

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CERVOS
BRASILEIROS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E DAS
TAXAS DE APOPTOSE TECIDUAL**

Letícia de Castro Fiori
Médica Veterinária

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CERVOS
BRASILEIROS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E DAS
TAXAS DE APOPTOSE TECIDUAL**

Discente: Letícia de Castro Fiori

Orientadora: Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias; área:
Reprodução Animal**

F519v	Fiori, Letícia de Castro Vitrificação de tecido ovariano de cervos brasileiros: avaliações histológicas e das taxas de apoptose tecidual / Letícia de Castro Fiori. -- Jaboticabal, 2022 40 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Maricy Apparício Ferreira 1. Biotecnologia animal. 2. Vitrificação. 3. Ovários. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CERVOS BRASILEIROS:
AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E DAS TAXAS DE APOPTOSE TECIDUAL

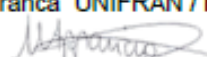
AUTORA: LETÍCIA DE CASTRO FIORI

ORIENTADORA: MARICY APPARÍCIO FERREIRA

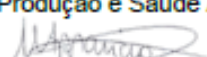
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade de Franca UNIFRAN / Franca/SP



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES (Participação Virtual)
Depto. de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ - UNESP

Jaboticabal, 10 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Letícia de Castro Fiori – nascida na cidade de Batatais, São Paulo, em 29 de abril de 1994. Filha de Regina Célia de Castro Fiori e José Henrique Fiori. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – no ano de 2018. Durante a graduação, foi monitora bolsista na disciplina de Química Fisiológica e Bioquímica Animal, ministrada pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, de agosto a setembro de 2014, sendo que, de outubro a dezembro foi monitora voluntária. Foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de outubro de 2014 a setembro de 2015, atuando na área de Anatomia Veterinária, com o trabalho intitulado “Descrição Morfológica do Pâncreas da Paca *Cuniculus paca*” (Processo: 2014/08196-4). Foi bolsista pela mesma instituição de financiamento de outubro de 2015 a setembro de 2016, atuando na área de Patologia Clínica Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, com o trabalho intitulado “Análise bioquímica do soro sanguíneo de bubalinos neonatos” (Processo: 2015/15887-6). Foi membro do Projeto de Extensão GEPA - Grupo de Estudos de Pequenos Animais, nos anos de 2015 a 2016. Foi monitora voluntária da disciplina de Clínica Médica de Ruminantes, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marquez. Entre setembro de 2017 a junho de 2018, fez graduação sanduíche, pelo programa BRAFAGRI, Brasil França Agricultura, financiado pela CAPES, nas instituições de ensino École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) e Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Entre abril de 2019 e fevereiro de 2021 realizou o curso de MBA em Gestão de Projetos, pela Universidade de São Paulo (USP), câmpus de Piracicaba. Em março de 2019, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-

Graduação em Medicina veterinária (Reprodução animal) na FCAV/UNESP, sob orientação da Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira, com bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Foi estagiária docente na disciplina de Fisiologia da Reprodução de Fêmeas, de agosto a dezembro de 2019, ministrada pela Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, irmãos e ao meu noivo pelo amor e suporte em todos os momentos, conselhos, incentivos e por não me deixarem perder as esperanças nos momentos difíceis.

A todos os meus familiares, em especial aos meus tios Neusa Xavier de Castro Ramazzi e Lúcio Ramazzi, pelo amor, incentivo e suporte que me forneceram e fornecem em minha vida.

À Profa. Maricy por me acolher, me orientar e lembrar da importância de lutar pelos sonhos, mesmo diante dos diversos desafios que surgem ao longo da nossa caminhada.

Aos colaboradores que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo da minha vida.

Aos meus amigos Ana Calchi, Alessandra Carrer, Juliana Emídio, Luciana Leão, Louise Mialick, Bruna Nestlehner, Jordana Costa pela ajuda, conselhos, companhia e pelos momentos de alegria, os quais foram essenciais nessa jornada, em especial aos meus amigos Priscila Bertevello e Luiz Cordeiro pela orientação em relação a pesquisa, carreira profissional e vida, além do carinho, amor e inspiração.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela excelente formação.

À CAPES por tornar possível a realização desse sonho através do financiamento do meu mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88887.339227/2019-00.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	14
2.1 Geral	14
2.2 Específico	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
4. MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 Colheita e Processamento do Tecido Ovariano	22
4.2 Delenimento Experimental	23
4.3 Vitrificação e Aquecimento	23
4.4 Processo Histológico	24
4.5 Morfologia e Classificação dos Folículos	24
4.6 Imuno-histoquímica	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Análises Histológicas	26
5.2 Análises Imuno-histoquímicas	30
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	33
8.REFERÊNCIAS	34

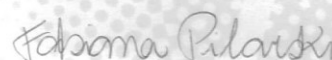
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Vitrificação de tecido ovariano de cervos brasileiros: avaliações histológicas e das taxas de apoptose tecidual**", protocolo nº 3750/21, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de dezembro de 2021.

Vigência do Projeto	20/12/2021 a 20/02/2022
Espécie / Linhagem	Cervo-do-pantanal / <i>Blastocerus dichotomus</i> Veado-mateiro / <i>Mazana americana</i> citótipo Juína Veado-catingueiro / <i>Mazana gouazoubira</i>
Nº de animais	01 de cada espécie
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Fêmeas
Origem	Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos - NUPECE

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2021.


Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CERVOS BRASILEIROS: AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E DAS TAXAS DE APOPTOSE TECIDUAL

RESUMO - Existem diversas espécies selvagens que estão ameaçados de extinção devido a caça, a perda do habitat natural ou variabilidade genética, nesse contexto, as biotecnologias da reprodução ganham importância na tentativa de preservação das espécies por meio da criopreservação de gametas ou tecidos gonadais, para uso futuro desses materiais em biotecnias como inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões xenotransplantes, entre outras. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar se o processo de vitrificação influencia ou não na resistência do tecido ovariano dos cervos brasileiros através de avaliações histológicas e de taxas de apoptose tecidual. Assim, foram analisados fragmentos de ovários (n=6) de cervídeos: o cervo-do-pantanal (n=2) (*Blastocerus dichotomus*); veado-catingueiro (n=2) (*Mazana gouazoubira*); e veado-mateiro (*Mazana americana* citótipo Juína), os quais permaneceram vitrificados por um período de quatro, três e um ano respectivamente. Através da coloração de HE foram encontrados diferentes graus de degenerações dos ovócitos no grupo fresco e vitrificado, como também folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Pela imuno-histoquímica foi possível identificar diferentes graus de marcação das proteínas ligadas a cascata de apoptose nas amostras frescas. Conclui-se que a vitrificação é uma técnica promissora na preservação de tecido ovariano de cervos brasileiros.

Palavras-chave: Criopreservação, Caspase-7, Caspase-3, Bax.

