

**Estudo comparativo de técnicas de criopreservação em tecido somático de *Felis silvestres catus***

**Comparative study of cryopreservation techniques in somatic tissue of *Felis silvestris catus***

**Estudio comparativo de las técnicas de criopreservación en tejido somático de *Felis silvestres catus***

Recebido: 13/07/2020 | Revisado: 18/07/2020 | Aceito: 22/07/2020 | Publicado: 06/08/2020

**Jane Cleide Jenuario Martins**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6902-0278>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [janeemartins@yahoo.com.br](mailto:janeemartins@yahoo.com.br)

**Érika Almeida Praxedes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6406-6346>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [erikaalmeida-@hotmail.com](mailto:erikaalmeida-@hotmail.com)

**Matheus Barbosa do Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2661-0846>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [matheus\\_mbn@hotmail.com](mailto:matheus_mbn@hotmail.com)

**Leonardo Vitorino Costa de Aquino**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7192-7581>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [leonardovt@live.com](mailto:leonardovt@live.com)

**Nilza Dutra Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2332-9293>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [nilza@ufersa.edu.br](mailto:nilza@ufersa.edu.br)

**Moacir Franco de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6269-0823>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [moacir@ufersa.edu.br](mailto:moacir@ufersa.edu.br)

**Alexsandra Fernandes Pereira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2137-854X>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: [alexandra.pereira@ufersa.edu.br](mailto:alexandra.pereira@ufersa.edu.br)

## **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi comparar os efeitos da Congelação Lenta (CL) e da Vitriificação em Superfície Sólida (VSS) na criopreservação da pele auricular apical de gatos domésticos utilizando ferramentas histológicas. Fragmentos de pele obtidos a partir de seis gatos (*Felis silvestres catus*) foram processados e destinadas à criopreservação por CL e VSS, utilizando uma solução composta por Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM) acrescida de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,5 M ou 3,0 M, para CL e VSS, respectivamente, além de 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o aquecimento, as amostras foram destinadas ao processamento histológico para posterior realização das colorações com hematoxilina-eosina, tricrômico de Gômori, e coloração de Weigert, bem como foi realizada a marcação de regiões organizadoras de nucléolo (NORs) utilizando nitrato de prata. Na técnica de VSS, características como espessura da epiderme, derme e espessura total da pele, apresentaram valores similares ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Além disso, a VSS mostrou-se eficiente na manutenção do número de células epidermais e percentual de fibras de colágenas. Conclui-se que a aplicação da técnica de VSS mostrou-se superior na manutenção histológica da pele auricular apical de gatos domésticos, auxiliando na geração de um banco somático da espécie.

**Palavras-chave:** Felídeos; Biobancos teciduais; Histologia.

## **Abstract**

The aim of this study was to compare the effects of Slow Freezing (SF) and Solid-Surface Vitrification (SSV) on the cryopreservation of the apical ear skin of domestic cats using histological tools. Fragments of skin obtained from six cats (*Felis silvestres catus*) were processed and destined for cryopreservation by SF and SSV, using a solution composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) plus dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1.5 M or 3.0 M, for SF and SSV, respectively, in addition to 0.25 M sucrose and 10% fetal bovine serum (FBS). After warming, the samples were destined for histological processing for subsequent staining with hematoxylin-eosin, Gromori trichrome, and Weigert staining, as well as the marking of nucleolus organizing regions (NORs) using silver nitrate. Thus, using

the VSS technique, characteristics such as epidermis thickness, dermis, and total skin thickness, presented values similar to the control group ( $p > 0.05$ ). The VSS technique proved to be efficient in maintaining the number of epidermal cells and the percentage of collagen fibers. It is concluded that the application of the VSS technique proved to be superior in the histological maintenance of the apical auricular skin of domestic cats, assisting in the generation of a somatic bank in the species.

**Keywords:** Felids; Tissue biobanks; Histology.

## Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar los efectos de la Congelación Lenta (CL) y la Vitricificación de Superficie Sólida (VSS) en la criopreservación de la piel auricular apical en gatos domésticos utilizando herramientas histológicas. Fragmentos de piel obtenidos de seis gatos (*Felis silvestres catus*) fueron procesados y destinados a la crioconservación por CL y VSS, utilizando una solución compuesta de Medio Esencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM) más dimetil sulfoxido (DMSO) a 1,5 M o 3,0 M, para CL y VSS, respectivamente, además de 0,25 M sacarosa y 10% de suero fetal bovino (SFB). Después del calentamiento, las muestras se destinaron al procesamiento histológico para la tinción posterior con tinción con hematoxilina-eosina, tricromo gomico y coloración de Weigert, así como el marcado de regiones organizadoras de nucleolos (NORs) utilizando nitrato de plata. Por lo tanto, utilizando la técnica VSS, características como el grosor de la epidermis, la dermis y el grosor total de la piel, presentaron valores similares al grupo de control ( $p > 0,05$ ). La técnica VSS demostró ser eficiente para mantener el número de células epidérmicas y el porcentaje de fibras de colágeno. Resulta que la aplicación de la técnica VSS demostró ser superior en el mantenimiento histológico de la piel auricular apical de los gatos domésticos, ayudando en la generación de un banco somático en la especie.

