



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARIA BÁRBARA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO
SOBRE O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS FIBROBLÁSTICAS DE
ONÇAS-PINTADAS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)**

MOSSORÓ–UFERSA

2020



MARIA BÁRBARA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO
SOBRE O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS FIBROBLÁSTICAS DE
ONÇAS-PINTADAS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira

MOSSORÓ–UFERSA

2020

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade da autora, sendo a mesma, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e sua respectiva autora seja devidamente citadas e mencionadas os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

S586a Silva, Maria Bárbara.
Avaliação das condições de cultivo e
criopreservação sobre o estabelecimento de
linhagens fibroblásticas de onças-pintadas,
Panthera onca (LINNAEUS, 1758) / Maria Bárbara
Silva. - 2020.
77 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2020.

1. Felídeos silvestres . 2. Bancos de células
somáticas. 3. Linhagem celular. I. Pereira,
Alexsandra Fernandes, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.



MARIA BÁRBARA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO
SOBRE O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS FIBROBLÁSTICAS
DE ONÇAS-PINTADAS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)**

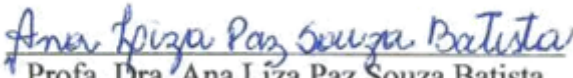
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 29/04/2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira
Presidente


Prof. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista
Membro examinador (Faculdade Cisne de Quixadá)


Prof. Dr. Herlon Victor Rodrigues Silva
Membro examinador (Uninassau Fortaleza)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIA BÁRBARA SILVA – Nascida em Baraúna, RN, no dia 16 de julho de 1993, filha de Francisca Francineide Alves Silva e Pedro Edmar da Silva. Graduiu-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi- Árido (UFERSA, 2013–2018). Estagiou no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), participando do programa de iniciação científica (Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica, UFERSA, 2015–2018). Em maio de 2018, foi aprovada no processo seletivo para o mestrado acadêmico em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), iniciando as atividades no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA) com bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus queridos e amados pais,
irmãos e sobrinhos, por todo amor, carinho,
apoio e incentivo.*

*A minha querida orientadora,
Alexsandra Fernandes Pereira por toda
confiança, paciência e ensinamentos
passados ao longo desse percurso.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos, proteção e força nos dias mais difíceis durante essa jornada e por ser meu suporte diário e principal fonte de renovação de coragem para prosseguir no caminho escolhido, superando quaisquer desafios.

Aos meus amados e queridos pais, Francisca Francineide Alves Silva e Pedro Edmar da Silva por serem meu principal alicerce e base familiar. Por todo amor, carinho, compreensão, apoio, paciência, ensinamentos e por todos os esforços realizados para que eu pudesse estar e chegar até aqui. Por sempre me mostrarem que Deus é a nossa maior fortaleza e que nossos objetivos sempre serão alcançados quando confiarmos plenamente Nele, sem medos. Vocês são os meus maiores exemplos de vida a seguir. Obrigada por todos ensinamentos, eles foram essenciais na minha conduta, e na constituição da minha personalidade. Não há palavras que possam expressar todo o amor e agradecimento que devo a vocês. Meu eterno agradecimento!

Aos meus irmãos, Maria Cláudia da Silva, Clabson Jatony Silva e José Beniellison da Silva por sempre me ampararem quando mais necessitei, auxiliando-me por meio dos simples e pequenos gestos, mas que representaram todo o amor, carinho e cuidado. Obrigada pelos momentos singelos em família. A vocês, meu muito obrigada, de coração!

Aos meus sobrinhos, Pedro Henrique da Silva Costa, Ana Cecília Pereira Silva e Laura Gabrielle Silva Nascimento, por me proporcionarem o conhecimento sobre a inocência dos seus pequeninos corações, por me ensinarem a compreender o significado do amor e por alegrarem ainda mais a minha vida. Obrigada minhas crianças!

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, um exemplo de mulher e profissional determinada, que realiza seu trabalho com paixão e dedicação. Agradeço a oportunidade em crescer como profissional e por todos os seus ensinamentos passados ao longo dessa jornada. Pela confiança, dedicação, tempo, paciência, carinho e atenção durante esses últimos anos, e acima de tudo, pela sua contribuição na realização deste projeto tão importante, que finaliza uma etapa significativa na minha vida. Obrigada pelos carões quando necessários, pelos conselhos, preocupações e ensinamentos. Meu eterno agradecimento!

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA) pelos momentos de alegria compartilhados, em especial a Alana Azevedo Borges, Érika Almeida Praxedes, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira e Matheus Barbosa do Nascimento, pela contribuição e por tornarem possível a concretização deste trabalho.

A Rosecleide Maia da Silva, pelo laço de amizade, dedicação e apoio durante os últimos cinco anos. Obrigada pela força e por sempre me auxiliar nas situações que mais precisei. Agradeço por sempre vivenciar as mais diversas emoções comigo e por não me permitir desanimar, você tem sido uma irmã que tive o privilégio de conhecer. Que bom que Deus me presenteou com sua amizade e companheirismo. Que nossa amizade permaneça sempre resistente, onde nem tempo e circunstâncias possam intervir. Muito obrigada amiga, de coração!

Aos meus amigos, Regis Vinicius Fagundes Dantas, Rhut Mikaella Alves Dantas, Jorge Alves da Silva Neto, Talison Eugênio da Costa, Breno de Holanda Almeida e Luiz Fernando Bezerra Evangelista, aos quais tenho um enorme carinho e respeito. Obrigada pelos os bons momentos de muitas alegrias, pela amizade e por tornarem os meus dias mais divertidos. Obrigada meus queridos!

Agradeço a todos os meus amigos que me auxiliaram de forma indireta, em especial, a Bonieria Medelleve Lyra de Sousa e a Maria Luiza Silva Santiago, pela amizade, preocupação, alegrias e momentos compartilhados. Obrigada Meninas!

Agradeço carinhosamente a banca examinadora pelo aceite ao convite em contribuírem para a finalização deste projeto, suas recomendações serão de muita importância na solidificação deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), especialmente aos docentes que o constituem. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, tornando possível a realização do trabalho.

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido, ao Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA/UFERSA), e a toda equipe do Zoológico São Francisco (Canindé, CE), Parque Zoobotânico Arruda Câmara (João Pessoa, PB), Parque Estadual de Dois Irmãos (Recife, PE) e ECOPOINT Parque Ecológico (Fortaleza, CE), por

disponibilizarem os animais para realização das colheitas de pele do pavilhão auricular. Ao médico veterinário Herlon Victor Rodrigues Silva por toda ajuda e disponibilidade nas colheitas de material. Agradeço por todo suporte e parceria.

Aos animais, as onças-pintadas, uma espécie linda que se encontra ameaçada a extinção e que apresenta um importante papel em nosso ecossistema. Sem elas, a realização deste projeto não seria possível.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram e torceram para que eu pudesse finalizar mais um ciclo, e que não foram aqui citados. Muito obrigada!

“Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa aceitar sua natureza e entrar no oceano. Somente ao entrar no oceano o medo irá se diluir, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de se tornar o oceano.”

(Khalil Gibran)

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS FIBROBLÁSTICAS DE ONÇAS-PINTADAS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)

SILVA, Maria Bárbara. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS FIBROBLÁSTICAS DE ONÇAS-PINTADAS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758). 2020. (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi- Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2020.

RESUMO: O quantitativo populacional cada vez mais reduzido de onças-pintadas, associado à sua importância ecológica, tem resultado no desenvolvimento de estratégias que promovam a sua conservação. Nesse sentido, células somáticas derivadas da pele destes animais podem ser empregadas para essa finalidade, seja na produção de embriões clones, na obtenção de células induzidas à pluripotência e nos estudos genéticos da espécie. Para tanto, o estabelecimento adequado destas amostras é etapa inicial para essas aplicações. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os danos gerados pelas condições de cultivo *in vitro* e criopreservação sobre o estabelecimento de cinco linhagens fibroblásticas derivadas de onças-pintadas adultas. Assim, fragmentos da pele da região auricular apical de uma fêmea e quatro machos foram cultivados *in vitro* para a obtenção das células somáticas. Inicialmente, para a identificação do tipo celular, células foram confirmadas como fibroblastos após análise morfológica e de imunofluorescência, e as cinco linhagens (um animal/uma linhagem) foram submetidas a dois experimentos. No primeiro experimento, células foram avaliadas em diferentes passagens do cultivo (primeira, terceira décima) para viabilidade, metabolismo e atividade proliferativa. No segundo experimento, células criopreservadas foram avaliadas quanto a viabilidade, metabolismo, atividade proliferativa, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e apoptose após descongelação em uma, três e dez passagens de cultivo. Células não criopreservadas foram utilizadas como controle. O cultivo *in vitro* após a primeira ($26,1 \text{ h} \pm 4,9$), terceira ($22,9 \text{ h} \pm 1,6$) e décima passagem ($22,8 \text{ h} \pm 3,7$) e criopreservação ($30,0 \text{ h} \pm 1,4$) não afetaram a atividade proliferativa. Além disso, nenhuma diferença foi observada para a viabilidade após a primeira ($98,9\% \pm 0,8$), terceira ($92,5\% \pm 6,2$), décima ($95,7\% \pm 1,4$) passagem e criopreservação ($73,2\% \pm 9,8$). Contudo, células cultivadas até a décima passagem ($49,0\% \pm 3,3$) e criopreservadas ($32,7\% \pm 2,8$) reduziram seu metabolismo. Adicionalmente, células criopreservadas mostraram em unidades de fluorescência arbitrárias altos níveis de EROs ($1,4 \pm 0,1$) e $\Delta\Psi_m$ alterado ($0,9 \pm 0,0$), quando comparados às células não criopreservadas ($1,0 \pm 0,1$ e $1,0 \pm 0,2$). Finalmente, células criopreservadas e cultivadas após dez passagens reduziram a atividade proliferativa reduzida ($45,1\% \pm 12,0$) e número de células viáveis ($30,4\% \pm 5,7$), quando comparadas as células criopreservadas e cultivadas após uma e três passagens. Em conclusão, fibroblastos viáveis podem ser estabelecidos a partir da orelha de onças-pintadas e que embora essas células não tenham mostrado alterações na viabilidade e atividade proliferativa, elas sofrem danos durante um longo cultivo e criopreservação nas condições estudadas.

Palavras-chave: felídeos silvestres, bancos de células somáticas, linhagem celular.

EVALUATION OF CULTURE AND CRYOPRESERVATION CONDITIONS ON THE ESTABLISHMENT OF FIBROBLASTIC LINES DERIVED FROM JAGUARS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758)

SILVA, Maria Bárbara. EVALUATION OF CULTURE AND CRYOPRESERVAION CONDITIONS ON THE ESTABLISHMENT OF FIBROBLASTIC LINES DERIVED FROM JAGUARS, *Panthera onca* (LINNAEUS, 1758). 2020. (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2020.

ABSTRACT: The increasingly small population quantity of jaguars, associated with their ecological importance, has resulted in the development of strategies that promote their conservation. In this sense, somatic cells derived from the skin of these animals can be used for this purpose, either in the production of clone embryos, in obtaining cells induced to pluripotency and in genetic studies of the species. Thus, the proper establishment of these samples is an initial step for these applications. Therefore, the aim of the present study was to assess the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation conditions on the establishment of five fibroblast lines derived from adult jaguars. Thus, fragments of skin from the apical auricular region of one female and four males were cultured *in vitro* to obtain somatic cells. Initially, to identify the cell type, cells were confirmed as fibroblasts after morphological and immunofluorescence analysis, and the five strains (one animal/one line) were subjected to two experiments. In the first experiment, cells were evaluated in different culture passages (first, third, tenth) for viability, metabolism and proliferative activity. In the second experiment, cryopreserved cells were evaluated for viability, metabolism, proliferative activity, levels of reactive oxygen species (ROSs), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and apoptosis after thawing and one, three and ten culture passages. Non-cryopreserved cells were used as controls. The *in vitro* culture after the first ($26.1 \text{ h} \pm 4.9$), third ($22.9 \text{ h} \pm 1.6$) and tenth passage ($22.8 \text{ h} \pm 3.7$) and cryopreservation ($30.0 \text{ h} \pm 1.4$) did not affect proliferative activity. Moreover, no difference was observed for viability after the first ($98.9\% \pm 0.8$), third ($92.5\% \pm 6.2$), tenth ($95.7\% \pm 1.4$) passage and cryopreservation ($73.2\% \pm 9.8$). Nevertheless, cells cultured to the tenth passage ($49.0\% \pm 3.3$) and cryopreserved ($32.7\% \pm 2.8$) reduced their metabolism. Additionally, cryopreserved cells showed high levels of ROS (1.4 ± 0.1) and altered $\Delta\Psi_m$ (0.9 ± 0.0) in arbitrary fluorescence units, when compared to non-cryopreserved cells (1.0 ± 0.1 and 1.0 ± 0.2). Finally, cryopreserved cells and cultured after ten passages reduced the reduced proliferative activity ($45.1\% \pm 12.0$) and number of viable cells ($30.4\% \pm 5.7$), when compared to cryopreserved and cultured cells after one and three passages. In conclusion, viable fibroblasts can be established from jaguars' ears and that although these cells have not shown changes in viability and proliferative activity, they suffer damage during a long culture and cryopreservation under the studied conditions.

Keywords: wild felids, somatic cell banking, cell line.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Exemplar de onça-pintada pertencente ao ECOPOINT Parque Ecológico (Fortaleza, CE). Fonte: Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA).....21

Figura 2: Biomas em que ocorrem a presença de onças-pintadas. Setas amarelas indicam ocorrência de onças-pintadas. Fonte: Desbiez et al. (2012) com modificações.....22

CAPÍTULO 3 – EVALUATION OF THE DAMAGE CAUSED BY *IN VITRO* CULTURE AND CRYOPRESERVATION TO DERMAL FIBROBLASTS DERIVED FROM JAGUARS: AN APPROACH TO CONSERVATION THROUGH BIOBANKS

Figure 1. Establishment of jaguar fibroblasts derived from primary and secondary cultures of peripheral ear skin. **(A)** Tissue cultured *in vitro* presenting cell detachment. Asterisk indicates tissue. **(B, C, and D)** Cells derived from first, third and tenth passages during *in vitro* culture, presenting fusiform aspect. **(E)** Cells after the cryopreservation by slow freezing. **(F)** Positive confirmation of fibroblasts by cell marking for intermediate vimentin. **(G)** Counter-labeled cells with Hoechst 33342. **(H)** Image overlay in (F) and (G). Scale bar of 50 μm . In A, B, C, D, and E: magnification 10 $\times$. In F, G and H: magnification 20 $\times$71

Figure 2. Evaluation of *in vitro* culture conditions on the establishment of fibroblasts derived from the skin of jaguars. **(A)** Assessment of the proliferative activity of cells derived from first, third and tenth passages through the development of growth curves. **(B)** Values of Population Doubling Time (PDT) of cells derived from first, third and tenth passages after seven days of analysis. **(C)** Assessment of the viability using Trypan blue in cells derived from first, third and tenth passages. **(D)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in cells derived from first, third and tenth passages. ^{a,b}: $p < 0.05$72

Figure 3. Evaluation of cryopreservation conditions on the establishment of fibroblasts derived from the skin of jaguars. **(A)** Assessment of the proliferative activity of non-

cryopreserved and cryopreserved cells through the development of growth curves. **(B)** Values of Population Doubling Time (PDT) of cells derived from non-cryopreserved and cryopreserved cells after seven days of analysis. **(C)** Assessment of the viability using Trypan blue in non-cryopreserved and cryopreserved cells. **(D)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in non-cryopreserved and cryopreserved cells. ^{a,b}: $p < 0.05$73

Figure 4. Evaluation of cryopreservation conditions on the establishment of jaguar fibroblasts. **(A)** Measurement of ROS levels in non-cryopreserved cells using H₂DCFDA probe. **(B)** Measurement of ROS levels in cryopreserved cells using H₂DCFDA probe. **(C)** Levels of ROS in non-cryopreserved and cryopreserved cells. **(D)** Quantification of $\Delta\Psi_m$ in non-cryopreserved cells using CMXRos probe. **(E)** Quantification of $\Delta\Psi_m$ in cryopreserved cells using CMXRos probe. **(F)** $\Delta\Psi_m$ in non-cryopreserved and cryopreserved cells. Scale bar of 50 μm . In A, B, D, and E: magnification 10 $\times$. ^{a,b}: $p < 0.05$74

Figure 5. Evaluation of number of passages on the proliferative activity, viability, and metabolism in cryopreserved cells derived from jaguar skin. **(A)** Assessment of the proliferative activity of cryopreserved cells after one, three and ten passages by determination of Population Doubling Time (PDT) values. **(B)** Assessment of the viability using Trypan blue in cryopreserved cells after one, three and ten passages. **(C)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in cryopreserved cells after one, three and ten passages. ^{a,b}: $p < 0.05$75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS CELULARES EM FELÍDEOS SILVESTRES – UMA REVISÃO DOS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE CELULAR

Tabela 1. Condições de cultivo de linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção..... 48

Tabela 2. Condições de criopreservação por congelação lenta em linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção.....50

CAPÍTULO 3 – EVALUATION OF THE DAMAGE CAUSED BY *IN VITRO* CULTURE AND CRYOPRESERVATION TO DERMAL FIBROBLASTS DERIVED FROM JAGUARS: AN APPROACH TO CONSERVATION THROUGH BIOBANKS

Table 1. Evaluation of number of passages on the apoptosis levels in cryopreserved cells derived from jaguars.....70

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
<	Menor que
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
BA	Bahia
°C	Graus Celsius
x	Vezes
CE	Ceará
cm	Centímetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsufóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species - ROS</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	Etilenoglicol
g/L	Grama por litro
° GL	Grau Gay Lussac
GO	Goiás
h	Hora
H ₂ DCFDA	2', 7'-diclorofluoresceína
I	Primeiro
II	Segundo
III	Terceiro
IV	Quarto
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

iPS	Células induzidas a pluripotência (<i>Induced pluripotent stem cells</i>)
iTNCS	Transferência Nuclear Interespecífica e Intraespecífica
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza (<i>International Union for Conservation of Nature</i>)
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LDH	Lactato Desidrogenase
MDH	Malato Desidrogenase
mM	Milimolar
MT	Mato Grosso
MTT	Ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MS	Mato Grosso do Sul
mg/Kg	Miligramma por kilograma
mm	Milímetro
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
μM	Micromolar
n° ou No	Número
PDT	Tempo de Duplicação da População (<i>Population Doubling Time</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VSS	Vitrificação em Superfície Sólida
VDC	Vitrificação Direta em Criotubos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1. ASPECTOS ECOLÓGICOS E QUANTITATIVO POPULACIONAL DAS ONÇAS-PINTADAS	21
2.2. ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO <i>IN SITU</i> APLICADAS EM ONÇAS-PINTADAS	23
2.3. ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i> APLICADAS EM ONÇAS-PINTADAS	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. OBJETIVO GERAL	29
5.2. OBJETIVOS ESPÉCIFICOS.....	29
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2 – ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS CELULARES EM FELÍDEOS SILVESTRES – UMA REVISÃO DOS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE CELULAR	39
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO CULTIVO <i>IN VITRO</i> E CRIOPRESERVAÇÃO EM FIBROBLASTOS DERIVADOS DA PELE DE ONÇAS-PINTADAS: UMA ABORDAGEM À CONSERVAÇÃO POR MEIO DE BIOBANCOS	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	76
ANEXOS	77

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A onça-pintada considerada o único e maior felídeo do gênero *Panthera* pertencente as Américas (SRBEK-ARAUJO et al., 2018; CORNER et al., 2019), vem sofrendo um declínio populacional, o qual foi estimado em cerca de 30% nas últimas três gerações (MORATO et al., 2013; ARAUJO et al., 2018). Consequentemente, estes felídeos silvestres estão sendo considerados, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (QUIGLEY et al., 2017), como uma espécie quase ameaçada à extinção, sendo as subpopulações da América Latina identificadas como ameaçadas ou criticamente ameaçadas (MORATO et al., 2018; QUIGLEY et al., 2017).

