



Ferramentas para a avaliação de células e tecidos somáticos após a criopreservação em mamíferos. Uma Revisão

Tools for evaluation of the somatic cells and tissues after cryopreservation in mammals. A Review

Cibelle Anne dos Santos Costa¹, Alana Azevedo Borges¹, Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Alexandra Fernandes Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). *Autor para correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo: A conservação de células e tecidos somáticos possui um papel importante para a preservação da biodiversidade, otimização em manejos reprodutivos e sistemas terapêuticos. Isso é possível através do aperfeiçoamento de técnicas de criopreservação e uso desse material genético em outras biotecnologias reprodutivas, como a transferência nuclear (clonagem). Nesse contexto, faz-se necessário uma análise precisa da amostragem biológica após a criopreservação, avaliando a viabilidade e, conseqüentemente, a eficiência da técnica de criopreservação empregada. Assim, essa revisão objetiva abordar as várias estratégias empregadas na determinação da eficiência dos métodos de criopreservação de células e tecidos somáticos, enfatizando seus aspectos teóricos e práticos em algumas espécies de mamíferos.

Palavras-chave: conservação, cultivo *in vitro*, análise histológica.

Abstract: The conservation of somatic cells and tissues shows an important role in biodiversity preservation, optimization of reproductive managements and therapeutic systems. This is possible through of the improvement of cryopreservation techniques and use of this genetic material into other reproductive biotechnologies, as nuclear transfer (cloning). In this context, an accurate analysis of the biological sample after cryopreservation makes it necessary, evaluating the viability and, consequently, the efficiency of cryopreservation technique employed. Thus, this review aims to address the various strategies employed in determining the efficiency of the cryopreservation methods of somatic cells and tissues, emphasizing the theoretical and practical aspects in some species of mammals.

Key words: conservation, *in vitro* culture, histological analysis.

Autor para correspondência: E. Mail: *alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebido em 15.8.2016. Aceito em 20.12.2016

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160067>

1. Introdução

A criopreservação consiste numa abordagem de conservação, a qual se define como o armazenamento de material biológico viável a temperaturas criogênicas por longos períodos de tempo, visando à manutenção adequada das estruturas e funções celulares (TSAI; LIN, 2012). Nesse contexto, progressos na criopreservação de células e tecidos somáticos tem proporcionado o desenvolvimento de métodos confiáveis (CAAMANO et al., 2008; LEÓN-QUINTO et al., 2009), permitindo a conservação de vários tipos celulares e tecidos (SIMIONE, 2009) com distintas aplicações.

Em geral, a criopreservação de material somático possui inúmeras finalidades, principalmente àquelas relacionadas às áreas de medicina humana e ciências animais, sendo considerada ferramenta essencial e prévia de muitos procedimentos. Um exemplo interessante seria para a conservação de material genético através da formação de bancos de gametas e reprodução de espécies ameaçadas (LEÓN-QUINTO et al., 2014) ou mesmo extintas (FOLCH et al., 2009). Além disso, essas técnicas podem ser empregadas comercialmente de maneira clínica na congelação de células-tronco (HUNT, 2011).

Assim, em virtude das técnicas de criopreservação apresentar uma ampla variação na escolha dos procedimentos

(vitricificação: BORGES et al., 2015, congelação lenta: CAPUTCU et al., 2013), condições de temperaturas (SILVESTRE et al., 2003) e tipos de crioprotetores empregados (LEÓN-QUINTO et al., 2014), é de fundamental importância o estabelecimento e a padronização de ferramentas de análises confiáveis da viabilidade da amostra após a criopreservação. Tal abordagem permite, portanto, determinar de maneira segura o melhor protocolo de criopreservação, pela verificação das características que geram menos danos a cada tecido, tipo e estrutura celular.

Assim, essa revisão objetiva abordar as ferramentas empregadas na avaliação da eficiência da conservação de células e tecidos somáticos após a criopreservação em diferentes espécies de mamíferos.

2. Criopreservação de material somático e suas aplicações

Notoriamente, a criopreservação representa uma técnica amplamente empregada em pesquisa básico-científica, para fins comerciais, terapêuticos e de conservação de material biológico, que garantem a estabilização do material genético, proporcionando a reprodutibilidade dos resultados (SIMIONE, 2009). Tanto na reprodução animal quanto humana, a preservação de células e tecidos somáticos e também aqueles germinativos tem sido com

sucessos estabelecidos em algumas espécies (LÉON-QUINTO et al., 2009, SANTOS et al., 2010) e constantemente aprimorados em outras (BORGES et al., 2015, PRAXEDES et al., 2016).