**Palabras clave:** Felinos; Biobancos de tejidos; Histología.

## 1. Introdução

O gato doméstico (*Felis silvestres catus*) desde os primórdios tem sido utilizado como animal de companhia para os seres humanos, e cada vez mais a sociedade tem adquirido a prática da criação desses animais, devido a fatores como popularização de construções verticais, moradias menores além de boa interação com pessoas, sociabilidade e afeição (Grisolio, Picinato, Nunes, & Carvalho, 2017). Para a economia, o mercado pet tem crescido

gradativamente, permitindo um salto na geração de renda por meio de pesquisas, propagandas e produtos para a manutenção da população felina (Souza, Pinheiro Júnior, Mendonça, & Ballaris, 2001). Além disso, a espécie tem sido utilizada como importante modelo experimental, pois é o único felídeo que não se encontra em risco de extinção a nível mundial, e possui características fisiológicas e comportamentais próximas dos felídeos silvestres (Lima, & Silva, 2018). Diante da relevância da espécie em diferentes âmbitos, o desenvolvimento e aplicação de biotecnologias reprodutivas mostra-se interessante. Assim, pesquisas são desenvolvidas visando resguardar seu material genético por meio da criopreservação para posterior aplicação em diferentes finalidades. Diferentes tipos de fontes biológicas podem ser armazenados em biobancos, como tecido gonadal, gametas, e amostras somáticas (Praxedes et al, 2019; Luvoni, & Colombo, 2020).

No que se refere as amostras somáticas, estas apresentam grande potencial para estudos visando tanto a multiplicação de espécies pela possibilidade de isolamento *in vitro* de células a partir dos tecidos e utilização tanto na clonagem por transferência nuclear de células somáticas (Praxedes, Borges, Santos, & Pereira, 2018), como para geração de células induzidas à pluripotência (iPCs) voltadas para a medicina reprodutiva e regenerativa (Vidane et al, 2017). Nesse sentido, em gatos, essa abordagem foi utilizada para avaliar o tratamento de doença no trato urinário usando iPCs (Vidane et al, 2017), além da possibilidade de diferenciação de gametas *in vitro*, visando a conservação de espécies ameaçadas (Praxedes et al, 2018). Assim, o armazenamento de amostras de pele por meio da criopreservação tem sido um recurso utilizado para resguardar material biológico de espécies tanto domésticas quanto silvestres (Praxedes et al, 2018).

Assim, após a obtenção, tais amostras são destinadas a criopreservação, que de maneira geral consiste na exposição tecidual até -196 °C e, em seguida, armazenado em nitrogênio líquido, com o objetivo de conservar o tecido por longos períodos, sem que haja maiores prejuízos pós-descongelamento (Praxedes et al, 2019). Dessa maneira, diferentes técnicas de criopreservação podem ser empregadas a depender do tipo de amostra e local de execução (Davies, Smith, Cooper, Shelton, & Scheven, 2014), onde as principais técnicas utilizadas para criopreservação de amostras de pele são a congelamento lento e a vitrificação (Borges et al, 2017; Praxedes et al, 2019).

No que se refere a congelamento lento, sua principal característica consiste no resfriamento gradual da amostra que em seguida é armazenado em nitrogênio líquido (Praxedes et al, 2019). Embora esta técnica já tenha demonstrado resultados promissores, ainda pode levar a formação de cristais de gelo, e exige o uso de materiais e equipamentos de

valor econômico mais elevado (Borges et al, 2017; Praxedes et al, 2019). Já a vitrificação em superfície sólida, consiste no resfriamento abrupto do tecido sobre uma superfície metálica com a presença de nitrogênio líquido, e posterior armazenamento, sendo esta técnica a mais utilizada nos protocolos de criopreservação de pele (Borges et al., 2018), por ser uma técnica simples e de baixo custo.

Neste contexto, em felídeos silvestres, Praxedes et al (2019) compararam a vitrificação em superfície sólida com a congelação lenta para a criopreservação de amostras de pele de onça-pintada (*Panthera onca*). Neste trabalho, a vitrificação em superfície sólida promoveu uma maior manutenção de parâmetros histológicos na região dermal e epidermal, bem como uma melhor recuperação celular após cultivo *in vitro*, resultando em células somáticas com uma atividade metabólica superior.

Diante disso, sabe-se que a arquitetura histológica da pele de gatos apresenta similaridades quanto a sua organização estrutural em camadas a espécies mamíferas em geral (Souza, Figuera, Kommers, & Barros, 2009). Contudo, a quantidade de camadas e sua espessura, bem como os componentes celulares podem variar entre espécies e entre diferentes regiões do corpo (Santos, 2019; Praxedes et al, 2020). Assim, faz-se necessário verificar diferentes técnicas de criopreservação, buscando aquela que promova maior manutenção de seus constituintes, células e matriz extracelular após a descongelação.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da congelação lenta (CL) e vitrificação em superfície sólida (VSS) na pele auricular apical de gatos domésticos, visando à geração de protocolos eficientes de criopreservação, bem como a formação de criobancos para posteriores aplicações em estudos voltadas para a própria espécie, além de espécies filogeneticamente próximas.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Questões éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.0011507/2017-61).

