



MEIOS SIMPLIFICADOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE PELE DE VEADO-MATEIRO (*Mazama rufa*) COMO MODELO PARA MAMÍFEROS NEOTROPICAIS: APLICABILIDADE EM CAMPO E ZOOLOGICOS

SANDOVAL, Eluzai D. P.¹; HERNÁNDEZ, Juan D. J.¹; DUARTE, José M. B.¹.

¹Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal, Brasil.

Resumo. A coleta e criopreservação de tecidos é uma ferramenta promissora para a conservação *ex-situ* da diversidade genética de animais silvestres. Testamos dois meios de congelamento lento para pele de *Mazama rufa*: um com Dulbecco Media Eagle Modified (DMEM) e outro com solução salina 0,9%. Ambos preservaram a viabilidade e proliferação celular, apoiando o uso da pele como fonte de células somáticas para genética e biotecnologias. O método é acessível e viável para profissionais de zoológicos e fauna, fortalecendo estratégias de conservação e bancos genéticos.

Palavras-chave: Cervídeo. Criobancos. Conservação.

Introdução

A criopreservação de tecidos somáticos e reprodutivos de animais silvestres, incluindo espécies ameaçadas, é uma estratégia essencial para o monitoramento sanitário e a conservação genética (OLIVEIRA et al. 2023). A pele é um dos tecidos mais acessíveis para coleta, podendo ser obtida durante contenção, procedimentos anestésicos ou após a morte do animal. Quando armazenadas corretamente, essas amostras podem manter a viabilidade celular por décadas, servindo como fonte para estudos citogenéticos e reprodutivos, além de aplicações com biotecnologias avançadas, como a reprogramação celular e a gametogênese in vitro (PERIS-FRAU et al. 2023).

Apesar de sua importância, os protocolos convencionais de criopreservação geralmente exigem infraestrutura laboratorial, equipamentos especializados e meios de preservação de alto custo, o que dificulta sua aplicação em campo ou em instituições com recursos limitados (SANDOVAL ET AL. 2025). Assim, torna-se urgente desenvolver e validar protocolos de congelamento mais simples, utilizando materiais de fácil acesso, que possam ser aplicados diretamente por médicos veterinários, biólogos e gestores de fauna, ampliando o alcance das estratégias de conservação *ex situ*.

Objetivo

Avaliar a eficiência de dois meios de congelamento lento para criopreservação de amostras de pele de veado-mateiro, *Mazama rufa*, como modelo para espécies silvestres de mamíferos.

Metodologia

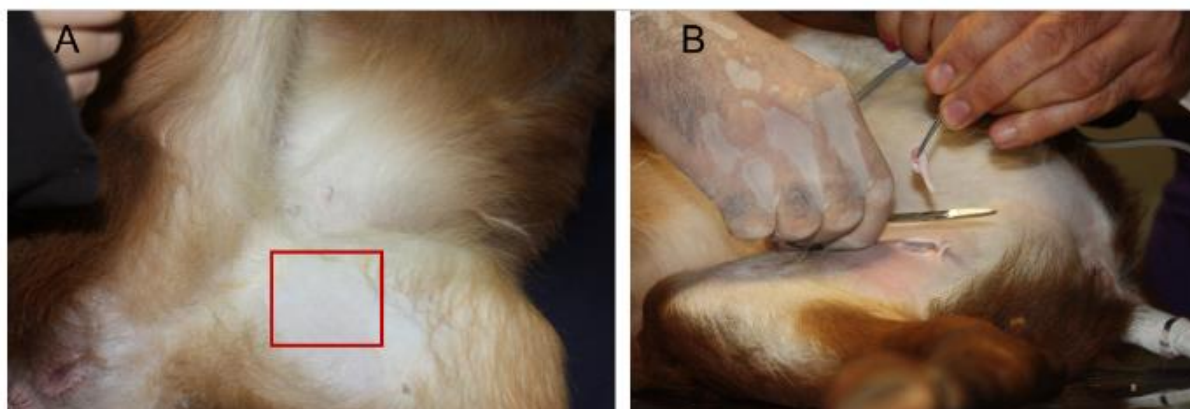
Para avaliação de meio de congelamento de pele foram coletadas amostras de tecido da região inguinal de 6 indivíduos veado-mateiro (Figura 1). Essa região foi escolhida por permitir a obtenção de um fragmento de pele de tamanho adequado, com menor presença de pelos, o que reduz o risco de contaminação, e por não resultar em uma ferida exposta em área visível ou funcional dos animais. Os fragmentos foram depositados em um meio de transporte (Dulbecco Media Eagle Modified - DMEM suplementado com 2,5% de solução de Penicilina-Estreptomicina 10.000ug/mL e 10mg/mL de Anfotericina B 1mg/L).