VITRIFICATION OF OVARIAN TISSUE OF BRAZILIAN DEER: HISTOLOGICAL AND TISSUE APOPTOSIS EVALUATIONS

ABSTRACT - There are several wild species that are threatened with extinction due to hunting, loss of natural habitat or genetic variability, in this context, reproductive biotechnologies gain importance in the attempt to preserve species through cryopreservation of gametes or gonadal tissues, for future use. of these materials in biotechnology such as artificial insemination, in vitro production of xenotransplant embryos, among others. Thus, the objective of the study was to evaluate whether the vitrification process influences or not the resistance of the ovarian tissue of Brazilian deer through histological evaluations and tissue apoptosis rates. Thus, fragments of ovaries (n=6) of deer were analyzed: the marsh deer (n=2) (*Blastocerus dichotomus*); brocket deer (n=2) (*Mazana gouazoubira*); and red deer (*Mazana americana* cytotype Juína), which remained vitrified for a period of four, three and one year, respectively. Through HE staining, different degrees of oocyte degeneration were found in the fresh and vitrified group, as well as follicles at different stages of development. By immunohistochemistry it was possible to identify different degrees of labeling of proteins linked to the apoptosis cascade in fresh samples. It is concluded that vitrification is a promising technique for the preservation of ovarian tissue in Brazilian deer.

keywords: Cryopreservation, Caspase-7, Caspase-3, Bax.

1. INTRODUÇÃO

Os Neotrópicos contêm uma enorme gama de biomas e consequentemente uma vasta biodiversidade, sendo considerada a mais rica do mundo em diversidade de cervos (Myers et al., 200), pois abrigam cerca de 30% do total dessas espécies, as quais são divididas em duas formas morfológicas, as espécies pequenas adaptadas para se desenvolverem em florestas fechadas, dos gêneros *Mazama* e *Pudu*, e as de médio a grande porte, caracterizadas pela presença de chifres ramificados e por habitarem áreas abertas, representadas pelos gêneros *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Odocoileus* e *Ozotoceros* (Duarte et al., 2008).

No entanto, a caça, a perda do habitat natural e variabilidade genética são ameaças a biodiversidade fazendo com que diversas espécies selvagens sejam ameaçadas ou extintas (Wildt et al., 2010), sendo que 50% dos cervídeos neotropicais estão classificados na IUCN Red List (2021) como em perigo de extinção.

Exemplo disso é o cervo-do-pantanal, *Blastocerus dichotomus*, que representa a maior espécie de cervídeo da América Latina, e apresenta risco elevado de extinção em um futuro próximo (IUCN 2021) devido ao declínio populacional (Duarte et al., 2001).

O veado-mateiro, *Mazama americana*, é um cervídeo de médio porte, classificado como dados insuficientes (IUCN 2021), em razão do desconhecimento da sua biologia, número e distribuição. Além disso, esse cervídeo apresenta alta complexidade do táxon, o que possibilita a existência de outras espécies no que hoje é considerada única; há evidências citogenéticas e filogenéticas (Jorge & Benirschke, 1977; Neitzel, 1987; Duarte & Jorge, 1996; Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010) que corroboram com essa teoria.

Mesmo espécies como o veado-catingueiro, *Mazama gouazoubira*, que apresentam uma flexibilidade ecológica e capacidade de adaptação em áreas antropofizadas, estão listadas na IUCN Red List (2021).

Segundo a IUCN (2021) mais de 38.500 espécies estão ameaçadas de extinção, o que representa 28% do total de espécies avaliadas. Mesmo as

iniciativas de leis que visam a ampliação de áreas protegidas não são suficientes para conservar todos os habitats e espécies de interesse, ratificando a necessidade de alternativas de preservação.

Diante desse cenário, a formação de bancos de germoplasma tornou-se uma valiosa opção para a preservação de material genético viável, capaz de se desenvolver após a descongelação (Mazur, 1980).

Assim, vale ressaltar que a reprodução humana e animal vem sendo estudada há anos com o objetivo de entender as alterações fisiológicas, hormonais, celulares e moleculares causadas pela senescência (Comizzoli et al., 2012), a qual é uma das responsáveis pela perda da fertilidade (Wu et al., 2010).

Tal fato impulsionou diversas pesquisas relacionadas a vitrificação de tecidos ovarianos, a qual se tornou uma das técnicas consagradas de preservação de material genético e fertilidade, e que possibilita futuras estratégias de reprodução assistida (Comizzoli et al., 2021).

No entanto, a criopreservação de tal estrutura é algo complexo devido à presença de diferentes tipos celulares, os quais apresentam uma sensibilidade e resposta variada ao processo induzido pelo frio, que pode ocasionar danos celulares (Gorricho et al., 2018) identificados histologicamente pela presença de sinais de apoptose celular, como lise estromal e celular, picnose, cariólise, vacuolização citoplasma e atrofia do tecido (Reed et al., 2000; Taatjes et al., 2018).

Tais danos também podem ser observados precocemente, antes mesmo do aparecimento de alterações visuais (Fabbri et al., 2003; Gorricho et al., 2018) pela presença de proteínas da via de apoptose, como as caspases (Boatright et al., 2003), Bax (Schuler et al., 2003) e Bcl-2 (Borner et al., 2003) através de técnicas como a imuno-histoquímica, o que demonstra a importância da utilização de diferentes técnicas na avaliação da integridade celular (Gorricho et al., 2018).

Existem diversos estudos que avaliam as alterações causadas nos tecidos pós vitrificação em diferentes espécies como: felinos domésticos (Gorricho et al., 2018), equino (Haag et al., 2013), caprino (Carvalho et al., 2013), cervídeos

(Gastal et al., 2018), entre outras, devido a sua importância e benefícios futuros proporcionados por ela.

No contexto da preservação de animais selvagens, a combinação entre a criopreservação e a aplicação de outras biotécnicas, surge como uma estratégia potencial para auxiliar na redução e na formação de bancos de germoplasma de espécies em risco de extinção (Bosch et al., 2004), a exemplo do já reportado em felídeos e canídeos (Carrijo, 2009).

Diante da importância da conservação da biodiversidade de espécies neotrópicas, dentre elas os cervídeos, em que 50% da espécie está classificada em algum grau de risco de ameaça de extinção pela IUCN Red List (2021), far-se-á necessário a utilização de estratégias de conservação, como a formação de bancos de germoplasma, visando a utilização desses materiais futuramente em biotecnologias reprodutivas.

Assim, o conhecimento dos possíveis danos ou não causados pela criopreservação nos tecidos germinativos, pelo exame histológico e imunohistoquímico, são essenciais para a avaliação do potencial desta técnica na preservação de espécies selvagens ameaçadas de extinção.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do processo de vitrificação sobre o tecido ovariano de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado-mateiro (*Mazama americana*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*).

2.2 Específico

- Identificar a presença de alterações morfológicas ligadas a dano celular, através da avaliação histológica das amostras antes e após o processo de criopreservação.

- Identificar a presença das proteínas Bax, Caspase – 3 e 7 ligadas a cascata de apoptose, por meio da técnica de imuno-histoquímica nas amostras frescas dos cervos brasileiros.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Mundialmente, a biodiversidade tem sido um tema de extrema importância a ser discutido, tanto pela sociedade quanto para os governos que visam, através de acordos internacionais, a sua conservação. A perda da biodiversidade faz com que diversas espécies sejam ameaçadas ou extintas. Diante desta problemática, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) desenvolve um trabalho de identificação do estado de conservação de algumas espécies.

Em 1964, foi disponibilizada a chamada Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (“IUCN Red List”), a qual contém informações do estado de conservação de espécies de plantas, animais, fungos e protozoários do mundo. Através de dados científicos essas espécies são classificadas como: não avaliada (NE), dados insuficientes (DD), menos preocupante (LC), quase ameaçados (NT), vulnerável (VU), em perigo (EN), em perigo crítico (CR), extinta da natureza (EW) e extinto (EX), ou seja, seguindo um grau do menor ao maior nível de preocupação.