## 2.2 Animais experimentais e biópsia tecidual

Um total de seis gatos adultos de rua foram utilizados no experimento. Biópsias de pele da região auricular apical (1–2 cm<sup>2</sup>) foram recuperadas de animais anestesiados para procedimentos de ooforectomia bilateral, sem intercorrências durante e após os procedimentos. Após a colheita, os fragmentos foram tricotomizados e higienizados com álcool a 70%. As amostras foram então armazenadas em tubos individuais contendo Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM)<sup>1</sup>, 10% de soro fetal bovino (SFB)<sup>2</sup>, e 2% de solução de penicilina e estreptomicina<sup>2</sup>, e transportadas a 4 °C ao laboratório por um período de até 2 h (Praxedes et al, 2019). As amostras foram fragmentadas (9 mm<sup>3</sup>) e então destinadas ao processamento histológico imediato (grupo controle) e criopreservação por congelamento lento (CL) ou vitrificação em superfície sólida (VSS).

## 2.3 Criopreservação tecidual e processamento histológico

Para realização dos procedimentos de criopreservação por congelamento lento (CL) ou por vitrificação em superfície sólida (VSS), brevemente, tecidos foram expostos à solução de criopreservação composta por DMEM<sup>1</sup> acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,5 M para CL ou 3,0 M para VSS, além de 0,25 M de sacarose e 10% de SFB.

Para a CL, os fragmentos foram inseridos em criotubos contendo 2,0 mL de solução de criopreservação, onde permaneceram por 12 h a -80 °C em recipiente Mr. Frosty. Posteriormente, foram transferidos para botijão de nitrogênio líquido (-196 °C) (Praxedes et al, 2019).

Já para a VSS, os fragmentos foram expostos a 1,8 mL de solução de criopreservação por 5 min. Posteriormente, os fragmentos foram colocados em uma superfície metálica sob nitrogênio líquido, transferidos em seguida para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C). Após duas semanas, os fragmentos foram aquecidos e destinados para o processamento histológico.

Para o processamento histológico, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% tamponado em solução tampão fosfato (PBS)<sup>2</sup> por 10 dias. Após o período de fixação, os

---

<sup>1</sup> Gibco-BRL

<sup>2</sup> Sigma-Aldrich

<sup>3</sup> Leica DM500, Leica Microsystems, 27 Alemanha

<sup>4</sup> Leica DM500, Leica Microsystems, 27 Alemanha

<sup>5</sup> US National Institutes of Health, EUA

fragmentos foram submetidos a banhos em graduação crescente de etanol (70, 80, 95 e 100%), para desidratação tecidual. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol, e em seguida impregnadas em parafina líquida. Após a solidificação, os blocos foram seccionados utilizando o micrótomo em cortes de 5  $\mu\text{m}$  e realizada as montagens das lâminas histológicas.

#### **2.4 Avaliação dos fragmentos, quanto à espessura das camadas de pele, quantificação das células e dos halos perinucleares**

Para avaliação da estrutura geral da pele foi realizada a histologia clássica com a coloração com hematoxilina-eosina (HE). Nessa técnica, a hematoxilina, por possuir caráter básico, tem atração por substâncias ácidas presentes nos tecidos, como os núcleos e ácidos nucleicos, corando-os em azul-púrpura. Já a eosina, sendo ácida, cora o citoplasma, as fibras colágenas e outras estruturas compostas por substâncias com caráter básico (acidófilas), corando-os em vermelho.

Para as análises, foram obtidos 20 registros fotográficos de campos aleatórios de cada lâmina em objetivas com aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio<sup>3</sup> com câmera acoplada<sup>4</sup>. Em cada lâmina (1 lâmina/animal) foi realizada a identificação e mensuração da epiderme, da derme e pele total (em  $\mu\text{m}$ ). Além disso, na derme e epiderme foram contados o número de células epidermais, os fibroblastos e halos perinucleares, como descrito por Praxedes et al (2019). Para todas as análises, foi utilizado o software ImageJ<sup>5</sup>.

#### **2.5 Avaliação da composição da matriz extracelular**

A análise da matriz extracelular foi realizada utilizando a quantificação das fibras colágenas e elásticas. Brevemente, cortes histológicos foram expostos à solução de Bouin, constituído por ácido pícrico, formol e ácido acético glacial. Em seguida, núcleos foram corados com hematoxilina férrica de Weigert. Com a solução tricrômica, o citoplasma foi corado em vermelho e o colágeno foi corado em azul. Finalmente, uma solução de ácido acético foi usada para enxaguar as seções após a coloração, o que produziu um tom mais delicado de coloração do tecido. Já a quantificação de fibras elásticas foi realizada por coloração de Weigert (Método de Weigert), onde foi possível visualizar as fibras elásticas em

tom azul escuro, os núcleos celulares em tons de azul a preto, o colágeno em tons de róseo a vermelho e outros elementos corados em amarelo.