Entre os principais fatores que resultam nessa redução populacional da onça-pintada têm-se a perda e a fragmentação dos habitats ocasionados por ações antropogênicas, como por exemplo, à caça ilegal (TORRE et al., 2018). Tal declínio tem gerado grande preocupação uma vez que afeta diretamente o equilíbrio e a manutenção do ecossistema, visto que esses animais possuem papéis ecológicos em diferentes habitats (OLSOY et al., 2016; ESPINOSA et al., 2018). Além disso, a onça-pintada regula a população de suas presas e beneficia outras espécies envolvidas na cadeia alimentar, sendo denominada como uma espécie guarda-chuva (RODRÍGUEZ-SOTO et al., 2013). Adicionalmente, estes mamíferos silvestres são considerados espécies paisagistas (ASTETE et al., 2008) e se destacam quanto ao valor econômico como atrativo ao turismo (MAFFEI et al., 2004; SILVER et al., 2004).

Diante deste cenário de redução populacional e associado a sua importância ecológica, estratégias de conservação de onças-pintadas tornam-se necessárias. Em geral, em virtude de informações ainda escassas dos aspectos reprodutivos da espécie (JORGE-NETO et al., 2018), técnicas de reprodução assistida ainda são reduzidas. Assim, ferramentas biotecnológicas, como o uso de bancos de células somáticas tornam-se alternativas relevantes no contexto da conservação animal. Esses bancos quando apropriadamente estabelecidos permitem a obtenção de embriões/crias por transferência nuclear de células somáticas (TNCS), produção de células induzidas à pluripotência e estudos genéticos da espécie (PRAXEDES et al., 2018).

Em felídeos silvestres, avanços nesta temática já foram observados na clonagem por TNCS em espécies do gênero *Felis*, como o gato-da-Líbia (*Felis silvestris lybica*, GÓMEZ et al., 2004), do gênero *Acinonyx*, como o guepardo (*Acinonyx jubatus*, MORO et al., 2015),

e do gênero *Phantera*, como o leão (*Panthera lio*, YELISETTI et al., 2016). Já a obtenção de células induzidas à pluripotência teve sua publicação mais marcante em felídeos silvestres relatada para o leopardo das neves (*Panthera uncia*, VERMA et al., 2012); tigre de Bengala, serval e onça-pintada (*Panthera tigris*, *Leptailurus serval*, *Panthera onca*, VERMA et al., 2013), as quais essas células podem em um futuro próximos serem empregadas como fonte de obtenção de gametas *in vitro* (SUKPARANGSI et al., 2018). Assim, para todas estas aplicações, o estabelecimento adequado de células somáticas consiste em uma etapa crucial para a eficiência das técnicas (LIU et al., 2010; GUAN et al., 2010).

Em geral, o estabelecimento de linhagens somáticas consiste em controlar e realizar de maneira adequada as condições de isolamento, identificação, cultivo *in vitro* e criopreservação das células somáticas. Inicialmente, a pele tem sido o órgão de escolha no isolamento destas células por ser uma fonte com quantitativo adequado de células e pode ser realizada a biópsia de maneira menos invasiva (PRAXEDES et al., 2018). Após a colheita, fragmentos de pele são cultivados e os fibroblastos são identificados. Por serem as células mais amplamente empregada nas ferramentas biotecnológicas já desenvolvidas (PEREIRA et al., 2018, 2019), os fibroblastos tornam-se as linhagens celulares de escolha para os estudos que se seguem.

Além disso, os fibroblastos apresentam um rápido crescimento e uma ótima capacidade de aderência celular e ainda se destacam quanto aos seus aspectos morfológicos, pois possuem núcleo grande, central e oval (PRAXEDES et al., 2019). Diante disto, estudos têm relacionado que as condições de cultivo *in vitro* e criopreservação podem alterar as características dos fibroblastos dificultando a reprogramação adequada destas células em suas aplicações (SONG et al., 2007). Em geral, danos gerados pelas condições do cultivo *in vitro*, tais como, o número de passagens, deve ser estudado antes da formação de bancos de células somáticas (SONG et al., 2007). Além disso, a identificação dos danos gerados durante a criopreservação consiste em fase importante para a otimização das condições de criopreservação de células somáticas (LEÓN-QUINTO et al., 2011, 2014).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as condições de cultivo *in vitro* e criopreservação sobre o estabelecimento de cinco linhagens fibroblásticas derivadas de onças-pintadas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. ASPECTOS ECOLÓGICOS E QUANTITATIVO POPULACIONAL DAS ONÇAS-PINTADAS

Atualmente, no Brasil, a onça-pintada (**Figura 1**) ocorre em cinco dos seis biomas brasileiros (**Figura 2**), apresentado um importante papel ecológico no ecossistema na qual fazem parte (LORENZANA et al., 2020). Esses animais são considerados um dos principais predadores no controle de herbívoros e predadores de pequeno porte, favorecendo as interações predador-presa (JORGE et al., 2013; JORGE-NETO et al., 2018; 2020). Ainda, as onças-pintadas por necessitarem de territórios saudáveis e de ampla extensão para viverem de forma adequada, são consideradas indicadores de qualidade ambiental (RODRÍGUEZ-SOTO et al., 2013).



Figura 1. Exemplar de onça-pintada pertencente ao ECOPOINT Parque Ecológico (Fortaleza, CE). Fonte: Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA).

No Brasil, a onça-pintada é categorizada como vulnerável à extinção, sendo a Caatinga e a Mata Atlântica as áreas mais afetadas, sendo esta última considerada a principal região em perder a presença dessa espécie (MORATO et al., 2013). De acordo com o estudo de Jędrzejewski et al. (2018), aproximadamente 46.391 onças-pintadas vivem em áreas protegidas em território brasileiro. Detalhadamente, a população mundial de onças-pintadas é considerada em cerca de 173.000 indivíduos, com maior concentração na Bacia

Amazônica e nas demais regiões do planeta tendem a ser pequenas e fragmentadas (JĘDRZEJEWSKI et al., 2018). Contudo, é possível afirmar que geralmente ocorra variações na densidade populacional destes animais e, portanto, ainda são necessários estudos que possam estimar com garantia o tamanho populacional de onças-pintadas (JĘDRZEJEWSKI et al., 2018).



Figura 2: Biomas em que ocorrem a presença de onças-pintadas. Setas amarelas indicam ocorrência de onças-pintadas. Fonte: Desbiez et al. (2012) com modificações.

Em um estudo desenvolvido por Sanderson et al. (2002) estima-se que as onças-pintadas estejam ocupando menos de 46% de sua área de distribuição que ocorria do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. Além disso, em países, como El Salvador e Uruguai, esses animais já são considerados extintos (QUIGLEY et al., 2017).

Em geral, esses animais estão sujeitos a diferentes tipos de ameaças (LORENZANA et al., 2020), como as ações antropogênicas associadas a agricultura, fragmentação do habitat, a caça e abate ilegal (CULLEN et al., 2016; ESPINOSA et al., 2018) ocasionando uma redução no seu quantitativo populacional (MORATO et al., 2013; ARAUJO et al., 2018). Adicionalmente, a fragmentação do habitat tem favorecido o isolamento de pequenas populações de onças-pintadas, tornando-as

vulneráveis e suscetíveis a alterações ambientais e depressão por endogamia (MENCHACA et al., 2019).

Diante desse cenário, estratégias de conservação têm sido propostas no Brasil por meio de ações englobadas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Grandes Felinos (PAN Grandes Felinos: Portaria no. 612/2018). Entre as recomendações desse plano de ação, têm-se o desenvolvimento de biotecnologias assistidas, como a formação de bancos de recursos biológicos e biotécnicas reprodutivas.

2.2. ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *IN SITU* APLICADAS EM ONÇAS-PINTADAS

As estratégias de conservação *in situ* são definidas como abordagens que objetivam a manutenção do habitat natural do animal e todas as espécies nele existentes por meio da conservação e educação ambiental (SANDERSON et al., 2002; JORGE-NETO et al., 2018). Para que essa estratégia seja possível, é necessário a obtenção de longas faixas territoriais e monitoramento destas por meio de armadilhas fotográficas (CASANOVA; BERNARDO, 2017) e, principalmente, da contribuição da sociedade (SILVA et al., 2008; ZARRATE-CHARRY et al., 2010).

No Brasil, um exemplo significativo dessa abordagem ocorre na Amazônia, a qual é considerada a área mais importante para essa finalidade (OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, alguns projetos não-governamentais que visam promover a conservação *in situ* de onça-pintada e associá-la ao desenvolvimento socioeconômico das regiões envolvidas têm sido estabelecidos, como o NEX No Extinction, em Corumbá, Goiás, Projeto Onças do Rio Negro, em Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Projeto Onçafari, em Miranda, Mato Grosso do Sul, Pantera Brasil em Poconé, Mato Grosso, e Projeto Amigo da Onça, em Parque Nacional Boquierão da Onça, na Bahia. Nesses projetos, o monitoramento, manejo, reintrodução dos animais no seu ambiente natural e estudos genéticos são realizados.

Contudo, esta abordagem pode apresentar limitações em relação à redução de áreas destinadas a manutenção dos animais, redução de presas que favorecem a alimentação e o desconhecimento da sociedade sobre a importância dessas estratégias que visam a conservação da biodiversidade (CRAWSHAW et al., 2004; JORGE-NETO et al., 2018). Além disso, sabe-se que a captura destes animais em longos territórios são muitas vezes de difícil acesso, dificultando a realização dos estudos (SILVER et al., 2004). Adicionalmente,

as áreas de proteção estabelecidas nesta estratégia raramente conseguem conservar os habitats (KATI et al., 2004), sendo necessário otimizar as estratégias de conservação *ex situ*.

2.3. ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO *EX SITU* APLICADAS EM ONÇAS-PINTADAS

As estratégias de conservação *ex situ* pode se dar de duas maneiras, a *ex situ in vivo* e a *ex situ in vitro*. As ferramentas *ex situ in vivo* consistem na manutenção de um animal vivo fora de seu habitat natural, como ocorrem nos zoológicos (RUEDA-ZOZAYA et al., 2016), possibilitando estudos sobre o entendimento dos aspectos fisiológicos e reprodutivos da espécie (GONZALEZ et al., 2017). Já àquelas *ex situ in vitro* são caracterizadas pela colheita e criopreservação de amostras biológicas, como gametas, embriões, tecidos gonadais, tecidos somáticos e células somáticas (PRAXEDES et al., 2018) para uso em biotécnicas reprodutivas.

No Brasil, de uma à três onças-pintadas são mantidas em zoológicos o que tem auxiliado no estabelecimento de estudos voltados para a promoção do bem-estar dos animais, avaliação dos aspectos reprodutivos e projetos de pesquisa com universidades colaboradoras (MORATO et al., 2004; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Morato et al. (2001) compararam as características seminais de onças-pintadas de cativeiros e vida livre e identificaram que indivíduos derivados de cativeiros possuem reduzido potencial reprodutivo, sendo a nutrição, meio ambiente e genética as causas dessa resposta. Já em 2002, Morato; Barnabe desenvolveram protocolos de avaliação e congelação de sêmen para a espécie, bem como realizaram monitoramento da função testicular, função ovariana e recuperação oocitária. Nesse estudo, embora os autores tenham obtido oócitos e espermatozoides, não foi observada a obtenção de embriões por fecundação *in vitro*, sendo atribuído para esta resposta a quantidade reduzida de oócitos e a baixa qualidade espermática.

Posteriormente, Araújo et al. (2018) otimizaram um protocolo anestésico usando medetomidina em associação com cateter uretral para recuperação seminal. Nesse estudo, os autores obtiveram um volume de sêmen de 347,2 µL, contendo uma concentração elevada de $2.635,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Em 2019, dois estudos interessantes foram desenvolvidos com onças-pintadas de cativeiros para a recuperação e avaliação espermática. Inicialmente, Silva et al. (2019a) apresentaram dados detalhados das características espermáticas, quanto à morfologia, morfometria e ultraestrutural nesta espécie. Em seguida,

os mesmos autores avaliaram a qualidade seminal de onças-pintadas, durante uma curva de refrigeração, comparando o uso dos diluidores Tris e ACP-117c. Os resultados mostraram que o Tris apresentou influência positiva na motilidade, funcionalidade da membrana e atividade mitocondrial espermática em comparação com o ACP-117c, sugerindo, assim, a utilização do extensor Tris na criopreservação de sêmen de onças-pintadas (SILVA et al., 2019b).

Já em estudos voltados para a avaliação das fêmeas, Barnes et al. (2016) realizaram o monitoramento do ciclo estral em onças-pintadas, observando a ocorrência de múltiplos estros, com aproximadamente 22 a 65 dias. Ainda, o período gestacional dura em média 91 a 110 dias, com uma natalidade de um a quatro indivíduos (MORATO et al., 2013; BARNES et al., 2016). Em 2020, Jorge Neto et al. avaliaram a indução da ovulação em onças-pintadas em cativeiros com base nas alterações morfológicas do ovário e observaram que a ovulação também pode ser adquirida na ausência da cópula.

Finalmente, em estudos voltados para bancos de amostras somáticas, estudos recentes têm evidenciado a obtenção de amostras derivadas da pele como principal fonte de recuperação destas células (PRAXEDES et al., 2018). O primeiro relato de colheita e criopreservação de amostras somáticas foi apresentado por Mestre-Citrinovitz et al. (2016) usando amostras de pele de indivíduos derivados da Argentina. Neste estudo, os autores descreveram de maneira técnica as etapas envolvidas durante o cultivo primário e congelamento lento de amostras somáticas derivadas da pele, músculo e cartilagem.

Recentemente, o nosso grupo, Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA) aperfeiçoou os protocolos de criopreservação de tecidos somáticos, comparando três técnicas de conservação: congelamento lento vs. vitrificação em superfície sólida (VSS) vs vitrificação direta em criotubos (VDC), na qual a VSS, foi a técnica mais eficiente (PRAXEDES et al., 2019; 2020). Além disso, nosso grupo também descreveu o cultivo *in vitro* desses fragmentos, otimizando as análises de atividade metabólica e proliferativa obtendo resultados positivos: células 100% funcionais e duplicação de população de 26 h, utilizando como meio nutritivo o meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico, nas seguintes condições de incubação: 38,5° C em 5% de CO₂ (PRAXEDES et al., 2019). Posteriormente, nosso grupo ainda descreveu a criopreservação de células somáticas, utilizando diferentes combinações de soluções crioprotetoras [10% de dimetilsulfóxido (DMSO) vs. 10% de DMSO acrescido de 0,2 M de sacarose vs. 10% de etilenoglicol (EG) vs. 10% de EG acrescido de 0,2 M de sacarose], resultando na solução de meio essencial mínimo modificado por Dulbecco

acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2 M de sacarose como a solução mais adequada para a criopreservação de células somáticas de onça-pintada (OLIVEIRA et al., 2020).

Portanto, como continuidade dessa temática voltada para a conservação de amostras somáticas de onças-pintadas, esta proposta visou contribuir para a obtenção de linhagens celulares viáveis após a manipulação *in vitro* e criopreservação.

3. JUSTIFICATIVA

O número populacional de onças-pintadas vem sendo reduzido nos últimos anos em consequência das ações antropogênicas que inclui a agricultura, a fragmentação do seu habitat, a caça e abate ilegal. Ainda, em virtude do seu importante papel ecológico para os ecossistemas, a necessidade de manutenção dessa espécie em cativeiros, visando a conservação da biodiversidade global tem sido necessária.

Alguns fatores isolados ou em conjunto podem afetar a realização e aplicabilidade de biotécnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial e a produção de embriões, em animais mantidos em cativeiros, uma vez que estes animais podem apresentar idade avançada ou a ausência de um histórico reprodutivo, o que dificulta ainda mais o conhecimento reprodutivo desta espécie e consequentemente sua reprodução.

