). O uso de ambos os tipos de vitrificação já foram observados com sucesso na criopreservação da pele de *P. tajacu* (BORGES et al. 2018b).

3. Eficiência da vitrificação da pele

Além dos fatores relacionados à escolha do crioprotetor e o tipo de técnica, outras características podem interferir na eficiência da criopreservação tecidual, como o tamanho do fragmento, 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 fragmentos com maiores dimensões são necessárias maiores concentrações de crioprotetores (ABAZARI et al., 2013), uma vez que a perfusão do crioprotetor no fragmento 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 fragmento maior será a facilidade de formação de cristais de gelo, tanto no resfriamento quanto durante o aquecimento, já que as periferias do fragmento irão responder mais rapidamente a modificação da temperatura enquanto que o núcleo do fragmento irá permanecer vitrificado, 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 pele começam a formar danos na arquitetura desta pela pressão exercida (FAHY et al., 2009; 2013). Desde 2005, foi demonstrado que a formação de gelo intracelular difere 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 $< -10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em tecido cartilaginoso.

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 fragmentos aderentes, o uso de 17,0 M de glicerol promoveu uma eficiência de 81% em termos de viabilidade.

4. Avaliação da eficiência da criopreservação da pele

Apesar dos danos não serem muito difundidos pela pele, alguns artefatos da criopreservação podem ser observados por técnicas histológicas (COMIZZOLI et al., 2012). Assim, os danos podem ser visualizados na forma de perfuração na pele 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 da pele como um todo, como na análise dos seus constituintes, epiderme e derme (BORGES et al., 2017a).

Alguns parâmetros são estabelecidos, como o aumento da permeabilidade da pele 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 da pele (BOEKEMA et al., 2015). Outras técnicas mais específicas, como proteínas argirófilas relacionadas às regiões organizadoras de nucléolo, permitem o reconhecimento da atividade proliferativa celular (QUEIROZ-NETA et al., 2018). Além disso, com a evolução das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão é possível observar imagens ultraestruturais da amostra com possíveis modificações após a criopreservação (BUELLEN et al., 2014). Já a microscopia eletrônica de varredura tem permitido 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 da pele 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 da pele criopreservada 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 da pele (BORGES et al., 2017; MEHRABANI et al., 2014). Além disso, outras análises quanto à qualidade, viabilidade, atividade proliferativa, funcional das células são empregadas (BORGES et al., 2017; MEHRABANI et al., 2014).

5. Uso em outras biotecnologias

O armazenamento por meio 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 sua pele criopreservada, 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 na TNCS.

Além disso, já foram demonstrados que vários tipos celulares derivados da pele podem ser usados como células doadoras de núcleo na TNCS, como o tecido cartilaginoso (CAPUTCU et al., 2013), tecido epitelial auricular (PEREIRA et al., 2015), podendo resultar no nascimento de crias viáveis. Deste modo, os bancos de pele podem ser empregados como bancos para as células doadoras para TNCS, tendo a capacidade de ressurgir espécies ameaçadas (LI et al., 2009). Finalmente, esses criobancos não somente possuem a capacidade de conservar o material genético, mas de promover um recurso para pesquisas biológicas.

Conclusões

A criopreservação da pele pode ser considerada como uma fonte relevante na formação de criobancos de recursos biológicos, 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. Contudo, 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.

Agradecimentos

Alana Azevedo Borges é bolsista de doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, 001). Alessandra Fernandes Pereira é bolsista em Produtividade do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 306963/2017-5).

Referências bibliográficas

1. 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.
2. 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 adipose tissue without dimethyl sulfoxide. **Genetics and Molecular Research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 10921-10933, 2014.
3. 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**, London, v. 41, n. 4, p. 848-852, 2015.
4. BORGES, A.A.; BEZERRA F.V.F.; QUEIROZ NETA, L.B.; COSTA, F.N.; SANTOS M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 350-356, 2018a.
5. BORGES, A.A.; LIRA, G.P.; NASCIMENTO, L.E.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA A.R.; PEREIRA, A.F. Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and biobanking**, New Rochelle, v. 16, n. 2, p. 77-81, 2018b.
6. BORGES, A.A.; BEZERRA, F.V.; COSTA, F.N.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Histomorphological characterization of

collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 69, n. 4, p. 948-954, 2017a.

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

8. BROCKBANK, K.G.M.; CHEN, Z.Z.; SONG, Y.C. Vitrification of porcine articular cartilage. **Cryobiology**, London, v. 60, n. 2, p. 217-221, 2010.

9. BULLEN, A.; TAYLOR, R.R.; KACHAR, B.; MOORES, C.; FLECK, R.A.; FORGE, A. Inner ear tissue preservation by rapid freezing: Improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods. **Hearing Research**, Boston, v. 315, p. 49-60, 2014.

10. CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ, E. Cryopreservation of Brown bear skin biopsies. **Cell Preservation Technology**, New Rochelle, v. 6, n. 1, p. 83-86, 2008.