Seguidamente, os fragmentos foram divididos em tamanhos menores para serem consequentemente depositados em tubos de congelamento contendo:

a) Meio de congelamento de pele (CP) convencional, contendo (DMEM) com 6% de Dimetil sulfóxido (DMSO);

b) Solução salina balanceada com 6% de DMSO. Todos os meios de congelamento foram suplementados com o crioprotetor Dimetil sulfóxido (DMSO). Adicional a esses grupos experimentais, um fragmento de tecido fresco foi analisado sem criopreservação e utilizado como controle. Assim, tecidos de todos indivíduos foram utilizados para todos os tratamentos incluindo o controle.

Figura 1. Região de coleta de fragmento de pele para congelamento lento e armazenamento em botijão de nitrogênio líquido. Adaptado de Duarte et al. 2021.



Fonte: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE).

Os fragmentos de pele depositados nos tubos de congelamento foram refrigerados por 3h a 4°C, colocados ao vapor de nitrogênio líquido por 30 min e submergidos no nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram estocados por 10 dias. Após esse tempo, os tubos foram descongelados durante 2 min em banho-maria a 37°C e as células foram isoladas de fragmentos de tecido por digestão enzimática, incubados por 30 minutos a 38 °C em solução de Liberase (1:30 Liberase/DPBS), e centrifugadas a 1600 rpm por 5 minutos. Seguidamente, foram colocadas em solução contendo os reagentes de viabilidade celular: iodeto de propídio (PI), Calceína-AM e Hoechst 33342, todos corantes fluorescentes, e as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência para identificar células vivas (verde – Calceína), mortas (vermelho – PI) e total (azul – Hoechst).

Fragmentos de tecido dos grupos controle e pós-congelamento foram fixados em solução de Bouin (4 °C, durante a noite), desidratados em etanol (50% e 70%) e incluídos em parafina. As lâminas foram cortadas, desparafinizadas, reidratadas e coradas com hematoxilina e eosina. Foram avaliadas, em microscópio óptico (20×), para verificar a integridade do tecido.

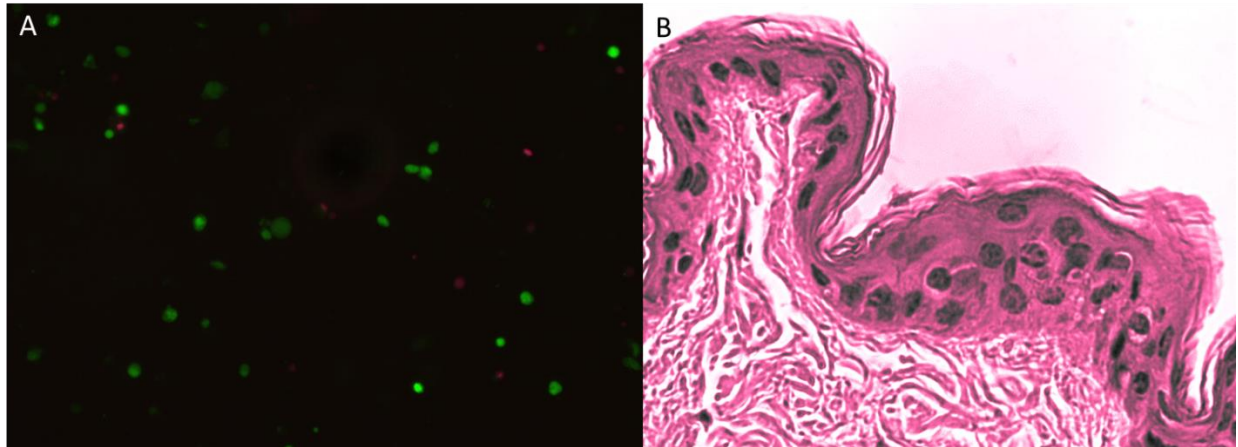
Os dados foram analisados por ANOVA de três fatores, com testes de Tukey e Dunnett para comparações entre grupos. A normalidade e a homogeneidade das variâncias também foram verificadas. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Trabalhos anteriores de criopreservação de pele de cervídeos mostraram que o uso de DMEM como meio base suplementado com o crioprotetor DMSO a 6% apresenta resultados satisfatórios, mantendo a viabilidade celular, a integridade de membranas e a capacidade de divisão celular (OLIVEIRA et al., 2023). Neste estudo, obtivemos resultados semelhantes com o uso de solução salina a 0,9% como meio base suplementado com DMSO, observando manutenção da viabilidade celular e da integridade tecidual.