Diante deste cenário, o uso de tecidos e células somáticas derivadas da pele têm se tornado uma alternativa para a conservação global, em virtude de sua finalidade para diversos fins, como a clonagem por transferência nuclear, reprogramação nuclear e produção de células induzidas a pluripotência, que visa a produção de gametas. Contudo, antes da sua aplicabilidade nestas respectivas biotécnicas, faz-se necessário o estabelecimento e caracterização celular por meio de avaliações quanto as condições de manipulação *in vitro* e criopreservação, visando a qualidade celular e a conservação adequada desse material por longos períodos. Portanto, o entendimento sobre os danos ocasionados pelas condições de cultivo e criopreservação, que possam comprometer a funcionalidade celular faz-se necessário.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I – O número elevado de passagens realizadas durante o cultivo *in vitro* de fibroblastos recuperados do tecido da pele da região auricular apical de onças-pintadas pode influenciar negativamente na viabilidade, metabolismo e funcionalidade celular;

II – A criopreservação celular pode afetar negativamente o metabolismo e a funcionalidade de linhagens fibroblásticas de onças-pintadas;

III – Linhagens fibroblásticas viáveis de onças-pintadas podem ser obtidas após as condições de manipulação *in vitro* e processo de criopreservação.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as condições de cultivo *in vitro* e criopreservação sobre o estabelecimento de cinco linhagens fibroblásticas derivadas de onças-pintadas.

5.2. OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

- Isolar e caracterizar linhagens celulares de onça-pintada a partir de ensaios que avaliem a qualidade das células;

- Criopreservar e avaliar os danos gerados pela congelação sobre a qualidade das células de onça-pintada;

- Avaliar a influência do tempo de cultivo quanto ao número de passagens realizadas antes e após a criopreservação.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, G.R.; PAULA, T.A.R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R.G.; BERGO, L.C.F.; SILVA, L.C.; COSTA, D.S.; BRAUD, C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 1–7, 2018.
- ASTETE, S.; SOLLMANN, R.; SILVEIRA, L. Comparative ecology of jaguars in Brazil. **Cat News Special**, v. 4, p. 9–14, 2008.
- BARNES, S.A.; TEARE, J.A.; STAADEN, S.; METRIONE, L.; PENFOLD, L.M. Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 225, p. 95–103, 2016.
- CASANOVA, D.C.; BERNARDO, R. New record of the jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) (Felidae), from a mosaic of Atlantic Forest in the Paraná state, Brazil. **Check List**, v. 13, p. 2075, 2017.
- CORNER, S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; AGNEW, D.; VENTA, P. J. Development of a 12-plex of new microsatellite markers using a novel universal primer method to evaluate the genetic diversity of jaguars (*Panthera onca*) from North American zoological institutions. **Conservation Genetics Resources**, v.11, p.487-497, 2019.
- CRAWSHAW, P.G., MAHLER, J.K., INDRUSIAK, C.I., CAVALCANTI, S.M., LEITE-PITMAN, M.R.P., SILVIUS, K.M. Ecology and conservation of the jaguar (*Panthera onca*) in Iguazu National Park, Brazil. **People in Nature**, v. 14, p. 286–296, 2004.
- CULLEN JR, L.; STANTON, J.C.; LIMA, F.; UEZU, A.; PERILLI, M.L.; AKÇAKAYA, H. R. Implications of fine-grained habitat fragmentation and road mortality for jaguar conservation in the Atlantic Forest, Brazil. **PloS one**, v. 11, p. 1–17, 2016.
- DESBIEZ, A.L.; PAULA, R.C. Species conservation planning: the jaguar National Action Plan for Brazil. **Cat News**, v.7, p.4-7, 2012.

ESPINOSA, S.; CELIS, G.; BRANCH, L.C. When roads appear jaguars decline: Increased
 access to an Amazonian wilderness area reduces potential for jaguar conservation. **PloS**
one, v.13, p.1–18, 2018.

GÓMEZ, M.C.; POPE, C.E.; GIRALDO, A.; LYONS, L.A.; HARRIS, R.F.; KING, A.L.;
 COLE, A.; GODKE, R.A.; DRESSER, B.L. Birth of african wildcat cloned kittens born
 from domestic cats. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, p. 247–258, 2004.

GONZALEZ, S.J.; HOWARD, J.G.; BROWN, J.; GRAJALES, H.; PINZÓN, J.;
 MONSALVE, H.; MORENO, M.A.; ESCOBAR, C.J. Reproductive analysis of male and
 female captive jaguars (*Panthera onca*) in a Colombian zoological park.
Theriogenology, v. 89, p. 192–200, 2017.

GUAN, W.J.; LIU, C.Q.; LI, C.Y.; LIU, D.; ZHANG, W.X.; MA, Y.H. Establishment and
 cryopreservation of a fibroblast cell line derived from bengal tiger (*Panthera tigris tigris*).
CryoLetters, v. 31, p. 130–138, 2010.

GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, C.E.; GÓMEZ-RAMÍREZ, M.A.; LÓPEZ-GONZÁLEZ,
 C.A.; DOHERTY JR, P.F. Are private reserves effective for jaguar conservation? **PloS**
one, v. 10, p. e0137541, 2015.

JEDRZEJEWSKI, W.; ROBINSON, H.S.; ABARCA, M.; ZELLER, K.A.; VELASQUEZ,
 G.; PAEMELAERE, E.A.D.; GOLDBERG, J.F.; PAYAN, E.; HOOGESTEIJN, R.;
 BOEDE, E.O.; SCHMIDT, K.; LAMPO, M.; VILORIA, A.L.; CARREÑO, R.;
 ROBINSON, N.; LUKACS, P.M.; NOWAK, J.J.; SALOM-PÉREZ, R.; CASTAÑEDA, F.;
 BORON, V.; QUIGLEY, H. Estimating large carnivore populations at global scale based on
 spatial predictions of density and distribution–Application to the jaguar (*Panthera onca*).
PloS One, v. 13, p. e0194719, 2018.

JORGE, M.L.S.; GALETTI, M.; RIBEIRO, M.C.; FERRAZ, K.M.P. Mammal defaunation
 as surrogate of trophic cascades in a biodiversity hotspot. **Biological Conservation**, v.163,
 p. 49–57, 2013.

JORGE-NETO, P.N.; LUCZINSKI, T.C.; ARAÚJO, G.R.; JÚNIOR, J.A.S.; SOUZA TRALDI, A.; SANTOS, J.A.M.; REQUENA, L.A.; GIANNI, M.C.M.; DECO-SOUZA, T.; PIZZUTTO, C.S.; BALDASSARRE, H. Can jaguar (*Panthera onca*) ovulate without copulation?. **Theriogenology**, v. 147 p. 57–61, 2020.

JORGE-NETO, P.N.; PIZZUTTO, C.S.; ARAÚJO, G.R.; DECO-SOUZA, T.; SILVA, L.C.; SALOMÃO JR, J.A.; BALDASSARE, H. Copulatory behavior of the Jaguar *Panthera onca* (Mammalia: Carnivora: Felidae). **Journal of Threatened Taxa**, v. 10, p.12933–12939, 2018.

KATI, V.; DEVILLERS, P.; DUFRENE, M.; LEGAKIS, A.; VOKOU, D.; LEBRUN, P. Hotspots, complementarity or representativeness? Designing optimal small-scale reserves for biodiversity conservation. **Biological Conservation**, v. 120, p. 471–480, 2004.

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**, v. 68, p. 227–233, 2014.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**, v. 62, p. 145–151, 2011.

LIU, C.; GUO, Y.; LIU, D.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and characterization of fibroblast cell line derived from Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). **Biopreservation and Biobanking**, v. 8, p. 99–105, 2010.

LORENZANA, G.; HEIDTMANN, L.; HAAG, T.; RAMALHO, E.; DIAS, G.; HRBEK, T.; EIZIRIK, E. Large-scale assessment of genetic diversity and population connectivity of Amazonian jaguars (*Panthera onca*) provides a baseline for their conservation and monitoring in fragmented landscapes. **Biological Conservation**, v. 242, p. 108417, 2020.

MAFFEI, L.; CUÉLLAR, E.; NOSS, A. One thousand jaguars (*Panthera onca*) in Bolivia's Chaco? camera trapping in the Kaa-Iya National Park. **Journal of Zoology**, v. 262, p. 295–304, 2004.

MENCHACA, A.; ROSSI, N.A.; FROIDEVAUX, J.; DIAS-FREEDMAN, I.; CARAGIULO, A.; WULTSCH, C.; HARMSSEN, B.; FOSTER, R.; DE LA TORRE, J.A.; MEDLLIN, R.A.; RABINOWITZ, S.; AMATO, G. Population genetic structure and habitat connectivity for jaguar (*Panthera onca*) conservation in Central Belize. **BMC Genetics**, v. 20, p.1–13, 2019.

MESTRE-CITRINOVITZ, A.; SESTELO, A.J.; CEBALLOS, M.B. BARAÑAO, J.L.; SARAGÜETA, P. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 116, p. 28.7. 1–28.7. 14, 2016.

MORATO, R.G.; BARNABE, R.C. Potencial de técnicas reproductivas para la conservación del jaguar. El Jaguar en el Nuevo Milenio (Eds. MEDELLIN, R.A.; EQUIHUA, C.; CHETKIEWICZ, C.L.; CRAWSHAW, P.G. JR; RABINOWITZ, A.; REDFORD; K.H.; ROBINSON, J.G.; SANDERSON, E.W.; TABER, A.B.), p. 43–53, 2002.

MORATO, R.G.; VERRESCHI, I.T.; GUIMARAES, M.A.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R.C. Seasonal variation in the endocrine–testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 61, p. 1273–1281, 2004.

MORATO, R.G.; BEISIEGEL, B.M.; RAMALHO, E.E.; CAMPOS, C.B.; BOULHOSA, R.L.P. Avaliação do risco de extinção da onça-pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, p. 122–132, 2013.

MORATO, R.G.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, F. C.; JACOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; D. SANA, D.; NUNES, A.L.V.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; BARNABE, R.C. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living *versus* captive jaguars (*Panthera onca*). **Reproduction**, v. 122, p. 745–751, 2001.

MORATO, R.G.; THOMPSON, J.J.; PAVIOLO, A.; DE LA TORRE, J.A.; LIMA, F.;
 MCBRIDE JR, R.T.; PAULA, R.C; JR, L.C.; SILVEIRA, L.; KANTEK, D.L.Z.;
 RAMALHO, E. E.; MARANHÃO, L.; HABERFELD, M.; SANA, D.A.; MEDELLIN,
 R.A.; CARRILLO, E.; MONTALVO, V.; MONROY-VILCHIS, O.; CRUZ, P.; JACOMO,
 A.T.; TORRES, N.M.; ALVES, G.B.; CASSAIGNE, I.; THOMPSON, R.; SAENS-
 BOLANOS, C.; CRUZ, J.C.; ALFARO, L.D.; HAGNAUER, I.; SILVA, M.X.;
 VOGLIOTTI, A.; MORAES, M.F.; MIYAZAKI, S.S.; PEREIRA, T.D.; ARAUJO, G.R.;
 SILVA, L.C.; LEUZINGER, L.; CARVALHO, M.M.; RAMPIN, L.; SARTORELLO, L.;
 QUIGLEY, H.; TORTATO, F.; HOOGESTEIJN, R.; CRAWSHAW JR, P.G.; DEVLIN,
 A.L.; MAY JR, J.A.; AZEVEDO, F.C.C.D.; CONCONE, H.V.B.; QUIROGA, V.A.;
 COSTA, S.A.; ARRABAL, J.P.; VANDERHOEVEN, E.; DI BLANCO, Y.E.; LOPES,
 A.M.C.; WIDMER, C.E.; RIBEIRO, M.C.; Jaguar movement database: a GPS-based
 movement dataset of an apex predator in the Neotropics. **Ecology**, v. 99, p. 1691–1691,
 2018.

MORO, L.N.; HIRIART, M.I.; BUEMO, C.; JARAZO, J.; SESTELO, A.; VERAGUAS,
 D.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L.; SALAMONE, D.F. Cheetah interspecific SCNT
 followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene
 expression. **Reproduction**, v. 150, p. 1–10, 2015.

OLIVEIRA, L.R.M.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, M.B.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.;
 PEREIRA, A.F. Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of
 somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks.
Anais da Academia Brasileira de Ciências, no prelo, 2020.

OLIVEIRA, T.G.; RAMALHO, E.E.; PAULA, R.C. Red List assessment of the jaguar in
 Brazilian Amazonia. **CATnews Special Issue**, v. 7, p. 8–13, 2012.

OLSOY, P.J.; ZELLER, K.A.; HICKE, J.A.; QUIGLEY, H.B.; RABINOWITZ, A.R.;
 THORNTON, D.H. Quantifying the effects of deforestation and fragmentation on a range-
 wide conservation plan for jaguars. **Biological Conservation**, v. 203, p. 8–16, 2016.

PAVIOLO, A.; ANGELO, C.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; MORATO, R.G.; PARDO, J.M.;
 SRBEK-ARAÚJO, A.C.; BEISIEGEL, B.M.; LIMA, F.; SANA, D.; SILVA, M.X.;

VELÁZQUEZ, M.C.; CULLEN, L.; CRAWSHAW JUNIOR, P.; JORGE, M.L.S.P.;
GALETTI, P.M.; DI BITETTI, M.S.; DE PAULA, R.C.; EIZIRIK, E.; AIDE, M.; CRUZ,
P.; PERILLI, M. L.L.; SOUZA, A.S.M.C.; QUIROGA, V.; NAKANO, E.; PINTO,
F.R.; FERNÁNDEZ, S.; COSTA, S.; MORAES JUNIOR, E.A.; AZEVEDO, F. A
biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the
Atlantic Forest of South America. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–16, 2016.

PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, A.R. Use of somatic banks
for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals – a review. **Revista
Brasileira de Reprodução Animal**, v. 42, p.104–108, 2018.

PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; LIRA, G.P.O. Use of cloning by
nuclear transfer in the conservation and multiplication of wild mammals. **Revista Brasileira
de Reprodução Animal**, v. 43, p. 242–247, 2019.

PRAXEDES, E.A.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; PEREIRA, A.F. Use of somatic
cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo Biology**, v. 37, p. 258–263, 2018.

PRAXEDES, E.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS,
M.V.O.; SILVA, H.V.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Effects of
cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – an alternative approach to
conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). **Cryobiology**, v. 88, p.15–22, 2019.

PRAXEDES, E.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; SILVA, M.B.; SANTOS,
M.V.O.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Quantitative and descriptive
histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards
formation of biobanks. **Anatomia, Histologia y Embryologia**, v. 49, p. 121–129, 2020.

QUIGLEY, H.; FOSTER, R.; PETRACCA, L.; PAYAN, E.; SALOM, R.; HARMSSEN,
B. 2017. *Panthera onca* (errata version published in 2018). *The IUCN Red List of
Threatened Species* 2017:e.T15953A123791436. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20173.RLTS.T15953A50658693.en>. Downloaded on 01 March 2020.

RODRÍGUEZ-SOTO, C.; MONROY-VILCHIS, O.; ZARCO-GONZÁLEZ, M. M.
 Corridors for jaguar (*Panthera onca*) in Mexico: Conservation strategies. **Journal for
 Nature Conservation**, v. 21, p. 438–443, 2013.

RUEDA-ZOZAYA, P.; MENDOZA-MARTÍNEZ, G.D.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, D.;
 MONROY-VILCHIS, O.; GODOY, J.A.; SUNNY, A.; PALOMARES, F.; CHÁVEZ, C,
 HERRERA-HARO, J. Genetic variability and structure of jaguar (*Panthera onca*) in
 Mexican zoos. **Genetica**, v. 144, p. 59–69, 2016.

SANDERSON, W.; REDFORD, K.H.; CHETKIEWICZ, C.L.B.; MEDELLIN, R.A.;
 RABINOWITZ, A.R.; ROBINSON, J.G.; TABER, A.B. Planning to save a species: the
 jaguar as a model. **Conservation Biology**, v. 16, p. 58–72, 2002.

SILVA, J.C.R.; SIQUEIRA, D.B.; MARVULO, M.F.V. Ética e bem-estar em animais
 silvestres–Unidades de conservação. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v. 11, p. 61–65,
 2008.

SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P.; RIBEIRO, L. R.; DE FREITAS, L. A.; DE OLIVEIRA,
 M. F.; DE ASSIS NETO, A. C.; SILVA, A. R. & DA SILVA, L. D. M. Morphology,
 morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*)
 sperm. **Animal reproduction science**, v. 203, p.84-93, 2019a.

SILVA, H. V. R., NUNES, T. G. P., BRITO, B. F., CAMPOS, L. B., DA SILVA, A. M.,
 SILVA, A. R., ... & DA SILVA, L. D. M. Influence of different extenders on morphological
 and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera
 onca*). **Cryobiology**. 2019b.

SILVER, S.C.; OSTRO, L.E.; MARSH, L.K.; MAFFEI, L.; NOSS, A.J.; KELLY, M.J.;
 WALLACE, R.B.; GÓMEZ, H.; AYALA, G. The use of camera traps for estimating jaguar
Panthera onca abundance and density using capture/recapture analysis. **Oryx**, v. 38, p. 148–
 154, 2004.

SONG, J.; HUA, S.; SONG, K.; ZHANG, Y. Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. **In Vitro Cellular & Development Biololoy Animal**, v. 43, p. 203–209, 2007.

SRBEK-ARAUJO, A.C.; HAAG, T.; CHIARELLO, A.G.; SALZANO, F.M.E.; EIZIRIK, E. Isolamento preocupante: análises genéticas não invasivas lançam luz sobre o status crítico de uma população remanescente de onça-pintada. **Journal of Mammalogy**, v.99, p.397–407, 2018.