Para as análises, foram obtidos 10 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em aumento de 40x com o uso de fotomicroscópio<sup>3</sup> com câmera acoplada<sup>4</sup>. Em cada lâmina (1 lâmina/animal) foi analisada a proporção volumétrica da matriz proteica. Para todas as análises, foi utilizado o software ImageJ<sup>5</sup> para mensuração da proporção volumétrica do tecido onde foi subtraído do valor de área total da imagem o valor de área com matriz proteica, obtendo-se o percentual.

## **2.6 Avaliação da atividade proliferativa usando a quantificação dos NOR**

A análise da atividade proliferativa na derme foi realizada por meio da quantificação de regiões organizadoras de nucléolo marcadas com nitrato de prata (AgNORs). Os cortes histológicos foram submetidos à coloração com nitrato de prata, onde a solução se ligou aos NORs, marcando pontos castanhos escuros dentro da célula. Dessa forma, quanto maior foi a quantidade de pontos escuros, maior foi a atividade proliferativa.

Para as análises foram obtidos 10 registros fotográficos aleatórios de cada lâmina em objetivas com aumento de 100x com o uso de fotomicroscópio<sup>3</sup> com câmera acoplada<sup>4</sup>. Nesta análise, foi utilizado o programa Image-Pro Plus<sup>6</sup> para a quantificação dos AgNORs por área.

## **2.7 Análise estatística**

Os dados gerados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão (uma repetição/ um animal) e analisados usando GraphPad Software Incorporation. Todos os resultados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Os dados obtidos de análises morfométricas foram analisados pela ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Os números de células e halos perinucleares foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. A significância foi fixada em  $p < 0,05$ .

---

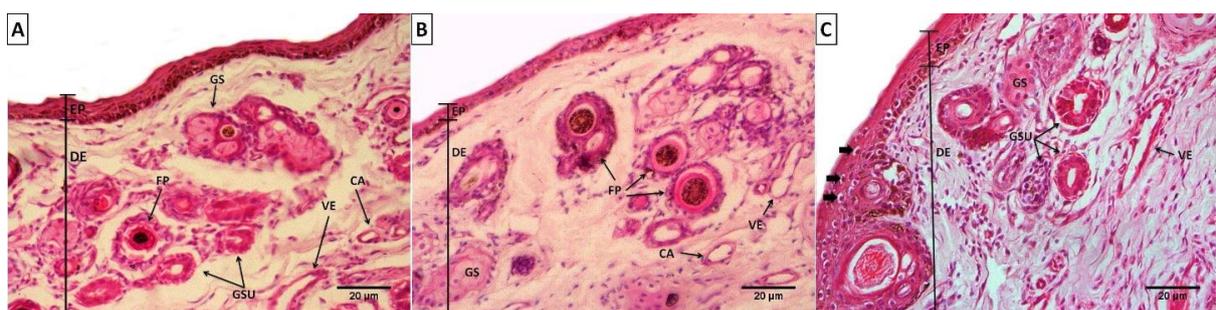
<sup>6</sup> Media Cybernetics, Silver Spring, USA

### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação dos fragmentos quanto à espessura das camadas de pele, quantificação das células e dos halos perinucleares

Inicialmente, a fim de mensurar os efeitos das técnicas de criopreservação na pele auricular de gatos domésticos, foram realizadas análises histológicas nas amostras utilizando a coloração HE (Figura 1: A, B e C). Por meio desta coloração, foi possível ter uma visão da arquitetura histológica da pele auricular apical de gatos no grupo de controle e criopreservação. Assim, foi possível observar a epiderme e as células epidérmicas mais externamente, e mais internamente a derme, onde foram observados os fibroblastos, os anexos, as vênulas e os capilares, formando a vascularização do tecido. Pode-se observar que as técnicas de criopreservação promoveram a manutenção da arquitetura geral do tecido.

**Figura 1** – Comparação das estruturas histológicas entre o grupo controle e as técnicas de criopreservação (vitrificação em superfície sólida e congelação lenta) da pele auricular da região apical de gatos domésticos. Coloração com HE para visualização das estruturas histológicas do tecido, bem como seus anexos, EP: epiderme, DE: derme, FP: folículo piloso, GS: glândula sebácea, GSU: Glândula sudorípara, VE: vênulas, CA: capilares. Setas largas: halos. **A:** Grupo controle **B:** Técnica de criopreservação em congelação lenta. **C:** Técnica de vitrificação em superfície sólida. 20 µm.

