



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**KARINNE YÁSCARA PEREIRA AMORIM**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES  
CRIOPROTETORAS NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
JAGUATIRICA, *Leopardus pardalis* (LINNAEUS, 1758)**

**MOSSORÓ-RN**

**2023**

**KARINNE YÁSCARA PEREIRA AMORIM**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES SOLUÇÕES  
CRIOPROTETORAS NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
JAGUATIRICA, *Leopardus pardalis* (LINNAEUS, 1758)**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira

**MOSSORÓ–RN**

**2023**

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, 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 tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

AA524 Amorim, Karinne Yáscara Pereira .  
a Avaliação da eficiência de diferentes soluções  
crioprotetoras na conservação de células somáticas  
de jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Linnaeus,  
1758) / Karinne Yáscara Pereira Amorim. – 2023.  
52 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.  
Coorientadora: Luanna Lorena Vieira Rodrigues.  
Monografia (graduação) – Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,  
2023.

1. Congelação lenta. 2. Biobancos de células  
somáticas. 3. Felídeos silvestres. I. Pereira,  
Alexsandra Fernandes, orient. II. Rodrigues,  
Luanna Lorena Vieira, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade  
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência  
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva  
CRB: 15/120

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.

KARINNE YÁSCARA PEREIRA AMORIM

**USO DE DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA CONSERVAÇÃO DE  
CÉLULAS SOMÁTICAS DE JAGUATIRICA, *Leopardus pardalis* (LINNAEUS, 1758)**

Monografia apresentada à Universidade Federal  
Rural do Semi-Árido como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 26/09/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Alexsandra  
Fernandes Pereira**

Assinado de forma digital por  
Alexsandra Fernandes Pereira  
Dados: 2023.10.18 10:12:42 -03'00'

---

Prof. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira

Presidente e Orientadora



---

Profa. Dra. Thaís Thatiane dos Santos Souza

Membro Examinador



Documento assinado digitalmente  
**LUANNA LORENNIA VIEIRA RODRIGUES**  
Data: 20/10/2023 09:06:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Mestre em Ciência Animal Luanna Lorennia Vieira Rodrigues

Membro Examinador

## AGRADECIMENTOS

À minha mainha Jucilene Sabino Pereira, por ser essa mulher inspiradora e me ensinar a nunca desistir dos meus sonhos. Foi a senhora que me ensinou a ser forte, mesmo sendo chorona; a ser divertida, mesmo estando tendo um dia ruim; a dar valor as pequenas coisas, mesmo perto de coisas gigantes. Obrigada por ser meu banco de apoio quando tudo parece desmoronar e minha platéia em todas as minhas conquistas. Te além, Ju!

Ao meu painho Erinaldo Freire de Amorim, por todo o apoio, investimento, conselhos e ensinamentos, por acreditar em mim. Foi o senhor que me incentivou a não largar tudo, lembrando que não tinha nada (piada interna), agora posso dizer que tenho alguma coisa (risos). Tenho orgulho em dizer que sou filha de Erinaldo e de herdar a sua vontade de conquistar as coisas com meu próprio suor e esforço. Te amo, Eri!

À minha avó Ozinete Sabino da Silva, por sempre se preocupar com minha alimentação e bem-estar no meio a correria das idas e voltas à universidade, por ser inspiração de mulher forte e decidida. Te amo, Dona Rosa! Ao meu parceiro, amigo e amor Kaio Eduardo da Silva Pereira, por todo o apoio e incentivo, por estar sempre comigo e fazer parte da minha vida. É nós, 'lek'! A minha irmã de coração, Vitória Alves, minha inspiração de escrita e criatividade, que aguentou meus desabafos quando achei que tudo ia desabar, que me alegra e me incentiva a correr atrás dos meus sonhos. Amo você, V!

Às minhas “Aprovadas em Biocel” Yasmin Beatriz França Moura e Samara Lima Olindo, vocês foram de suma importância para a conclusão dessa graduação. Masmin, você é minha irmã sereia, que me inspira, ilumina tudo ao seu redor e que sempre foi minha luz no fim do túnel durante todas as escuridões que apareceram durante essa graduação, à você minha eterna gratidão! Sam, você é um exemplo de organização, esforço, dedicação e também diversão, me inspirou muito durante todo esse tempo. Vocês duas são presentes que a Biotecnologia me trouxe e que levarei para sempre. Obrigada por todas as trocas de conhecimento, por terem aguentado todos esses anos comigo e por terem me ajudado nos experimentos. Amo vocês!

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Luanna Lorena Vieira Rodrigues, por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho, por todos os ensinamentos, conversas e apoio, por ter sido muito acolhedora e compreensiva. Ao João Vitor da Silva Viana que se tornou um amigo e confidente pelo qual tenho um carinho enorme, juntamente com à Antonia Beatriz Mendonça Pereira por toda ajuda nos experimentos e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Além disso, agradeço a todos os outros que formam o Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), fazendo dele uma verdadeira família.

À minha ilustre orientadora, Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, por ser inspiração de

foco, gentileza e determinação. Obrigada por todos os ensinamentos, cobranças, incentivos, paciência, pela oportunidade de ser sua orientanda e por ser essa pessoa incrível. Muito obrigada mesmo!

À instituição que fez tudo isso possível, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), assim como o corpo docente do curso de Biotecnologia, que repassaram conhecimentos de diferentes áreas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) pela Bolsa de Iniciação Científica.

À banca avaliadora formada por Profa. Dra. Thaís Thatiane dos Santos Souza e a Mestre em Ciência Animal Luanna Lorena Vieira Rodrigues por todas as considerações, sugestões e pelo tempo que dedicaram na leitura deste trabalho visando sempre melhorá-lo. Obrigada pela disponibilidade e gentileza.

Finalmente, à mim mesma por toda coragem e esforço e à Deus por ser meu guia em todos os momentos da minha vida.

*Eu faço da dificuldade a minha motivação,  
a volta por cima vem na continuação. O  
que se leva dessa vida é o que se vive e o  
que se faz.*

*(Charlie Brown Jr)*

## RESUMO

A jaguatirica, maior espécie de pequenos felinos do Brasil, é um carnívoro de grande importância ecológica. No Brasil, esta espécie se encontra em risco de extinção e a formação de biobancos de recursos somáticos representa uma ferramenta para a conservação da espécie. Contudo, existem fatores que podem afetar o sucesso desses bancos, como a solução de criopreservação empregada. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito do tipo de crioprotetor intracelular, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG), na presença ou ausência de um crioprotetor extracelular, a sacarose (SAC), sobre a morfologia, viabilidade e atividade metabólica de células somáticas após a descongelação. Para tanto, amostras de pele do pavilhão auricular apical foram recuperadas de uma jaguatirica encontrada no centro da cidade de Mossoró e levada ao hospital veterinário, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). No laboratório, as amostras foram cultivadas até obtenção de células somáticas. Em seguida, células foram criopreservadas por congelamento lento em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco com 10% de soro fetal bovino, de acordo com os grupos: 10% de EG (grupo EG), 10% de DMSO (grupo DMSO), 5% de EG + 5% de DMSO (grupo EG-DMSO), 10% de EG + 0,2 M de SAC, 10% de DMSO + 0,2 M de SAC, 5% de EG + 5% de DMSO + 0,2 M de SAC. Células não submetidas à criopreservação foram usadas como controle (grupo controle). Após duas semanas, células foram descongeladas e submetidas à análise morfológica usando microscopia invertida, viabilidade usando o ensaio de azul de tripan e atividade metabólica pelo ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de quatro repetições. Para todas as análises foi utilizado o software Graphpad InStat 3.06, onde todos os resultados foram analisados por ANOVA seguido de teste Tukey ou teste t não pareado. A significância foi definida em  $P < 0,05$ . Quanto à morfologia, as células do grupo não criopreservado mantiveram um padrão de confluência, variando entre 75–100%, enquanto os grupos submetidos à criopreservação demonstraram confluências de no máximo 40%. Quanto à viabilidade, não houve diferença entre os grupos criopreservados, variando entre  $53,1 \pm 10,4\%$  e  $79,6 \pm 3,0\%$ , e grupo não criopreservado ( $85,2 \pm 6,1\%$ ). Já em relação à atividade metabólica, os grupos criopreservados variaram entre  $71,3 \pm 36,9\%$  e  $100 \pm 36,9\%$  não diferiram do grupo não criopreservado ( $100 \pm 13,4\%$ ). Em conclusão, todas as combinações de soluções crioprotetoras utilizadas nesse estudo mostraram eficácia, mesmo com a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares (EG e DMSO) na presença ou não do crioprotetor extracelular (SAC). Assim, as informações denotadas por este estudo visam contribuir para a conservação da jaguatirica, uma vez que essas células podem ser empregadas em técnicas de reprodução assistida.

**Palavras-chave:** congelamento lento, biobancos de células somáticas, felídeos silvestres.

## ABSTRACT

The ocelot, the largest small felines species in Brazil, is a carnivore that has a great ecological importance. In Brazil, this species is endangered and the formation of somatic resources cryobanks could be a useful tool for the species conservation. Nevertheless, some factors can affect the success of these banks, such as the cryopreservation solution employed. Therefore, the aim was to evaluate the effect of the type of intracellular cryoprotectant, dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), in the presence or absence of an extracellular cryoprotectant, sucrose (SUC), on the morphology, viability and metabolic activity of somatic cells after thawing. Then, ear skin samples were recovered from an ocelot found in Mossoró and taken to the veterinary hospital, of Federal Rural University of the Semi-Arid. In the laboratory, the samples were cultured until somatic cells were obtained. After, cells were cryopreserved by slowly frozen in medium containing minimal essential medium modified by Dulbecco with 10% fetal bovine serum, 10% DMSO and 0.2 M SUC, according to groups: 10% EG (EG group), 10% DMSO (DMSO group), 5% EG + 5% DMSO (EG-DMSO group), 10% EG + 0.2 M SUC, 10% DMSO + 0.2 M SUC, 5% EG + 5% DMSO + 0.2 M SUC. Cells not subjected to cryopreservation were used as a control (control group). After two weeks, cells were thawed and subjected to morphological analysis using inverted microscopy, viability using the trypan blue assay, and metabolic activity using the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide assay tetrazolium] (MTT). All data were expressed as mean  $\pm$  standard error of four replicates. For all analyses, Graphpad Instat 3.06 software was used, where all results were analyzed by ANOVA followed by Tukey test or unpaired t test. Significance was defined at  $P < 0.05$ . For morphology, the cells in the non-cryopreserved group maintained a confluence pattern, varying between 75–100%, while the groups subjected to cryopreservation showed confluences of a maximum of 40%. For viability, there was no difference among the cryopreserved groups, ranging from  $53.1 \pm 10.4\%$  and  $79.6 \pm 3.0\%$ , and the non-cryopreserved group ( $85.2 \pm 6.1\%$ ). Regarding metabolic activity, the cryopreserved groups ranging between  $71.3 \pm 36.9\%$  and  $100 \pm 36.9\%$  did not differ from the non-cryopreserved group ( $100 \pm 13.4\%$ ). In conclusion, all combinations of cryoprotectant solutions used in this study showed efficacy, even with the reduction in the concentration of intracellular cryoprotectants (EG and DMSO) in the presence or absence of extracellular cryoprotectant (SUC). Thus, the information denoted by this study aims to contribute to the conservation of the ocelot, since these cells can be used in assisted reproduction techniques.