SUKPARANGSI, W.; BOOTSRI, R.; SIKEAO, W.; KAROON, S.; THONGPHAKDEE, A. Establishment of induced pluripotent stem cells from Fishing Cat and Clouded Leopard using integration-free method for wildlife conservation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 230–230, 2018.

TORRE, J.A.; GONZÁLEZ-MAYA, J.F.; ZARZA, H.; CEBALLOS, G.; MEDELLÍN, R.A. The jaguar's spots are darker than they appear: assessing the global conservation *status* of the jaguar *Panthera onca*. **Oryx**, v. 52, p.300–315, 2018.

VERMA, R.; HOLLAND, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. **Theriogenology**, v. 77, p. 220–228, 2012.

VERMA, R.; LIU, J.; HOLLAND, M. K.; TEMPLE-SMITH, P.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P. J. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. **BioResearch**, v. 2, p. 72–76, 2013.

YELISETTI, U.M.; KOMJETI, S.; KATARI, V.C.; SISINTHY, S.; BRAHMASANI, S.R. Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 52, p. 632–645, 2016.

ZARRATE-CHARRY, D.; TRUJILLO, L.L.; BALAGUERA-REINA, S.; GONZÁLEZ MAYA, J.; TRUJILLO, F. Rescate y manejo de fauna silvestre ex situ en Colombia: Estudio

de caso de un jaguar (*Panthera onca*) en la Orinoquia Colombiana. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 4, p. 81–89, 2010.

**CAPÍTULO 2 – ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS CELULARES EM
FELÍDEOS SILVESTRES – UMA REVISÃO DOS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE
CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE CELULAR**

Artigo de revisão: Establishment of cell lines in wild felids – A review of the effects of
culture and cryopreservation conditions on cell quality

Periódico: Revista Brasileira de Reprodução Animal.

Qualis (Medicina Veterinária): B4 (antigo e atual)

Data de submissão: 05 de Março de 2020.

Estabelecimento de linhagens celulares em felídeos silvestres – Uma revisão dos efeitos das condições de cultivo e criopreservação sobre a qualidade celular

Establishment of cell lines in wild felids – A review of the effects of culture and cryopreservation conditions on cell quality

Maria Bárbara Silva¹, Alessandra Fernandes Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

* Correspondência: Alessandra F. Pereira, Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625900, Brasil, Telefone: +55 84 3317 8361, E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

Linhagens celulares, principalmente fibroblastos derivados da pele, podem ser ferramentas interessantes para a conservação e multiplicação de felídeos silvestres ameaçados de extinção. Esses animais em virtude de seu quantitativo reduzido têm nos bancos de células somáticas uma alternativa para a conservação de material biológico derivados de pequenas populações, garantindo assim o armazenamento da diversidade genética de diferentes grupos de indivíduos. Isso porque tais linhagens, quando apropriadamente estabelecidas por meio das técnicas de cultivo *in vitro* e criopreservação, permitem seu emprego na obtenção de embriões por clonagem por transferência nuclear de células somáticas e produção de células induzidas à pluripotência. Assim, uma das etapas essenciais para o uso dessas linhagens de maneira eficiente consiste na avaliação dos efeitos das condições de cultivo *in vitro* e criopreservação das células, visando reconhecer os danos gerados pelas manipulações e identificar os ajustes necessários aos protocolos empregados. Portanto, o objetivo desta revisão consiste em reunir e explorar informações úteis sobre as condições de cultivo *in vitro* e criopreservação de células derivadas de felídeos silvestres, visando o estabelecimento de linhagens celulares na conservação e multiplicação destas espécies.

Palavras chave: bancos de recursos somáticos, fibroblastos, transferência nuclear de células somáticas, indução à pluripotência.

Abstract

Cell lines, mainly fibroblasts derived from the skin, can be interesting tools for the conservation and multiplication of endangered wild felids. These animals, due to their reduced quantity, have somatic cell banks as an alternative for the conservation of biological material derived from small populations, thus guaranteeing the storage of the genetic diversity of different groups of individuals. This is because such lines, when properly established through *in vitro* culture and cryopreservation techniques, allow their use in obtaining embryos by cloning by somatic cell nuclear transfer and production of cells induced to pluripotency. Thus, one of the essential steps for the use of these lines in an efficient way consists of the evaluation of the effects of the conditions of *in vitro* culture and cryopreservation of the cells, aiming to recognize the damages generated by the

manipulations and to identify the necessary adjustments to the employed protocols. Therefore, the aim of this review is to gather and explore useful information about *in vitro* culture and cryopreservation conditions of cells derived from wild felids, aiming at the establishment of cell lines in the conservation and multiplication of these species.

Keywords: somatic resource banks, fibroblasts, somatic cell nuclear transfer, pluripotency induction.

Introdução

O termo linhagem celular é descrito para o cultivo de células previamente isoladas e caracterizadas, que apresentam um maior caráter proliferativo de acordo com as condições *in vitro* favoráveis e necessárias para o seu desenvolvimento e sobrevivência, como as condições ambientais e nutritivas (Ulrich & Pour, 2001). Convencionalmente, as linhagens celulares são classificadas como aquelas de crescimento finito, as quais apresentam um número limitado de passagens (em torno de 50 passagens), enquanto aquelas de crescimento infinito são caracterizadas por tempo de cultivo infinito de células imortalizadas (Rebello, 2014). Em geral, para a conservação da diversidade genética e, posterior, conservação de felídeos silvestres, as linhagens de crescimento finito têm sido empregadas (Yelisetti et al., 2016). Para tanto, após o estabelecimento das linhagens de células, estas podem ser empregadas na obtenção de embriões/crias clones por transferência nuclear de células somáticas (TNCS, Gómez et al., 2003) e produção de células induzidas à pluripotência (iPS, Verma et al., 2012).

Para a primeira aplicabilidade, o sucesso da TNCS em felídeos silvestres já pôde ser observado em vários felídeos silvestres, como o gato selvagem africano (*Felis silvestris libica*, Gómez et al., 2003), gato marmoreado (*Pardofelis marmorata*, Thongphakdee et al., 2006), gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*, Yin et al., 2006), gato de cabeça chata (*Prionailurus planiceps*, Thongphakdee et al., 2010) e chita asiática (*Acinonyx jubatus venaticus*, Moulavi et al., 2017). Já na produção de iPS, estudos relacionados à reprogramação de células somáticas a partir de vetores retrovirais transfectados visando à obtenção de células pluripotentes já pôde ser observado em alguns felídeos silvestres, como leopardo das neves (*Panthera uncia*, Verma et al., 2012), tigre de Bengala (*Panthera tigris*, Verma et al., 2013), onça-pintada (*Panthera onca*, Verma et al., 2013), serval (*Leptailurus serval*, Verma et al., 2013), gato pescador (*Prionailurus viverrinus*, Sukparangsi et al., 2018) e leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*, Sukparangsi et al., 2018).

Nesse contexto, para que uma célula manipulada *in vitro* seja empregada nessas finalidades, a mesma deve apresentar características adequadas durante o cultivo *in vitro* e criopreservação (Pereira et al., 2019). Portanto, o estabelecimento é o primeiro passo para se conhecer as características e necessidades das células, quanto às suas exigências nutricionais, aspectos genéticos, estágio de diferenciação e ciclo celular, parâmetros fundamentais para a obtenção de embriões clones e estudos de reprogramação (Pereira et al., 2018). Contudo, quando células somáticas são cultivadas *in vitro* objetivando possivelmente a sua utilização na reprogramação nuclear, é importante ressaltar que estas podem sofrer modificações, devido as condições impostas pelo ambiente, condições de cultivo e criopreservação inadequadas, e, conseqüentemente, o uso de células impróprias na TNCS, por exemplo, acarretará na produção de embriões clones defeituosos, comprometendo a eficiência e o sucesso da clonagem (Gómez et al., 2008; Song et al., 2007).

Portanto, o objetivo dessa revisão é reunir e explorar informações úteis acerca das necessidades no manuseio destas células sob condições de cultivo *in vitro* e criopreservação, visando o estabelecimento de linhagens celulares para suas posteriores aplicações.

Em felídeos silvestres, células somáticas já foram obtidas da pele de diferentes regiões do animal, como a região auricular (Wittayarat et al., 2012; Praxedes et al., 2019), abdominal (Sukparangsi et al., 2018), inguinal (Mestre-Citrinovitz et al., 2016), e do tecido muscular esquelético (Thongphakdee et al. 2010), sendo o primeiro caso amplamente preferível na obtenção destas células (Praxedes et al., 2018). Além disso, amostras somáticas podem ser obtidas de ambos os gêneros (Wittayarat et al., 2011), tanto por biópsias (Moro et al., 2015), quanto por necrópsias (Yelisetti et al., 2016; Moulavi et al., 2017).

Após a colheita das amostras teciduais, células podem ser cultivadas a partir de duas formas: por explante tecidual (Praxedes et al., 2019), ou por digestão enzimática tecidual (Moulavi et al., 2017). Em ambas as condições, os fibroblastos têm sido a célula de escolha na maioria de estudos de caracterização de linhagens celulares (Guan et al., 2010; Liu et al., 2010), especialmente por suas características morfológicas e de crescimento *in vitro* que favorecem seu emprego em reprogramação nuclear (Gómez et al., 2003; Praxedes et al., 2019). Contudo, durante o cultivo primário, além de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos podem estar presentes, sendo necessário um maior tempo de cultivo para a obtenção de um cultivo homogêneo de fibroblastos (Praxedes et al., 2020).

Para a caracterização de uma linhagem celular, diferentes ensaios têm sido empregados para a confirmação do tipo celular. Inicialmente, células têm sido avaliadas pelos seus aspectos morfológicos e de aderência celular. Assim, a morfologia fibroblástica, ou seja, formato fusiforme, núcleo central e oval tem sido observado em células na 3ª passagem de cultivo *in vitro* de onça-pintada (Mestre-Citrinovitz et al., 2016; Praxedes et al., 2020). Além disso, a expressão de proteínas fluorescentes tem sido empregada na confirmação do tipo e da qualidade de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, por meio da utilização de marcadores que avaliam a expressão e função das proteínas presentes em células, conforme observado em células de tigre Siberiano (Song et al., 2007) e tigre de Bengala (Guan et al., 2010).

Ainda em células derivadas de tigre Siberiano (Song et al., 2007), por cariotipagem, foi observada a manutenção do número de cromossomos da espécie ($2n = 38$) ao longo do cultivo *in vitro*. Além disso, a análise isoenzimática tem sido aplicada na etapa de caracterização de linhagens celulares. Assim, os resultados obtidos quanto ao cariótipo em associação com os ensaios isoenzimáticos, podem contribuir na confirmação em relação a origem de uma determinada linhagem celular, bem como identificar prováveis contaminações cruzadas com outros tipos de células (Liu et al., 2010). Portanto, está avaliação tem sido realizada em fibroblastos de tigre Siberiano (Liu et al., 2010) e tigre de Bengala (Guan et al., 2010) com o intuito de determinar a origem das células e avaliar a ausência da contaminação cruzada, por meio da análise de lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH), que são enzimas que auxiliam na via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico. Os resultados usando esses ensaios evidenciaram que as atividades enzimáticas foram adequadas e positivas para a ausência de contaminação. Finalmente, ensaios de identificação da ausência de agentes microbiológicos têm sido propostos com o intuito de garantir uma linhagem celular de qualidade (Liu et al., 2010).

Fatores que influenciam no estabelecimento de linhagens celulares

Inúmeros fatores podem comprometer ou influenciar no estabelecimento de uma linhagem celular, como as condições de cultivo *in vitro* (composição do meio: León-Quinto et al., 2011; duração do cultivo: Song et al., 2007; uso constante da tripsina durante as passagens: Liu et al., 2010). Além disso, as condições de criopreservação (processo de

congelamento/descongelamento: Gómez et al., 2008; concentrações de crioprotetores: León-Quinto et al., 2014) podem promover danos nas células, sendo essencial conhecer e estabelecer as condições adequadas no estabelecimento de linhagens celulares a serem empregadas em futuras biotecnologias (Pereira et al., 2019).

Efeitos das condições de cultivo in vitro

Durante o cultivo *in vitro*, células são avaliadas quanto as suas características e comportamento *in vitro*, os quais as condições *in vitro* devem melhor mimetizar as condições que ocorrem *in vivo*. Assim, as condições de cultivo são estabelecidas baseadas nas condições mais adequadas e necessárias para uma célula não sofrer danos. Em geral, células de felídeos silvestres têm sido cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos e, em alguns casos, suplementado com aminoácidos (Song et al., 2007), glicose e fatores de crescimento (León-Quinto et al., 2011). Essas células têm sido incubadas a uma temperatura entre 37 °C a 38,5 °C a 5% de CO₂ (Tab. 1). Em células do lince-ibérico (*Lynx pardinus*), León-Quinto et al. (2011) verificaram que a melhor composição de meio cultivo para essas células foram meio básico suplementado com 15% de SFB, 4,5 g/L de glicose e 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF).

Além disso, a duração do cultivo pode promover alterações nas células. Contudo, em fibroblastos de tigre Siberiano foram avaliados o cultivo *in vitro* até a oitava passagem, sendo observado características e padrões normais (Song et al., 2007). Por outro lado, a extensão de um cultivo celular pode promover um maior estresse para as células e, consequentemente, induzir a ativação dos mecanismos de morte celular (Liu et al., 2010), impossibilitando seu uso para fins de pesquisas e na conservação dos recursos genéticos.

Adicionalmente, o uso constante da tripsina também pode afetar as características biológicas e hereditárias em decorrência de um estresse provocado (Liu et al., 2010), afetando assim a integridade do DNA (Gómez et al., 2003). Em fibroblastos derivados de gato selvagem africano (*Felis silvestris libica*), após comparação da desagregação mecânica vs. enzimática com tripsina vs. pronase, células foram identificadas com danos ao DNA; contudo, a dissociação com pronase demonstrou uma redução destes efeitos negativos, sendo considerada a mais confiável, porém os mecanismos de atuação destas enzimas devem ainda ser melhor compreendidos (Gómez et al., 2003). Assim, visando a obtenção de linhagens celulares normais e de ótima qualidade, medidas devem ser aplicadas como o uso de reagentes confiáveis, e pH rigorosamente controlado. Ainda, a troca do meio nutritivo deve ser realizada em intervalos padrões e o mínimo possível no número de passagens realizadas, assim como curtos intervalos entre passagens (Liu et al., 2010).

Finalmente, estudos em felídeos silvestres tem apresentados resultados positivos quanto as avaliações realizadas em células cultivadas *in vitro*, quanto a confluência, viabilidade celular pelo ensaio azul de tripan, atividade metabólica e atividade proliferativa por meio da determinação do tempo de duplicação da população (PDT). Em relação ao crescimento celular, foi observado um crescimento adequado em células de onça-pintada entre 9 e 10 dias (Praxedes et al., 2020); no tigre de Bengala e tigre Siberiano entre 5 a 12 dias (Guan et al., 2010; Liu et al., 2010). Além disso, a obtenção da confluência celular se deu entre de 10 a 15 dias na onça-pintada com taxa de 70% de confluência (Praxedes et al., 2020), e no leopardo, com cerca de 70-80% de confluência (Wittayarat et al., 2013). Quanto a viabilidade celular, foram obtidas taxas de 90% para células da onça-pintada (Praxedes et al., 2019); 98,5% para o tigre Siberiano (Liu et al., 2010) e 97,6% para o tigre de Bengala (Guan et al., 2010). Além disso, fibroblastos de lince-ibérico e onça-pintada apresentaram atividade metabólica de 100% durante o cultivo *in vitro* (León-Quinto et al., 2014; Praxedes

et al., 2019). Quanto ao PDT, foi obtido os respectivos valores: 26 h para a onça-pintada (Praxedes et al., 2019); 24 h para o tigre Siberiano (Liu et al., 2010); 28 h para o tigre de Bengala (Guan et al., 2010), e 26,7; 27,2 e 34,7 h para o leopardo, leão e tigre (Yelisetti et al., 2016). Portanto, estes resultados podem estar associados as condições de cultivo utilizadas e o número de passagens realizadas, assim como a idade dos animais (Yelisetti et al., 2016).

Efeitos das condições de criopreservação

A criopreservação possibilita o armazenamento de amostras biológicas por longos períodos de tempo, sendo uma técnica integrante e necessária realizada no exercício do cultivo de células somáticas. Assim, conhecer os efeitos que os processos de congelamento/descongelamento podem causar em cultivos celulares, visando sempre a obtenção de células viáveis é etapa essencial (Praxedes et al., 2019; Oliveira, et al., 2020).

Células de felídeos silvestres, como o tigre Siberiano (Song et al., 2007) e onça-pintada (Mestre-Citrinovitz et al., 2016; Praxedes et al., 2019), têm sido criopreservadas por meio da congelamento lenta, na qual a temperatura é reduzida de forma gradual e controlada, utilizando baixas concentrações de crioprotetores (Praxedes et al., 2018). É importante ressaltar que o uso de concentrações elevadas de crioprotetores podem provocar certa toxicidade para as células, além da formação dos cristais de gelo, favorecendo o surgimento de modificações na camada lipídica e, conseqüentemente, comprometendo a atividade e sobrevivência celular (Praxedes et al., 2019).

Nesse contexto, a fim de minimizar esses efeitos negativos da criopreservação, a associação de crioprotetores tem sido amplamente empregada visando a redução do estresse osmótico (Tab. 2). Portanto, para o sucesso da criopreservação, o conhecimento sobre o tipo celular, os crioprotetores empregados, bem como a sua concentração e o tempo de exposição em relação as células, são pontos a serem explorados. León-Quinto et al. (2011) avaliaram três diferentes soluções crioprotetoras (10% de dimetilsulfóxido, DMSO, na ausência e presença de 0,1 ou 0,2 M de sacarose) em fibroblastos de lince-ibérico, e observaram que estas foram capazes de manter a viabilidade celular. Posteriormente, em 2014, o mesmo grupo utilizando a mesma espécie e condições de criopreservação, observaram que a solução que apresentou a combinação de sacarose foi mais eficiente de acordo com os parâmetros celulares estudados. Além disso, nos estudos de Oliveira et al. (2020), diferentes soluções crioprotetoras (DMSO e etilenoglicol, EG na ausência e presença de 0,2 M de sacarose) usando meio básico contendo 10% SFB foram avaliadas em fibroblastos de onça-pintada, sendo a solução mais eficiente e que garantiu a qualidade celular aquela constituída por 10% de DMSO, 10% de SFB e 0,2 M de sacarose (Tab.2).