11. CAO, W.; LI, L.; TRAN, B.; KAJIURA, S.; AMOH, Y.; LIU, F.; HOFFMAN, R.M. Extensive hair shaft

growth after mouse whisker follicle isolation, cryopreservation and transplantation in nude mice. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0145997, 2015.

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

13. CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, London, v. 63, n. 3, p. 292-297, 2011.

14. COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; HAGEDORN, M.; WILDT, D.E. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 8, p. 1666-1681, 2012.

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

16. PEREIRA, B.C.; ORTIZ, I.; DORADO, J.; CONSUEGRA, C.; DIAZ-JIMENEZ, M.; DEMYDA-PEYRAS, S.; GOSALVEZ, J.; HIDALGO, M.

Evaluation of DNA damage of mare granulosa cells before and after cryopreservation using a chromatin dispersion test. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 72, p. 28-30, 2019.

17. COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.L.T.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FRANÇA, P.H.F.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Aplicação da vitrificação para fins de conservação de tecido somático de cutias (*Dasyprocta leporina*). **Anais do XXI Seminário de Iniciação Científica (SEMIC) da UFERSA**, Mossoró, 2015.

18. CRUZAN, G.; CORLEY, R.A.; HARD, G.C.; MERTENS, J.J.; MCMARTIN, K.E.; SNELLINGS, W.M.; DEYO, J.A. Subchronic toxicity of ethylene glycol in Wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites. **Toxicological Sciences**, Reston, v. 81, n. 2, p. 502-511, 2004.

19. DA-CROCE, L.; GAMBARINI-PAIVA, G.H.R.; ANGELO, P.C.; BAMBIRRA, E.A.; CABRAL, A.C.V.; GODARD, A.L.B. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. **Cell and Tissue Banking**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2013.

20. DARIOLLI, R.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J.S.; OMAE, S.V.; CAMPOS, L.C.G.; KRIEGER, J.E.

Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67939, 2013.

21. DAVIDSON, A.F.; GLASSCOCK, C.; MCCLANAHAN, D.R.; BENSON, J.D.; HIGGINS, A.Z. Toxicity minimized cryoprotectant addition and removal procedures for adherent endothelial cells. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0142828, 2015.

22. FAHY, G.M.; GUAN, N.; GRAAF, I.A.; TAN, Y.; GRIFFIN, L.; GROOTHUIS, G. M. Cryopreservation of precision-cut tissue slices. **Xenobiotica**, London, v. 43, n. 1, p. 113-132, 2013.

23. FAHY, G.M.; WOWK, B.; PAGOTAN, R.; CHANG, A.; PHAN, J.; THOMSON, B.; PHAN, L. Physical and biological aspects of renal vitrification. **Organogenesis**, London, v. 5, n. 3, p.167-175, 2009.

24. FAHY. G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, London, v. 60, n. 3, p. S45-S53, 2010.

25. FAROOQUE, T.M.; CHEN, Z.; SCHWARTZ, Z.; WICK, T.M.; BOYAN, B.D.; BROCKBANK, K.G. Protocol development for vitrification of tissue-engineered cartilage. **Bioprocessing**, Williamsbg, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2009.

26. FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ECHEGOYEN, E. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 6, p. 1026-1034, 2009.
27. GE, L.; SUN, L.; CHEN, J.; MAO, X.; KONG, Y.; XIONG, F.; WU, J.; WEI, H. The viability change of pig skin *in vitro*. **Burns**, London, v. 36, n. 4, p. 533-538, 2010.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, Á.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, London, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014.
35. LI, L.F.; YUE, H.; MA, J.; GUAN, W.J.; MA, Y.H. Establishment and characterization of a fibroblast line from Simmental cattle. **Cryobiology**, London, v. 59, n. 1, p. 63-68, 2009.

36. MEHRABANI, D.; MAHBOOBI, R.; DIANATPOUR, M.; ZARE, S.; TAMADON, A.; HOSSEINI, S. E. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. **Veterinary Medicine International**, Nasr City, v. 2014, p. 1-6, 2014.
37. MOULAVI, F.; HOSSEINI, S.M.; TANHAIE-VASH, N.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, S.H.; HAJINASROLLAH, M.; ASGHARI, M.H.; GOURABI, H.; SHAHVERDI, A.; VOSOUGH, A.D.; NASR-ESFAHANI, M.H. Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-mortem frozen tissue in absence of cryo-protectant and in vitro matured domestic cat oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 90, p. 197–203, 2017.
38. NA, R.S.; ZHAO, Q. J.; SU, X.H.; CHEN, X.W.; GUAN, W.J.; MA, Y.H. Establishment and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 62, n. 1, p. 43-52, 2010.
39. PRAXEDES, E.A.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; PEREIRA, A.F. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo Biology**, 2018, v. 37, p. 258-263, 2018.
40. PEREIRA, A.F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K.C.; CARNEIRO, I.S.; AVELARA, S.R.G.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; SOUSA, F.C.; MELO, C.H.S.; MOURA, R.R.; TEIXEIRAA, D.I.A.; BERTOLINI, L.R.; FREITAS, V.J.F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 163-172, 2013.
41. PEREIRA, A.F.; FREITAS, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128, 2009.
42. PEREIRA, A.F.; MELO, L.M.; FREITAS, V.J.F.; SALAMONE, D.F. Phosphorylated H2AX in parthenogenetically activated, in vitro fertilized and cloned bovine embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 485-493, 2015.
43. PEREIRA, A.F.; SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FEITOSA, A.K.N. Isolamento e caracterização de células doadoras derivadas da pele para a transferência nuclear. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 8, p. 311-316, 2014.