**Keywords:** slow freezing, somatic cell cryobanks, wild felids.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Exemplar de jaguatirica no Parque das Neblinas do município de Bertoga do estado de São Paulo.....                                                                                                                                               | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Distribuição geográfica da jaguatirica.....                                                                                                                                                                                                      | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Coleta, processamento, avaliação da morfologia, viabilidade e atividade metabólica de células somáticas de jaguatirica submetidas a diferentes combinações de crioprotetores durante a congelação lenta.....                                     | 23 |
| <b>Figura 4.</b> Morfologia de células somáticas de jaguatirica do grupo não criopreservado (a), dos grupos de células criopreservadas: com 10% DMSO (b); 10% DMSO + SAC (c); 10% EG (d); 10% EG + SAC (e); 5% EG + 5% DMSO (f); 5% EG + 10% DMSO + SAC (g) ..... | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Avaliação da viabilidade com azul de tripan em células somáticas de jaguatirica criopreservadas em diferentes soluções. ....                                                                                                                     | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Avaliação de diferentes soluções de criopreservação sobre a atividade metabólica de células somáticas derivadas de jaguatirica.....                                                                                                              | 28 |

## LISTA DE QUADRO

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1.</b> Criopreservação de células somáticas em felídeos silvestres empregando diferentes associações de crioprotetores..... | 16 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                               |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| cm              | Centímetro                                                    |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                                            |
| DMEM            | Meio Essencial Mínimo Modificado por<br>Dulbecco              |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido                                              |
| EP              | Erro Padrão                                                   |
| EG              | Etilenoglicol                                                 |
| h               | Hora                                                          |
| ICMBio          | Instituto Chico Mendes de Conservação da<br>Biodiversidade    |
| IUCN            | International Union for Conservation of Nature                |
| LBA             | Laboratório de Biotecnologia Animal                           |
| mg/kg           | Miligrama por quilo                                           |
| min             | Minuto                                                        |
| mL              | Militro                                                       |
| mL/kg           | Mililitro por quilo                                           |
| Mm              | Milímetro                                                     |
| mm <sup>2</sup> | Milímetro quadrado                                            |
| mm <sup>3</sup> | Milímetro cúbico                                              |
| MTT             | Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5<br>difeniltetrazólio |
| nm              | Nanômetro                                                     |
| n°              | Número                                                        |
| °C              | Graus Celsius                                                 |
| PBS             | Solução tampão fosfato                                        |
| pH              | Potencial hidrogeniônico                                      |
| RN              | Rio Grande do Norte                                           |
| SAC             | Sacarose                                                      |

SFB

Soro Fetal Bovino

UFERSA

Universidade Federal Rural do Semi-Árido

v

Volume

$\mu\text{L}$

Microlitro

$\mu\text{m}$

Micrômetro

$\mu\text{m}^2$

Micrômetro quadrado

## LISTA DE SÍMBOLOS

|   |               |
|---|---------------|
| * | Asterisco     |
| ° | Grau          |
| ± | Mais ou menos |
| % | Porcentagem   |
| x | Vezez         |

## SUMÁRIO

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                      | <b>6</b>  |
| <b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                                                           | <b>8</b>  |
| 2.1 Aspectos ecológicos e biotecnologias desenvolvidas para a conservação da jaguatirica ..... | 8         |
| 2.2 Estado da arte da conservação de recursos somáticos em felídeos silvestres .....           | 11        |
| 2.3 Criopreservação de células somáticas e os fatores que afetam sua eficiência .....          | 13        |
| 2.3.1 Crioprotetores intracelulares .....                                                      | 15        |
| 2.3.2 Crioprotetores extracelulares .....                                                      | 16        |
| <b>3. HIPÓTESES.....</b>                                                                       | <b>18</b> |
| <b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>                                                                  | <b>19</b> |
| <b>5. OBJETIVOS.....</b>                                                                       | <b>20</b> |
| 5.1 Objetivo geral.....                                                                        | 20        |
| 5.2 Objetivos específicos .....                                                                | 20        |
| <b>6. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                             | <b>21</b> |
| 6.1 Bioética e locais de execução .....                                                        | 21        |
| 6.2 Animal e desenho experimental.....                                                         | 21        |
| 6.3 Biópsia de pele.....                                                                       | 22        |
| 6.4 Criopreservação das células.....                                                           | 22        |
| 6.5 Cultivo <i>in vitro</i> e avaliações.....                                                  | 23        |
| 6.5.1 Avaliação morfológica e viabilidade .....                                                | 23        |
| 6.5.2 Avaliação da atividade metabólica .....                                                  | 24        |
| 6.6 Análise estatística.....                                                                   | 24        |
| <b>7. RESULTADOS .....</b>                                                                     | <b>25</b> |
| 7.1 Avaliação morfológica e viabilidade .....                                                  | 25        |
| 7.2 Avaliação da atividade metabólica.....                                                     | 26        |
| <b>8. DISCUSSÃO.....</b>                                                                       | <b>27</b> |
| <b>9. CONCLUSÃO.....</b>                                                                       | <b>31</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                         | <b>32</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A jaguatirica é uma das espécies de mamíferos pertencente à família *Felidae* e à ordem Carnívora (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Sua distribuição geográfica é bastante ampla, ocorrendo em todo o continente americano, desde o sul do Texas ao norte da Argentina. No Brasil, a jaguatirica compreende diversas áreas do país, desde regiões florestadas à semiáridas, como a Caatinga (OLIVEIRA; CASSARO, 1999, MURRAY; GARDNER, 1997).

Contudo, a jaguatirica foi inserida na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), sendo listada como pouco preocupante (PAVIOLO et al., 2015). Em geral, todos os felídeos silvestres estão sofrendo perda de habitat, fragmentação e outras pressões antrópicas, como colisões de veículos, comércio ilegal e morte por retaliação em virtude da depredação de pequenos animais (PAVIOLO et al., 2015). Além disso, a crescente expansão populacional humana tem ocasionado uma inevitável fragmentação dos biomas e isolamento de populações silvestres (DUEÑAS et al., 2017).

Devido a todos esses fatores citados, estratégias de conservação têm sido desenvolvidas para auxiliar na manutenção da diversidade genética desses animais (SANDERSON et al., 2002), especialmente a formação de biobancos a partir da criopreservação de células somáticas por congelamento lenta (MACHADO et al., 2016). Essa ferramenta possui grande valor para a conservação de espécies silvestres, uma vez que células somáticas são mais fáceis de se obter do que outros tipos celulares, como as células reprodutivas (PEREIRA et al., 2021).

Para que essa ferramenta seja empregada de maneira eficiente são utilizados crioprotetores categorizados como penetrantes ou intracelulares, os quais são caracterizados por sua ligação com água e ação na redução do tamanho e na formação dos cristais de gelo (MORO et al., 2015); e como não-penetrantes ou extracelulares, os quais são responsáveis por aumentar a osmolaridade do meio externo celular, reduzindo a formação dos cristais de gelo (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Os crioprotetores intracelulares mais empregados na criopreservação de amostras somáticas são o etilenoglicol (EG) (OLIVEIRA et al., 2021) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (LEÓN-QUINTO et al., 2009). Enquanto a sacarose (SAC) e o soro fetal bovino (SFB) são os crioprotetores extracelulares mais utilizados (LEÓN-QUINTO et al., 2009).

Em células somáticas, tanto o DMSO quanto o EG têm sua capacidade de proteção dependente da espécie e do tipo celular que está sendo investigada (LI et al. 2006). Em geral, o baixo peso molecular do DMSO (78,0 g/mol) e do EG (62,1 g/mol) garantem a alta permeabilidade na célula; contudo, tal permeabilidade pode causar estresse osmótico (SCHNEIDER; MAZUR, 1984), resultando em uma lesão celular. Nesse contexto, o uso do crioprotetor deve ser otimizado para a célula em estudo. Adicionalmente, para minimizar os efeitos da toxicidade dos crioprotetores

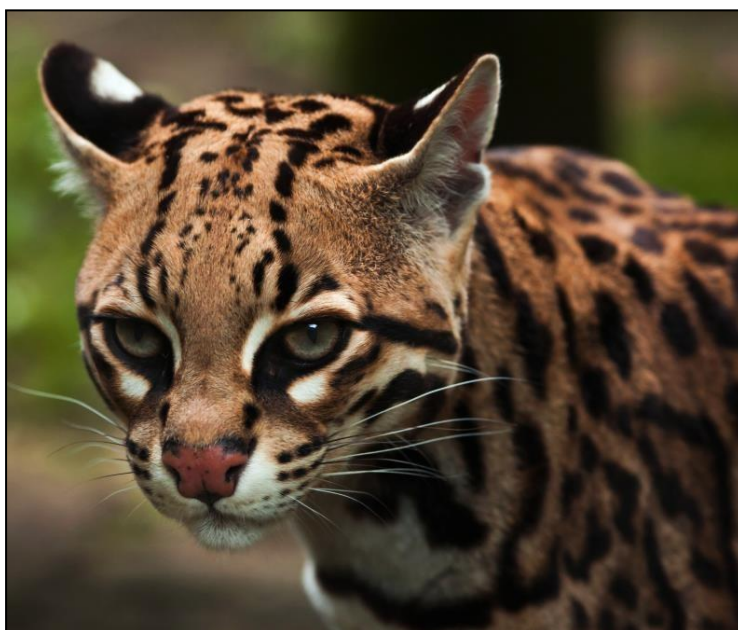
intracelulares, têm sido empregados os crioprotetores extracelulares, como a sacarose e o SFB (LÉON QUINTO et al. 2014).

Portanto, comparar várias combinações de crioprotetores intracelulares e extracelulares mostrará qual será a que mais se adequa as células somáticas de jaguatirica, sendo essa comparação uma etapa fundamental para manter a conservação dos seus recursos somáticos, contribuindo para a conservação da espécie e podendo ser aplicados em técnicas de reprodução assistida, como a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e a indução de células a pluripotência (iPCS).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Aspectos ecológicos e biotecnologias desenvolvidas para a conservação da jaguatirica

A jaguatirica (**Figura 1**) dispõe de uma quantidade considerável de estudos comparado aos demais felídeos neotropicais, tendo uma base ampla de conhecimento sobre seus critérios ecológicos: padrões de atividade (CRAWSHAW; QUIGLEY, 1989; WELLER; BENNETT, 2001; MAFFEI et al., 2005; DI BITETTI et al., 2006; KOLOWSKI; ALONSO, 2010), densidade populacional (TROLLE; KÉRY, 2003; DILLON, 2005; MAFFEI et al., 2005; DILLON; KELLY, 2008; FUSCO-COSTA et al., 2010), habitat (LUDLOW; SUNQUIST, 1987; CRAWSHAW; QUIGLEY, 1989; HAINES et al., 2006; DILLON; KELLY, 2008) e dieta (EMMONS, 1987; MARTINS et al., 2008; ABREU et al., 2008).



**Figura 1.** Exemplar de jaguatirica no Parque das Neblinas do município de Bertiooga do Estado de São Paulo. Fonte: Infoescola.

A densidade populacional da jaguatirica (**Figura 2**) altera de acordo com o ambiente e com o método usado para a estimativa, variando desde 2,3 felídeos/100 km<sup>2</sup> em Belize (DILLON; KELLY, 2007) até 75,2 indivíduos/100 km<sup>2</sup> na Amazônia Peruana (KOLOWSKI; ALONSO, 2010). No Brasil, a jaguatirica é encontrada em todas as regiões, com exceção do sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA; CASSARO, 2005). Ao longo da sua distribuição ela ocorre em uma grande variedade de habitats, estando presentes em ambientes brasileiros com fisionomias do Cerrado, Caatinga, Pantanal e, principalmente, das florestas tropicais e subtropicais (OLIVEIRA;

CASSARO, 2005). Adicionalmente, elas vivem em áreas com densa cobertura vegetal (MURRAY; GARDNER, 1997).