Portanto, o DMSO é um crioprotetor intracelular universal e que possui alta capacidade de penetração, além de uma ótima solubilidade em água (León-Quinto et al., 2011), e tem sido rotineiramente empregado na criopreservação de linhagens celulares de felídeos silvestres em uma concentração de 10% (Tab. 2). Já o SFB é considerado um agente extracelular, e um antioxidante que atua como protetor celular, podendo ser utilizado em diferentes concentrações como é observado no tigre Siberiano: 40% e 50% de SFB (Song et al., 2007; Liu et al., 2010) e no leopardo: 90% (Verma et al., 2012). Finalmente, a sacarose é classificada como um crioprotetor extracelular que tem a capacidade de equilibrar a pressão osmótica nos processos de congelamento/descongelamento e que permite uma proteção adicional (León-Quinto et al., 2011). Apesar de tudo que foi abordado quanto a criopreservação em felídeos silvestres, ainda faz-se necessário a otimização de protocolos de criopreservação, buscando análises de avaliação mais precisas que possam garantir a qualidade celular e um armazenamento prolongado para células desses mamíferos ameaçados.

Considerações finais

O conhecimento quanto ao estabelecimento de linhagens celulares tem possibilitado a aplicação destas células na conservação de felídeos silvestres ameaçadas a extinção. Assim, essa revisão abordou os principais critérios que podem influenciar na obtenção e na qualidade de uma linhagem celular, visando sempre a melhoria dos aspectos quanto as avaliações dos efeitos nas condições de cultivo *in vitro* e da criopreservação destas células para suas aplicações em estudos de reprogramação visando à produção de embriões/crias clones e células induzidas à pluripotência. Essas células são as principais responsáveis pelo sucesso da reprogramação nuclear, tendo em vista que células que apresentam qualidade celular afetada são consideradas inviáveis e não podem ser utilizadas, e seu uso implicaria no surgimento embriões defeituosos e falhas na reprogramação. Assim, a otimização de protocolos que visam a melhoria das condições de manipulação *in vitro* e de criopreservação faz-se necessário, de modo que possam evitar os danos e garantir a qualidade celular e sua utilização na conservação das espécies.

Agradecimentos

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico. AF Pereira é pesquisadora do CNPq (nº 306963/2017-5).

Referências

- Borges AA, Pereira AF.** Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote*, v.27, p.111-117, 2019.
- Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE.** Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod*, v.69, p.1032-1041, 2003.
- Gómez MC, Pope CE, Ricks DM, Lyons J, Dumas C, Dresser BL.** Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reprod Fert Develop*, v.21, p.76-82, 2008.
- Guan WJ, Liu CQ, Li CY, Liu D, Zhang WX, Ma YH.** Establishment and cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). *Cryo-Letters*, v.31, p.130-138, 2010.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)** Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/15953/0>>. Acessado em 20 de fevereiro de 2020.
- León-Quinto T, Simón MA, 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*, v.68, p. 227-233, 2014.
- León-Quinto T, Simón MA, Sánchez Á, Martín F, Soria B.** Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology*, v.62, p.145-151, 2011.

964 **Liu C, Guo Y, Liu D, Guan W, Ma Y.** Establishment and characterization of fibroblast cell
 965 line derived from Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). Biopreserv Biobank, v.8, p.99-
 966 105, 2010.

967 **Mestre-Citrinovitz AC, Sestelo AJ, Ceballos MB, Baraño JL, Saragüeta P.** Isolation
 968 of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South
 969 American endangered species. Curr Protoc Mol Biol, v.116, p. 28.7.1–28.7.14, 2016.
 970

971 **Moulavi F, Hosseini SM, Tanhaie-Vash N, Ostadhosseini S, Hosseini SH, Hajinasrollah**
 972 **M, Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD, Nasr-Esfahani MH.**
 973 Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from *post-*
 974 *mortem* frozen tissue in absence of cryoprotectant and *in vitro* matured domestic cat oocytes.
 975 Theriogenology, v.90, p.197-203, 2017.

976 **Moro LN, Hiriart MI, Buemo C, Jarazo J, Sestelo A, Veraguas D., Rodriguez-Alvarez**
 977 **L, Salamone DF.** Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves
 978 *in vitro* development but not pluripotent gene expression. Reproduction, v.150, p.1-10,
 979 2015.

980 **Oliveira LRM, Praxedes EA, Silva MB, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF.**
 981 Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells
 982 derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. An Acad Bras
 983 Ciênc, no prelo, 2020.

984 **Pereira AF, Borges AA, Praxedes EA, Silva AR.** Uso de bancos somáticos visando a
 985 clonagem por transferência nuclear na conservação de mamíferos silvestres—uma
 986 revisão. Rev Bras Reprod Anim, v. p.104-108, 2018.

987 **Pereira AF, Borges AA, Santos MVO, Lira GPO.** Use of cloning by nuclear transfer in
 988 the conservation and multiplication of wild mammals. Rev Bras Reprod Anim, v.43, p.242-
 989 247, 2019.

990 **Praxedes EA, Borges AA, Santos MVO, Pereira AF.** Use of somatic cell banks in the
 991 conservation of wild felids. Zoo Biol, v.37, p.258-263, 2018.

992 **Praxedes EA, Oliveira LRM, Silva MB, Borges AA, Santos MVO, Silva HVR, Oliveira**
 993 **MF, Silva AR, Pereira AF.** Effects of cryopreservation techniques on the preservation of
 994 ear skin – an alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus,
 995 1758). Cryobiology, v.88, p.15-22, 2019.

996 **Praxedes EA, Queiroz Neta LB, Borges AA, Silva MB, Santos MVO, Ribeiro LR, Silva**
 997 **HVR, Pereira AF.** Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera*
 998 *onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. Anat Histol Embryol,
 999 v.49, p.121-129, 2020.

1000 **Rebello MA.** Fundamentos da Cultura de Tecido e Células Animais. 1ed, Rio de Janeiro:
 1001 Rubio 2014, 208p.

1002 **Song J, Hua S, Song K, Zhang Y.** Culture, characteristics and chromosome complement
 1003 of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. In Vitro Cell Dev Biol Anim, v.43, p.203-
 1004 209, 2007.
 1005

- Sukparangsi W, Bootsri R, Sikeao W, Karoon S, Thongphakdee A.** Establishment of induced pluripotent stem cells from Fishing Cat and Clouded Leopard using integration-free method for wildlife conservation. *Reprod Fertil Dev*, v.30, p.230-230, 2018.
- Thongphakdee A, Numchaisrika P, Omsongkram S, Chatdarong K, Kamolnorranath S, Dumnui S, Techakumphu M.** *In vitro* development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.219-226, 2006.
- Thongphakdee A, Siriaroonrat B, Manee-In S, Klincumhom N, Kamolnorranath S, Chatdarong K, Techakumphu M.** Intergeneric somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat. *Theriogenology*, v.73, v.120-128, 2010.
- Ulrich AB, Pour PM.** Enciclopédia de Genética: Cell lines, p.310-311, 2001.
- Wittayarat M, Thongphakdee A, Saikhun K, Chatdarong K, Otoi T, Techakumphu M.** Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family Felidae. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.305-310, 2013.
- Veraguas D, Gallegos PF, Castro FO, Rodriguez-Alvarez L.** Cell cycle synchronization and analysis of apoptosis-related gene in skin fibroblasts from domestic cat (*Felis silvestris catus*) and kodkod (*Leopardus guigna*). *Reprod Domest Anim*, v.52, p.881-889, 2017.
- Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ.** Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77, p.220-228, 2012.
- Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ.** Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *BioResearch*, v.2, p.72-76, 2013.
- Yelisetti UM, Komjeti S, Katari VC, Sisinthy S, Brahmasani SR.** Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected *postmortem* as donor cells and rabbit oocytes as recipients. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.52, p.632-645, 2016.
- Yin X, Lee Y, Lee H, Kim N, Kim L, Shin H, Kong I.** *In vitro* production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silverstris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology*, v.66, p.275-282, 2006.

1042 Tabela 1: Condições de cultivo de linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção.

Espécie	Classificação IUCN*	Condições de cultivo	Principais resultados	Autores
<i>Panthera tigris</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com 10% SFB, e 1% de solução de aminoácidos. Cultivo a 37 °C em 5% de CO ₂ e 95% de ar, até oitava passagem.	Fibroblastos obtidos com sucesso por cultivo de tecidos com morfologia, curva de crescimento e quantidade de cromossomos normais.	Song et al. (2007)
<i>Panthera tigris altaica</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com 10% SFB e antibióticos. Cultivo a 37 °C com 5% de CO ₂ , até a terceira passagem.	Fibroblastos foram estabelecidos com sucesso, favorecendo o fornecimento de um material valioso para fins de pesquisas.	Liu et al. (2010)
<i>Pardofelis marmorata</i> e <i>Prionailurus planiceps</i>	Quase ameaçado Ameaçado de extinção	DMEM com 20% SFB e antibióticos. Cultivo a 38,5 °C com 5% de CO ₂ , até a quinta passagem.	Produção de embriões por meio da transferência nuclear utilizando linhagens celulares, resultando no nascimento de 11 filhotes vivos.	Thongphakdee et al. (2010)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com HEPES, aminoácidos, mercaptoetanol, piruvato de sódio, antibióticos e variações de SFB (10% vs. 15% vs. 20%), glicose (1g/L vs. 4,5 g/L), FGF ou EGF (5 vs. 10 ng/mL). Cultivo a 37 °C com 5% de CO ₂ ,	A solução mais adequada foi meio básico suplementado com 15% de SFB, glicose a 4,5 g/L e EGF a 10 ng/mL.	León-Quinto et al. (2011)

<i>Pardofelis temminckii</i> ,	Quase ameaçado		DMEM com 20% SFB e	Linhagens foram sincronizadas com <u>Wittayarat</u> et
<i>Pardofelis marmorata</i> e	Quase ameaçado		antibióticos. Cultivo a 37 °C com	sucesso nos estágios G0/G1 por al.
<i>Panthera pardus</i>	Vulnerável		5% de CO ₂ , até a sexta passagem.	diferentes métodos: privação de soro, (2013)
				inibição por contato e agente químico.
<i>Acinonyx jubatus</i>	Criticamente	em	DMEM com 10% SFB e	Linhagens criopreservadas na ausência Moulavi et al.
<i>venaticus</i>	perigo		antibióticos. Cultivo a 38 °C com	de crioprotetores foram utilizadas na (2017)
			5% de CO ₂ .	transferência nuclear de células
				somáticas, possibilitando a obtenção de
				blastocistos.
<i>Leopardus guigna</i>	Vulnerável		DMEM: F12 com 30% SFB,	Sincronização do ciclo celular por Veraguas et al.
			piruvato, L-glutamina, antibiótico	supressão de soro por 3 dias (2017)
			e incubadas a 38,5 °C em 5% de	proporcionou maior número de
			CO ₂ .	fibroblastos em G0/G1.
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado		DMEM com 10% SFB,	Obtenção de fibroblastos viáveis após o Praxedes et al.
			antibiótico. Cultivo a 38,5 °C e 5%	cultivo <i>in vitro</i> . (2019)
			de CO ₂ , até a terceira passagem.	
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado		DMEM com 10% FBS e	Fibroblastos foram obtidos com padrões Oliveira et al.
			antibiótico. Cultivo a 38,5 °C e 5%	normais quanto a morfologia, viabilidade (2020)
			de CO ₂ , até a quarta passagem.	e confluência.

1043 *Grau de ameaça de extinção de acordo com a IUCN (2020). DMEM: Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco; SFB: Soro Fetal Bovino.

1044

1045 Tabela 2: Condições de criopreservação por congelação lenta em linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção.

Espécie	Classificação IUCN*	Condições de criopreservação	Principais resultados	Autores
<i>Panthera tigris</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 40% SFB	Fibroblastos obtidos apresentaram morfologia, curva de crescimento e quantidade de cromossomos normais.	Song et al. (2007)
<i>Panthera tigris tigris</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 90% SFB	Congelamento teve pouca influência na viabilidade dos fibroblastos, apresentando uma taxa superior a 90%.	Guan et al. (2010)
<i>Panthera tigris altaica</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 50% SFB	Células apresentaram uma viabilidade superior a 90% após o processo de congelamento.	Liu et al. (2010)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO na ausência e presença da sacarose (0,1 vs. 0,2 M).	As três soluções de congelamento apresentaram altas taxas de sobrevivência celular após a descongelamento (90% de viabilidade).	León-Quinto et al. (2011)
<i>Panthera uncia</i>	Vulnerável	10% DMSO e 90% SFB	Fibroblastos apresentaram uma viabilidade de 90% após a descongelamento.	Verma et al. (2012)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO na ausência e presença de sacarose (0,1 vs 0,2 M).	A combinação de sacarose apresentou um efeito positivo nas taxas de viabilidade celular. Valores superiores a 70%.	León-Quinto et al. (2014)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado	Diferentes soluções: 10% DMSO vs. 10% DMSO acrescido de 0,2 M sacarose vs. 10% EG. vs. 10% EG acrescido de 0,2 M sacarose.	A solução constituída por 10% DMSO, 10% SFB e 0,2 M sacarose foi a mais eficiente em garantir a qualidade celular.	Oliveira et al. (2020)

1046 *Grau de ameaça à extinção de acordo com a IUCN (2020). DMSO: Dimetilsulfóxido; SFB: Soro Fetal Bovino; EG: Etilenoglicol.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO EM FIBROBLASTOS DERIVADOS DA PELE DE ONÇAS-PINTADAS: UMA ABORDAGEM À CONSERVAÇÃO POR MEIO DE BIOBANCOS

Artigo Experimental: Evaluation of the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks

Periódico de submissão: Zoo Biology

Qualis (Medicina Veterinária): B1 (antigo): A4 (atual) Fator de impacto: 1,153

Data de submissão: 07 de Fevereiro de 2020

Evaluation of the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks

Maria B. Silva¹, Érika A. Praxedes¹, Alana A. Borges¹, Lhara R. M. Oliveira¹, Matheus B. Nascimento¹, Herlon V. R. Silva², Alexandre R. Silva³, Alessandra F. Pereira^{1*}

¹Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoro, RN, Brazil.

²Laboratory of Reproduction of Carnivorous, Ceara State University, Fortaleza, CE, Brazil.

³Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoro, RN, Brazil.

***Correspondence:** Alessandra F. Pereira, PhD, Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625900, Brazil, Phone: +55 84 3317 8361, E-mail address: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Running head: Establishment of jaguar fibroblasts.

Manuscript Word Count: 3 854.

ABSTRACT

Ex-situ conservation strategies such as the formation of somatic cell banks are valuable tools for the conservation of jaguars, whose population has been declining in recent years. Once properly established, these cells can be successfully leveraged for future applications. We aimed to assess the effects of *in vitro* culture and cryopreservation on the establishment of fibroblasts derived from jaguars. Initially, we identified five dermal fibroblastic lines using morphology and immunophenotyping assays; these lines were then subjected to two experiments. In the first experiment, the viability, metabolism, and proliferative activity of cells at different passages (first, third, and tenth) were evaluated. In the second experiment, the cells were cryopreserved and the

levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and apoptosis were evaluated after one, three and ten passages. Non-cryopreserved cells were used as controls. The *in vitro* culture after first, third, and tenth passages and cryopreservation conditions did not affect the proliferative activity and viability. However, cells cultured until tenth passage and frozen/thawed cells showed reduced metabolism. Additionally, cryopreserved cells showed higher levels of intracellular ROS and altered $\Delta\Psi_m$ when compared to those of non-cryopreserved cells. Finally, frozen/thawed cells cultured after ten passages showed reduced proliferative activity and number of viable cells than did frozen/thawed cells cultured after one and three passages. In summary, we have shown that viable fibroblasts can be established from jaguar skin and that although these cells do not show altered viability and proliferative activity, they do undergo damage during extended culture and cryopreservation.

KEYWORDS: Captive management, cell banking, cell line, *ex-situ* conservation, *Panthera* genus.

1. INTRODUCTION

Jaguars (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) are unique wild felids belonging to the genus *Panthera* and are commonly found in the Americas, where they play an important role in ecosystem structure and function (Silver et al., 2004). These animals act as important predators in the food chain, regulating approximately 90 different prey species (Chiarello et al., 2008), and are considered indicators of environmental quality (Abreu et al., 2004). According to Jedrzejewski et al. (2018), the current population of jaguars in Brazil is estimated at approximately 86,800, followed by Peru with 22,200 jaguars. Due mainly to anthropic actions, the population of jaguars has been declining (Paviolo et al., 2016). As a result, on the rating scale of International Union for Conservation of Nature, jaguars are classed as "Near Threatened" (Quigley et al., 2017). Therefore, it is necessary to develop strategies for conservation of the jaguar population.

Research focusing on the creation of germplasm cryobanks of wild felids has increased in recent years (Praxedes et al., 2019; Silva et al., 2019a), with zoos actively participating in the development

of conservation programs (Rueda-Zozaya et al., 2016). These cryobanks are fundamental for the maintenance of biodiversity (Silva, Silva, Silva & Comizzoli, 2019b). The use of cryobanks is essential for the reproduction (Comizzoli, Mermillod, & Mauget, 2000) and regeneration of wild species (Zhou, Meng & Li, 2010). Although most banks store semen and embryos, the interest in somatic resources has increased due mainly to gonadal sampling restrictions (Praxedes, Borges, Santos, & Pereira, 2018), especially because only a small quantity of samples can be collected in several breeding centers. Thus, establishing somatic cells as primary and fibroblast cell lines can provide a unique opportunity for jaguar conservation research via the use of somatic cells in cloning by somatic cell nuclear transfer and nuclear reprogramming (Pereira, Borges, Santos, & Lira, 2019).