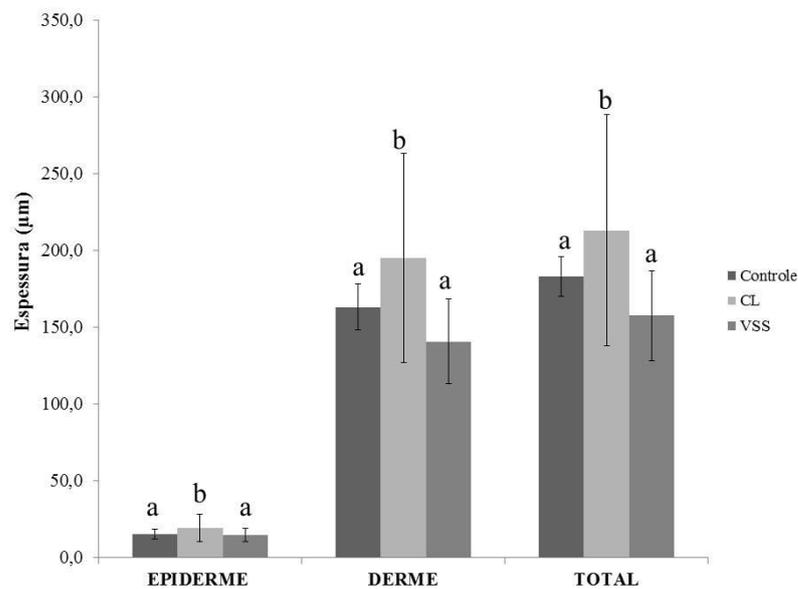


Fonte: Autores.

Além disso, utilizando a coloração de HE, foram mensuradas a espessura da epiderme, derme e espessura total da pele (Figura 2). Assim, pode-se observar que a VSS promoveu a manutenção da espessura de todas as camadas de pele, bem como a sua espessura total. Em contraste, o CL resultou num espessamento da espessura de todas as camadas em relação ao grupo de controle ( $p < 0,05$ ).

Relativamente à constituição celular da epiderme e da derme, bem como à presença de halos na epiderme (Tabela 1), a técnica VSS promoveu a manutenção do número de células epidérmicas semelhante ao do grupo controle. Quanto ao número de fibroblastos, o tratamento CL, permitiu a manutenção destas células, bem como o número de halos perinucleares.

**Figura 2** – Mensuração da derme, epiderme e espessura total da pele apical auricular de gatos domésticos usando coloração de hematoxilina-eosina. \*CL: Congelação lenta; VSS: Vitriificação em superfície sólida, <sup>a,b</sup>:  $p < 0,05$ .



Fonte: Autores.

### 3.2 Avaliação da composição da matriz extracelular

Para avaliar a percentagem de fibras de colágeno, foi utilizada a coloração tricrômica de Gomori (Figura 3: A, B e C), e pode-se observar que as fibras de colágeno têm diferentes calibres na sua forma, além de apresentarem um maior espessamento entre si, apresentando assim um padrão de disposição não organizada. Assim, pode se observar que a VSS manteve os parâmetros percentuais semelhantes aos do grupo controle, enquanto o tratamento CL mostrou uma percentagem mais elevada de fibras (Figura 4).

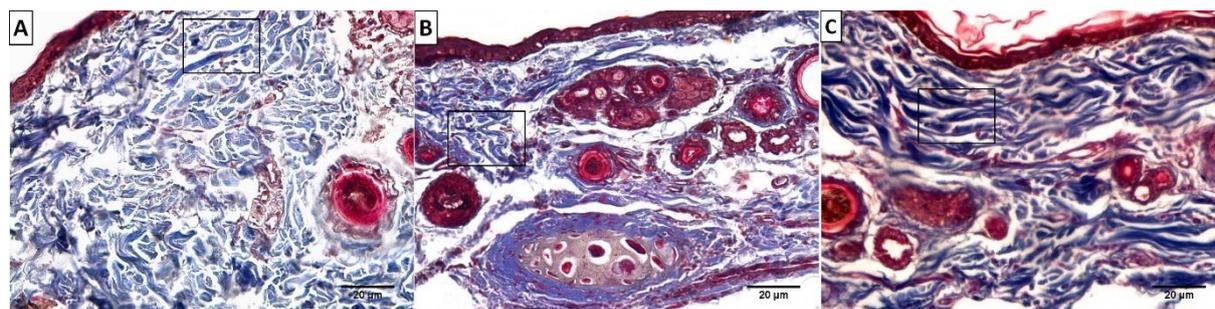
**Tabela 1** – Valores médios  $\pm$  erro padrão resultantes da quantificação de células epidermais, halos perinucleares e fibroblastos.

Grupo	Células Epidermais		Fibroblastos		Halos Perinucleares	
	Valores	Variações	Valores	Variações	Valores	Variações
Controle	$35,8 \pm 6,9^a$	$5 \pm 85$	$38,0 \pm 6,5^a$	$10 \pm 88$	$3,6 \pm 1,1^a$	$1 \pm 16$
CL	$26,9 \pm 5,4^b$	$4 \pm 72$	$42,4 \pm 8,6^a$	$8 \pm 21$	$2,7 \pm 0,8^a$	$1 \pm 8$
VSS	$39,5 \pm 6,6^a$	$13 \pm 82$	$45,0 \pm 5,9^b$	$14 \pm 81$	$6,1 \pm 1,8^b$	$1 \pm 25$

CL: Congelação lenta; VSS: Vitriificação em superfície sólida, <sup>a,b</sup>:  $p < 0,05$ .

Fonte: Autores.