**Figura 2.** Distribuição geográfica da jagatirica. Fonte: Toda Matéria.

Em geral, esses felídeos são hegemonicamente noturnos e crepusculares (EMMONS, 1988; LAACK, 1991), possuem um grau de atividade diurna versátil entre estudos (DI BITETTI et al., 2006), o que sugere o aumento no inverno e em dias chuvosos (MURRAY; GARDNER, 1997). As jagatiricas são predadoras generalistas e oportunistas (ALIAGA-ROSSEL et al., 2006), sua alimentação consiste especialmente em pequenos mamíferos, bem como podem consumir répteis, aves e anfíbios (EMMONS, 1987; ABREU et al., 2008). Ainda, presas com um porte superior ao desse felídeo, como os cervídeos, podem compor sua dieta (DE VILLA MEZA et al., 2002).

A jagatirica apresenta uma grande versatilidade em se tratando dos seus parâmetros ecológicos em distintos ambientes, como sua área de vida e seu padrão de atividade, fazendo com que o número de estudos sobre esta espécie em diferentes regiões aumentem (LUDLOW; SUNQUIST, 1987; CRAUSHAW; QUIGLEY, 1989; KOLOWSKI; ALONSO, 2010). O estudo realizado por Oliveira (2012) considerou três aspectos ecológicos desse animal na Caatinga, sendo dois comportamentais – área de vida e padrão de atividade – e um populacional – razão sexual. Em

virtude disso, os atributos comportamentais apresentados por esse felídeo neste bioma podem ser considerados inadequadas, e pela densidade populacional deste animal ser declinada na área estudada, sendo a suposição das medidas de preservação e manejo podem não ocasionar o resultado almejado.

Há uma diminuição na população desses animais que pode estar sendo ocasionada por ações antrópicas, como a construção de rodovias relacionadas ao emprego de projetos direcionados à agropecuária (SILVEIRA et al., 2010). Além disso, o aumento populacional da humanidade resultou em uma desintegração de biomas e isolamento das espécies, principalmente às terrestres como os felídeos (DUEÑAS et al., 2017), uma vez que são caçadas em virtude dos riscos à saúde humana e a criações domésticas de animais de produção (MENDONÇA et al., 2011), e isso tem provocado sua perda populacional intensificada e rápida.

Segundo o Plano de Ação Nacional (PAN) de Conservação dos Pequenos Felinos, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), outras coações que a jaguatirica enfrenta além da caça são conflitos com expansão agrícola, silvicultura, queima de pastagens e alterações de habitat (PLURALE, 2014). Nesse aspecto, a expansão de estratégias para conservação se torna bastante viável, por visar o estabelecimento do manejo dessas espécies e sua manutenção, como a aplicação das técnicas *ex situ* e *in situ* (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

Em relação as ferramentas *in situ*, estas ocorrem por meio da manutenção do ambiente natural da espécie, sem precisar realocá-la (PIZZUTTO et al., 2021). Tais métodos já foram desenvolvidos em jaguatirica, em especial na região da Amazônia, considerada a área de maior importância para esse objetivo, uma vez que evidencia um território abrangente e natural que fornece meios sustentáveis para a conservação de populações de felídeos (OLIVEIRA et al., 2012). Como exemplo de aplicações da metodologia *in situ* tem-se o estudo realizado por Mendonça (2014) que teve como objetivo estimar a densidade e o tamanho populacional da jaguatirica no Parque Estadual da Serra do Mar, no sudeste do Brasil, por meio do uso de armadilhas fotográficas associadas a modelos espacialmente explícitos de captura-recaptura. A partir das informações obtidas, foi realizada uma avaliação do estado de conservação da população de jaguatirica.

Ainda, tem-se o estudo de Haines et al. (2016), por meio de ferramentas *in situ* com o uso de uma análise de viabilidade populacional com telemetria do Sistema de Posicionamento Global (GPS), observaram que quatro combinações de estratégias de recuperação dos ambientes foram necessárias para a conservação de jaguatiricas nos Estados Unidos. Tais estratégias consistiram na translocação desses felídeos, redução da mortalidade nas estradas de colisões veículo-jaguatirica, proteção e restauração de habitats e estabelecimento de um corredor entre duas populações reprodutoras para reduzir a probabilidade de extinção das jaguatiricas.

Contudo, estratégias *in situ* possuem algumas limitações (SILVA et al., 2008), uma vez que

para a conservação *in situ* são requeridos extensos territórios e o monitoramento destes, bem como a conscientização e contribuição da população (ZARRATE-CHARRY et al., 2010). Sabendo disso, técnicas *ex situ* vêm sendo sugeridas, das quais consistem em dois mecanismos: o *ex situ in vivo* que remete à conservação, realocando as espécies, retirando-as da natureza, e alocando em ambientes controlados por equipes especializadas, objetivando sua reintrodução na natureza (FARHADINIA et al., 2020); e o *ex situ in vitro* que se refere à formação de bancos de amostras de células, tecidos, gametas e embriões, visando o armazenamento a longo prazo e aplicação em biotecnologias (MESTANZA-RÁMON et al., 2020; MUJITABA et al., 2020).

Em jaguatirica, poucos estudos *ex situ in vitro* têm sido realizados com o objetivo de conservação da espécie. Um exemplo é o de Sarti et al. (2011), onde realizaram um estudo sobre o espaço intertubular e descreveram seu arranjo em jaguatirica adulta. Para tal estudo, realizaram a coleta de fragmentos dos testículos de cinco jaguatiricas adultas, provenientes de cativeiro, por meio da biópsia incisional. O compartimento intertubular correspondeu a 19,4% do parênquima, sendo 3,9% ocupado por células de Leydig, tal compartimento apresentou padrão do tipo II e o tecido conjuntivo foi o componente mais abundante do tecido intertubular. Assim, estudar o processo espermatogênico e a morfologias dos testículos pode permitir o estabelecimento dos padrões morfofisiológicos da reprodução assistida, devido ao fornecimento de conhecimento dos aspectos reprodutivos de diferentes espécies, bem como tem como finalidade favorecer o desempenho reprodutivo de animais em cativeiro, fazendo com que haja um aumento no número populacional desses animais.

Portanto, uma das estratégias para conservação genética da jaguatirica seria os bancos de amostras somáticas, especialmente da pele. Em síntese, isso é possível devido ocorrer uma recuperação e estocagem de amostras obtidas a partir de animais vivos ou *post-mortem*, tendo como resultado uma maior diversidade genética da população, como no estudo de Viana et al.(2023) onde foi realizada a comparação de duas diferentes técnicas de criopreservação do tecido somático de jaguatirica, a vitrificação direta em tubos (VDC) e a vitrificação de superfície sólida (VSS), e pode-se concluir que ambas as técnicas de vitrificação podem ser usadas para a conservação da pele de jaguatirica, no entanto a VSS garantiu uma maior qualidade celular após o cultivo *in vitro* desses tecidos na maioria dos parâmetros avaliados, como viabilidade, metabolismo e análise dos níveis de apoptose.

## **2.2 Estado da arte da conservação de recursos somáticos em felídeos silvestres**

A aplicação de bancos de recursos somáticos objetivando a conservação da biodiversidade vem crescendo nos últimos anos (COSTA et al., 2016), particularmente em virtude do crescimento de espécies ameaçadas de extinção e os benefícios da utilização dessas amostras na conservação da população genética (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Além das vantagens que o uso de recursos somáticos possui, há o alcance de um tamanho expressivo de tecidos por animal, sem limitar-se ao

estágio reprodutivo e ao sexo, podendo serem empregadas na multiplicação de indivíduos, utilizando a clonagem por transferência nuclear de célula somática (PRAXEDES et al., 2018). O uso de recursos somáticos também possibilita estudos de reprogramação celular, visando a produção de gametas e multiplicação de indivíduos (PRAXEDES et al., 2018) e pesquisas relativas ao conhecimento das espécies usando análises morfológicas (BORGES et al., 2017).

Em geral, os recursos somáticos podem ser recuperados de animais *in vivo* e *post-mortem* (SILVESTRE et al., 2003). Células somáticas já foram obtidas da pele de diferentes regiões em felídeos silvestres, como da região auricular (WITTAYARAT et al., 2013), abdominal (SUKPARANGSI et al., 2018), inguinal (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016) e tecido muscular esquelético (THONGPHAKDEE et al., 2010), sendo o primeiro amplamente preferível na obtenção destas células, por ser de mais fácil acesso e menos invasivo ao animal (PRAXEDES et al., 2018).

As células de felídeos silvestres, como o tigre-Siberiano (*Panthera tigris altaica*, SONG et al., 2007) e onça-pintada (*Panthera onca*, OLIVEIRA et al., 2021), têm sido criopreservadas por meio da congelação lenta, na qual a temperatura é reduzida de forma gradual e controlada, utilizando baixas concentrações de crioprotetores (PRAXEDES et al., 2018). Ainda, é importante ressaltar que o uso de concentrações elevadas de crioprotetores podem provocar toxicidade para as células, favorecendo modificações na camada lipídica e, conseqüentemente, comprometendo a atividade e sobrevivência celular (PRAXEDES et al., 2019).

Mestre-Citrinovitz et al. (2016) desenvolveram um estudo com onças-pintadas mantidas no território argentino. Nesse estudo, os autores descreveram protocolos de cultivo de fibroblastos e congelação lenta derivados de três fontes teciduais: pele, músculo e cartilagem. Os autores afirmaram apresentar um biobanco com 570 amostras somáticas de 45 espécies ameaçadas de extinção, incluindo a onça-pintada. Portanto, o aprimoramento da criopreservação de células somáticas é fundamental para o estabelecimento de biobancos da espécie.

Oliveira et al. (2021) realizaram a avaliação dos efeitos dos crioprotetores intracelulares (10% de DMSO; 10% de EG) na ausência ou presença de um crioprotetor extracelular (0,2 M de sacarose) sobre a morfologia, confluência, viabilidade e metabolismo de células somáticas derivadas de cinco onças-pintadas pertencentes a zoológicos brasileiros. Como resultados tiveram que as combinações de DMSO na ausência e presença de sacarose foram eficientes na criopreservação de células somáticas desses animais, reduzindo os danos causados pela formação de cristais de gelo. Tais resultados representaram um grande avanço para o estabelecimento de bancos genéticos somáticos para onças-pintadas e corroboraram com os resultados do presente estudo.

Já o estudo realizado por Lira et al. (2021) foi o primeiro a avaliar a capacidade de criopreservação de tecidos somáticos de onça-parda (*Puma concolor*). Com base nas informações obtidas nesse estudo, foi possível estabelecer um biobanco para aprimorar as estratégias de conservação para onça-parda e outros felídeos silvestres, demonstrando que as amostras submetidas à criopreservação foram viáveis e mantiveram a integridade do tecido, mostrando alterações mínimas após o aquecimento. Além disso, foi possível isolar células somáticas viáveis de tecidos

criopreservados e, embora essas células sofram alterações em seu metabolismo e estresse oxidativo, demonstrou bom desempenho em cultivo *in vitro*.

Portanto, o desenvolvimento de um banco de tecidos somáticos para os felídeos oferece uma ferramenta eficiente e alternativa para a conservação de material genético e sua aplicação em diversas pesquisas, sendo essencial o estabelecimento das condições adequadas de criopreservação celular.

### 2.3 Criopreservação de células somáticas e os fatores que afetam sua eficiência

A criopreservação pode ser definida pela diminuição da temperatura a valores criogênicos, promovendo a redução do metabolismo celular e conservando as amostras por longo período (JANG et al., 2017). Normalmente, a técnica mais utilizada para células somáticas é a congelação lenta (LIRA et al., 2021). Essa técnica usa curvas de resfriamento lento (0,3–1,0 °C/min) associadas à crioprotetores com baixo peso molecular, como o EG, DMSO e glicerol (LOUTRADI et al., 2008). Sua metodologia clássica possui equipamentos de resfriamento programado (DONNEZ et al., 2004), onde resultam numa desidratação celular entre -30 a -80 °C, prevenindo uma congelação super resfriada ou desordenada.