Considering the importance of cell culture, we focused on establishing jaguar cell lines as a crucial strategy to form somatic resource banks. In this context, two factors are crucial—the conditions of *in vitro* culture and cryopreservation. Recently, our group established primary culture conditions for jaguar cells by evaluating these cells until the first passage (Praxedes et al., 2019; 2020). However, studies in different mammals have shown that somatic cells may lose their viability and functions following extended *in vitro* culture (Magalhães et al., 2017; Tian, Kubota, Enright, & Yang, 2003). In general, the evaluation of damage caused by a higher number of passages and cryopreservation is a key determinant of cell reprogramming rate (Gómez et al., 2008). Thus, cell quality assessments along different passages and after the cryopreservation are important to determine the extent to which the cells are damaged and to optimize *in vitro* conditions accordingly.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation to the establishment of fibroblasts derived from jaguars; these findings will facilitate the planning of future strategies for jaguar conservation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethics statement, chemicals and media

All experiments were carried out by ethical approval of Committees of the Rural Federal University of Semi-Arid (no. 23091.0011507/2017-61) and Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (no. 57460-1) with respect to animal experimentation and care of animals under study. Unless otherwise indicated, all the reagents, and media were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and Gibco-BRL (Carlsbad, CA, USA). Anti-vimentin antibody and goat anti-mouse IgG were purchased from Abcam (Cambridge, CA, USA).

2.2. Sample collection, obtaining and identification of fibroblastic lines

Peripheral ear skin samples (1–2 cm²) were collected from five healthy adult jaguars (11.6 ± 1.5 - year-old) from zoos belonging to different cities in north-eastern Brazil. After administration of 0.08 mg/kg dexmedetomidine hydrochloride (Dexdormitor®, Zoetis, São Paulo, SP, Brazil) and mechanical containment (Araujo et al., 2018), tissues were transported to the laboratory in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2% antibiotic-antimycotic solution at 4°C for 3–8 h.

In the laboratory, tissues were fragmented and cultured according to Praxedes et al. (2019). Briefly, fragments were cultured by primary and secondary systems in DMEM supplemented with 10% FBS and 2% antibiotic-antimycotic solution at 38.5°C and 5% CO₂. The culture medium was changed every 24 h. The cells were harvested when they reached 70% confluency and subcultured into fresh dishes. Subconfluent cells were evaluated for their fibroblastic morphology using an inverted microscope (Nikon TS100, Tokyo, Japan).

Moreover, immunophenotyping assay was performed for the establishment of fibroblastic lines. Then, the cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 10 min at 25°C and washed with chilled phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the cells were incubated with antigen-retrieval buffer (100 mM Tris, 5% urea, pH 9.5), and permeabilized for 1 h in 0.4% Triton X-100. Then, the cells were incubated in 0.1% Tween-20 for 1 h to block non-specific binding of antibodies. Finally, the cells were immunostained with mouse anti-vimentin antibody (ab8979, 1:200) for 24 h at 4°C,

1185 followed by incubation with secondary antibody (goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 488, ab150113,
1186 1:400) for 1 h at 25°C in the dark. Cells were counterstained with 1 µg/mL Hoechst 33342 for 1 min
1187 and observed under a fluorescence microscope (Olympus BX51TF, Tokyo, Japan). Thus, cells
1188 stained with vimentin were considered fibroblasts, since vimentin is a cytoskeletal protein present in
1189 cells of mesenchymal origin such as fibroblasts (Surolia et al., 2019).

1190
1191 **2.3. Experimental design and cryopreservation**

1192 After obtaining fibroblastic lines, cells were subjected to two experiments. In the first experiment,
1193 cells at different passages (first, third, and tenth) were evaluated for viability, metabolism, and
1194 proliferative activity. These passages were chosen based on a previous study by Kubota et al. (2000)
1195 who considered the third and tenth passages as the most frequently used passages in studies of nuclear
1196 reprogramming. In the second experiment, cryopreserved cells after one, three and ten passages were
1197 evaluated for levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$),
1198 and apoptosis. These characteristics of cryopreserved cells were compared to those of non-
1199 cryopreserved cells.

1200
1201 For cryopreservation, suspensions (1.0×10^5 cells/mL) containing the cryopreservation solution were
1202 added to cryovials, maintained at 4°C for 10 min, and transferred to a -80°C freezer in Mr. Frosty
1203 system® (Thermo Scientific Nalgene, Rochester, NY, USA) for 12 h at a cooling rate of 1°C/min.
1204 Subsequently, cryovials were stored in liquid nitrogen (-196°C). The cryopreservation solution
1205 consisted of DMEM with 1.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.25 M sucrose and 10% FBS,
1206 according to Oliveira et al. (2020). After two weeks, cryovials were thawed at 25°C for 1 min and
1207 immersed in a water bath at 37°C for 4 min. For removal of cryoprotectants, cells were washed with
1208 DMEM plus 0.2 M sucrose and maintained at 4°C for 15 min. Subsequently, the cells were washed
1209 with DMEM and maintained at 25°C for 15 min. Finally, the cells were cultured and subjected to
1210 different analyses.

1211
1212 **2.4. Analysis of proliferative activity, viability, and metabolism**

The proliferative activity of cells was quantified according to the growth curve and determination of population doubling time (PDT). Cells (1×10^4 cells/mL) were plated in 24-well dishes, trypsinized, and counted. The readings were recorded every 24 h for a period of 168 h. The average counts at regular intervals of 24 h were used to elaborate the growth curve and estimate PDT (Roth, 2006), according to following equation:

$$PDT = T \ln 2 / \ln (X_e / X_b)$$

PDT was the time of the culture (in hours), T was the incubation time, X_b was the number of cells at the beginning of the time incubation, X_e was the number of cells at the end of the incubation time, and ln was Napierian logarithm.

Cell viability was analyzed using trypan blue assay. All analyses were carried out in duplicate for each cell line. Briefly, an aliquot of suspended cells was stained with 0.4% trypan blue (in PBS) in 1:1 ratio and counted using a Neubauer chamber. Unstained cells were considered viable owing to the intact membrane, whereas cells stained with trypan blue were considered non-viable owing to penetration of the dye. The percentage of viable cells was calculated by dividing the number of viable cells by total number of cells counted.

For the evaluation of metabolic activity, cells were subjected to a 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) assay. Briefly, cells at a density of 5×10^4 cells/mL were cultured for 5 days in 5% CO₂ at 38.5°C in DMEM supplemented with 10% FBS and 2% antibiotic-antimycotic solution. Then, cells were incubated with 5 mg/mL MTT solution for 3 h at 38.5°C and 5% CO₂. Subsequently, DMSO was added to solubilize MTT and the readings were recorded at 595 nm, according to Praxedes et al. (2019).

2.5. Quantification of intracellular ROS levels and $\Delta\Psi_m$

For the measurement of ROS levels, cells were stained with a fluorescent probe, H₂DCFDA according to Santos et al. (2019). Briefly, cells were washed with PBS, suspended in 500 µL of 5 µM H₂DCFDA and incubated at 38.5°C in 5% CO₂ for 30 min. For the evaluation of $\Delta\Psi_m$, cells were stained with a fluorescent probe, MitoTracker Red (CMXRos). Briefly, cells were incubated with 500 nM MitoTracker Red and subjected to the above-mentioned conditions. The cells were washed with PBS, mounted on glass slides, and photographed under a fluorescence microscope (Olympus BX51TF, Tokyo, Japan). The fluorescence signal intensities were quantified using the ImageJ software (version 1.49v, Java 1.8.0_201, Wayne Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; website: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). The background signal intensity was subtracted from the values obtained for treated samples. Measured mean value of micrograph for non-cryopreserved cells was used as a calibrator. Relative levels (arbitrary fluorescence units) were calculated by dividing the measured value of each micrograph by the mean value of calibrator.

2.6. Apoptosis assay

To perform apoptosis assay, 2 µg/mL of acridine orange and 10 µg/mL of ethidium bromide was added to cell aliquots. Subsequently, cells were analyzed using fluorescence microscopy at 480 nm, where 300 cells were counted at 200× magnification. The cells were classified into (i) viable cells, with a uniform light green nucleus; (ii) early apoptotic cells, with a non-uniform green nucleus; (iii) late apoptotic cells, with a non-uniform bright orange nucleus, and (iv) necrotic cells, with a uniform orange nucleus (Kosmider et al., 2004). A fluorescence microscope was used to observe apoptotic changes in the stained cells, which were quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7. Statistical analysis

All data were expressed as the mean $\pm$ standard error and were analyzed using StatView software (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA). Normality of all results was verified using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity was verified using the Levene's test. Viability,

metabolism, ROS levels, and $\Delta\Psi_m$ were altered with arcsine and analyzed using variance analysis (ANOVA) followed by the Tukey test. All other data were compared using ANOVA followed by the unpaired t-test. Statistical significance was set at p value less than 0.05.

3. RESULTS

3.1. Identification and characterization of fibroblastic lines

Cell morphology was observed from the margins of 95% (19/20) tissue fragments derived from the peripheral ear skin of jaguars after 8.0 ± 0.3 days of adherence to the culture plates (Figure 1A). Figures 1B-D show the morphological features of fibroblasts derived from first, third and tenth passages. Subconfluent cells were observed after 9.0 ± 0.0 days. Additionally, cell morphology and confluence were not altered after cryopreservation (Figure 1E). Therefore, the morphological characteristics of fibroblastic lines included a fusiform shape with cytoplasmic extensions and a central nucleus.

Moreover, the expression of vimentin in cultured cells (Figures 1F-H) was significantly higher, where it was distributed throughout the cytoskeleton of the cells, especially in long bundles of intermediate filaments (green color). Therefore, the evaluation of immunophenotyping allowed us to demonstrate that the cells obtained were indeed fibroblasts.

3.2. Effects of *in vitro* culture conditions on the fibroblastic lines

The *in vitro* culture did not affect the proliferative activity after the first, third, and tenth passages ($p > 0.05$) with PDT values ranging of 22.8–26.1 h (Figures 2A-B). Moreover, no difference was observed among the passages in viability with all values observed above 95.7% (Figure 3C). All passages showed a sigmoid growth curve with cells entering the adaptation phase on day 1 of the growth curve, followed by the exponential phase (Figure 2A). Additionally, an evident phase of decline was observed only in cells derived from the first passage.

Regarding cellular metabolism, cells derived from the first and third passages did not show altered metabolic response (Figure 2D). However, cells cultured after the tenth passage showed reduced metabolic activity ($49.0\% \pm 3.3$) when compared to the cells belonging to other passages ($p < 0.05$).

3.3. Effects of cryopreservation conditions on the fibroblastic lines

Cryopreservation did not affect the proliferative activity of cells ($22.9 \text{ h} \pm 1.6$ and $30.0 \text{ h} \pm 1.4$) for non-cryopreserved and cryopreserved cells (Figures 3A-B). Moreover, only after day 1, the cryopreserved cells entered the exponential phase (Figure 3A). Additionally, cryopreservation did not reduce the viability significantly, with $92.5\% \pm 6.2$ and $73.2\% \pm 9.8$ viable cells observed in non-cryopreserved and cryopreserved cells, respectively (Figure 3C). On the other hand, a significant difference in metabolism was observed between non-cryopreserved ($100.0\% \pm 6.0$) and cryopreserved cells ($32.7\% \pm 2.8$, Figure 3D).

Consistent with above findings, cryopreserved cells (1.4 ± 0.1) showed higher levels of intracellular ROS when compared to non-cryopreserved cells (1.0 ± 0.1 , Figures 4A-C). Moreover, cryopreserved cells showed a reduction in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) when compared to non-cryopreserved cells (Figures 4D-F).

Cryopreserved cells cultured after one, three and ten passages did not show altered viability (Figure 5B) and metabolism (Figure 5C) with values ranging from $87.6\% \pm 5.3$ to $91.2\% \pm 2.0$ and $60.1\% \pm 12.2$ to $67.8\% \pm 8.5$, respectively ($p > 0.05$). However, cryopreserved cells cultured after ten passages showed a higher value of PDT ($45.1 \text{ h} \pm 12.0$) when compared to cells cultured after one ($30.0 \text{ h} \pm 1.4$) and three passages ($24.7 \text{ h} \pm 9.0$) with PDT values ranging from 24.7–45.1 h (Figure 5A). Finally, cryopreserved cells cultured after ten passages showed increased apoptosis when compared to cells cultured after one and three passages (Table 1).

4. DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating the effects of *in vitro* culture conditions and cryopreservation on the establishment of fibroblasts derived from jaguars. We demonstrated that viable fibroblasts with excellent proliferative activity can be established from jaguar skin by reducing the damage induced by extended culture time and cryopreservation. Additionally, the cryopreservation protocol negatively affected the ROS levels and $\Delta\Psi_m$ in dermal fibroblasts derived from jaguars. Moreover, the duration of culture of cryopreserved cells negatively affected the number of viable cells and their PDT values. These results are important as they allow researchers to understand the extent of specific damage caused by particular conditions. This is especially critical for planning new strategies to reduce these negative effects during the establishment of jaguar fibroblastic lines.

Interestingly, both proliferative activity and viability were unaffected by the number of cell passages and cryopreservation. In general, the nutrient conditions of the culture and environmental conditions promote cell establishment and cell growth. These conditions, when optimized, can allow cells to grow independent of the duration of culture, temperature reduction protocols, and presence of cryoprotectants (Subramanian et al., 2018). Probably, the addition of serum to the culture medium has a significant impact on cell growth. This stimulatory effect can be attributed to growth factors, collagen, and fibronectin supplied by the serum, which collectively play an important role in cell growth, cell adhesion and cell expansion (Hosokawa, Fijisawa, Bing-Hua, Jujo, & Higuchi, 1997). Interestingly, similar PDT values were reported for cells derived from leopard (*Panthera pardus*, 26.7 h), lion (*Panthera leo*, 27.2 h) (Yelisetti et al., 2016), and Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*, 24.0 h, Liu et al., 2010).

The maintenance of viability after cryopreservation may be attributed to efficient protection by cryoprotectants (DMSO, FBS, and sucrose). Cryoprotectants prevent the rupture of plasma membrane of cells by reducing the formation of ice crystals (Elliott, Wang, & Fuller, 2017) and osmotic pressure inside the cell (Castilho, Moraes, Augusto, Butler, 2008). Since the trypan blue assay used to estimate cell viability is based on the integrity of plasma membrane, higher values of

cell viability demonstrate the efficacy of cryoprotectants in maintaining cell membrane integrity. Consistent with our previous results, similar values for viability were obtained in Siberian tiger (98.5%, Liu et al., 2010), and Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*, 97.6%, Guan et al., 2010).

In contrast to cell viability, metabolism of jaguar fibroblasts was altered following *in vitro* culture and cryopreservation. In relation to *in vitro* culture, this may be correlated with the constant use of trypsin during high number of passages, which can induce cellular stress and consequently affect their respective biological characteristics (Liu et al., 2010). Moreover, the freezing/thawing procedure involved in cryopreservation may cause reduction in protein synthesis as well as intracellular molecular transport. These factors may result in reduced metabolic activity due to a reduction or complete loss of cellular activity (Loecker, Koptelov, Grischenko, & Loecker, 1998). Consistent with this, cells derived from brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) that showed impaired metabolic activity were non-viable cells (Magalhães et al., 2017). However, several mechanisms that have not yet been elucidated may be responsible for the decrease in metabolism, and it is considered that contact between cells during freezing/thawing may be a relevant factor (Loecker et al., 1998).

In cryopreserved fibroblasts derived from jaguar, we observed an increase in the ROS levels. ROS are characterized as a set of molecules and free radicals produced during the oxygen metabolism of an organism (Santos, Borges, Queiroz Neta, Bertini, & Pereira, 2018). Since these species carry unpaired electrons, they are highly unstable and reactive. It is important to note that exposure to low temperatures can cause undesirable damage to cells after cryopreservation, since the cryoprotectants are mildly toxic to cells (Bomhard, Elsässer, Ritschl, Schwarz, & Rotter, 2016). Thus, the structure of the lipid layer can undergo changes through the oxidation of key molecules, increasing permeability and thereby adversely affecting cell function and survival (Wlodkowic, Telford, Skommer, & Darzynkiewicz, 2011).

The culture medium, depending on its composition, can promote the overproduction of ROS. At physiological levels, ROS are necessary to perform important cellular functions. However, a significant elevation of their levels leads to oxidative stress (Agarwal, Said, Bedaiwy, Banerjee, & Alvarez, 2006). In addition to the generation of ROS, $\Delta\Psi_m$ of the cells was reduced following cryopreservation. This can be explained by the increased permeability of the cell membrane, which results in the release of apoptotic factors and consequently, in the decrease of the membrane potential (Popovic, Kaye, & Hill, 1996). The accumulation of free radicals, such as peroxide, may also favor the reduction of $\Delta\Psi_m$ (Pfeuty, & Gueride, 2000).

Cryopreserved cells after ten passages showed differing PDT values and apoptosis levels from cryopreserved cells after one and three passages. This may be attributed to inability of cells to recover from cryopreservation-induced damage. In addition, with increase in passage number, the availability of growth factors decreases (Mammone, Gan, & Foyouzi-Youssefi, 2006). With reference to apoptosis, our data corroborate the studies in brown brocket deer by Magalhães et al. (2017), who reported reduced viability in the cells of the tenth passage when compared with cells of the fourth and tenth passage. This may be correlated with cryopreservation, since it allows the formation of ice crystals inside the cell, which causes irreversible damage after thawing (Borges et al., 2017). In addition, extended culture can induce cellular stress, eventually inducing cell death (Dluska, Metera, Markowska-Radomska, & Tudek, 2019). Interestingly, no difference was observed in the metabolism of cryopreserved cells cultured after one, three and ten passages. It is possible that the metabolic rates were already reduced after cryopreservation and these reduced values were maintained over the duration of culture.