Especialmente a criopreservação de células e tecidos somáticos é de grande importância tanto para programas de conservação de espécies ameaçadas, quanto para medicina terapêutica. Em geral, células e tecidos somáticos são de mais fácil obtenção que gametas e tecidos germinativos (MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2015), além da possibilidade de serem utilizados em técnicas como a transferência nuclear de células somáticas (TNCS, clonagem) que podem proporcionar o ressurgimento de espécies extintas, a produção e a multiplicação de espécies de interesse zootécnico (LOI et al., 2001; PEREIRA et al., 2013). Nesse contexto, células oriundas de tecidos da região da pele e cartilagem auricular e articular podem servir para esse propósito (LEÓN-QUINTO et al., 2014; CETINKAYA et al., 2014).

Além disso, vários trabalhos exemplificam a abordagem terapêutica. O estabelecimento de bancos de cartilagem articular pode proporcionar, por exemplo, um tratamento alternativo para pacientes com graves enfermidades nas articulações (JOMHA et al., 2012). Já células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes tipos

teciduais, como tecido adiposo, polpa dental e medula óssea (DAVIES et al., 2014), são consideradas uma opção interessante para a utilização em terapia celular (MA et al., 2012), podendo ser empregadas na bioengenharia tecidual e medicina regenerativa (PARK et al., 2014). Assim, essas células e tecidos criopreservados podem ser empregados futuramente como fonte autóloga de células-tronco (CHOUDHERY et al., 2013). Como outros tipos celulares também utilizados em aplicações terapêuticas têm-se: hepatócitos (MAGALHÃES et al., 2012), células epiteliais amnióticas humanas (NIKNEJAD et al., 2013), células do cordão umbilical (PRATA et al., 2012) e células sanguíneas do cordão umbilical (MOTTA et al., 2014; SHIMAZU et al., 2015).

Para tecidos somáticos, duas técnicas de criopreservação podem ser utilizadas, a congelamento lento (CAAMANO et al., 2008) e a vitrificação (BORGES et al., 2015), as quais consistem da exposição a crioprotetores, resfriamento, estocagem, aquecimento e remoção dos crioprotetores dos fragmentos teciduais (SILVA et al., 2015).

Em geral, estratégias de vitrificação tem se mostrado superiores ao processo convencional de congelamento em várias espécies (BROCKBANK et al., 2010).

Já em células somáticas, o uso da congelamento lenta tem sido a metodologia mais empregada (PEREIRA et al., 2013; LEON-QUINTÓ et al., 2009). Em geral, células recuperadas podem ser criopreservadas usando crioprotetores penetrantes como o dimetilsulfóxido sozinho ou em associação com um agente não penetrante como a sacarose (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

3. Métodos de análise em tecidos somáticos

3.1. Microscopias

A avaliação histológica consiste na primeira abordagem e representa um dos importantes métodos de estudo da viabilidade do tecido após a criopreservação (KLOCKE et al., 2014). Em geral, com o emprego da histologia clássica pode-se avaliar o nível de danos gerados pela criopreservação, tanto na estrutura quanto na morfologia geral do tecido, além de suas células e de alguns componentes da matriz extracelular. O processamento histológico do tecido somático é comum aos demais tecidos e envolve: fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, microtomia, montagem e coloração das lâminas.

Há vários tipos de corantes empregados nessa avaliação, sendo a combinação de hematoxilina-eosina a mais empregada.

BORGES et al. (2015) e COSTA et al. (2015) avaliaram a eficiência de dois métodos de vitrificação (vitrificação em superfície sólida e vitrificação convencional em criotubos) em tecido somático derivado da pele de duas espécies silvestres. Ambos os autores empregaram histologia clássica com hematoxilina-eosina e conseguiram observar danos causados no tecido pela criopreservação em camadas da epiderme e da derme, distinguindo alterações também nas suas células.