As vantagens de um sistema de congelação lenta são a redução gradativa da temperatura que objetiva diminuir o estresse térmico na etapa de transição das soluções do estado líquido para o sólido, além de promover uma desidratação na célula que reduz a formação de cristais de gelo (SHAW et al., 2000). O Mr. Frosty (Mr. Frosty™ Freezing Container) é um dos equipamentos mais utilizados por ter um sistema prático e ser de baixo custo (GÓMEZ et al., 2003). Esse dispositivo consiste em um suporte para reserva de tubos criogênicos, onde são envoltos por isopropanol e colocados em um freezer programável que possibilita diminuições de temperaturas até - 80 °C numa taxa de 1–3 °C por min (CASTRO et al., 2011).

O maior dano que a congelação lenta pode causar sobre a célula é a formação de cristais de gelo (ELLIOTT et al., 2017). Na tentativa de reduzir tais danos, é indicado utilizar substâncias crioprotetoras, uma vez que atuam na redução da cristalização por meio da redução da atividade da água e reduzindo o estresse físico e osmótico (ELLIOTT et al., 2017). Crioprotetores são substâncias que possuem ação protetora para as células quando são adicionadas aos meios, reduzindo efeitos graves na conservação (MORAES et al., 2016). Eles podem diminuir danos durante a congelação e a descongelação (MORAES et al., 2016).

Em geral, os crioprotetores são classificados de acordo com sua capacidade de penetração em células, como intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes (HERRID et al., 2017). Combinações de crioprotetores já foram inseridas na criopreservação de células somáticas de felídeos silvestres (**Quadro 1**).

**Quadro 1.** Criopreservação de células somáticas em felídeos silvestres empregando diferentes associações de crioprotetores.

| Espécie                                                                                                                         | Solução crioprotetora                          | Principal resultado                                                            | Referência                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Tigre-de-bengala ( <i>Panthera tigris tigris</i> )                                                                              | 10% de DMSO com 90% de SFB                     | 90% de viabilidade após a descongelação                                        | Guan et al. (2010)               |
| Leopardo-das-neves ( <i>Panthera uncia</i> )                                                                                    | 10% de DMSO com 90% de SFB                     | Estabelecimento do cultivo e criopreservação celular                           | Verma et al. (2012)              |
| Lince-ibérico ( <i>Lynx pardinus</i> )                                                                                          | 10% de DMSO com 0,2 M de sacarose e 35% de SFB | 90% de viabilidade após a descongelação                                        | León-Quinto et al. (2014)        |
| Onça-pintada ( <i>Panthera onca</i> )                                                                                           | 10% de DMSO com 10% de SFB                     | Estabelecimento de coleta e cultivo dos fragmentos, seguido de criopreservação | Mestre-Citrinovitz et al. (2016) |
| Gato-do-mato ( <i>Leopardus tigrinus</i> ), Gato-palheiro ( <i>Leopardus colocolo</i> ) e Onça-Pintada ( <i>Panthera onca</i> ) | 2,5-10% DMSO com 10% SFB                       | 82,2%-98% sobrevivência celular para as três espécies                          | Arantes et al. (2021)            |
| Gato de Pallas ( <i>Otocolobus manul</i> ; <i>Felis manul</i> )                                                                 | 10% de DMSO com 10% de SFB                     | 80% de viabilidade após a descongelação                                        | Mlodawska et al. (2022)          |
| Onça-parda ( <i>Puma</i> )                                                                                                      | 2,5% DMSO com 0,2 M de sacarose                | 91% de viabilidade após a descongelação                                        | Rodrigues et al. (2022)          |

### 2.3.1 Crioprotetores intracelulares

Os crioprotetores intracelulares são definidos como agentes que possuem um peso molecular baixo e que conseguem se introduzirem nas células e são fundamentais para a criopreservação dos sistemas biológicos (CASTRO et al., 2011). Em consequência do seu peso molecular baixo, eles têm a capacidade de penetrar nas células, diminuindo possíveis lesões, além de possuírem alta solubilidade e conseguir formar ligações entre o hidrogênio e a água, prevenindo a construção dos cristais de gelo no meio intracelular. Sua base é composta de amidas, glicerol e, principalmente, dimetilformamida (JANZ et al., 2012).

Tais substâncias agem na substituição parcial da água no interior das células, diminuindo o ponto de congelamento a partir do crescimento da viscosidade da solução congelada e prendendo-se a eletrólitos, evitando uma grande exposição ao próprio eletrólito (JAIN; PAULSON, 2017). Em geral, a eficácia dos crioprotetores intracelulares em relação a conservação de células é influenciada por fatores, como o tempo de exposição, a sua concentração e a organização molecular entre as espécies (CASTRO et al., 2011).

O crioprotetor intracelular precisa ser um elemento que seja capaz de se infiltrar na célula por difusão passiva, para que resulte uma desidratação celular e proteja dos danos causados pela congelamento. A permeabilidade do crioprotetor na célula depende do seu baixo peso molecular (PURDY, 2006). O EG e o DMSO são os crioprotetores mais usados na criopreservação de células. O EG consiste em um álcool que é obtido a partir da hidrólise do óxido de eteno, apresenta um baixo peso molecular (62,07 g/mol) e baixo ponto de fusão (15,6 °C) (MARTINS; CARDOSO, 2005). Em virtude dessas características, o EG tem sido empregado como crioprotetor intracelular (NEWTON et al., 1998). Contudo, sua metabolização resulta em subprodutos com potencial de toxicidade alta, como o oxalato e o ácido glicólico (CORLEY et al., 2005).

Já o DMSO apresenta peso molecular maior (78,00 g/mol), comparado ao EG, e sua temperatura de congelamento é de 18,5 °C (BRAYTON, 1986). O DMSO mantém a integridade da membrana lipídica das células e das proteínas isoladas enquanto ocorre os processos de aquecimento e resfriamento (VILLAMIN, 2009). A sua alta toxicidade é uma desvantagem, além de dificultar o emprego, uma vez que só pode ser preparado quando realmente for ser usado, em virtude da sua capacidade de absorção de água do ambiente, conhecida por higroscopia (JANZ et al., 2012).

A eficiência dos crioprotetores intracelulares, como o EG, DMSO e o propanodiol pode variar de acordo com o tipo de estrutura, seja uma célula ou um tecido, a concentração e o tempo de exposição usado antes da criopreservação, além das diferenças nas estruturas que variam entre cada espécie de animais (FAUSTINO et al., 2010; GANDOLFI et al., 2006).

Em felídeos silvestres, várias combinações de crioprotetores já foram empregadas com sucesso na criopreservação de células somáticas. Em lince-ibérico, León-Quinto et al. (2014) usaram a combinação de 10% de DMSO com acréscimo de 35% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2 M de sacarose na criopreservação de células derivadas da pele e obtiveram resultados positivos, com taxas de viabilidade acima de 80% após a criopreservação, enfatizando a eficiência da utilização de um dissacarídeo, como a sacarose, para promover a manutenção osmótica do meio e realizar uma proteção sinérgica com o crioprotetor intracelular, obtendo melhores resultados com seu uso em combinação.

Outros estudos já relataram a utilização de 10% de SFB em conjunto a 10% de DMSO para criopreservar células derivadas da pele de diferentes felídeos, como a onça-pintada, gato-do-deserto (*Felis margarita*, MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016), gato-marmoreado (*Pardofelis marmorata*, GÓMEZ et al., 2008), gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*, THONGPHAKDEE et al., 2010), e gato-da-líbia (*Felis silvestris libica*, YIN et al., 2006) obtendo taxas de viabilidade acima de 80% após a descongelação.

Nos estudos de Oliveira et al. (2021), diferentes soluções crioprotetoras (DMSO e EG na presença e ausência 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 constituída por 10% de DMSO, crioprotetor intracelular, 10% de SFB e 0,2 M de sacarose, ambos crioprotetores extracelulares. Nesse mesmo estudo, o grupo contendo 10% EG acrescido de 0,2 M de sacarose obteve uma taxa maior de viabilidade celular quando comparado ao grupo contendo somente EG.

Assim, apesar do DMSO ter tido mais eficiência na maioria dos estudos, o EG deve ser testado devido a sua capacidade de proteção depender da espécie em estudo e do tipo celular (LI et al., 2006), tornando-se necessário avaliar e comparar os efeitos de ambos crioprotetores intracelulares sobre a viabilidade das células de interesse.

### **2.3.2. Crioprotetores extracelulares**

Os crioprotetores extracelulares possuem um alto peso molecular que agem estimulando a gradação da osmolaridade do meio externo fazendo com que a água saia do interior da célula para o meio extracelular, reduzindo a geração de cristais de gelo. Os aminoácidos, as lipoproteínas e a sacarose são exemplos de crioprotetores extracelulares (GONZALES, 2004).

Em geral, crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares que tem como funções a redução da formação dos cristais de gelo, facilitando a desidratação das células e protegendo a membrana celular, seu alto peso molecular proporciona a não permeabilidade das

células (NIEMANN, 1991). Outra função importante que estas substâncias possuem é a interação com a membrana celular, que podem variar de acordo com a função da estrutura, seja célula ou tecido, que será criopreservada (FULLER et al., 2004), do tipo, concentração e tempo de exposição usado antes do processo de criopreservação, e das diferenças na estrutura entre cada espécie de animais (FAUSTINO et al., 2010; GANDOLFI et al., 2006). Os crioprotetores extracelulares mais comumente utilizados na criopreservação celular são a sacarose e o SFB (WHALEY et al., 2021).

Diversos estudos indicam a eficiência da sacarose em associação com crioprotetores intracelulares para a criopreservação celular em felídeos silvestres, conforme demonstrado por León-Quinto et al. (2011), onde foi observada que a combinação de 10% de DMSO com 0,1 M ou 0,2 M de sacarose foi mais eficiente em relação à ausência de sacarose. Posteriormente, León-Quinto et al. (2014) observaram um efeito positivo da sacarose na viabilidade celular, devido sua atuação ter promovido uma diminuição da pressão osmótica por meio da desidratação celular, resultando um aumento da viabilidade celular (CENTIKAYA et al., 2011).

Quanto ao SFB, este agente possui propriedades antioxidantes, antitóxicas e antiproteolíticas, além de proteger as células contra danos mecânicos ao se ligar as proteínas da membrana celular (CASTILHO et al., 2008). Deste modo, o SFB tem sido altamente usado sob diferentes concentrações em soluções de criopreservação de células somáticas (GUAN et al., 2010; LEÓN-QUINTO et al., 2014). Alguns estudos já comprovaram a sua eficiência na criopreservação de células em diferentes concentrações. Liu et al. (2010) utilizaram 50% de SFB associado a 10% de DMSO na criopreservação de células de tigre-iberiano (*Panthera tigris tigris*), e obtiveram uma viabilidade celular superior a 90% após a descongelação. Posteriormente, Moulavi et al. (2017) usaram a mesma combinação crioprotetora na criopreservação de células de chita-asiática (*Acinonyx jubatus venaticus*) e obtiveram 85% de viabilidade celular. Ainda, foram relatadas com sucesso concentrações mais baixas de SFB, como no estudo de Silva et al. (2021), onde utilizaram 10% de SFB associado a DMSO e sacarose e como resultado alcançou 73,2% de viabilidade celular.

Esses estudos denotam a versatilidade de combinações e concentrações de crioprotetores que podem ser utilizadas com sucesso em distintos felídeos, ressaltando a primordialidade de se comparar diferentes concentrações para obtenção de um protocolo otimizado para a espécie em estudo, a jaguatirica.