In conclusion, we have shown that viable fibroblasts can be established from jaguar skin and that, although these cells do not show altered viability and proliferative activity, they do undergo damage during extended culture and cryopreservation. Therefore, we suggest restricting the culture of fibroblasts to less than 10 passages. In addition, the cryopreservation protocol needs to be optimized to improve the quality of cells for future applications in biotechnology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Ecologic Park Ecopoint, Zoo São Francisco de Canindé, Park Dois irmãos and Zoobotonic Park Arruda Câmara for access and management of jaguars, and the Laboratory Biochemistry and Molecular Biology (BIOMOL/UERN) for technical assistance. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Financial Code 001) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, no. 306963/2017-5). AR Silva and AF Pereira were CNPq investigators.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have conflict of interest.

ORCID

Alexsandra F Pereira: <https://orcid.org/0000-0003-2137-854X>

REFERENCES

- Abreu, K. C., Koproski, L. P., Kuczach, A. M., Camargo, P. C., & Boscarato, T. G. (2004). Grandes felinos e o fogo no parque nacional de Ilha Grande, Brasil. *Floresta*, 34, 163–167.
- Agarwal, A., Said, T. M., Bedaiwy, M. A., Banerjee, J., & Alvarez, J. G. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive technique setting. *Fertility and Sterility*, 86, 503–512.
- Araujo, G. R., Paula, T. A. R., Deco-Souza, T., Morato, R. G., Bergo, L. C., Silva, L. C., Costa, D. S., & Braud, C. (2018). Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Animal Reproduction Science*, 195, 1-7.
- Borges, A. A., Lima, G. L., Queiroz Neta, L. B., Santos, M. V. O., Oliveira, M. F., Silva, A. R., & Pereira, A. F. (2017). Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*, 69, 643–654.

1432 Bomhard, A., Elsässer, A., Ritschl, L. M., Schwarz, S., & Rotter, N. (2016). Cryopreservation of
 1433 endothelial cells in various cryoprotective agents and media–vitrification versus slow freezing
 1434 methods. *PloS one*, 11, e0149660.

1435 Castilho, L., Moraes, A., Augusto, E., & Butler, M. (2008). Animal cell technology: from
 1436 biopharmaceuticals to gene therapy. Garland Science. Taylor & Francis Group, New York;
 1437 Abingdon England.

1438 Chiarello, A. G., Aguiar, L. M. S., Cerqueira, R., Melo, F. R., Rodrigues, F. H. G., & Silva, V. M. F.
 1439 (2008). Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira*
 1440 *Ameaçada de Extinção*, 2, 680–880.

1441 Comizzoli, P., Mermillod, P., & Mauget, R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered
 1442 mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 493–504.

1443 Dluska, E., Metera, A., Markowska-Radomska, A., & Tudek, B. (2019). Effective cryopreservation
 1444 and recovery of living cells encapsulated in multiple emulsions. *Biopreservation and Biobanking*,
 1445 17, 468–476.

1446 Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and
 1447 applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures.
 1448 *Cryobiology*, 76, 74–91.

1449 Gómez, M. C., Pope, C. E., Kutner, R. H., Ricks, D. M., Lyons, L. A., Ruhe, M., & Reiser, J. (2008).
 1450 Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by
 1451 cryopreservation of donor cells. *Cloning and Stem Cells*, 10, 469–484.

1452 Guan, W. J., Liu, C. Q., Li, C. Y., Liu, D., Zhang, W. X., & Ma, Y. H. (2010). Establishment and
 1453 cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*).
 1454 *CryoLetters*, 31, 130–138.

1455 Hosokawa, M., Fijisawa, H., Bing-Hua, Z., Jujo, H., & Higuchi, K. (1997). *In vitro* study of the
 1456 mechanisms of senescence acceleration. *Experimental Gerontology*, 32, 197–203.

1457 Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., & Yang, X. (2000).
 1458 Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *PNAS*, 97, 990–
 1459 997.

- Jędrzejewski, W., Robinson, H. S., Abarca, M., Zeller, K. A., Velasquez, G., Paemelaere, E. A., Goldberg, O. F., Payan, E., Hoogesteijn, R., Boede, E. O., & Schmidt, K. (2018). Estimating large carnivore populations at global scale based on spatial predictions of density and distribution—Application to the jaguar (*Panthera onca*). *PLoS One*, 13, e0194719.
- Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R., & Ochocki, J. (2004). Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 563, 61–70.
- Liu, C., Guo, Y., Liu, D., Guan, W., & Ma, Y. (2010). Establishment and characterization of fibroblast cell line derived from Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Biopreservation and Biobanking*, 8, 99–105.
- Loecker, W., Koptelov, V. A., Grischenko, V. I., & De Loecker, P. (1998). Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation. *Cryobiology*, 37, 103–109.
- Magalhaes, L. C., Bhat, M. H., Freitas, J. L., Melo, L. M., Teixeira, D. I., Pinto, L. C., Câmara, L. M. C., Duarte, J. M.B., & Freitas, V. J. (2017). The effects of cryopreservation on different passages of fibroblast cell culture in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Biopreservation and Biobanking*, 15, 463–468.
- Mammone, T., Gan, D., & Foyouzi-Youssefi, R. (2006). Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell Biology International*, 30, 903–909.
- Oliveira, L. R. M., Praxedes, E. A., Silva, M. B., Ribeiro, L. R., Silva, H. V. R., & Pereira, A. F. (2020). Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, in press.
- Paviolo, A., Angelo, C., Ferraz, K. M. P. M. B., Morato, R. G., Pardo, J. M., Srbeek-Araujo, A. C., ... & Azevedo, F. (2016). A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. *Scientific Reports*, 6, 37147.

- Pereira, A. F., Borges, A. A., Santos, M. V. O., & Lira, G. P. O. (2019). Use of cloning by nuclear transfer in the conservation and multiplication of wild mammals. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 43, 242–247.
- Pfeuty, A., & Gueride, M. (2000). Peroxide accumulation without major mitochondrial alteration in replicative senescence. *FEBS letters*, 468, 43–47.
- Popovic, E. A., Kaye, A. H., & Hill, J. S. (1996). Photodynamic therapy of brain tumors. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 14, 251–261.
- Praxedes, E. A., Borges, A. A., Santos, M. V. O., & Pereira, A. F. (2018). Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biology*, 37, 258–263.
- Praxedes, E. A., Oliveira, L. R. M., Silva, M. B., Borges, A. A., Santos, M. V. O., Silva, H. V. R., Oliveira, M. F., Silva, A. R., & Pereira, A. F. (2019). Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – an alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology*, 88, 15–22.
- Praxedes, E. A., Queiroz Neta, L. B., Borges, A. A., Silva, M. B., Santos, M. V.O., Ribeiro, L. R., Silva, H. V. R., & Pereira, A. F. (2020). Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 49, 121–129.
- Quigley, H., Foster, R., Petracca, L., Payan, E., Salom, R. & Harmsen, B. *Panthera onca* (errata version published in 2018). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T15953A123791436. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en>. Downloaded on 23 January 2020.
- Roth, V. (2006). Available at: <http://www.doubling-time.com/compute.php>. Accessed date: 15 October 2019.
- Rueda-Zozaya, P., Mendoza-Martínez, G. D., Monroy-Vilchis, O., Godoy, J. A., Sunny, A., Palomares, F., Chavez, C., & Herrera-Haro, J. (2016). Genetic variability and structure of jaguar (*Panthera onca*) in Mexican zoos. *Genetica*, 144, 59–69.
- Santos, M. V. O., Nascimento, L. E., Praxedes, E. A., Borges, A. A., Silva, A. R., Bertini, L. M., & Pereira, A. F. (2019). *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine

1514 oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, 128, 74–
1515 80.

1516 Santos, M. V. O., Borges, A. A., Queiroz Neta, L. B., Bertini, L. M., & Pereira, A. F. (2018). Use of
1517 natural antioxidants in *in vitro* mammalian embryo production. *Semina: Ciências Agrárias*, 39,
1518 431–444.

1519 Silva, H. V. R., Nunes, T. G. P., Brito, B. F., Campos, L. B., Silva, A. M. D., Silva, A. R., Comizzoli,
1520 & Silva, L. D. M. D. (2019a). Influence of different extenders on morphological and functional
1521 parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology*, 19, 30195-6.

1522 Silva, H. V. R., Silva, A. R., Silva, L. D. M., & Comizzoli, P. (2019b). Semen cryopreservation and
1523 banking for the conservation of neotropical carnivores. *Biobanking and Biopreservation*, 17, 183–
1524 188.

1525 Silver, S. C., Ostro, L. E., Marsh, L. K., Maffei, L., Noss, A. J., Kelly, M. J., Robert, B., & Wallace,
1526 H. G. A. G. The use of camera traps for estimating jaguar *Panthera onca* abundance and density
1527 using capture/recapture analysis. *Oryx*, 38, 148–154, 2004.

1528 Subramanian, J., Aulakh, R. P., Grewal, P. S., Sanford, M., Pynn, A. F., & Yuk, I. H. (2018). Short-
1529 and long-term effects on mAb-producing CHO cell lines after cryopreservation. *Biotechnology*
1530 *Progress*, 34, 463–477.

1531 Surolia, R., Li, F. J., Wang, Z., Li, H., Dsouza, K., Thomas, V., Mirov, S., Pérez-Sala, D., Athar, M.,
1532 Thannickal, V. J., & Antony, V. B. (2019). Vimentin intermediate filament assembly regulates
1533 fibroblast invasion in fibrogenic lung injury. *JCI insight*, 4, 123253.

1534 Tian, X. C., Kubota, C., Enright, B., & Yang, X. (2003). Cloning animals by somatic cell nuclear
1535 transfer biological factors. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 98.

1536 Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2011). Apoptosis and beyond:
1537 cytometry in studies of programmed cell death. In *Methods in Cell Biology*, Academic Press. 103,
1538 55–98,

1539 Yelisetti, U. M., Komjeti, S., Katari, V. C., Sisinthy, S., & Brahmasani, S. R. (2016). Interspecies
1540 nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected *postmortem* as

1541 donor cells and rabbit oocytes as recipients. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*,
1542 52, 632–645.

1543 Zhou, G. B., Meng, Q.G., & Li, N. (2010). *In vitro* derivation of germ cells from embryonic stem
1544 cells in mammals. *Molecular Reproduction and Development*, 77, 586–594.

1545 **TABLE**

1546

1547 **Table 1.** Evaluation of number of passages on the apoptosis levels in cryopreserved cells derived from jaguars.

Passages	Cryopreserved cells and cultured after same passages			
	Viable (%)	Initial apoptotic (%)	Late apoptotic (%)	Necrotic (%)
one	50.1 ± 2.5 ^a	23.3 ± 2.0 ^a	9.7 ± 2.5 ^a	0.7 ± 0.1 ^a
three	59.3 ± 2.9 ^a	29.3 ± 2.5 ^a	10.7 ± 2.7 ^a	0.7 ± 0.2 ^a
ten	30.4 ± 5.7 ^b	34.0 ± 10.4 ^a	13.5 ± 4.7 ^a	1.0 ± 0.3 ^a

1548 ^{a,b}: $p < 0.05$.

1549

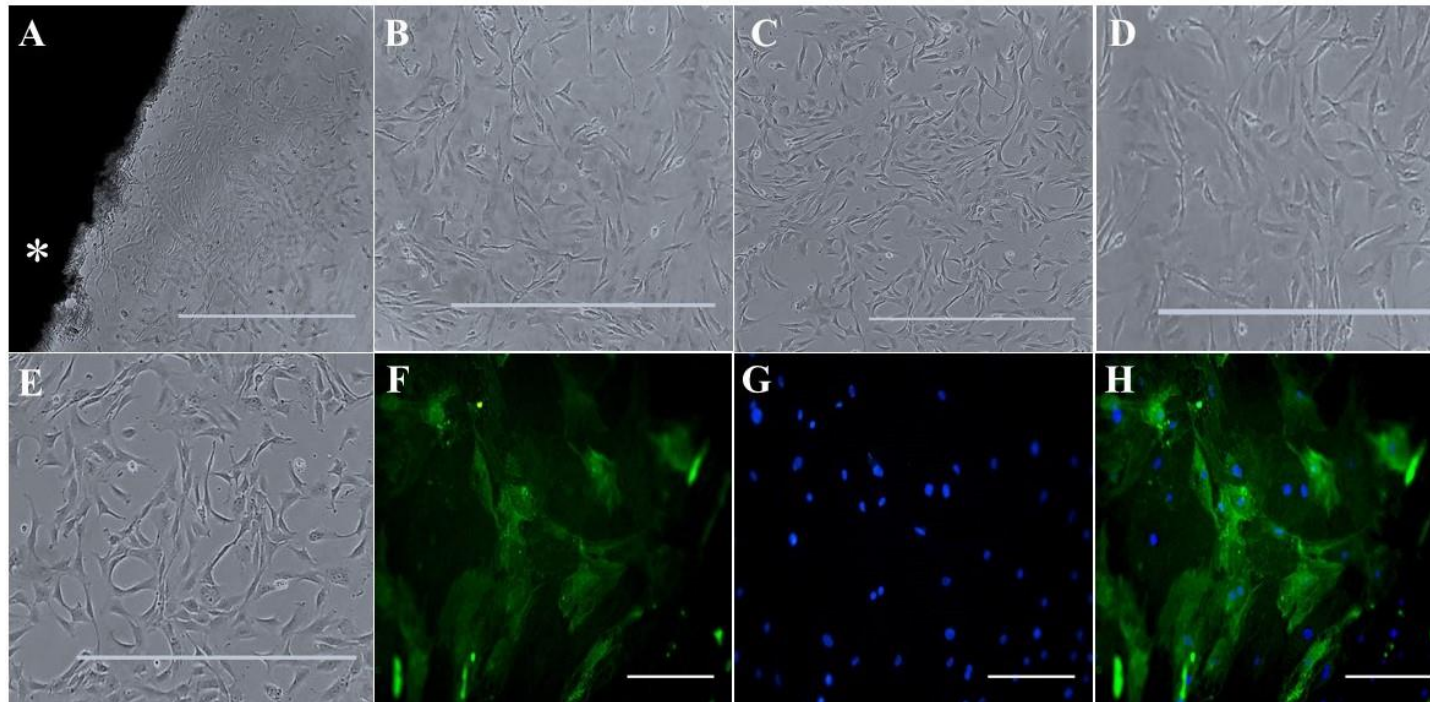
1550

1551

1552

1553

1554 **FIGURES**



1565 **Figure 1.** Establishment of jaguar fibroblasts derived from primary and secondary cultures of peripheral ear skin. **(A)** Tissue cultured *in vitro*
 1566 presenting cell detachment. Asterisk indicates tissue. **(B, C, and D)** Cells derived from first, third and tenth passages during *in vitro* culture,
 1567 presenting fusiform aspect. **(E)** Cells after the cryopreservation by slow freezing. **(F)** Positive confirmation of fibroblasts by cell marking for
 1568 intermediate vimentin. **(G)** Counter-labeled cells with Hoechst 33342. **(H)** Image overlay in (F) and (G). Scale bar of 50 μ m. In A, B, C, D, and E:
 1569 magnification 10 $\times$. In F, G and H: magnification 20 $\times$.

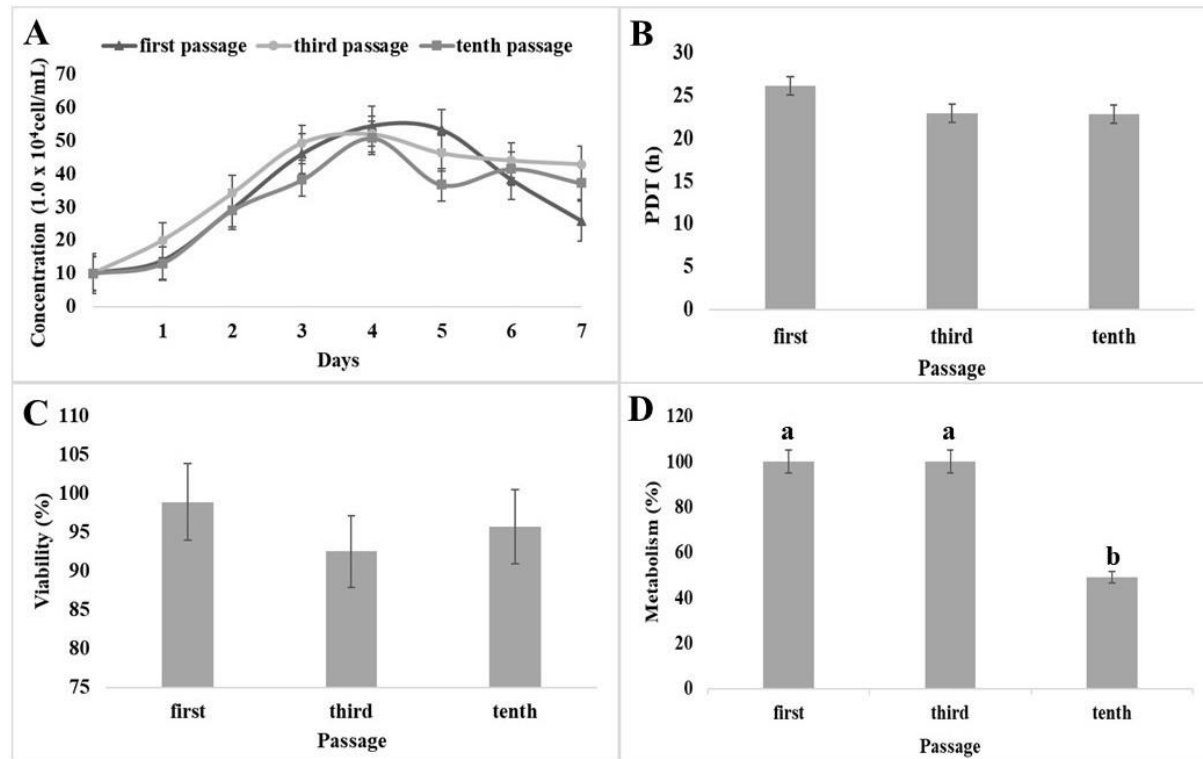


Figure 2. Evaluation of *in vitro* culture conditions on the establishment of fibroblasts derived from the skin of jaguars. **(A)** Assessment of the proliferative activity of cells derived from first, third and tenth passages through the development of growth curves. **(B)** Values of Population Doubling Time (PDT) of cells derived from first, third and tenth passages after seven days of analysis. **(C)** Assessment of the viability using Trypan blue in cells derived from first, third and tenth passages. **(D)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in cells derived from first, third and tenth passages. ^{a,b}: $p < 0.05$.