As análises histológicas com coloração de hematoxilina-eosina (HE) não revelaram alterações marcantes nas camadas epidérmicas, colágeno dérmico, fibras elásticas ou tecido adiposo, entre os diferentes meios de congelamento em relação ao tecido fresco. Em todos os tecidos analisados, a proporção de células viáveis se manteve acima de 70% ($\pm 8,3\%$) após cultivo celular, sem diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 2. Imagem representativa de análise de viabilidade celular e integridade do fragmento de pele de veado-mateiro *Mazama rufa*. (A) (A) Células viáveis coradas em verde com Calceína-AM, células mortas coradas em vermelho com Iodeto de Propídio. (B) Avaliação histomorfológica do tecido.



Este estudo representa uma das primeiras análises comparativas de meios de congelamento de pele de cervídeos, corroborando achados prévios com tecidos reprodutivos (GASTAL et al., 2018; PERIS-FRAU et al., 2023; PUKAZHENTHI et al., 2015). Embora protocolos mais elaborados utilizem meios de laboratório ricos em nutrientes, aminoácidos e soro fetal, o uso de solução fisiológica como base para criopreservação representa um avanço importante para amostragens à campo. A possibilidade de preparar o meio com materiais de fácil acesso amplia a aplicabilidade do protocolo por veterinários, biólogos e técnicos de fauna, mesmo sem infraestrutura laboratorial especializada. Dessa forma, os resultados reforçam o potencial da criopreservação simplificada como ferramenta viável para o biobanco genético e suporte a biotecnologias reprodutivas em programas de conservação.

Conclusão

Os resultados do estudo demonstram que ambos os meios de congelamento testados, tanto o convencional DMEM, quanto a solução salina a 0,9% com DMSO foram eficazes na manutenção da viabilidade celular e integridade tecidual de amostras de pele de *Mazama rufa* após criopreservação. A similaridade dos resultados entre os tratamentos reforça a aplicabilidade do uso de soluções simplificadas como alternativa técnica acessível. Esses achados contribuem para a ampliação das estratégias de biobancos somáticos e para o fortalecendo ações de conservação ex situ.

Referências

OLIVEIRA, LC. et al. A method to freeze skin samples for cryobank: A test of some cryoprotectants for an endangered deer. **Biopreserv Biobank.**, p. 37944047, 2023.

GASTAL, GDA. et al. Cryopreservation and in vitro culture of white-tailed deer ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 113, p. 253-60, 2018.

PERIS-FRAU, P. et al. DNA integrity and viability of testicular cells from diverse wild species after slow freezing or vitrification. **Front Vet Sci.**, v. 9, p. 1114695, 2023.



PUKAZHENTHI, BS. et al. Slow freezing, but not vitrification, supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. ***PLoS One***, v. 10, e0132790, 2015.

DUARTE, JMB. et al. Skin Freezing Technique for Living Cell Bank. ***GenProtocols***, 2021.