### **3. HIPÓTESES**

**I** – A associação do crioprotetor intracelular EG associado aos crioprotetores extracelulares SAC + SFB é uma alternativa para a criopreservação de células somáticas de jaguatirica, proporcionando a manutenção da integridade morfológica e das atividades metabólicas;

**II** – A adição de crioprotetores extracelulares (SAC + SFB) aumenta a capacidade de criopreservação da solução crioprotetora, promovendo maior conservação das características das células somáticas de jaguatirica.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A jaguatirica representa um importante papel no ecossistema onde habita, sendo considerada uma espécie-chave, já que afeta diretamente o controle de suas presas. Nos últimos anos, vem sendo observado, em níveis nacionais e internacionais, uma diminuição da população deste felídeo, especialmente por causas não naturais, como a caça furtiva, colisões de veículos, e fragmentação do seu habitat. Por essa razão e associado ao seu papel ecológico, estratégias direcionadas à conservação da jaguatirica objetivam manter um equilíbrio do ecossistema, proporcionando a permanência constante das populações relativas das diferentes espécies.

Nesse cenário, a formação de bancos de células somáticas obtidas a partir da pele permite ser uma alternativa à conservação de uma grande variedade genética usando a criopreservação, uma vez que tais amostras podem ser coletadas por métodos pouco invasivos e não se limitam ao estágio reprodutivo e ao sexo do indivíduo. Esses bancos compreendem uma interessante ferramenta, já que as técnicas de criopreservação têm tido destaque por possibilitar a conservação por longos períodos e ser uma medida de emergência na conservação de espécies.

Portanto, avaliar a influência de diferentes crioprotetores utilizados na criopreservação de células somáticas obtidas da pele de jaguatirica é um passo importante na formação adequada destes bancos. Tais bancos quando eficientemente produzidos podem ser aplicados para fins conservacionistas, visando a manutenção da espécie para o ecossistema.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Comparar diferentes soluções de criopreservação de células somáticas de jaguatirica, visando contribuir para a conservação da espécie.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos dos crioprotetores intracelulares (DMSO e EG) na presença de crioprotetores extracelulares (SAC + SFB) sobre a qualidade de células somáticas derivadas de jaguatirica;
- Avaliar o efeito do cultivo *in vitro* após a descongelação de células somáticas sobre a morfologia, confluência e viabilidade de células somáticas derivadas de jaguatirica.

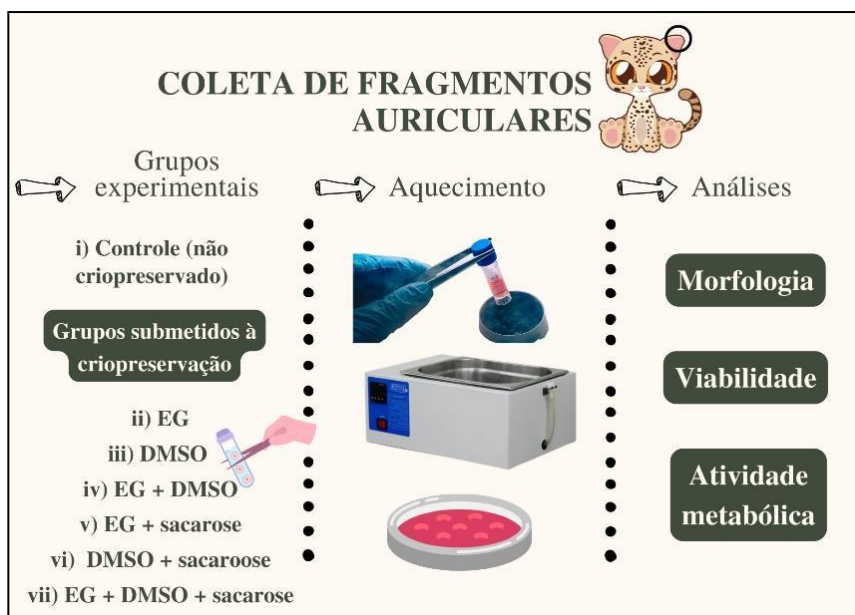
## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Bioética e local de execução

A presente proposta foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no. 71837-1). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira).

### 6.2 Animal e desenho experimental

A jaguatirica encontrada no centro da cidade de Mossoró e atendida no hospital veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido foi utilizada para a coleta dos tecidos somáticos. Para tanto, fragmentos de pele auricular foram cultivados e as células recuperadas foram cultivadas até a terceira passagem e, em seguida, conservadas em nitrogênio líquido contendo 10% de DMSO + 10% de SFB + 0,2 M de sacarose. Posteriormente, as células foram descongeladas, cultivadas e criopreservadas de acordo com os grupos (**Figura 3**): i) grupo controle (células não submetidas à criopreservação), ii) 10% de EG, iii) 10% de DMSO, iv) 5% de EG + 5% de DMSO, v) 10% de EG + 0,2 M de sacarose, vi) 10% de DMSO + 0,2 M de sacarose e vii) 5% de EG + 5% de DMSO + 0,2 M de sacarose.



**Figura 3.** Coleta, processamento, avaliação da morfologia, viabilidade e atividade metabólica de células somáticas de jaguatirica submetidas a diferentes combinações de crioprotetores durante a congelação lenta.

Após a descongelação, células foram submetidas às análises quanto aos aspectos morfológicos, viabilidade por azul de tripan e atividade metabólica pelo ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Todas as análises foram realizadas após a criopreservação e a descongelação das amostras.

### 6.3 Biópsia de pele

Para a coleta da pele derivada do pavilhão auricular apical, a jaguatirica foi previamente anestesiada com 0,08 mg/kg de cloridrato de dexmedetomidina (Dexdormitor®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) por via intramuscular e monitorada durante todo o procedimento (ARAÚJO et al., 2018). As amostras de pele (1–2 cm<sup>2</sup>) foram obtidas, em seguida, foram lavadas em 70% de álcool e transportadas ao laboratório em tubos contendo meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de SFB e 2% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B, a 4° C por um período de 30 min.

No laboratório, os fragmentos foram tricotomizados e seccionados em 9,0 mm<sup>3</sup>. Em seguida, sob fluxo laminar, as amostras foram submetidas as lavagens em meios de acordo com a sequência: i) DMEM suplementado com 10% de SFB (denominado, DMEM<sup>+</sup>) e 10% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (denominado, DMEM<sup>10</sup>); ii) álcool a 70% e iii) DMEM<sup>+</sup> acrescido de 2% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (denominado, DMEM<sup>2</sup>), conforme Viana et al. (2022). Finalmente, foi adicionado 10% de SFB em uma placa com DMEM<sup>2</sup>, onde os explantes foram cultivados até a obtenção de células somáticas (LEÓN-QUINTO et al., 2011), as quais foram conservadas para uso nesta proposta.

### 6.4 Criopreservação das células somáticas

As células somáticas utilizadas na criopreservação foram distribuídas aleatoriamente para cada grupo e criopreservadas usando a congelação lenta, de acordo com Mestre-Citrinovitz et al. (2016) com modificações. Inicialmente, as células foram suspensas em 350 µL de DMEM contendo 10% de SFB em criotubos. Em seguida, 350 µL de DMEM contendo DMSO ou EG foram adicionados à suspensão de células inicial. Para os grupos contendo sacarose, foram adicionados 300 µL de DMEM com sacarose para atingir o volume de 1,0 mL. Para os grupos sem sacarose, 300 µL de DMEM foram adicionados para atingir o volume de 1,0 mL. Finalmente, a suspensão de células em criotubos foi mantida a 4 °C por 10 min e transferida para um freezer a 80 °C em Mr. Frosty system® (Thermo Scientific Nalgene, Rochester, NY, EUA) por 12 h usando uma taxa de resfriamento de 1 °C/min. Posteriormente, todos os criotubos foram armazenados em nitrogênio

líquido (-196°C).

Após duas semanas, para a descongelação das amostras, os criotubos foram mantidos por 1 min a 25 °C e imersos em banho maria a 37 °C por 4 min, de acordo com León-Quinto et al. (2014). Para a remoção de crioprotetores, suspensões de células derivadas de grupos contendo sacarose foram adicionados em DMEM contendo 10% de SFB e 0,2 M de sacarose e mantidas a 4°C por 15 min, seguida de centrifugação a 1300×g por 10 min. Subsequentemente, o sobrenadante foi removido, o conteúdo celular foi suspenso em DMEM com 10% de SFB, mantido a 25 °C por 15 min, seguida por outra centrifugação a 1300×g durante 10 min. Finalmente, suspensões celulares derivadas de grupos sem sacarose foram centrifugados duas vezes como descrito anteriormente usando DMEM mais 10% de SFB. Depois da primeira e da segunda adição de meio, as células foram mantidas a 4 °C por 15 min e 25 °C por 15 min, respectivamente.

## **6.5 Cultivo *in vitro* e avaliações**

Após as células atingirem a confluência de 70%, foi realizado o primeiro subcultivo celular. As passagens foram realizadas por meio do processo de tripsinização. Brevemente, o meio de cultivo das placas foi descartado, e as placas lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, 1,0 mL de solução de tripsina foi adicionada às placas incubadas a 38,5 °C por até 7 min. Com as células em suspensão, foi adicionado 2,0 mL de meio DMEM<sup>2</sup> para inibição da tripsina.

As células foram centrifugadas e foi realizada a contagem para determinação do número de células por mL nas placas, para realizar a primeira passagem, conforme realizado por León-Quinto et al. (2014). Após a primeira passagem, as células foram cultivadas até a quarta passagem, para obtenção da concentração de  $1,0 \times 10^5$  células/mL, para então serem realizadas as avaliações necessárias antes e após a conservação.

### **6.5.1 Avaliação morfológica**

A avaliação morfológica foi realizada diariamente nas células em cultivo *in vitro*, onde as placas de cultivo foram retiradas da incubadora e direcionadas a cabine de fluxo laminar, e, em seguida, observadas em microscópio invertido (Nikon TS100, Tokyo, Japan) para a identificação das células. Para a caracterização morfológica, a placa inteira foi analisada e as células foram classificadas de acordo com seus padrões de adesão e confluência (VIANA et al., 2023). Os dados obtidos foram armazenados para uma descrição dos aspectos morfológicos.

### 6.5.2 Avaliação da viabilidade

A análise da viabilidade foi realizada usando a coloração com azul de tripan a 0,4% realizado por Guan et al. (2010). Após a centrifugação para a retirada dos crioprotetores, foi retirada uma parte com 20  $\mu$ L da suspensão celular, onde foi colocada em contato com 20  $\mu$ L do corante azul de tripan. Em seguida, essa solução foi preenchida na câmara de Neubauer, assim como todos os quatro quadrantes laterais da câmara foram contabilizados, atingindo uma taxa de viabilidade de acordo com a fórmula: (nº de células vivas/ nº total de células contadas) \* 100. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

#### 6.5.2. Avaliação da atividade metabólica

Para a avaliação da atividade metabólica foi realizado o ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Brevemente,  $5,0 \times 10^4$  células não submetidas à criopreservadas e descongeladas foram cultivadas em placas de 12 poços em uma atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C. Após cinco dias, 1,0 mL da solução de MTT (5 mg/mL em DMEM) foi adicionada em cada poço e as placas foram incubadas por um período de 3 h a 38,5 °C.

Posteriormente, a solução de MTT foi removida e 1,0 mL de DMSO foi adicionado a cada poço como solução de solubilização do MTT. Em seguida, foi agitado manualmente em constância por 5 min para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-mini-1240, Kyoto, Japan) a uma absorbância de 595 nm. Para as células não criopreservadas foram considerados os valores médios da densidade óptica de 100% para a comparação com os demais grupos. Já os valores obtidos a partir da leitura dos grupos experimentais foram transformados em porcentagem, por meio da divisão pelo valor obtido com o grupo controle (QUEIROZ-NETA et al., 2018).