A família Cervidae é formada por animais ungulados, artiodáctilos e ruminantes, a qual apresenta cerca de 55 espécies no mundo. Destas, aproximadamente 17 habitam o Neotrópico, dividindo-se em duas formas morfológicas, as espécies pequenas, adaptadas para se desenvolverem em florestas fechadas, dos gêneros *Mazama* e *Pudu*, e as de médio a grande porte, caracterizadas pela presença de chifres ramificados e por habitarem áreas abertas, representadas pelos gêneros *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Odocoileus* e *Ozotoceros* (Duarte et al., 2008).

Mais de 50% dos cervídeos neotropicais estão classificadas na IUCN Red List (2021) como EN. No Brasil existem pelo menos oito espécies desta família, sendo elas: *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama americana*

(veado-mateiro), *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro), *Mazama nana* (veado-bororó), *Mazama rondoni* (veado-roxo) e *Mazama bororo* (bororó-do-sul) (DUARTE, 1996).

O veado-catingueiro, *Mazama gouazoubira*, é uma espécie de pequeno porte, com ampla distribuição geográfica no território brasileiro, seu status de conservação é considerado como LC (categoria de risco mais baixo), devido à sua flexibilidade ecológica e capacidade de adaptação em áreas antropofizadas.

No entanto, tal status sofre alteração quando analisados em alguns Estados. No Paraná é considerada DD, no Rio Grande do Sul é VU e no Rio de Janeiro, EN (Bergallo et al., 2000; Fontana et al., 2003; Mikich & Bérnills, 2004).

O vedado-mateiro, *Mazama americana*, é um cervídeo de médio porte, poliétrico não sazonal com ampla distribuição geográfica na América Latina, podendo ser encontrado do sul do México, em toda a América Central, até o norte da América do Sul (Emmons & Feer 1997, Varela et al. 2010). No Brasil está presente desde o rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (Duarte et al., 2012).

Tal espécie é classificada como DD (IUCN 2021), em razão do desconhecimento da sua biologia, número e distribuição. Além disso, esse cervídeo apresenta alta complexidade do táxon o que possibilita a existência de outras espécies no que hoje é considerada única; há evidências citogenéticas e filogenéticas (Jorge & Benirschke, 1977; Neitzel, 1987; Duarte & Jorge, 1996; Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010) que corroboram com essa teoria.

Abril e colaboradores (2010) propuseram a classificação desta espécie a partir de uma árvore filogenética, baseando-se na biologia molecular e citogenética. Dessa forma, foram descritas duas linhagens de cariótipos que divergem em um ancestral comum: uma caracterizada pelo baixo número de diplóides, classificadas como citótipo Juína e Rondônia, e a outra com elevado número de diplóides, representada pelos citótipos Paraná, Santarém, Jari e Carajas.

O *Blastocerus dichotomus*, cervo-do-pantanal, é a maior espécie de cervídeo da América Latina, chegando a pesar 130 Kg. Habitam regiões de várzeas das planícies de inundação dos grandes rios e originalmente eram

encontrados em algumas regiões do Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e em grande extensão no Brasil (Azara, 1902; Ribeiro, 1919; Cabrera, 1961; Nogueira-Neto, 1973; Jungius, 1976; Hofmann et al., 1976).

Esta espécie de cervídeo está categorizada como VU, ou seja, apresenta um risco elevado de extinção na natureza em um futuro próximo (IUCN 2021), devido ao declínio populacional que varia entre 30 a 50%, dependendo do estado. No Paraná, por exemplo, as construções das hidrelétricas causaram extinção da espécie, já o Pantanal possui mais de 80% do total da população dessa espécie (Duarte et al., 2001) provavelmente pelas características climáticas do local e menos ações predatórias.

Segundo a IUCN (2021) mais de 38.500 espécies estão ameaçadas de extinção, o que representa 28% do total de espécies avaliadas. Mesmo as iniciativas de leis que visam a ampliação de áreas protegidas não são suficientes para conservar todos os habitats e espécies de interesse, ratificando a necessidade de alternativas de preservação.

Atualmente, com os avanços das biotecnologias, a preservação *in vitro* de células germinativas surge como opção de conservação de espécies tanto animal como vegetal, através da criação de bancos de germoplasma, os quais tem como objetivo o resgate de populações extintas ou com importância biológica a ser preservada (Hiemstra et al., 2005), além de espécies em risco de extinção (Ramos et al., 2011).

Os bancos de germoplasma nada mais são do que células somáticas ou gametas armazenados em botijão criogênico contendo nitrogênio líquido a -196°C (Domingues et al., 2011). A baixa temperatura leva a uma redução significativa do metabolismo do material biológico a ponto de mantê-lo viável, a fim de continuar o seu desenvolvimento após a descongelação (MAZUR, 1980).

Esta alternativa se torna ainda mais valiosa por possibilitar a aplicação das técnicas reprodutivas, como a criopreservação de gametas e tecidos gonadais tanto masculino como feminino, produção *in vitro* de embriões, transferência de embriões, inseminação artificial (Galli et al., 2003).

Estas técnicas são amplamente utilizadas em animais de alto valor zootécnico, através dos programas de melhoramento genético. O interesse econômico nas espécies de produção fez com que aumentasse o número de estudos na área de criobiologia, resultando em alguns avanços em relação a metodologia, e possibilitando a extrapolação de protocolos para a conservação de germoplasma de diferentes espécies animais.

No entanto, a criopreservação deve ser realizada de forma criteriosa de modo a garantir que o material recuperado exerça a mesma função pós-descongelamento (Silvestre et al., 2004), pois a capacidade de sobrevivência do material biológico depende de algumas variáveis, tais como a sua tolerância aos crioprotetores, o processo de desidratação, a velocidade de redução da temperatura e ao método, seja ele congelamento lento ou vitrificação (Santos et al., 2010a).

Na congelamento lento as células são submetidas a um resfriamento e, em seguida, a uma queda gradual e controlada de temperatura até serem congeladas, utilizando baixas concentrações de crioprotetores (Del Valle, 2008).

Na vitrificação a congelamento é ultrarrápida, havendo uma passagem direta do meio em estado líquido para amorfo. Para tanto, são necessárias soluções de crioprotetores mais concentradas e viscosas (Gonçalves et al., 2008), sendo que ambas as técnicas podem ser utilizadas na preservação tanto de gametas como de células somáticas.

Dentro das opções de material biológico a ser criopreservado, os tecidos gonadais ganham destaque pela preservação de folículos primordiais, os quais são mais resistentes que os oócitos aos efeitos dos crioprotetores (Hovatta, 2005), sendo capazes de se desenvolverem até os estágios mais avançados. Ademais, possibilitam manter as funções do tecido (Carrijo, 2009), que retornam facilmente a sua atividade após xeno ou alotransplante (Donnez et al., 2006), podendo se manter ativos por períodos superiores a 6 meses (Gosden et al., 1994; Oktay et al., 1998).

No contexto da preservação de animais selvagens, a combinação entre a criopreservação e a aplicação de outras biotécnicas, como o xenotransplante, é

uma abordagem potencial para reduzir as espécies em risco de extinção (Bosch et al., 2004), a exemplo do já reportado em felídeos e canídeos (Carrijo, 2009).

O desenvolvimento folicular após a realização do xenotransplante já foi relatado em ovinos, felinos (Gosden et al., 1994), humanos (Oktay et al., 1998), elefantes (Gunasena et al., 1998), marsupiais (Mattiske et al. 2002) e cães (Neto et al., 2012).