Já a imunohistoquímica baseia-se na especificidade antígeno-anticorpo para melhor analisar a morfologia do tecido, de acordo com a informação espacial e funcional das moléculas-alvo que se quer corar (FREVERT et al., 2014). Assim, na avaliação de tecidos após a criopreservação, podem-se utilizar várias abordagens. Um exemplo interessante seria a avaliação da densidade dos vasos sanguíneos utilizando o anticorpo anti-CD31, em que o grupamento de diferenciação (CD31) é expresso na superfície das junções intercelulares do endotélio (LEE et al., 2015).

Finalmente, com o microscópio eletrônico de transmissão é possível uma análise detalhada da ultraestrutura do tecido, podendo observar os efeitos da criopreservação sobre a matriz extracelular, estrutura e distribuição das organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático

(ONARI et al., 2012). Além disso, observações são possíveis em termos de densidade e integridade do citoplasma e das membranas, organização do citoesqueleto, vacuolizações e formato do núcleo (CHEN et al., 2013). Trabalhos interessantes usando essa ferramenta podem ser evidenciados em cartilagem articular (ONARI et al., 2012) e células epiteliais do oviduto (CHEN et al., 2013).

3.2. Cultivo de fragmentos teciduais

A análise histológica juntamente com o cultivo *in vitro* de fragmentos teciduais consiste na melhor combinação de métodos para estimar a viabilidade do tecido após a criopreservação (KLOCKE et al., 2014). Assim, tecidos podem ser cultivados *in vitro* para a verificação da capacidade de sobrevivência e proliferação de suas células desprendidas do tecido ao longo do cultivo (OSKAM et al., 2011).

Em geral, para o emprego adequado desta ferramenta, amostras teciduais após a colheita e criopreservação, devem ser cuidadosamente manipuladas de maneira asséptica (PEREIRA et al., 2014). Depois, as mesmas devem ser cortadas em fragmentos de tamanho adequado de acordo com a proposta experimental ou acima de 1,0 mm³ e cultivados por longos períodos para identificação da viabilidade do tecido pelo desprendimento das suas células e fixação nas placas de Petri (SANTOS et al., 2016). A essa fase chama-se esse cultivo

primário e as células recuperadas podem ser empregadas em diferentes aplicações e avaliações.

4. Métodos de análise em células somáticas

4.1. Cultivo celular *in vitro*

O cultivo *in vitro* consiste na primeira e principal ferramenta de avaliação de células somáticas após a criopreservação. Em geral, após o aquecimento das amostras, células são cultivadas em sistema de subcultivos (ou cultivos secundários), nas quais retornarão suas condições ideais de temperatura, atmosfera e umidade, dispondo de grande quantidade de nutrientes presentes no meio (PEREIRA et al., 2014). Desta maneira, células retomam sua atividade metabólica e recuperam-se do estresse sofrido pelas baixas temperaturas.

A partir de então, diferentes avaliações podem ser empregadas para estimar a eficiência dos procedimentos de criopreservação, como o perfil de crescimento (SANTOS et al., 2016), aspectos morfológicos (BORGES et al., 2015), confluência celular (SILVESTRE et al., 2003) e viabilidade por diferentes métodos (BORGES et al., 2015; LEÓN-QUINTO et al., 2014).

4.2. Avaliações das células somáticas em cultivo *in vitro*

Inicialmente, a imunocitoquímica e imunofluorescência podem ser empregadas

na avaliação da qualidade das células em cultivo *in vitro*. Assim, células são incubadas com anticorpos primários que se ligam às moléculas desejadas e, posteriormente, com anticorpos secundários conjugados ou não com fluoróforos. Após isso, pode-se avaliar a viabilidade celular pela presença de moléculas que estejam relacionadas a funções fisiológicas importantes e a sobrevivência celular (NIKNEJAD et al., 2013; CETINKAYA et al., 2014; DEMIRCI et al., 2014).

Outra metodologia proposta seria a análise da capacidade proliferativa pela determinação da curva de crescimento e o cálculo do tempo de desdobramento da população (ou *population doubling time*, PDT). Este último refere-se ao tempo necessário para a população celular se duplicar e sua mensuração é empregada para quantificar a resposta das células que foram submetidas ao estresse do processo de congelação e aquecimento (SANTOS et al., 2016). Quanto mais rápido as células se multiplicarem, ou seja, quanto menor o PDT, maior será a eficiência do protocolo de criopreservação utilizado.