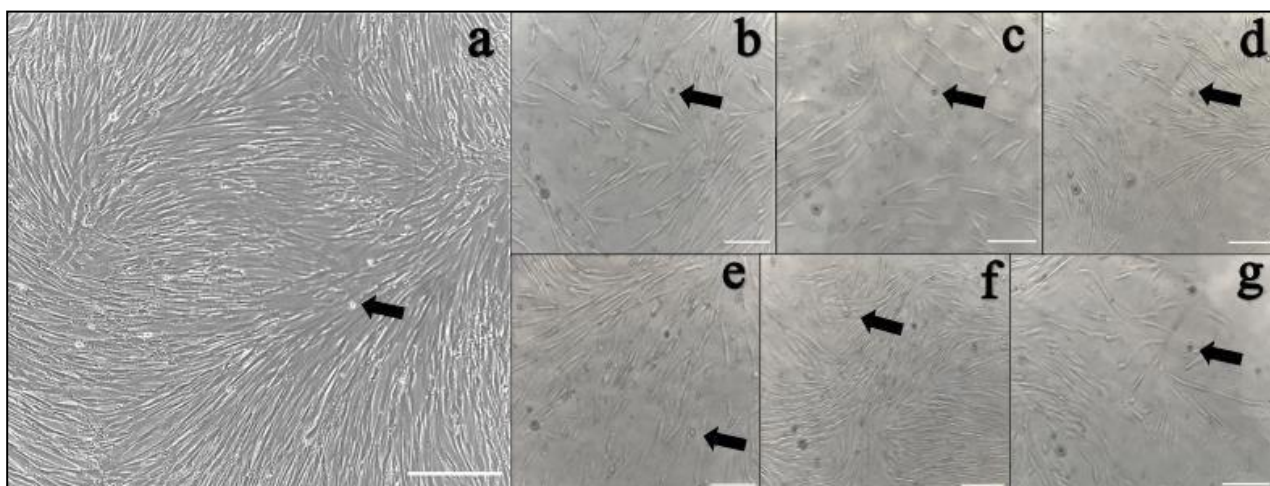
### 6.6 Análise estatística

Dados de quatro repetições foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e analisados no software GraphPad (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, EUA). Todos os resultados foram verificados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e para homocedasticidade pelo Teste de Levene. Como dados referentes ao teste azul de tripan e atividade metabólica não mostraram uma distribuição normalmente, eles foram transformados em arco-seno. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido de teste Tukey ou teste t não pareado. A significância foi definida em  $P < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

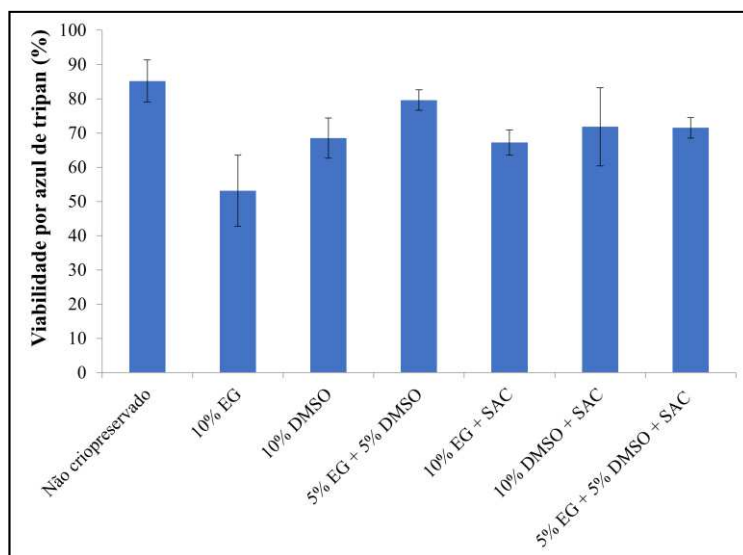
### 7.1 Avaliação morfológica e viabilidade

Para a análise morfológica, as células foram observadas diariamente no microscópio invertido, sendo observado o tempo de crescimento, seus padrões de adesão e confluência ao decorrer do cultivo. O grupo controle necessitou de uma média de 10 dias para o crescimento celular, enquanto os grupos criopreservados levaram entre 15–20 dias para que as células crescessem. O grupo controle comparado aos grupos criopreservados mantiveram um padrão de confluência, variando entre 75–100%, onde as células somáticas apresentaram uma morfologia similar a fibroblastos, mostrando aspecto fusiforme com prolongamentos citoplasmáticos (**Figura 4A**). Enquanto os grupos criopreservados demonstraram confluências de no máximo 40%; contudo, todos os grupos tinham algumas células aderidas a placa com aparência de fibroblastos e apresentaram debris celulares (**Figura 4**).



**Figura 4.** Morfologia de células somáticas de jaguatirica do grupo não criopreservado (a), dos grupos de células criopreservadas: com 10% de DMSO (b); 10% de DMSO + 0,2 M de SAC (c); 10% de EG (d); 10% de EG + 0,2 M de SAC (e); 5% de EG + 5% de DMSO (f); 5% de EG + 5% DMSO + 0,2 M de SAC (g). Células somáticas (seta). Barra de escala 100  $\mu$ m, ampliação 10 $\times$ .

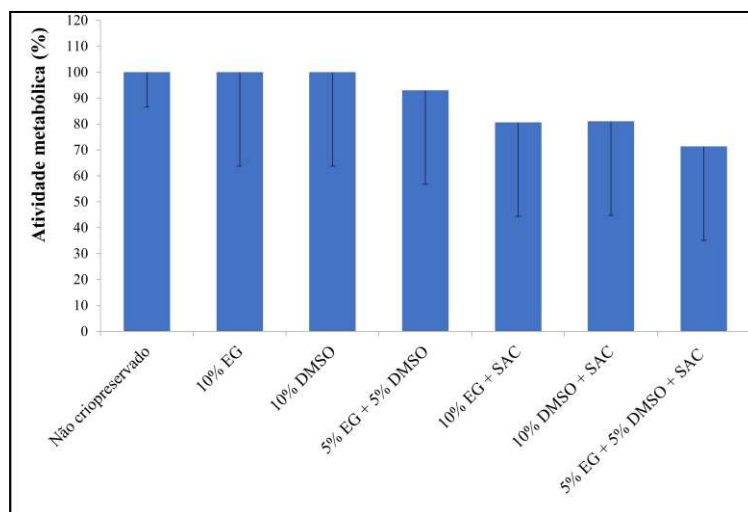
Quanto à análise da viabilidade com azul de tripan, não houve diferença entre os grupos, ou seja, a viabilidade se manteve similar entre os grupos após a descongelação, variando entre  $53,1 \pm 10,4\%$  a  $85,2 \pm 6,1\%$  (**Figura 5**).



**Figura 5.** Avaliação da viabilidade com azul de tripan em células somáticas de jaguatirica criopreservadas em diferentes soluções crioprotetoras.

## 7.2 Avaliação da atividade metabólica

Quanto às taxas de atividade metabólica pelo ensaio de MTT, não houveram diferenças entre os grupos quando comparados ao grupo controle (**Figura 6**).



**Figura 6.** Avaliação de diferentes soluções de criopreservação sobre a atividade metabólica de células somáticas derivadas de jaguatirica. Valores obtidos do MTT no D5. Barras representam erro padrão.

## 8. DISCUSSÃO

A construção de bancos de recursos somáticos é uma ferramenta interessante para a conservação do material genético de indivíduos, independente da idade e do sexo (PRAXEDES et al., 2018). Nesse contexto, uma das etapas essenciais é a escolha da solução crioprotetora ideal para a espécie em questão, uma vez que a implementação de uma solução crioprotetora eficiente é capaz de reduzir as crioinjúrias celulares, proporcionando a manutenção da morfologia, confluência, viabilidade e atividade metabólica após as etapas de congelação e descongelação (OLIVEIRA et al., 2021). Associado a isso, é possível haver um maior quantitativo de células para diferentes finalidades, como a clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS, MOULAVI et al., 2017) e a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, VERMA et al., 2013).

No presente trabalho, durante o cultivo *in vitro*, as células foram avaliadas quanto à confluência, onde foi acrescido 10% de SFB ao meio de cultivo, semelhante ao que foi empregado em onça-pintada (*Panthera onca*, PRAXEDES et al., 2019) e em chita (*Acinonyx jubatus*, MORO et al., 2015), uma vez que o SFB fornece fatores essenciais para o crescimento e manutenção das células (PRAXEDES et al., 2019). No estudo, o grupo não criopreservado necessitou de uma média de 10 dias para o crescimento celular e atingir uma confluência de 100%, enquanto os grupos criopreservados apresentaram um crescimento celular somente em 15–20 dias; contudo, a confluência foi de até 40%. De acordo com Mestre-Citrinovitz et al. (2016), isso se justifica ressaltando-se a importância de usar células para congelação até a quarta passagem, pelo fato de após demasiados subcultivos as células irão ter seu nível de crescimento diminuído, requerendo mais tempo para alcançar a confluência desejada, além de sofrerem senescência celular. No entanto, o presente estudo mostrou que as células de quarta passagem necessitou de mais tempo para se dividirem, assim, possivelmente o ideal seria utilizar células somáticas de jaguatirica de até terceira passagem. Em contrapartida, o estudo de Praxedes et al. (2019) com onça-pintada, apresentou um padrão de crescimento celular entre 9–10 dias. Esses dados se assemelham ao obtido por Mestre-Citrinovitz et al. (2016), que relataram um crescimento celular entre 10–14 dias para onça-pintada. Ainda, para outras espécies de felídeos, como o tigre de Bengala (*Panthera tigris tigris*) e o tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*), o crescimento celular só ocorreu após cerca de 5 a 12 dias de cultivo *in vitro* (GUAN et al., 2010; LIU et al., 2010).

Ainda, as células somáticas de jaguatirica foram avaliadas quanto à morfologia, onde apresentaram uma morfologia normal, exibindo formato fusiforme com extensões citoplasmáticas, além de um grande núcleo ovalado, corroborando com os aspectos encontrados nas células somáticas derivadas de onça-pintada (OLIVEIRA et al., 2021) e onça-parda (RODRIGUES et al., 2022). Sabendo disso, a manutenção dessas características morfológicas podem estar associadas com a combinação de crioprotetores intra e extracelulares, pois estes agem reduzindo a formação de cristais de gelo (LEÓN-QUINTO et al., 2014), mantendo então as características morfológicas

normais.

Quanto à avaliação da viabilidade por azul de tripan, esta é uma análise que classifica as células em viáveis e não viáveis por meio da penetração através da membrana danificada (VIANA et al., 2023). No presente estudo, a viabilidade se manteve similar entre os grupos criopreservados e o grupo não-criopreservado (controle), variando entre  $53,1 \pm 10,4\%$  a  $85,2 \pm 6,1\%$ , corroborando com o estudo de Oliveira et al. (2021), onde foi realizada a avaliação dos efeitos dos crioprotetores intracelulares (DMSO ou EG) na ausência ou presença de um crioprotetor extracelular (SAC) e não apresentou diferenças nas taxas de viabilidade entre os grupos experimentais.

Já no trabalho de Silva et al. (2021), foi relatado uma taxa de 73,2% de viabilidade para fibroblastos de onça-pintada (*P. onca*) com 10% de DMSO. Ainda, Arantes et al. (2021) avaliaram em seu estudo o DMSO a 2,5% e 10% em fibroblastos de tigre-do-norte (*Leopardus tigrinus*), gato-campeiro (*Leopardus colocolo*) e onça-pintada, e não relataram diferenças na viabilidade celular dessas três espécies após a descongelação, obtendo 82,2–98% de células viáveis. Ainda, o estudo de Mlodawska et al. (2022) avaliou células somáticas de gato de Pallas (*Otocolobus manul*) utilizando 10% de DMSO acrescido de 10% de SFB e obteve como resultado uma taxa de 80% de viabilidade, corroborando com a taxa de viabilidade obtida para a jaguatirica. Portanto, os resultados dessa avaliação mostraram que houve uma manutenção na integridade da membrana celular das células dos grupos criopreservados, o que é um fator importante para aprimorar os protocolos de congelação lenta, uma vez que as células com membranas rompidas não são viáveis para futuras aplicações por estarem em apoptose inicial (PARK et al., 2017).