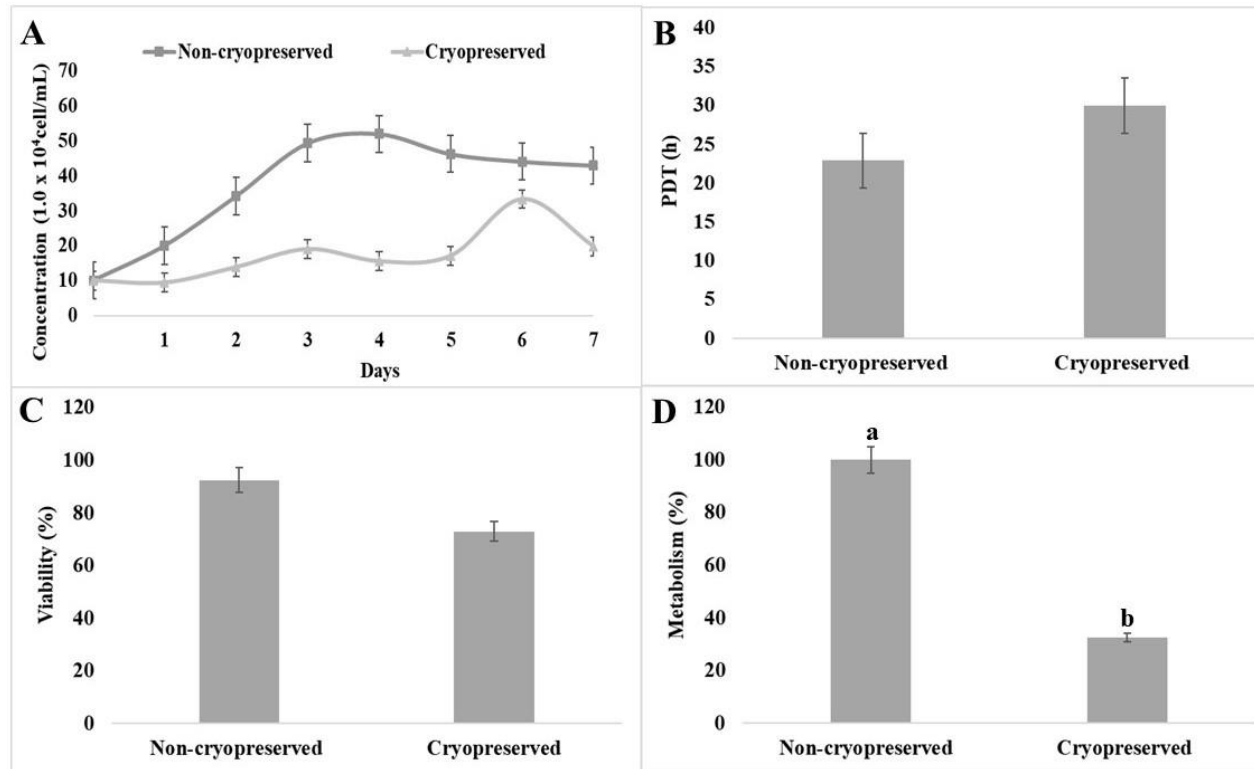


Figure 3. Evaluation of cryopreservation conditions on the establishment of fibroblasts derived from the skin of jaguars. **(A)** Assessment of the proliferative activity of non-cryopreserved and cryopreserved cells through the development of growth curves. **(B)** Values of Population Doubling Time (PDT) of cells derived from non-cryopreserved and cryopreserved cells after seven days of analysis. **(C)** Assessment of the viability using Trypan blue in non-cryopreserved and cryopreserved cells. **(D)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in non-cryopreserved and cryopreserved cells. ^{a,b}; $p < 0.05$.

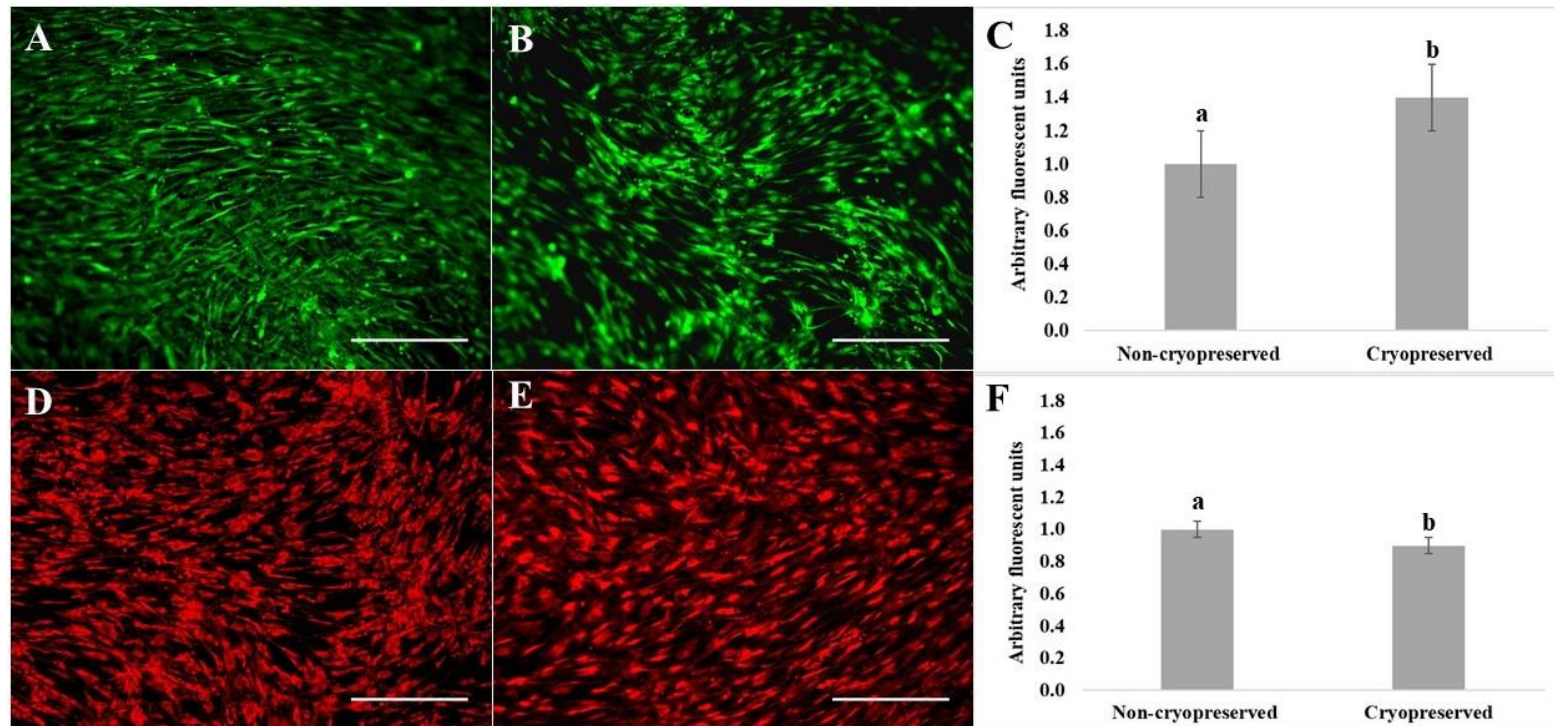


Figure 4. Evaluation of cryopreservation conditions on the establishment of jaguar fibroblasts. **(A)** Measurement of ROS levels in non-cryopreserved cells using H₂DCFDA probe. **(B)** Measurement of ROS levels in cryopreserved cells using H₂DCFDA probe. **(C)** Levels of ROS in non-cryopreserved and cryopreserved cells. **(D)** Quantification of $\Delta\Psi_m$ in non-cryopreserved cells using CMXRos probe. **(E)** Quantification of $\Delta\Psi_m$ in cryopreserved cells using CMXRos probe. **(F)** $\Delta\Psi_m$ in non-cryopreserved and cryopreserved cells. Scale bar of 50 μ m. In A, B, D, and E: magnification 10 $\times$. ^{a,b}: $p < 0.05$.

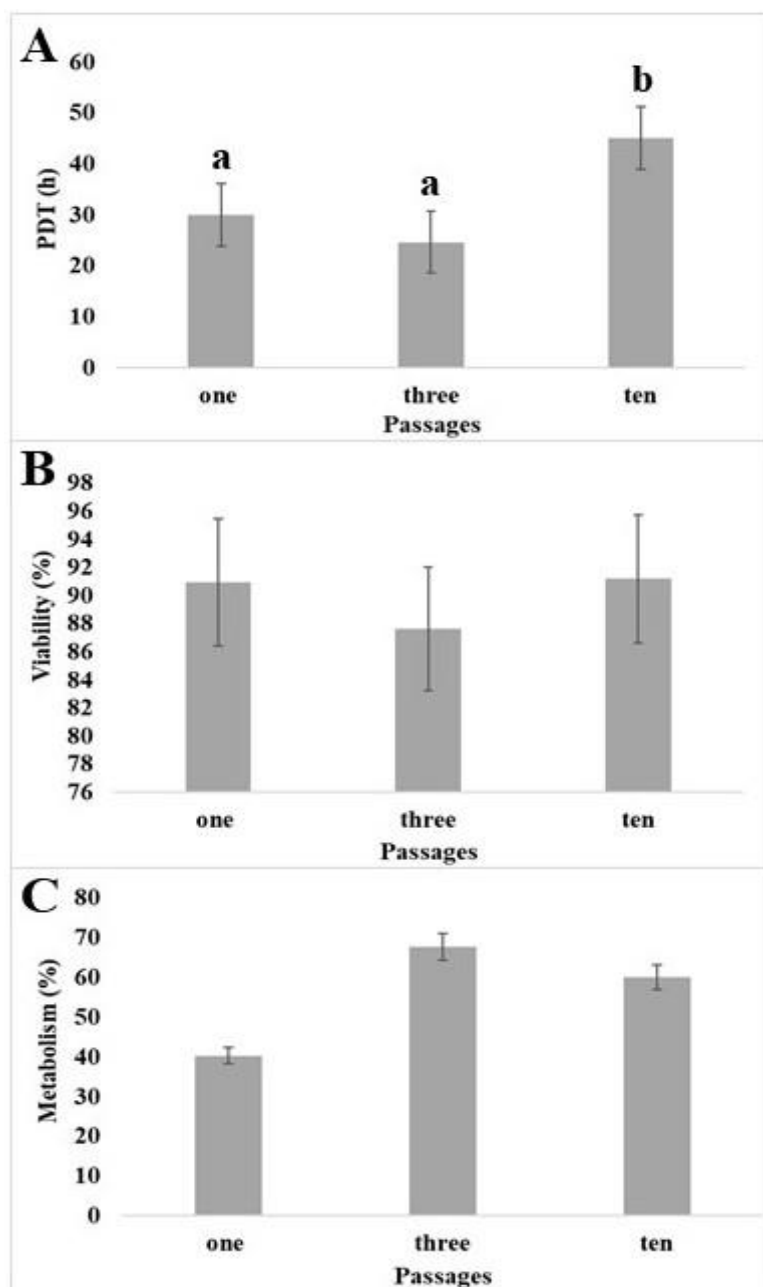


Figure 5. Evaluation of number of passages on the proliferative activity, viability, and metabolism in cryopreserved cells derived from jaguar skin. **(A)** Assessment of the proliferative activity of cryopreserved cells after one, three and ten passages by determination of Population Doubling Time (PDT) values. **(B)** Assessment of the viability using Trypan blue in cryopreserved cells after one, three and ten passages. **(C)** Evaluation of the metabolism using MTT assay in cryopreserved cells after one, three and ten passages. ^{a,b}: $p < 0.05$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho descreveu o estabelecimento de cinco linhagens fibroblásticas recuperadas de tecidos da pele do pavilhão auricular apical de onças-pintadas, por meio do isolamento, caracterização e criopreservação celular. Assim, foi possível a obtenção de linhagens fibroblásticas viáveis, com viabilidade celular e atividade proliferativa adequadas. Além disso, células obtidas a partir da décima passagem apresentam metabolismo reduzido.

Portanto, esse estudo compreendeu a primeira etapa necessária para a obtenção de linhagens celulares viáveis, avaliando as condições de manipulação *in vitro* e criopreservação destas células, objetivando garantir a qualidade celular e a conservação desse recurso genético, visando a sua aplicação na conservação de onças-pintadas. Esses resultados irão contribuir para diferentes finalidades, como nas etapas sequenciais e necessárias para a realização da clonagem, que consiste na sincronização do ciclo celular nos estágios G0/G1 e na reprogramação nuclear, além da produção de células induzidas a pluripotência, visando a produção de gametas *in vitro*.

1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685

1686
1687
1688
1689
1690

1691
1692

1693
1694

1695
1696
1697

1698
1699
1700

1701
1702
1703
1704
1705

ANEXOS

ANEXO No. 01: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DE REVISÃO:
ESTABLISHMENT OF CELL LINES IN WILD FELIDS – A REVIEW OF THE EFFECTS
OF CULTURE AND CRYOPRESERVATION CONDITIONS ON CELL QUALITY A
REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL 05 – MAR – 2020.



Alexsandra Fernandes Pereira <alexandra.pereira@ufersa.edu.br>

RBRA 878 Rev Bras Reprod Anim - confirma recebimento artigo

1 mensagem

RBRA <rbr@cbra.org.br>
Para: Alexsandra Fernandes Pereira <alexandra.pereira@ufersa.edu.br>

5 de março de 2020 16:35

Prezado(a) Autor(a), Alexsandra Fernandes Pereira
alexandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebemos o manuscrito "**Estabelecimento de linhagens celulares em felídeos silvestres – Uma revisão dos efeitos das condições de cultivo e criopreservação sobre a qualidade celular - RB878**", submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal. O trabalho será enviado para a análise do Corpo Editorial e faremos contato tão logo tenhamos uma posição sobre a situação corrente do mesmo.

Atenciosamente,
Secretaria das Publicações/RBRA

1726 ANEXO No. 02: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO EXPERIMENTAL:
 1727 EVALUATION OF THE DAMAGE CAUSED BY *IN VITRO* CULTURE AND
 1728 CRYOPRESERVATION TO DERMAL FIBROBLASTS DERIVED FROM JAGUARS: AN
 1729 APPROACH TO CONSERVATION THROUGH BIOBANKS A REVISTA ZOO BIOLOGY
 1730 07 – FEV – 2020.

07-Feb-2020

Dear Dr Pereira,

Your manuscript entitled "Evaluation of the damage caused by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Zoo Biology.

Your manuscript number is ZOO-20-027. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/zoo>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Zoo Biology.

Sincerely,
 Zoo Biology Editorial Office

1731

CERTIFICATE OF ENGLISH EDITING							
This document certifies that the paper listed below has been edited to ensure that the language is clear and free of errors. The edit was performed by professional editors at Editage, a division of Cactus Communications. The intent of the author's message was not altered in any way during the editing process. The quality of the edit has been guaranteed, with the assumption that our suggested changes have been accepted and have not been further altered without the knowledge of our editors.							
TITLE OF THE PAPER Evaluation of the damage caused by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks							
AUTHORS MB Siva, EA Praxedes, AA Borges, LRM Oliveira, MB Nascimento, HVR Silva, AR Silva, AF Pereira							
JOB CODE LEESP_15							
	Signature  Vikas Narang, Chief Operating Officer, Editage						
Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 500 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery.	Date of Issue February 07, 2020  						
Contact Editage <table border="0"> <tr> <td>Worldwide request@editage.com +1 877-334-8243 www.editage.com</td> <td>Japan submissions@editage.com +81 03-6968-3348 www.editage.jp</td> <td>Korea submit-korea@editage.com 1544-8241 www.cditage.co.kr</td> <td>China fabiao@editage.cn 400-005-6055 www.editage.cn</td> <td>Brazil contato@editage.com 0800-852-20-97 www.editage.com.br</td> <td>Taiwan submit@editage.com 02 2657 0306 www.editage.com.tw</td> </tr> </table>		Worldwide request@editage.com +1 877-334-8243 www.editage.com	Japan submissions@editage.com +81 03-6968-3348 www.editage.jp	Korea submit-korea@editage.com 1544-8241 www.cditage.co.kr	China fabiao@editage.cn 400-005-6055 www.editage.cn	Brazil contato@editage.com 0800-852-20-97 www.editage.com.br	Taiwan submit@editage.com 02 2657 0306 www.editage.com.tw
Worldwide request@editage.com +1 877-334-8243 www.editage.com	Japan submissions@editage.com +81 03-6968-3348 www.editage.jp	Korea submit-korea@editage.com 1544-8241 www.cditage.co.kr	China fabiao@editage.cn 400-005-6055 www.editage.cn	Brazil contato@editage.com 0800-852-20-97 www.editage.com.br	Taiwan submit@editage.com 02 2657 0306 www.editage.com.tw		

1732