44. QUEIROZ NETA, L.B.; LIRA, G.P.O.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, Berlin, p. 486-495, 2018.
45. SAEED, A.M. Vitrification and rapid-freezing of cumulus cells from rabbits and pigs. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1359-1371, 2000.
46. SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 1194-1202, 2016.
47. SEGGIO, A.M.; ELLISON, K.S.; HYND, M.R.; SHAIN, W.; THOMPSON, D.M. Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 67-73, 2008.
48. SHAW, J.M.; COX, S.L.; TROUNSON, A.O.; JENKIN, G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, London, v. 161, n. 1, p. 103-110, 2000.
49. SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; ESCRIBA, M.J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 1, p. 69-76. 2002.
50. SILVESTRE, M.A.; SÁNCHEZ, J.P.; GÓMEZ, E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 3, p. 221-229, 2004.
51. SINGH, M.; MA, X.; SHARMA, A. Effect of postmortem time interval on in vitro culture potential of goat skin tissues stored at room temperature. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, New York, v. 48, n. 8, p. 478-482, 2012.
52. SMIT, F.E.; BESTER, D.; VAN DEN HEEVER, J.J.; SCHLEGEL, F.; BOTES, L.; DOHMEN, P.M. Does prolonged *post-mortem* cold ischemic harvesting time influence cryopreserved pulmonary homograft tissue integrity? **Cell and Tissue Banking**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 531-544, 2015.
53. USTA, O.B.; KIM, Y.; OZER, S.; BRUINSMA, B.G.; LEE, J.; DEMIR, E.;

- BERENDSEN, A.T.; PUTS, C.F.; IZAMIS, M.L.; UYGUN, K.; UYGUN, B.E.; YARMUSH, M.L. Supercooling as a viable non-freezing cell preservation method of rat hepatocytes. **PloS one**, San Francisco v. 8, n. 7, p. e69334, 2013.
54. VERMA, R.; HOLLAND, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. **Theriogenology**, New York, v. 77, n. 1, p. 220-228. e2, 2012.
55. VON BOMHARD, A.; ELSÄSSER, A.; RITSCHL, L.M.; SCHWARZ, S.; ROTTER, N. Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and media—vitrification versus slow freezing methods. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. e0149660, 2016.
56. WANG, L.; PEGG, D.E.; LORRISON, J.; VAUGHAN, D.; ROONEY, P. Further work on the cryopreservation of articular cartilage with particular reference to the liquidus tracking (LT) method. **Cryobiology**, London, v. 55, n. 2, p. 138-147, 2007.
57. WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. **Cryobiology**, London, v. 48, n. 2, p. 179-189, 2004.
58. YAMAKI, S.B.; PEDROSO, A.G.; ATVARIS, T.D.Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em Química (Físico-Química). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 330-334, 2002.
59. YEOMAN, R.R.; WOLF, D.P.; LEE, D.M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, Tehran v. 83, p. 1248-1254, 2005.
60. ZHANG, Y.L.; LIU, F.J.; ZHUANG, Y.F.; WANG, X.A.; ZHAI, X.W.; LI, H.X.; ZHANG, W.C. Blastocysts cloned from the Putian Black pig ear tissues frozen without cryoprotectant at -80 and -196 °C for 3 yrs. **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 5, p. 1166-1170, 2012.

1 **Tabela 1.** Conservação de material genético usando diferentes técnicas de criopreservação da pele em mamíferos.

2 DMSO: dimetilsulfóxido. EG: etilenoglicol.

Espécie	Técnica	Tecido/Região	Crioprotetores	Referência
<i>S. scrofa domesticus</i>	Congelação rápida	Cartilaginoso/Articular	1, 3, 5, 6 ou 7 M 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 15 M 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	1,41 M DMSO	Cetinkaya; Arat (2011)
<i>P. tajacu</i>	Vitrificação	Epitelial/Auricular	3 M DMSO, 3 M EG e 0,25 M sacarose	Borges et al. (2017b)
<i>U. arctos</i>	Congelação lenta	Epitelial/Auricular	1,41 M DMSO	Caamaño et al. (2008)

3