Apesar de não apresentarem diferenças entre os grupos, essa conservação da membrana pode estar associada ao conjunto de agentes crioprotetores extracelulares utilizados, já que estes têm a capacidade de estabilizar proteínas membranares, além de reduzir os efeitos de pressão osmótica durante a criopreservação (SILVA et al., 2017). Ainda, a congelação lenta possui um importante papel na manutenção da viabilidade celular, já que mostra melhores resultados para células somáticas de felídeos silvestres (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016), como a chita-asiática (*Acinonyx jubatus venaticus*, MOULAVI et al., 2017), gato-tigre-do-norte (*Leopardus tigrinus*) e gato-campeiro (*Leopardus colocolo*, ARANTES et al., 2021), gato-de-pallas (*Otocolobus manul* MLODAWSKA et al., 2022) e onça-parda (*Puma concolor*, LIRA et al., 2021).

Quanto às taxas de atividade metabólica pelo ensaio de MTT, não houveram diferenças entre os grupos criopreservados (variando entre  $71 \pm 36,3\%$  –  $100 \pm 36,3\%$ ) quando comparados ao grupo controle ( $100 \pm 13,4\%$ ), corroborando com o trabalho de Oliveira et al. (2021) com onça-pintada, no qual não foram observadas diferenças entre o grupo não criopreservado ( $100,0 \pm 1,8\%$ ) e os criopreservados (variando entre  $85,7 \pm 5,3\%$  e  $89,1 \pm 4,1\%$ ). Ainda, no estudo de León-Quinto et al. (2011) foi realizada a análise de diferentes soluções de congelação (10% de DMSO

+ 0,1 M ou 0,2 M de sacarose) para células isoladas das peles de lince-ibérico (*Lynx pardinus*) e esses autores obtiveram uma média da atividade metabólica pelo teste de MTT de 85%. Esse ensaio foi desenvolvido inicialmente por Mosmann (1983) e tem por objetivo avaliar a atividade metabólica de células, para isso, ocorre a redução do sal de tetrazólio por células funcionais, produzindo cristais azuis de formazan. Entre as vantagens deste ensaio tem-se a obtenção de resultados quantitativos das células viáveis com um rendimento relativamente alto, uma vez que não necessita de contagem manual das células. Assim, qualquer aumento ou diminuição do número de células viáveis pode ser detectado, mensurando a concentração dos cristais de formazan solubilizados, refletida na densidade óptica e usando um leitor de placas ou espectrofotômetro com comprimentos de onda de 540 a 720 nm (BAI et al., 2018).

Deste modo, a capacidade crioprotetora pode ser explicada pelo uso dos crioprotetores intracelulares EG e DMSO, uma vez que ambos possuem características físico-químicas capazes de proporcionar a proteção da célula, como o baixo ponto de fusão e o baixo peso molecular do EG e a capacidade de dissolver compostos polares e não polares do DMSO (BHATTACHARYA et al., 2018). Ambos crioprotetores já foram empregados com sucesso na criopreservação de amostras de diferentes felídeos, como onça-pintada (SANTOS, 2021) e onça-parda (RODRIGUES et al., 2022).

Deste modo, ambos crioprotetores intracelulares empregados neste trabalho demonstraram esse efeito positivo nas células do felídeo utilizadas no presente estudo, estando em combinação ou não com a sacarose. Adicionalmente, a sacarose e o SFB são crioprotetores extracelulares comumente utilizados, são tipicamente mais pesados e possuem ligações covalentes com polímeros, dímeros ou trímeros (WHALEY et al., 2021). Diversos estudos apontam a eficiência da sacarose associada a crioprotetores intracelulares na criopreservação de células de felídeos silvestres, um desses estudos é o de Silva et al. (2021) onde estes autores sugeriram que a eficiência em manter a viabilidade celular de fibroblastos de onça-pintada após a criopreservação está ligada à combinação de 10% de DMSO com 0,25 M de sacarose.

Portanto, todas as combinações de soluções crioprotetoras testadas apresentaram eficácia para a criopreservação das células somáticas de jaguatirica, onde foi possível manter as células com bons índices de viabilidade e atividade metabólica, podendo possibilitar o emprego dessas células em técnicas como a TNCS e iPSC. Assim, em felídeos silvestres estas técnicas têm sido estudadas, como no estudo de Verma et al. (2013), os autores examinaram a indução de pluripotência em culturas de fibroblastos de três espécies de felinos geograficamente separadas: tigre de Bengala asiático (*Panthera tigris*), serval africano (*Leptailurus serval*) e a onça-pintada sul-americana (*Panthera onca*) e obtiveram a reprogramação bem-sucedida, bem como fornece uma abordagem única para compreender a atribuição da linhagem e a pluripotência, a iPSC podendo contribuir para a medicina regenerativa (VERMA et al., 2013). Já quanto à TNCS, sabe-se que esta consiste em uma técnica que possibilita impedir que os recursos genéticos dos animais sejam perdidos através de tecnologias de conservação *ex situ* (MOULAVI et al., 2017). Portanto, o uso das células de

jaguaririca nessas técnicas seria de grande importância para sua conservação. Assim, os resultados obtidos no presente estudo representam um avanço para o estabelecimento de bancos de recursos somáticos para fins de conservação da espécie em estudo e adicionalmente de outras espécies filogeneticamente próximas que estejam ameaçadas ou em risco de extinção.

## 9. CONCLUSÃO

Todas as combinações de soluções crioprotetoras testadas nesse estudo (10% de EG, 10% de DMSO, 5% de EG + 5% de DMSO, 10% de EG + 0,2 M de SAC, 10% de DMSO + 0,2 M de SAC, 5% de EG + 5% de DMSO + 0,2 M de SAC) demonstraram eficiência, mesmo com a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares (EG e DMSO) na presença ou não da sacarose acrescido de 10% de SFB. Sendo as soluções de 10% de DMSO ou 10% de EG mais eficientes e comumente utilizadas em outras espécies de felídeos, podendo ser soluções padrões para a criopreservação de células somáticas de jaguatirica. Dessa forma, as informações denotadas por este estudo buscam contribuir para a conservação da jaguatirica e possibilitam a utilização da mesma como um modelo experimental para espécies filogeneticamente próximas que se encontrem em situação de perigo à extinção. Além disso, foi o primeiro trabalho a avaliar a melhor combinação de substâncias crioprotetoras intra e extracelulares na congelação lenta de células somáticas de jaguatirica. Ainda, essas informações podem ser utilizadas para futuras aplicações em biotecnologias reprodutivas, principalmente contribuindo para o aprimoramento de técnicas como a transferência nuclear de células somáticas e a indução de células à pluripotência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K.; MORORIOS, R.; SILVAPEREIRA, J.; MIRANDA, J.; JABLONSKI, E.; PASSOS, F. Feeding habits of ocelot (*Leopardus pardalis*) in Southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 73, p. 407- 411, 2008.

ALIAGA-ROSSEL E.; MORENO R.S.; KAYS R.S.; GIACALONE J. Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on agouti (*Dasyprocta punctata*). **Biotropica**, v. 38, p. 691-694. 2006.

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

ARANTES, L.G.; TONELLI, G.S.S.S.; MARTINS, C.F.; BÃO, S.N. Cellular characterization and effects of cryoprotectant solutions on the viability of fibroblasts from three Brazilian wild cats. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, p. 11-18, 2021.

ARAÚJO, G.R.; PAULA, T.A.R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R.G.; BERGO, L.C.; SILVA, L.C.; BRAUD, C. Comparação de amostras de sêmen coletadas de onças-pintadas selvagens e de cativeiro (*Panthera onca*) por cateterismo uretral após indução farmacológica. **Animal Reproduction Science**, v.195, p.1-7, 2018.

BAI, C. B.; WANG, S. N.; QIAO, R.; FAN, H. Y.; WEI, B.; XU, P.; YANG, S. A Fluorescent Sensor for Zn<sup>2+</sup> Based on Rhodamine Thiophene Framework. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, p. 10368-10381, 2018.

BHATTACHARYA, S.; BOHONĚK, M.; HENAO, F. J.; VALENCIA, J.; MARKOVIĆ, Z.; PREINER, D.; STUPIĆ, D.; ANDABAKA, Ž.; ŠIKUTEN, I.; ŠTAMBUK, P.; KONTIĆ, J. K.K.; MALETIĆ, E.; AMORIM, C.; LEONEL, E.; LUCCI, C.; SCHIEWE, M.; MULLEN, S.; WALLBERG, K. M.; WATERSTONE, M.; ANASTÁCIO, A.; BOZKURT, Y. Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences. London, United Kingdom: **IntechOpen**, 2018.

BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.Q.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. **Cytotechnology**, v. 69, p. 643-654, 2017.

BRAYTON C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v. 76, p. 76-90, 1986.

CASTILHO, L., MORAES, A., AUGUSTO, E., BUTLER, M. Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy. **Garland Science**, 2008.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 957-962, 2011.

CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, v. 63, p. 292-297, 2011.

CORLEY, R.A.; BARTELS, M.J.; CARNEY, E.W.; WEITZ, K.K.; SOELBERG, J.J.; GIES, R.A.; THRALL K.D. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for ethylene glycol and its metabolite, glycolic acid, in rats and humans. **Toxicological Science**, v. 85, p. 476-490, 2005.

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Tools for the evaluation of somatic cells and tissues after cryopreservation in mammals. A review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 820-829, 2016.

CRAWSHAW, P.; QUIGLEY, H.B. Notes on ocelot movement and activity in the Pantanal region, Brazil. **Biotropica**, v. 21, p. 377-379, 1989.

DE VILLA MEZA, A.; MARTINEZ MEYER, E.; LÓPEZ GONZÁLEZ, C.A. Ocelot (*Leopardus pardalis*) food habits in a tropical deciduous forest of Jalisco, Mexico. **The American midland naturalist**, v. 148, p. 146-154, 2002.

DI BITETTI, M.S.; PAVIOLO, A.; ANGELO, C. Density, habitat use and activity patterns of ocelots (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. **Journal of Zoology**, v. 270, p. 153- 163, 2006.

DILLON, A. Ocelot density and home range in Belize, Central America: camera-trapping and radio telemetry. **Dissertação de Mestrado**. Virginia Polytechnic Institute and State University, 2005.

DILLON, A.; KELLY, M.J. Ocelot *Leopardus pardalis* in Belize: the impact of trap spacing and distance moved on density estimates. **Oryx**, v. 41, p. 469-477, 2007.

DILLON, A.; KELLY, M.J. Ocelot home range, overlap and density: comparing radio telemetry with camera trapping. **Journal of Zoology**, v. 275, p. 391-398, 2008.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN, L. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, p. 1405-1410, 2004.

DUEÑAS, A.; ESCOBAR-LASSO, S.; AGUILAR-RAYA, G.; MENDOZA, E. Wild felid species richness affected by a corridor in the lacandona forest, Mexico. **Biodiversity and Conservation**, v. 40, p.115-120, 2017.

ELLIOTT, G.D.; WANG, S.; FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low Temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p.74–91, 2017.

EMMONS, L.H. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 20, p. 271–283, 1987.

EMMONS, L.H. A field study of ocelots (*Felis pardalis*) in Peru. **Revue d'Ecologie (Terre et Vie)**, v. 43, p. 133-157, 1988.