No entanto, a criopreservação de tecido ovariano enfrenta algumas limitações em relação à técnica, devido à dificuldade dos crioprotetores em penetrarem o tecido, podendo causar isquemia ou problemas de revascularização tecidual levando à apoptose celular (Newton et al., 1996). Isto ocorre pela diversidade de tipos celulares presentes na amostra, os quais apresentam temperaturas distintas de congelamento (Castro et al., 2011).

A criopreservação de tecido ovarino de diferentes espécies selvagens ameaçadas de extinção é complexa devido a estrutura do tecido e a heterogeneidade celular, dessa forma, o conhecimento dos efeitos da criopreservação na proliferação e apoptose das células gonadais é essencial para o desenvolvimento folicular e produção de gametas viáveis após a cultura *in vitro* ou o transplante do tecido ovariano (Gastal et al., 2018).

Nos tecidos, a apoptose pode ser identificada pelo exame histológico e análise da morfologia, caracterizando-se pela presença de lise estromal e celular, picnose, cariólise, vacuolização citoplasmática e atrofia celular (Hussein, 2005).

Luvoni e colaboradores (2012) relataram que a integridade morfológica do tecido ovariano felino foi preservada após a vitrificação, independentemente do tipo folicular. Nesta mesma espécie, o tecido ovariano foi criopreservado, descongelado, submetido à técnica de xenotransplante e, após mais de 60 dias, foi avaliado por histologia, na qual se constatou a presença de folículos capazes de se desenvolverem até estágios avançados e também evidências de necrose e fibrose (Bosch et al., 2004).

Fragmentos de tecido ovariano de ovinos foram avaliados histologicamente, após o processo de criopreservação, e notou-se manutenção

da integridade morfológica e celular (Bandeira et al., 2015) comprovando a eficácia da técnica na preservação da viabilidade do tecido.

Em caprinos foi observado uma queda nas taxas de folículos pré-antrais morfológicamente normais após a vitrificação (Carvalho et al., 2013). Assim como em bovinos, houve uma queda na porcentagem de folículos primordiais e primários morfológicamente normais logo após o aquecimento dos fragmentos, contudo, essas amostras descongeladas foram submetidas a cultura *in vitro*, e após 4 horas foi observado uma recuperação folicular dos danos causados pelo processo de preservação, indicando que um curto período de cultura pós-descongelamento pode aumentar a recuperação de folículos (Paynter et al., 1999).

No entanto, as alterações morfológicas que caracterizam o processo de apoptose nos tecidos são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos (Saraste et al., 2000), os quais podem ser observados através de técnicas de imuno-histoquímica, antes mesmo do aparecimento das alterações estruturais, permitindo uma identificação precoce e precisa do processo de morte celular.

Alguns dos sinalizadores desta cascata de eventos são as caspases, as quais são divididas em caspases iniciadoras (8 e 9) e efetoras (3, 6 e 7) (Hussein, 2005). Estas proteases agem através da clivagem dos substratos de aspartato (Nicholson et al., 1997) levando à condensação e fragmentação nuclear, como também a externalização de fosfolípidios de membrana que irão comunicar para a célula ser fagocitada por macrófagos (Nicholson et al., 1997, Boatright et al., 2003).

Além dessa protease, existe também a Bcl-2, enzima anti-apoptótica, que participa ativamente da regulação da apoptose, inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio, a acidificação celular e estabilização do potencial de membrana mitocondrial (Schuler et al., 2003), mantendo uma homeostase entre as enzimas anti-apoptóticas e pró- apoptóticas como a Bax, proteína mais estudada desta família (Hussein et al., 2003) e que juntamente com as Bcl-2, formam homodímeros e heterodímeros, definindo assim o balanço apoptótico.

Entretanto, a ação das caspases na membrana mitocondrial leva a um desequilíbrio, fazendo com que as Bcl-2 não sejam capazes de impedir o desencadeamento da cascata da apoptose, seja pela competição por sítios na membrana externa da mitocôndria, ou pelo sequestro das próprias Bax (Petros et al., 2004).

Em humanos, a imuno-histoquímica revelou coloração positiva para a proteína Bcl-2 nas células da granulosa, tanto nas amostras frescas como nas criopreservadas, mesmo que a avaliação morfológica tenha demonstrado uma boa integridade estromal e folicular (Fabbri et al., 2003).

Assim como em felinos, foi observado que folículos classificados como morfológicamente normais foram positivos para caspase-3, indicando a importância da utilização de diferentes técnicas na avaliação da integridade celular (Gorricho et al., 2018).

Em veado-de-cauda-branca a criopreservação do tecido ovariano através da vitrificação ou congelação lenta demonstrou que não houve interrupção dos marcadores de apoptose, como a Bax e a Bcl-2, visto que os fragmentos submetidos a criopreservação lenta apresentaram menor viabilidade durante a cultura *in vitro*, sofrendo apoptose mais cedo do que os vitrificados. (Gastal et al., 2018).

Diversos estudos em diferentes espécies demonstram que a vitrificação do tecido ovariano não causou aumento dos danos ao DNA (Fabbri et al., 2003; Faustino et al., 2015), mesmo em tecido criopreservação há quase 20 anos (Fabbri et al., 2016).

Dos métodos de criopreservação a vitrificação apresenta algumas vantagens em relação ao congelamento lento: menor tempo, custo e praticidade na execução da técnica, já que no congelamento lento é necessário um oneroso freezer programável, o que dificulta a sua aplicação a campo (Santos et al., 2010b), sendo essa última um dos maiores diferenciais para a preservação de germoplasma, principalmente de espécies selvagens que vieram a óbito inesperadamente ou em outras situações a campo em que há a oportunidade de colher material biológico para a formação de banco de germoplasma.

Portanto, os estudos da criopreservação de tecidos gonadais de espécies selvagens ameaçadas de extinção, como os cervídeos, é de suma importância para o conhecimento da viabilidade e dos danos causados pela técnica, através de análises morfológicas aliadas a imuno-histoquímica, a fim de identificar alterações iniciais que sinalizam o desencadeamento da cascata de apoptoses, permitindo assim, o aprimoramento da técnica para posterior formação bem-sucedida de bancos de germoplasma.

4. MATERIAL E MÉTODO

Todos os produtos químicos utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), salvo quando citado outra empresa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (n° 3750/21).

4.1 Colheita e Processamento do Tecido Ovariano

Foram colhidos os ovários (n=6) de três diferentes espécies de cervídeos, após o procedimento de necrópsia dos animais, do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Os animais foram eutanasiados por razões médicas, sendo que nenhum foi eutanasiado para o propósito deste estudo. Os ovários foram transportados até o laboratório imersos em solução de PBS-PVA suplementada com antibiótico (100I U/mL de penicilina sódica e 0,1mg/mL de sulfato de estreptomicina) e antimicótico (0,25 µg/mL de anfotericina B) e refrigerada a 4°C dentro de 1 a 4 horas.

No laboratório os ovários foram transferidos para placa de Petri, onde foram lavados em solução de PBS-PVA e seccionados ao meio, a fim de separar o córtex da medula, com o auxílio de um bisturi. O córtex ovarino foi seccionado em fragmentos (3mm³) e divididos aleatoriamente entre grupo controle (fresco) e grupo vitrificado.