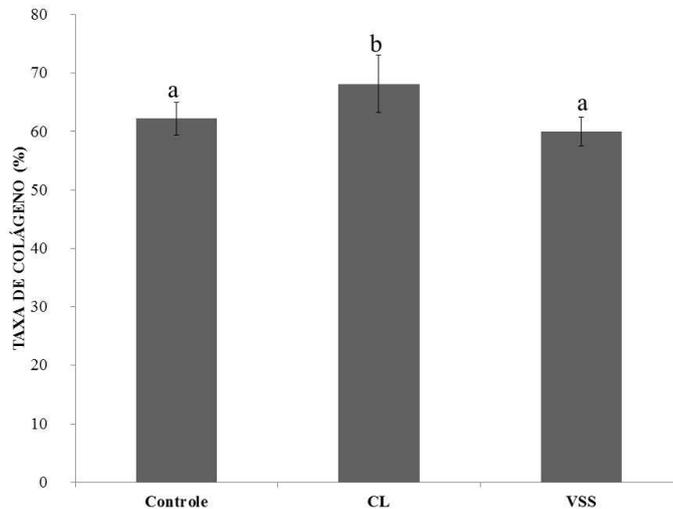
**Figura 3** – Visualização das estruturas histológicas utilizando a coloração com tricrômico de Gomori, na pele auricular da região apical de gatos domésticos. **A:** Grupo controle. **B:** Técnica de criopreservação em congelação lenta. **C:** Técnica de criopreservação em superfície sólida. 20  $\mu$ m.



Fonte: Autores.

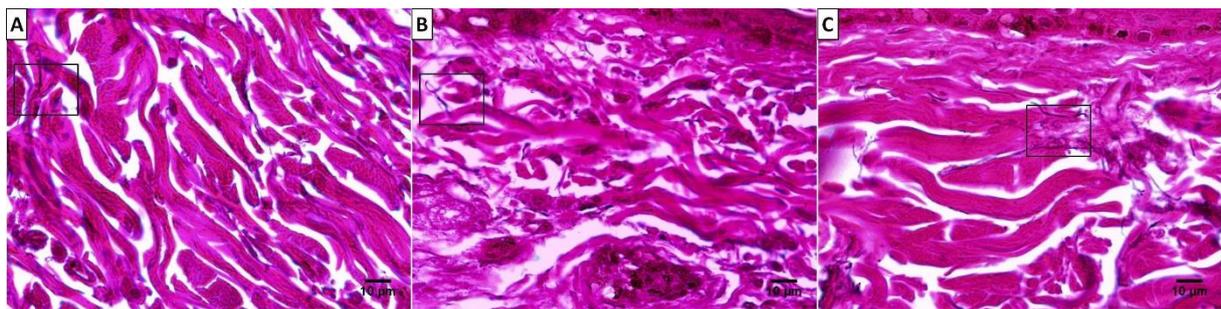
Adicionalmente, na região dermal para a análise das fibras elásticas (Figura 5: A, B e C) foi realizada a coloração de Weigert, onde as fibras colágenas são coradas em vermelho e as fibras elásticas em preto. Assim, percebe-se que as fibras elásticas se mostraram bastante delgadas e em baixa quantidade.

**Figura 4** – Mensuração da derme, epiderme e espessura total da pele apical auricular de gatos domésticos usando coloração com hematoxilina-eosina. \***CL**: Congelação lenta; **VSS**: Vitricificação em superfície sólida, <sup>a,b</sup>:  $p < 0,05$ .



Fonte: Autores.

**Figura 5** – Visualização das fibras elásticas na matriz extracelular dermal corada com Weigert: **A**: Grupo controle. **B**: Técnica de criopreservação em congelação lenta. **C**: Técnica de criopreservação em superfície sólida. 10  $\mu$ m.



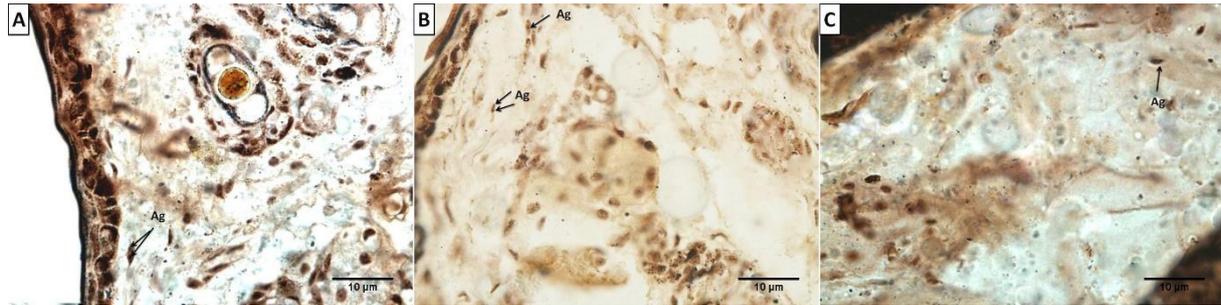
Fonte: Autores.

### 3.3 Avaliação da atividade proliferativa através da quantificação dos NOR

A avaliação da atividade proliferativa da derme foi analisada com a contagem de AgNORs presentes nos fibroblastos na região dermal, utilizando a marcação com nitrato de

prata (Figura 6: A, B e C). Nenhuma diferença foi observada entre o grupo controle, onde ambas as técnicas de criopreservação conseguiram promover a manutenção tanto do número quanto da área dos NORs quantificados (Tabela 2).