Além disso, a dosagem de glicosaminoglicanos e outros componentes celulares da matriz extracelular é também uma ferramenta interessante. Em geral, os glicosaminoglicanos participam de várias funções fisiológicas importantes, entre elas, a adesão e o crescimento celular

(TOMATSU et al., 2014). A produção de matriz extracelular é estimada pela quantificação de glicosaminoglicanos presente nas células, utilizando espectrofotometria (CETINKAYA et al., 2014; LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Finalmente, a expressão gênica também pode ser empregada em cultivos celulares, a fim de se conhecer como a célula se comporta a nível transcricional diante das condições em que elas são submetidas durante a criopreservação, determinando com profundidade os mecanismos pelos quais ocorrem a perda da viabilidade. Um exemplo interessante seria a análise dos altos níveis de expressão de caspases que pode ser um indicativo da baixa eficácia do método de criopreservação (ZHANG et al., 2013). Adicionalmente, pode-se ainda quantificar a expressão de marcadores específicos para caracterização do tipo celular e sua funcionalidade (NIKNEJAD et al., 2013; DEMIRCI et al., 2014).

Conclusões

A conservação de material somático por criopreservação de células e tecidos é sem dúvidas uma valiosa técnica para diferentes finalidades na área humana e animal. Nesse contexto, as técnicas de análise de células e tecidos somáticos, tanto as mais simples quanto as mais elaboradas, são importantes para conhecer o comportamento das células expostas às

temperaturas criogênicas e verificar como elas respondem a essas condições, objetivando assim melhorar a técnica pela redução dos danos gerados.

Assim, espera-se promover um avanço e aperfeiçoamento significativo dos protocolos de criopreservação, contribuindo no desenvolvimento de suas aplicações terapêuticas e investigação básica.

Referências Bibliográficas

1. BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.Q.; SANTOS, M.V.O.; SANTOS, M.L.T.; LIMA, G.L.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Isolation of somatic cell derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different vitrification techniques. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 12, n. 1, p. 842, 2015.
2. 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.
3. CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; DE 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.
4. 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.
5. CETINKAYA, G.; HATIPOGLU, I.; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, London, v. 68, n. 1, p. 65-70, 2014.
6. CHEN, S.; EINSPANIER, R.; SCHOEN, J. Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: validation of a comprehensive *in vitro* model for reproductive science. **Theriogenology**, New York, v. 80, n. 8, p. 862-869, 2013.
7. CHOUDHERY, M.S.; BADOWSKI, M.; MUISE, A.; PIERCE, J.; HARRIS, D.T. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 187, n. 1, p. 24-35, 2013.
8. 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*). In: XXI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (SEMIC) DA UFERSA, Mossoró, 2015.
9. DAVIES, O.G.; SMITH, A.J.; COOPER, P.R.; SHELTON, R.M.; SCHEVEN, B.A. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, London, v. 69, n. 2, p. 342-347, 2014.
10. DEMIRCI, S.; DOGAN, A.; SISLI, B.; SAHIN, F. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. **Cryobiology**, London, v. 68, n. 1, p. 139-146, 2014.
11. FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; VIGNON, X. 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.

12. FREVERT, C.W.; JOHNSON, B.; STAHL, W.L. Immunohistochemistry: antibody specificity. **Reference Module in Biomedical Sciences**, New York, v. 1, p. 3807-3816, 2014.
13. HUNT, C.J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Karger, v. 38, p. 107-123, 2011.
14. JOMHA, N.M.; ELLIOTT, J.A.; LAW, G.K.; MAGDOORI, B.; FORBES, J.F.; ABAZARI, A.; ADESIDA, A.B.; LAOUAR, L.; ZHOU, X., MCGANN, L.E. Vitrification of intact human articular cartilage. **Biomaterials**, New York, v. 33, n. 26, p. 6061-6068, 2012.
15. KLOCKE, S.; BUNDGEN, N.; KOSTER, F.; EICHENLAUB-RITTER, U.; GRIESINGER, G. Slow-freezing *versus* vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, London, v. 291, n. 2, p. 419-426, 2014.
16. LEE, J.; LEE, J.R.; YOUM, H.W.; SUH, C.S.; KIM, S.H. Effect of preoperative simvastatin treatment on transplantation of cryopreserved-warmed mouse ovarian tissue quality. **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 2, p. 285-293, 2015.
17. LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F.J.; MORENOD, J.M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; 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. 3-4, p. 347-361, 2009.
18. LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal *versus* adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, London, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014.
19. LOI, P.; PTAK, G.; BARBONI, B.; FULKA, J.JR.; CAPPAL, P.; CLINTON, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 10, p. 962-964, 2001.
20. MA, L.; MAKINO, Y.; YAMAZA, H.; AKIYAMA, K.; HOSHINO, Y.; SONG, G.; KUKITA, T.; NONAKA, K.; SHI, S.; YAMAZA, T. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e51777, 2012.
21. MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.R.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of brazilian biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 62-66, 2016.
22. MAGALHÃES, R.; NUGRAHA, B.; PERVAIZ, S.; YU, H.; KULESHOVA, L.L. Influence of cell culture configuration on the post-cryopreservation viability of primary rat hepatocytes. **Biomaterials**, New York, v. 33, n. 3, p. 829-836, 2012.
23. MOTTA, J.P.R.; PARAGUASSÚ-BRAGA, F.H.; BOUZAS, L.F.; PORTO, L.C. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. **Cryobiology**, London, v. 68, n. 3, p. 343-348, 2014.
24. NIKNEJAD, H.; DEIHIM, T.; PERIOVI, H.; ABOLGHASEMI, H. Serum-free cryopreservation of human amniotic epithelial cells before and after isolation from their natural scaffold.