4.2 Deleniamiento Experimental

O experimento foi desenvolvido em três replicatas, contendo o grupo controle – amostras frescas (G01, G02, G03) e o vitrificado (GV1, GV2, GV3) com o objetivo de avaliar os efeitos da vitrificação sobre a integridade do tecido ovariano. Para isso, foram utilizadas as seguintes espécies de animais:

- Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de 16 anos de idade e criopreservado por quatro anos;
G01: amostra controle (fresca);
GV1: amostra vitrificada.
- Veado-catingueiro (*Mazana gouazoubira*) de quatro anos de idade e criopreservado por três anos;
G02: amostra controle (fresca);
GV2: amostra vitrificada.
- Veado-mateiro (*Mazana americana* citótipo Juína) (Abril, 2010) de quatro anos de idade e criopreservado por um ano
G03: amostra controle (fresca);
GV3: amostra vitrificada.

Os fragmentos do grupo controle foram fixados em solução de formol salina à 10%, por 24 horas, e mantido em álcool 70%, enquanto os demais fragmentos foram vitrificados e mantidos em botijão criogênico até avaliação. Ambos os grupos foram avaliados por histologia e imuno-histoquímica.

4.3 Vitrificação e Aquecimento

O protocolo de vitrificação realizada foi baseado no estudo desenvolvido por Ishijima et al. (2006) com modificações. Os fragmentos foram imersos em gotas de 200 µl de tampão salina de fosfato de Dulbecco modificado (mDPBS)

com 1M de DMSO à temperatura ambiente por 60 seg, e depois foram transferidas para criotubos contendo 10 µL de mDPBS-DMSO, os quais foram mantidos por 5 min no gelo. Ato contínuo, foi adicionado no criotubo solução de DAP 123 (1M de acetaminada, 2M DMSO e 3 M propilenoglicol), sendo mantidos a 0°C por mais 5 min. Por fim, foram mergulhados em nitrogênio líquido e mantidos em botijão criogênico até avaliação.

No processo de aquecimento dos fragmentos criopreservados, os criotubos foram mantidos em temperatura ambiente por 60 seg, e então foi adicionado mDPBS contendo 0,25 M de sacarose a 37°C. Os fragmentos foram então transferidos para placas de Petri onde foram lavados repetidas vezes em solução mDPBS e por fim em HTF-BSA, por 3 min.

4.4 Processo Histológico

Os fragmentos foram fixados em solução de formalina tamponada à 10%, por 24 horas e então foram submetidos ao processo de desidratação por diferentes gradientes de álcool (70%, 80%, 95%, 100%), seguida pela clarificação com xilol e inclusão em parafina, os blocos de parafina foram cortados em secções de 7 µm, para a imuno-histoquímica e para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

4.5 Morfologia e Classificação dos Folículos

As amostras de tecido ovariano foram analisadas e classificadas morfológicamente (Gorricho et al., 2018) como folículos primordiais, em que os oócitos estão rodeados por uma camada de células granulosas achatadas; folículo primário, ou seja, os oócitos estão circundados por uma camada de células granulosas cuboidais; folículos secundários, os oócitos rodeados por duas ou mais camadas de células da granulosa em formato cuboidais; e folículos terciários, quando há a presença de um antro com folículo multilaminar.

Com base nas alterações morfológicas, as amostras foram classificadas conforme consta na tabela 1.

Tabela 1. Escore morfológico utilizado para a classificação das amostras de tecido ovariano de cervídeos brasileiros.

Escore	Descrição	Característica histológica
0	Sem alterações	Folículos intactos
1	Degeneração discreta	Folículos apresentando destacamento das células da membrana basal
	Degeneração moderada	Folículos com ligeiro descolamento das células da membrana basal, com até 30% de oócitos degenerados
2	Degeneração acentuada	Folículos apresentando mais de 30% de oócitos degenerados.

4.6 Imuno-histoquímica

Através da imunocoloração o grupo controle foi avaliado para a identificação das proteínas caspase-3, caspase-7 e Bax. Para isso, os cortes histológicos previamente preparados foram desparafinados em xilol e hidratados em banhos decrescentes de etanol (100, 95, 80, 70%).

A recuperação dos antígenos específicos foi através do tampão citrato (pH 6,0) em panela de vapor (Pascal®, Dako, EUA) por 30 min. Após esse processo, as amostras foram resfriadas em banho-maria e lavadas com água desionizada, e então bloqueadas para a peroxidase exógena (Envision™ Flex Peroxidase-Blocking reagent, Dako, Carpinteria, CA, EUA), e em seguida do bloqueio de proteínas (ScyTek Laboratories, Logan, UT, EUA) a 27°C por 30 min.

As lâminas foram permeabilizadas em 1% Triton™ X-100, por 30 min à temperatura ambiente, as proteínas não específicas foram bloqueadas em solução de BSA a 1%, por 60 min em temperatura ambiente, e incubadas com

100 µL da solução de anticorpo monoclonal anti-Bax (1mg/mL anticorpo monoclonal de rato, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anticorpo primário anti-caspase-3 clivado (1: 300, anticorpo monoclonal, feito em coelho, Cell signaling, Massachusetts, EUA), e anti-caspase-7 (1:300, anti-humano, feito em coelho, Sigma-Aldrich, EUA), por 60 min à temperatura ambiente.

Na etapa seguinte, as amostras foram lavadas com solução tampão Tris (pH 7,4), e com o anticorpo secundário (Envision, Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi aplicado como anticorpo secundário e incubado novamente a 27°C por 1 h em uma câmara escura. As lâminas foram então lavadas novamente com solução tampão Tris e a reação ocorreu com substrato cromógeno de diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 5 min.

A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1 min. O controle positivo foi realizado com um linfonodo equino normal e o controle negativo com um ensaio de bloqueio de peptídeo, usando um Cleaved Caspase-3 Blocking Peptide (Asp175, Cell signaling, Massachusetts, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (Leica DM 2500) com objetiva de 20x e 40x. A extensão da caspase-3 a reação nas amostras foi semiquantificada usando uma versão modificada do que foi descrito por Walker (2006). As amostras foram classificadas como: 0 = negativo, 1 = <10% de células coradas, 2 = 10-50% de células coradas ou 3 => 50% células coradas

5. RESULTADOS

5.1 Análises Histológicas

As amostras frescas e vitrificadas dos cervos brasileiros foram analisadas morfológicamente a partir das diferentes fases foliculares, ou seja, folículos primordiais, em que os oócitos estão rodeados por uma camada de células granulosas achatadas, folículo primário em que os oócitos estão circundados por uma camada de células granulosas cuboidais; e folículos maduros pela presença

de líquido folicular indicando antro e classificadas de acordo com as alterações (Tabela 2).

Ao analisar os resultados encontrados nas amostras frescas o cervo-do-pantanal apresentou maior proporção de estruturas foliculares com alto grau de degeneração.

No veado-catingueiro foram identificados somente folículos primordiais destacados da membrana basal com até 30% dos oócitos em degeneração nas amostras frescas, e no veado-mateiro foi identificada folículo primário sem alteração e degeneração moderada em folículos primários, como também degeneração acentuada e moderada nos folículos primordiais avaliados.

O cervo-do-pantanal foi o único modelo experimental em que não foi detectado folículos nos fragmentos ovarianos após o processo de vitrificação, já nas amostras frescas foram observados folículos primordiais, primários e maduros (Tabela 2).

No veado-catingueiro foram observados a presença de folículos primordiais e primários com degeneração acentuada e folículos maduros destacados da membrana basal e com degeneração moderada após a vitrificação.