**Figura 6** – Coloração com nitrato de prata para visualização de NOR. **A:** Grupo controle. **B:** Técnica de criopreservação em congelação lenta. **C:** Técnica de criopreservação em superfície sólida. 10  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autores.

**Tabela 2** – Avaliação da atividade proliferativa na derme da pele da região apical auricular de gatos domésticos através da quantificação de AgNORs.

Grupo	Número de AgNOR/Célula	Área AgNOR/Célula ( $\mu\text{m}^2$ )
Controle	$2,1 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$
CL	$2,1 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
VSS	$2,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$

CL: Congelamento lento; VSS: Vitrificação em superfície sólida,  $p > 0,05$ .

Fonte: Autores.

#### 4. Discussão

Neste estudo, foram avaliados os efeitos das técnicas de criopreservação (CL e VSS) na pele auricular apical de gatos domésticos, revelando que a VSS foi a técnica que promoveu a manutenção de uma maior quantidade de parâmetros histológicos analisados, corroborando com estudos prévios desenvolvidos em outras espécies mamíferas (Borges et al, 2017), bem como em outros gatos selvagens (Praxedes et al, 2019).

A fim de avaliar em detalhe os efeitos das diferentes técnicas de criopreservação sob a

histologia geral da pele, foi observada de modo inédito a manutenção da espessura da epiderme, derme e pele total usando a técnica VSS. Por outro lado, utilizando a CL, todas as camadas foram consideravelmente espessadas. Isso pode estar relacionado com características metodológicas inerentes à técnica, onde a CL pode ser realizada com uma lenta diminuição da temperatura, o que pode desencadear a geração de cristais de gelo intracelular e, conseqüentemente, danos nos tecidos, o que poderia resultar num maior espessamento das camadas de pele avaliadas (Jang et al, 2017). Borges et al (2017) também obtiveram melhores parâmetros ao comparar a VSS com a vitrificação direta em criotubos na conservação da pele auricular de catetos (*Pecari tajacu*), demonstrando que a VSS não causou danos na epiderme e derme.

Quanto à análise realizada sob a constituição celular do tecido, inicialmente, as células epidermais quantificadas no presente estudo referem-se a queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans, células que desempenham importantes funções como a reparação e renovação da pele (Souza et al, 2009), com capacidade de auto renovação, e de grande interesse biotecnológico (Mochiduki, & Okita, 2012). Assim, neste estudo a VSS foi a técnica que promoveu uma maior manutenção das células da epiderme, onde com a CL sofreu uma redução significativa destas células. Santos (2019) comparando os efeitos da VSS na pele da onça-pintada em diferentes regiões do animal, também obteve um melhor resultado principalmente na região auricular, com um número de 78,8 células epidérmicas, demonstrando assim a eficiência da técnica VSS em promover a manutenção das células epidérmicas.

Ainda na região epidermal, os halos perinucleares são regiões que indicam células em início de apoptose, onde o núcleo sofre uma separação do citoplasma (Queiroz Neta et al, 2018), dessa forma, houve um aumento de halos perinucleares na técnica VSS, indicando uma possível apoptose nessas células causadas pela técnica, o que não foi observado na CL. No estudo realizado por Praxedes et al (2019) com a onça-pintada, a pele da região auricular demonstrou um aumento de halos perinucleares (17,6), e esses resultados podem estar atrelados a altas taxas de resfriamento promovidas pela VSS no momento da congelação, onde além de promover no tecido uma queda de temperatura brusca, como a epiderme é mais externa, se torna mais exposta à danos causados pela técnica VSS.

Partindo-se para região dermal, os fibroblastos quantificados são o principal tipo celular presente nessa região e estão envolvidos no processo de cicatrização e reepitelização após alguma injúria tecidual (Amadeu, Coulomb, Desmouliere, & Costa, 2003). Assim, fibroblastos são as principais células comumente utilizadas na transferência nuclear de células

somáticas ou geração de iPCs (Praxedes et al, 2018). Dessa forma, apesar do grupo CL ter apresentado um número similar de fibroblastos ao grupo controle, a VSS mostrou uma sutil alteração no número de fibroblastos na derme. Assim, essa sutil elevação não comprometeria um posterior uso desse tecido para obtenção de tais células para aplicação em biotécnicas, uma vez que na VSS uma maior quantidade de fibroblastos foi observada.

As fibras dérmicas são classificadas como fibras colágenas ou fibras elásticas, sendo a região dermal composta em maior parte por fibras colágenas (75% a 90%) (Souza et al, 2009). Neste estudo, a VSS não causou danos à matriz colágena, obtendo uma taxa de colágeno de 60% semelhante à apresentada pelo grupo controle. Este resultado também pode ser observado em estudos de Praxedes et al (2019), que em onças-pintadas obtiveram um valor de 57% de colágeno utilizando a mesma técnica. Portanto, a diminuição da taxa de colágeno utilizando a técnica CL pode ser atribuída ao tempo que o crioprotetor leva para penetrar no tecido, levando assim a maiores danos dérmicos durante a congelação.