Cryobiology, London, v. 67, n. 1, p. 56-63, 2013.

25. ONARI, I.; HAYASHI, M.; OZAKI, N.; TSUCHIYA, H. Vitreous preservation of articular cartilage from cryoinjury in rabbits. **Cryobiology**, London, v. 65, n. 2, p. 98-103, 2012.

26. OSKAM, I.C.; LUND, T.; SANTOS, R.R. Irreversible damage in ovine ovarian tissue after cryopreservation in propanediol: analyses after *in vitro* culture and xenotransplantation. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 46, n. 5, p. 793-799, 2011.

27. PARK, B.W.; JANG, S.J.; BYUN, J.H.; KANG, Y.H.; CHOI, M.J.; PARK, W.U.; LEE, W.J.; RHO, G.J. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Malden, 2014.

28. PEREIRA, A.F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K.C.; CARNEIRO, I.S.; AVELARA, S.R.G.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; SOUSA, F.C.; MELO, C.H.S.; MOURA, R.R.; TEIXEIRA, D.I.A.; BERTOLINI, L.R.; FREITAS, V.J.F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 163-172, 2013.

29. PEREIRA, A.F.; SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FEITOSA, A.K.N. Isolation and characterization of skin-derived donor cells for nuclear transfer. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 8, p. 311-316, 2014.

30. PRATA, K.L.; SANTIS, G.C.; ORELLANA, M.D.; PALMA, P.V.; BRASSESCO, M.S.; COVAS, D.T. Cryopreservation of umbilical cord

mesenchymal cells in xenofree conditions. **Cytotherapy**, New York, v. 14, n. 6, p. 694-700, 2012.

31. PRAXEDES, E.C.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; APOLINARIO, C.A.; BEZERRA, J.A.; SOUZA, A.L.; OLIVEIRA, M.F.; RODRIGUES, A.P.; SILVA, A.R. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton South, *in press*, 2015.

32. 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, *in press*, 2016.

33. SANTOS, R.R.; AMORIM, C.; CECCONI, S.; FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, p. 151-163, 2010.

34. SHIMAZU, T.; MORI, Y.; TAKAHASHI, A.; TSUNODA, H.; TOJO, A.; NAGAMURA-INOUE, T. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. **Cytotherapy**, New York, v. 17, n. 5, p. 593-600, 2015.

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

36. SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; CERVERA, R.P.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 5-6, p. 1469-1477, 2003.
37. SIMIONE, F.P. Thermo scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. **Thermo Fisher Scientific Incorporation**, New York, 2009.
38. TOMATSU, S.; SHIMADA, T.; MASON, R.W.; KELLY, J.; LAMARR, W.A.; YASUDA, E.; SHIBATA, Y.; FUTATSUMONI, H.; MONTAÑO, A.M.; SUZUKI, Y.; ORII, T. Assay for glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry and its applications. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, New York, Supplem 2, p. 1-23, 2014.
39. TSAI, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 425-433, 2012.
40. ZHANG, J.M.; WANG, H.C.; WANG, H.X.; RUAN, L.H.; ZHANG, Y.M.; LI, J.T.; TIAN, S.; ZHANG, Y.C. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 52-55, 2013.