Tabela 2. Classificação morfológica das estruturas analisadas nos cortes histológicos, em que 0 - folículos intactos; 1 - folículos apresentando destacamento das células da membrana basal (degeneração discreta); 2- folículos com ligeiro descolamento das células da membrana basal com até 30% de oócitos degeneração (degeneração moderada); e 3 – folículos apresentando mais de 30% oócitos em degeneração acentuada.

Amostra	Animal	Fol.Primordial	Fol.primário	Fol. maduro
Fresco	Cervo-do-pantanal	-	-	-
Fresco	Cervo-do-pantanal	3	-	-
Fresco	Cervo-do-pantanal	3	-	-
Fresco	Cervo-do-pantanal	0	3	3
Fresco	Cervo-do-pantanal	3	-	-
Fresco	Cervo-do-pantanal	3	-	-
Vitrificado	Cervo-do-pantanal	-	-	-
Vitrificado	Cervo-do-pantanal	-	-	-
Fresco	Veado-catingueiro	1	-	-
Fresco	Veado-catingueiro	-	-	-
Vitrificado	Veado-catingueiro	-	3	2
Vitrificado	Veado-catingueiro	3	-	-
Vitrificado	Veado-catingueiro	3	3	1
Vitrificado	Veado-catingueiro	3	3	1
Fresco	Veado-mateiro	-	-	-
Fresco	Veado-mateiro	-	-	-
Fresco	Veado-mateiro	3	2	3
Fresco	Veado-mateiro	3	2	2
Vitrificado	Veado-mateiro	2	0	2
Vitrificado	Veado-mateiro	2	2	3

Nas amostras vitrificadas de veado-mateiro foram observados a presença de folículos primordiais e maduros com degeneração acentuada, e folículos primários e maduros com degeneração moderada, assim como nas amostras frescas. No entanto, foi observado a presença de folículo primários sem alteração.

Através da coloração de HE foi possível identificar o estroma ovariano com acentuada quantidade de fibrose e ausência de folículos em uma amostra fresca do cervo-do-pantanal (Fig.1.A), como também folículo primário com destacamento de membrana basal e apoptose do ovócito (Fig.1.C); folículo maduro com poucas alterações morfológicas em amostras vitrificadas de veado-mateiro (Fig.1.B); e folículos primordiais em apoptose (Fig.1.D).

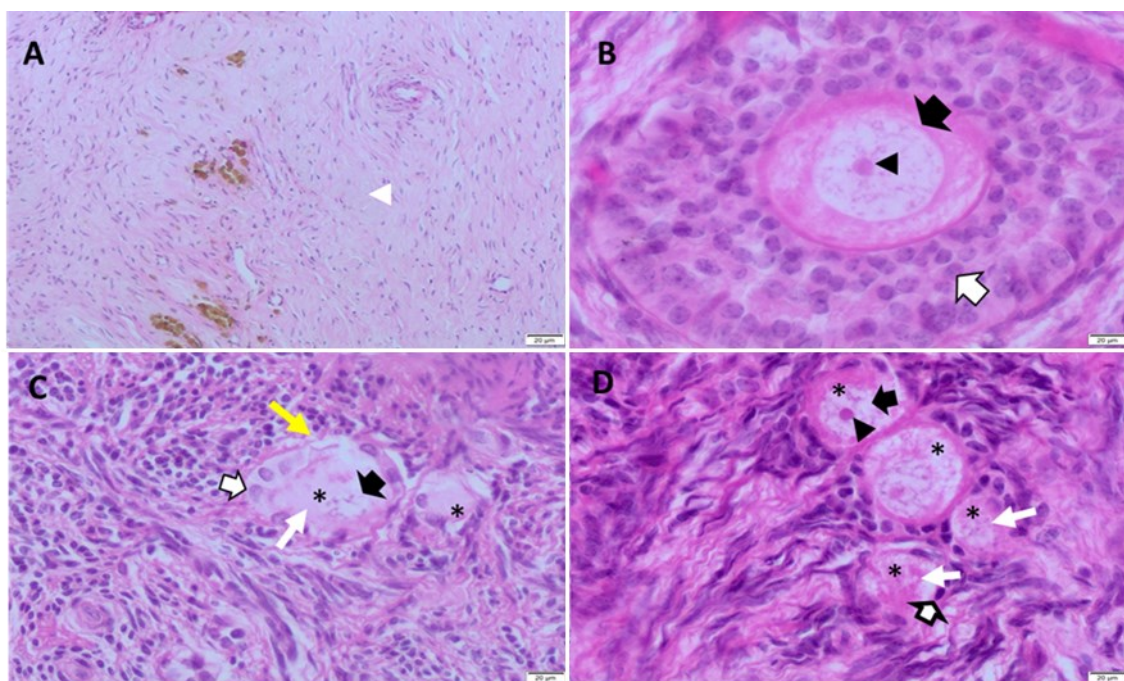


Fig. 1. Fotomicrografia de tecido ovariano, HE, aumento de 400x (20 μ m) de cervos brasileiros frescos (A, C, D) e criopreservado (B). A: parênquima ovariano de cervo-do-pantanal com acentuada quantidade de fibrose (cabeça de seta branca); B: folículo terciário em desenvolvimento com poucas alterações morfológicas de veado-mateiro, nucléolo (cabeça de seta preta), núcleo (seta preta) e células foliculares esféricas (seta branca contorno preto) C: folículo primário (*) de veado-catingueiro com destacamento de membrana basal (seta amarela) e apoptose de ovócito (seta branca), células foliculares (seta branca contorno preto), núcleo (seta preta) D: folículos primordiais (*) em apoptose.

5.2 Análises Imuno-histoquímicas

Através da imunocoloração das amostras frescas, dos cervos brasileiros, foram observadas diferentes porcentagens de marcação citoplasmática ou nuclear das proteínas de interesse pesquisadas no presente estudo (Tabela 3).

Tabela 3 Porcentagem da marcação das proteínas Bax, caspase-3 e 7 das amostras frescas dos cervos brasileiros.

Espécie	Bax	Caspase-3	Caspase-7
Cervo-do-pantanal	35%	1% citoplasmática	15%
Veado-catingueiro	50%	1% nuclear	15%
Veado-mateiro	100%	5% citoplasmática	15%
Marcação	Citoplasmática	Nuclear e Citoplasmática	Citoplasmática

Nas amostras de cervo-do-pantanal foi identificado uma marcação citoplasmática de 30% de Bax, no estroma do córtex ovariano, de 1% de caspase-3 e de 15% de caspase-7, sendo possível também observar a presença de um folículo em transição de primordial para primário devido a presença de células da granulosa fusiformes e cubóides (Fig. 2, G01).

No veado-catingueiro foi observado uma marcação citoplasmática de 15% de Bax, 1% de nuclear de Caspase-3 e 15% de citoplasmática de caspase-7 (Fig. 2, G02).

No veado mateiro foi identificado uma marcação citoplasmática de 100% de Bax, 5% de caspase-3 e 15% de caspase-7 (Fig. 2, G03).