No que se refere a avaliação das fibras elásticas, estas se apresentaram um número menor, sendo caracterizadas como muito delicadas. Por serem estruturas muito finas e de baixa quantidade, sua quantificação não é eficiente. Estudo com suínos também demonstrou esse mesmo padrão de fibras (Khiao et al., 2019), onde elas estão em menor número e um maior espessamento entre si.

Finalmente, no que diz respeito à quantificação dos AgNORs, por meio da ligação do nitrato de prata com as regiões organizadoras dos nucléolos, foi possível identificar indicações de divisão celular (Preradovic, Danic, Kardum-skelin, Sarcevic, & Hadzibegovic, 2017). Assim, não houve alteração da atividade proliferativa na derme, as duas técnicas promoveram a manutenção do número de AgNORs/células e sua área, semelhante ao grupo controle, onde estes resultados provam ser uma excelente indicação da qualidade proliferativa dos fibroblastos.

## **5. Considerações Finais**

Apesar de técnicas de criopreservação causarem alterações teciduais, buscando-se por aquela que promova uma maior manutenção de parâmetros qualitativos teciduais, a técnica de vitrificação em superfície sólida mostrou resultados superiores na conservação de tecidos somáticos de gatos domésticos, quando comparada a seus controles. Além disso, a técnica apresentou um baixo custo, podendo ser realizada à campo, além de viabilizar o armazenamento de recursos genéticos para uso em biotecnologias, como a transferência

nuclear de células somáticas, geração de células induzidas à pluripotência, com potencial uso translacional em medicina regenerativa e reprodução animal.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, 001).

### **Referências**

Amadeu, T. P., Coulomb, B., Desmouliere, A., & Costa, A. M. A. (2003). Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and *in vitro* models. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2(2), 60-68.

Borges, A. A., Lima, G. L., Queiroz Neta, L. B., Santos, M. V. O., Oliveira, M. F., Silva, A. R., & Pereira, A. F. (2017) Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*, 69, 643-654.

Borges, A. A., Queiroz Neta, L. B., Santos, M. V. O., Oliveira, M. F., Silva, A. R., & Pereira, A. F. (2018). Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 350-356.

Davies, O. G., Smith, A. J., Cooper, P. R., Shelton, R. M., & Scheven, B. A. (2014). The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*, 69(2), 342-347.

Cheuquemán, C., Faúndez, R., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2018). Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, 50(9), e.13080.

- Grisolio, A. P. R., Picinato, M. A. C., Nunes, J. O. R., & Carvalho, A. A. B. (2017). O comportamento de cães e gatos: sua importância para saúde pública. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 4(1), 117-126.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6, 12-18.
- Khiao, I. M., Richardson, K. C., Loewa, A., Hedtrich, S., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2019). Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 48, 207-217.
- Lima, D. B. C., & Silva, M. D. L. (2018). Vitriificação testicular de felinos pré-púberes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 42, 125-128.
- Luvoni, G. C., & Colombo, M. (2020). Cold case: Small animal gametes cryobanking. *Theriogenology*, 150, 445-451.
- Mochiduki, Y., & Okita, K. (2012). Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnology Journal*, 7, 789-797.
- Praxedes, É. A., Borges, A. A., Santos, M. V. O., & Pereira, A. F. (2018) Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biology*, 37(4), 258-263.
- Praxedes, É. A., Oliveira, L. R. M., Silva, M. B., Borges, A. A., Santos, M. V. O., Silva, H. V. R., Oliveira, M. F., Silva, A. R., & Pereira, A. F. (2019) Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology*, 88, 15-22.
- Praxedes, É. A., Queiroz Neta, L. B, Borges, A. A., Silva, M. B.; Santos, M. V. O., Ribeiro, L. R., Silva, H. V. R., & Pereira, A. F. (2020). Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 49(1), 121-129.

Preradovic, L.F., Danic, D., Kardum-skelin, I., Sarcevic, B., & Hadzibegovic, A.D. (2017). AgNOR Counts in differential diagnosis of parathyroid adenoma and hyperplasia in preoperative cytologic smears. *Southeastern European Medical Journal*, 1, 19-26.

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., Oliveir,a M. F., & Pereira, A. F. (2018). 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*, 54(7), 486-495.

Santos, M. D. C. B. (2019). Avaliação histológica da pele auricular, femoral e caudal de onça-pintada, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) e sua qualidade após a vitrificação. Universidade Federal Rural do Semiárido (Graduação em Biotecnologia).

Souza, L. C., Pinheiro Junior, O. Á., Mendonça A. O., & Ballaris, A. L. (2001). Associação homem-animal: reflexos na economia. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 4(1), 62-65.

Souza, T. M., Fighera, R. A., Kommers, G. D., & Barros, C. S. (2009). Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 177-190.

Vidane, A., Pinheiro A., Casals J., Passarelli, D., Hage, M., Bueno, R., Martins, D., & Ambrosio, C. (2017). Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 316-326.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Jane Cleide Jenuario Martins – 14%

Érika Almeida Praxedes – 14%

Matheus Barbosa do Nascimento – 14%

Leonardo Vitorino Costa de Aquino – 14%

Nilza Dutra Alves – 12%

Moacir Franco de Oliveira – 12%

Alexsandra Fernandes Pereira – 20%