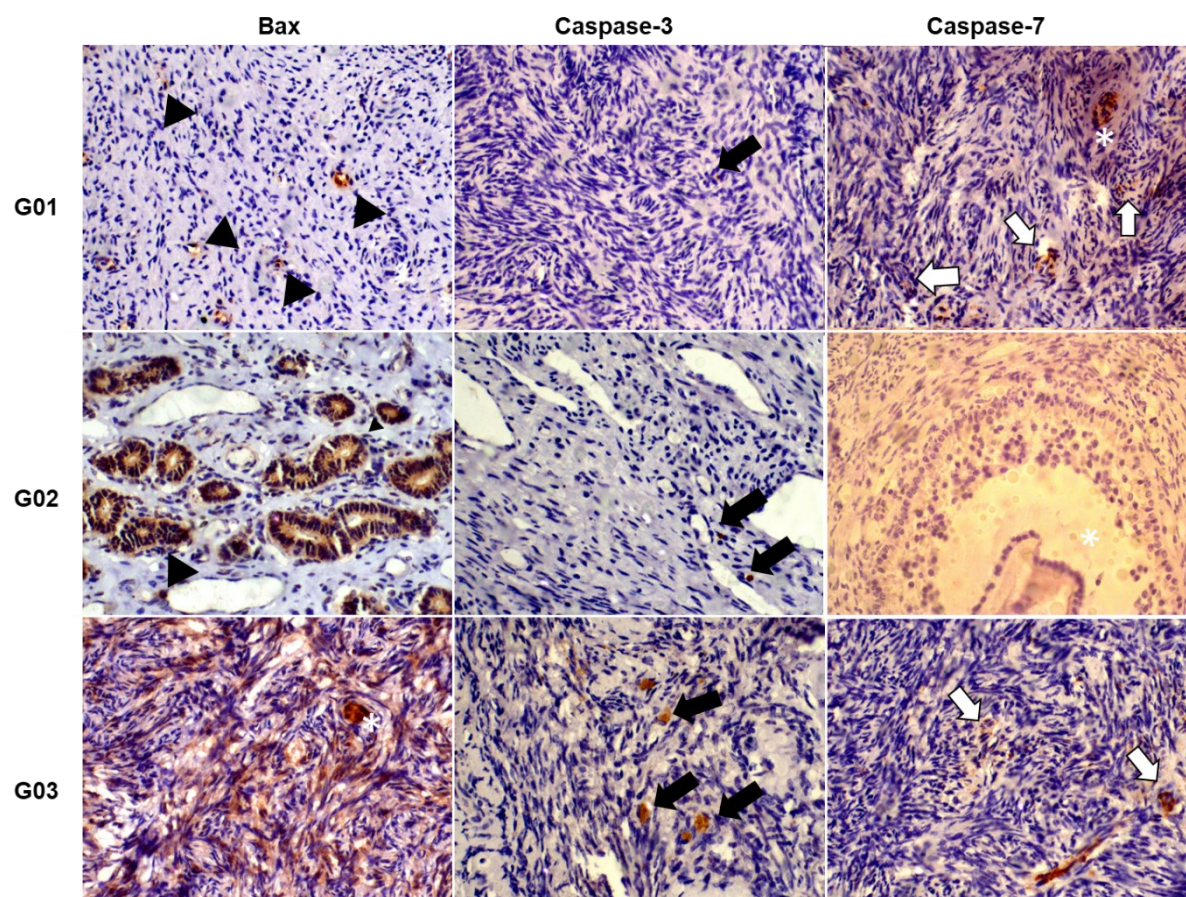


Fig. 2. Fotomicrografia de imuno-histoquímica de amostras frescas de cervos brasileiros, em que G01: cervo-do pantanal, G02: veado-catingueiro; G03: veado-mateiro, cabeça de seta indicando a imunomarcação de Bax; caspase-3 indicada pela seta preta e seta preta contorno branco caspase-7, e (*) indicando a presença de folículos.

6. DISCUSSÃO

A criopreservação de tecidos gonadais, para a utilização futura nas diferentes biotécnicas reprodutivas, surge como uma alternativa na preservação de animais selvagens, entretanto, há ainda um número reduzido pesquisas que envolvam a criopreservação de tecido ovarino nessas espécies, sendo este o segundo estudos de vitrificação de tecido ovariano em cervídeo, e o primeiro em cervo-do-pantanal, veado-mateiro e veado-catingueiro.

Os principais achados morfológicos das amostras frescas do cervo-do-pantanal foram alto grau de degeneração das estruturas foliculares, principalmente dos folículos primordiais; o que pode estar relacionado à idade avançada do animal de 16 anos e 9 meses, por ser um dos fatores associados a

redução do número de folículos ovarianos (Peixoto et al., 2006), mesmo porque são animais que atingem a maturidade sexual em torno dos 14 meses (Duarte et al., 2014).

A ausência de folículos nos fragmentos ovarianos do cervo-do-pantanal após o processo de vitrificação; pode estar relacionado a distribuição aleatória aplicada na análise dos campos histológicos, já que as amostras frescas apresentavam folículos primordiais.

O veado-catingueiro as estruturas foliculares das amostras vitrificadas apresentaram diferentes graus de degeneração, assim como também no veado-mateiro podem estar associadas a criotolerância dos diferentes tipos celulares (Santos et al., 2010; Castro et al., 2011).

As degenerações das amostras vitrificadas de veado-mateiro foram as mesmas encontradas nas frescas, no entanto, foi observado a presença de folículo primários sem alteração, portanto, pode-se concluir que o processo de criopreservação foi capaz de manter a viabilidade morfológica do tecido ovariano nessa espécie.

Sabe-se que as análises histológicas possuem certa limitação na identificação de pequenas alterações que possam comprometer a viabilidade do tecido ovariano, em vista disso, a utilização da imuno-histoquímica como uma técnica de detecção da apoptose, antes mesmo das alterações morfológicas é fundamental para a identificação da viabilidade do tecido tanto antes como após criopreservação (Gorricho et al., 2018).

Sendo assim, foi realizada a imunocoloração das amostras frescas dos cervos brasileiros, as quais demonstraram marcação citoplasmática de Bax, de 35% em cervo-do-pantanal, 50% em veado-catingueiro e 100% da amostra de veado-mateiro; caspase-7 em 15% da amostra de todas as espécies analisadas e caspase-3 em 1% no citoplasma de cervo-do-pantanal e 5% no veado-mateiro, já no veado-catingueiro foi observado 1% de marcação dessa última proteína no nuclear (Fig. 04, Fig. 05).

O sucesso na manutenção da integridade estrutural do tecido após o método de congelação (Jewgnow et al., 1998; Carvalho et al., 2013; Bandeira et

al., 2015), bem como a possibilidade da obtenção de oócitos maduros após o cultivo de folículos pré-antrais de tecido ovariano criopreservado tem sido destacados na literatura (Amorin et al., 2016), tais dados demonstram que a congelação de tecido ovariano é uma alternativa para a formação de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção, por isso, estudos que envolvam análises da viabilidade tecidual antes e após a criopreservação dessas espécies e das demais são de extrema importância para o conhecimento dos efeitos e avanço dos estudos relacionados a criopreservação.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a vitrificação de tecidos ovariano de cervos brasileiros demonstrou ser uma técnica promissora na preservação de tecido ovariano de cervos brasileiros.

8.REFERÊNCIAS

Abril VV, Carnelossi EAG, Gonzalez S, Duarte JMB. (2010) Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenet Genome Res** 128:177–187.

Amorim CA, Shikanov A. (2016) The artificial ovary: current status and future perspectives. **Future Oncol** 12: 2323-32.

Azara F. (1902) Apuntamientos para la historia natural de los cuadrúpedes del Paraguay y Rio de Plata. **Imprenta de la Viuda de Ibarra** 1: 389.

Bergallo HG, Rocha CFD, Alves MAS, Van Sluys M. (2000) A fauna ameaçada de extinção no Estado do Rio de Janeiro. **EDUERJ** 166.

Bandeira FT, Carvalho AA, Castro SV, Lima LF, Viana DA, Evangelista JS, Pereira MJS, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR. (2015) Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reprod Domest Anim** 50: 177-85.

Boatright KM, Salvesen GS. (2003) Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.** 15: 725-31.

Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology** 39:615-47.

Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Winingen JD, Massey JB, Lamb SV, Brackett BG. (2004) Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology** 61: 581-94.

Cabrera A. (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”** 4:309-732.

Carrijo, OA. (2009) Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas doméstica. Brasília. Tese (Doutorado em Biologia Animal) Curso de pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.

Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CA, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR. (2013) Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Anim Reprod Sci** 138: 220-7.

Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR. (2011) Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae** 39: 1-17.

Comizzoli P, Ottinger MA. (2021) Understanding reproduction aging in wildlife to improve animal conservation and human reproductive health. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** 9: 1-8.

Del Valle A. (2008) Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, 25: 287-296.

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. (2006) Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone-marrow transplantation for sickle anaemia: case report. **Hum Reprod**. 21: 183-88.

Duarte JMB, Jorge W. (1996) Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Arch Zootecnia**; 45: 281–287.

Duarte JMB. (2001) O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa. Relatório técnico. FUNEP/CESP: CD ROM.

Duarte JMB, González S, Maldonado JE. (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**; 49: 17–22.

Emmons LH, Feer F. (1997) Neotropical rainforest mammals: A field guide. University of Chicago Press; 2ed:175-185.

Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Pasquinelli G, Caprara G, Valente S, Seracchioli R, Paradisi R. (2016) Long-term storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. **J Ovarian Res** 9:50-60.

Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Seracchioli R, Grigioni WF. (2003) Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. **Gynecol Oncol** 89:259-66.

Faustino LR, Carvalho AA, Silva CM, Rossetto R, Lopes CA, van Tilburg MF, Carneiro PBM, Bão SN, Moura AAA, Bordignon V, Figueiredo JR, Rodrigues APR. (2015) Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex. **Reprod Fertil Dev** 27: 440-8.

Fontana CS, Bencke GA, Reis RE. (2003) Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS; 632.

Galli C, Duchy R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. (2003) Bovine embryo technologies. **Theriogenology** 59: 599-616.

Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. (2008) Biotécnicas Aplicadas à Reprodução de Cães e Gatos. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Roca 2 ed.

Gastal GDA, Aguiar FLN, Rodrigues APR, Scimeca JM, Apgar GA, Banz WJ, Feugang JM, Gastal EL. (2018) Cryopreservation and in vitro culture of white-tailed deer ovarian tissue. **Theriogenology** 113:253-260.

Gorricho CM, Tavares MR, Apparício M, Fonseca-Alves CE, Macente BI, Mansano CFM, Toniollo GH. (2018) Vitrification of cat ovarian tissue: Does fragment size matters? **Reproduction in Domestic Animals** 53: 125-32.

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. **Hum Reprod.** 9: 597-603.

Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, M Bush, Raath C, Critser ES, McGann LE, Critser JK. (1998) Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Anim Reprod Sci** 53: 265-75.

Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, Jones KL, Figueiredo JR, Gastal EL. (2013) Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology** 79: 599-609.

Hiemstra SJ, Van Der Lende T, Woelders H. (2000) The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Rome: FAO 25-35.

Hofmann RC, Ponce Del Prado CF, Otte KC. (1976) Registrato de dos nuevas especies de mamíferos para el Perú, *Odocoileus dichotomus* (Illiger, 1811) y *Crysocyon brachyurus* (Illiger, 1811), con notas sobre su habitat. **Revista Florestal del Perú** 5:61-81.

Hovatta O.(2001) Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. **Human Reproduction Update** 4: 378- 383.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. (2003) Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **J Pathol** 199: 275–88.

Hussein MR. (2005) Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update** 11: 162-78.

Ishijima, T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki, H. (2006). Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development** 52: 293-99.

Jewgenow K, Penfold L, Meyer H, Wildt D. (1998) Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility** 112: 39-47.

Jorge W, Benirschke K. (1977) Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer, *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia** 42:711–721.

Jungius H. (1976) Status and distribution of threatened deer species in South America. *World Wildlife Yearbook* 203-217.

Lima, AKF, Silva AR, Santos, RR, Sales DM, Evangelista AF, Figueiredo JR, Silva LDM (2006). Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology** 66: 1664–66.

Luvoni GC, Tessaro I, Apparicio M, Ruggeri E, Luciano AM, Modina SC. (2012) Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. **Reproduction Domestic Animal** 47: 385–91.

Mattiske D, Shaw G, Shaw JM.(2002) Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii* after cryopreservation and xenografting into mice. **Reproduction** 123: 143–153.

Mazur P. (1980) Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origin Life** 10: 137-159.

Mikich SB, Bérnils RS. (2004) Livro Vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. **Instituto Ambiental do Paraná**; 763.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-58.

Neitzel H.(1987) Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: Obe G, Basler A (eds), *Cytogenetics, Basic and Applied Aspects*. Berlin: Springer Verlag 90–112.

Neto V, Joly T, Commin L, Bruyre P. (2012) New Approaches of Ovarian Tissue Cryopreservation from Domestic Animal Species. **Current Frontiers in Cryopreservation** 206-12.

Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. (1996) Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum Reproduction** 11: 1487-1491.

Nicholson DW, Thornberry NA. (1997) Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci.** 22:2 99-306.

Nogueira-Neto P.(1973) A criação de animais indígenas vertebrados. **Tecnapis** 327.

Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. (1998) Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human Reproduction** 13: 1133–38.

Paynter S, Cooper A, Fuller B, Shaw R. (1999) Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology** 38: 301-9.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.** 1644: 83-94.

Ramos AF, Albuquerque MSM, Mariante AS. (2011) Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35: 104-107.

Peixoto MGCD, Bergamann JAG, Penna VM, Pereira CS. (2006) Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 58: 567-74.

Reed JC.(2000) Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology** 157: 1415–30.

Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. (2010) Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Anim Reprod Sci** 122: 151–163

Saraste A, Pulkki K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res** 45: 528-37.

Schuler M, Maurer U, Goldstein JC. (2003) p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ** 10: 451-60.

Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochemistry and Cell Biology** 2008; 129: 33–43.

The IUCN Red List of Threatened Species. Available online: <https://www.iucnredlist.org/> (accessed on 09 December 2021)

Varela DM, Trovati RG, Guzmán KR, Rossi RV, Duarte JMB. (2010) Red Brocket Deer – *Mazama americana*. Biodiversidade Brasileira 151-159. In: Duarte, J.M.B. & Gonzalez, S. (eds.). Neotropical cervidology, biology and medicine of Latin American deer. Funep/IUCN. 393.

Walker RA (2006) Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment. **Histopathology** 49: 406–10

Wildt DE, Comizzoli P, Pukazhenthi, B, Songsasen N. (2010) Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. **Molecular Reproduction Development** 77: 397–409.

Wu JM, Takahashi DL, Ingram KD, Mattison JA, Roth G, Ottiger MA, Zelinski MB. (2010) Ovarian reserve tests and their utility in predicting response to controlled ovarian stimulation in rhesus monkeys. **American Journal Primatology** 72: 672–680.