FAUSTINO L.R.; SANTOS R.R.; SILVA C.M.G.; PINTO L.C.; CELESTINO J.J.H.; CAMPELLO C.C.; FIGUEIREDO J.R.; RODRIGUES A.P.R. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 90-97, 2010.

FUSCO-COSTA, R.; INGBERMANA, B.; COUTOC, H.T.Z.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Densidade populacional de uma população insular costeira de jaguatirica na Mata Atlântica, sudeste do Brasil. **Mammalian Biology**, v. 75, n. 4, pág. 358-362,

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine** Online, v. 9, p. 680-869, 2004.

GANDOLFI F.; PAFFONI A.; BRAMBILLA E.P.; BONETTI S.; BREVINI T.A.L.; RAGNI G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1150-1156, 2006.

GÓMEZ, M.C.; JENKINS, J.A.; GIRALDO, A.; HARRIS, R.F.; KING, A.; DRESSER, B.L.; POPE, C.E. Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 69, p.1032-1041, 2003.

GÓMEZ, M.C.; POPE, C.E.; KUTNER, R.H.; RICKS, D.M.; LYONS, L.A.; RUHE, M.; REISER, J. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. **Cloning and Stem Cells**, v.10, p. 469-484, 2008.

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*). **Cryo-Letters**, v.31, p.130-138, 2010.

HAINES, A.M.; JANECKA, J.E.; TEWES, M.E.; GRASSMAN, L.I.J.; MORTON, P. The importance of private lands for ocelot *Leopardus pardalis* conservation in the United States. **Oryx**, v. 40, p. 1-5, 2006.

HAINES, A.M.; TEWES, M.E.; LAACK, L.L.; GRANT, W.E.; YOUNG, J. Evaluating recovery strategies for an ocelot (*Leopardus pardalis*) population in the United States. **Biological Conservation**, v. 126, p. 512-522, 2016.

HERRID, M.; BILLAH, M.; SKIDMORE, J.A. Successful pregnancies from vitrified embryos in the dromedary camel: Avoidance of a possible toxic effect of sucrose on embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 116-123, 2017.

JAIN K.J.; PAULSON R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1037-1046, 2010.

JANG, T.H.; PARK, S.C.; YANG, J.H.; KIM, J.Y.; SEOK, J.H.; PARK, U.S.; CHOI, C.W.; LEE, S.R.; HAN, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, p.12-18, 2017.

JANZ, F.L.; JANZ, F.D.L., DEBES, A.D.A., CAVAGLIERI, R.D.C., DUARTE, S.A., ROMÃO, C.M., MORÓN, A.F., BYDLOWSKI, S.P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

KOLOWSKI, J.; ALONSO, A. Density and activity patterns of ocelots (*Leopardus pardalis*) in northern Peru and the impact of oil exploration activities. **Biological Conservation**, v. 143, p. 917-925, 2010.

LAACK, L.L. Ecology of the ocelot (*Felis pardalis*) in south Texas. **Texas A & I University Press**. p. 226, 1991.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F. J.; MORENO, J.M.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 347-361, 2009.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. **Cryobiology**, v. 62, p. 145-151, 2011.

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.

LIRA, G.P.O.; BORGES, A.A.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.; MOURA, L.F.M.P.; SILVA, H.V.R.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of somatic tissue cryopreservation on puma (*Puma concolor* L, 1771) tissue integrity and cell preservation after *in vitro* culture. **Cryobiology**, v. 101, p. 52-60, 2021.

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.

LOUTRADI, K.E.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; PAPANIKOLAOU, E.G.; PADOS, G.; BONTIS, I.; TARLATZIS, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v.90, p.186-193, 2008.

LUDLOW, M.; SUNQUIST, M. Ecology and behavior of ocelots in Venezuela. **National Geographic Research**, v. 3, p. 447-461, 1987.

MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.R.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of brazilian biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 62-66, 2016.

MAFFEI, L.; NOSS, A.J.; CUÉLLAR, E.; RUMIZ, D.I. Ocelot (*Felis pardalis*) population densities, activity, and ranging behaviour in the dry forests of eastern Bolivia: data from camera trapping. **Journal of Tropical Ecology**, v. 2, p. 349-353, 2005.

MARTINS L.; CARDOSO, D. Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas de óxido de eteno. **Química Nova**, v.28, p.264-273, 2005.

MARTINS, R.; QUADROS, J.; MAZZOLLI, M. Food habits and anthropic interference on the territorial marking activity of *Puma concolor* and *Leopardus pardalis* (Carnivora: Felidae) and other carnivores in the Jureia-Itatins Ecological Station, Sao Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 427-435, 2008.

MENDONÇA, L.E.T.; SOUTO, C.M.; ANDRELINO, L.L.; SOUTO, W.M.S.; VIEIRA, W. L.S.; ALVES, R.R.N. Conflitos entre pessoas e animais silvestres no semiárido paraibano e suas implicações para conservação. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.11, p.185-199, 2011.

MENDONÇA, P.P. A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) no Parque Estadual da Serra do Mar: densidade, tamanho populacional e perspectivas para a conservação. **Dissertação de pós-graduação**, 2014.

MESTRE-CITRINOVITZ, A.C.; 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.

MOULAVI, F.; HOSSEINI, S.M.; TANHAIE-VASH, N.; OSTADHOSEINI, S.; HOSSEINI, S.H.; HAJINASROLLAH, M.; ASGHARI, M.H.; GOURABI, H.; SHAHVERDI, A.; VOUSOUHG, A.D.; NASRESFAHANI, M.H. Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-mortem frozen tissue in absence of cryo-protectant and in vitro matured domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v. 1, n. 90, p, 197-203, 2017.

MORAES, K.; MORAES, R.O.; CONTI, M.J.; LANÇONI, M.D.; CASTANHA, A.; MORAIS, K.; SOARES, R. Manipulação, cultivo e preservação de microrganismos. Apostila de treinamento. **Fundação André Tosello pesquisa e tecnologia**. 2016. Impresso.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p.55–63, 1983.

MUJITABA, M.; VASS, N.; BODO, S. The recent state of cryopreservation techniques for *exsitu* gene conservation and breeding purposes in small ruminants: A review. **Acta Agraria Debreceniensis**, v. 2020, p. 81–87, 2020.

MURRAY, J.L., GARDNER, G.L. *Leopardus pardalis*. **Mammalian Species**, v. 548, p. 1-10, 1997.

MLODAWSKA, W.; MROWIEC, P.; BOCHENEK, M.; WNŹYK, K.; KOCHAN, J.; NOWAK, A.; NIŹYAŹSKI, W.; PROCHOWSKA, S.; PAŹYYS, M. Effect of serum starvation and contact

inhibition on dermal fibroblast cell cycle synchronization in two species of wild felids and domestic cat. **Annals of Animal Science**, v. 22, p. 1245-1255, 2022.

NEWTON H.; FISHER J.; ARNOLD J.R.P.; PEGG D.E.; FADDY M.J.; GOSDEN R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 376-380, 1998.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros. **Sociedade de Zoológicos do Brasil**, São Paulo, SP, 2ªed., 1999.

OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. Guia de campo dos felinos do Brasil. **Instituto Pró-Carnívoros**, v. 1, p. 80, 2005.

OLIVEIRA, G.P. Ecologia da jaguatirica, *Leopardus Pardalis* (Linnaeus, 1758), na caatinga do Piauí. **Dissertação de Pós-Graduação** em Ecologia da Universidade de Brasília, p. 1-13, 2012.

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**, 2021.

PARK, B. W.; JANG, S. J.; BYUN, J. H.; KANG, Y. H.; CHOI, M. J.; PARK, W. U.; RHO, G. J. Cryopreservation of human dental follicle tissue for use as a resource of autologous mesenchymal stem cells. **Journal Tissue Engr and Regenerative Medicine**, v.11, p.489–500, 2017.

PAVIOLO, A.; OLIVEIRA, T.; SCHIPPER, J.; BIANCHI, R.; PAYAN, E; CARVAJAL, S.V. *Leopardus pardalis* (errata version published in 2016) **The IUCN Red List of Threatened Species** 2015.

PEREIRA, A.F.; AQUINO, L.V.C.; NASCIMENTO, M.B.; BEZERRA, F.V.; BORGES, A.A.; PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, M.F. Ultrastructural and morphometric description of the ear skin and cartilage of two South American wild histricognate rodents (*Dasyprocta leporina* and *Galea*

*spixii*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06775, 2021.

PIZZUTTO, C.S.; COLBACHINI, H.; JORGE-NETO, P.N. One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. **Animal Reproduction**, v. 18, p. 1–7, 2021.

PLURALE. Estudo aponta que status de conservação de jaguatiricas é preocupante. **Plurale em site**, 2014. Disponível em <<https://www.plurale.com.br/site/noticias-detalhes.php?cod=13514&codSecao=2>>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2022.

PRAXEDES, É.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 É.A.; OLIVEIRA L.R.M.; SILVA M.B.; BORGES A.A.; SANTOS M.V.O.; SILVA H.V.R.; OLIVEIRA M.F.; SILVA A.R.; PEREIRA A.F. 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.

RODRIGUES L.L.V.; MOURA, Y.B.F.; VIANA, J.V.S.; PRAXEDES, E.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Comparison between concentration and type of intracellular cryoprotectants and the presence of sucrose for cryobanks of somatic cells derived from captive *Pumas*. **Zoo Biology**, p. 1-9, 2022.

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.

SANTOS, M. D. C.; AQUINO, L. V. C.; NASCIMENTO, M. B.; SILVA, M. B.; RODRIGUES, L. L. V.; PRAXEDES, E. A.; OLIVEIRA, L. R. M.; SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F. Evaluation of different skin regions derived from a postmortem jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), after vitrification. **Zoobiology Wiley**, ed. 40, p. 280-287, 2021.

SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; POLLI, G.O.; DECO, S.T.; ARAUJO, G.R. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 63, p.1060-1065, 2011.

SHAW, J.M.; COX, S.L.; TROUNSON, A.O.; JENKIN, G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.161, p.103-110, 2000.

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, A.A.R.; RODRIGUES, C.G.; SILVA, M.B. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia**, v.17, p.13-18, 2017.

SILVA, M.B.; PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; NASCIMENTO, M.B.; SILVA, H.V.R.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Evaluation of the damage caused by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. **Zoo Biology**, v. 40, p. 288-296, 2021.

SILVEIRA, L.; JÁCOMO, A.T.; ASTETE, S.; SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.M.; FURTADO, M.M.; MARINHO-FILHO, J. Density of the near threatened jaguar *Panthera onca* in the caatinga of north- eastern Brazil. **Oryx**, v.44, p.104-109, 2010.

SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; CERVERA, R.P.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. **Theriogenology**, v. 59, p. 1469-1477, 2003.

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

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.

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, p.120-128, 2010.

TROLLE, M.; KÉRY, M. Estimation of Ocelot Density in the Pantanal Using Capture–Recapture Analysis of Camera-Trapping Data. **Journal of Mammalogy**, v. 84, p. 607-614, 2003.

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 Open Access**, v. 2, n. 1, p. 72-76, 2013.

VIANA, J.V.S.; MOURA, L.F.M.P.; PRAXEDES, E.A.; AQUINO, L.V.C.; NASCIMENTO, M.B; JÚNIOR, F.R.P.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of vitrification techniques on the formation of skin cryobank of the ocelot (*Leopardus pardalis*). **CryoLetters**, v. 44, p. 47-53, 2023.

WELLER, S.H.; BENNETT, C.L. Twenty-four hour activity budgets and patterns of behavior in captive ocelots (*Leopardus pardalis*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 71, p. 67-79, 2001.

WHALEY, D.; DAMYAR, K.; WITEK, R.P.; MENDOZA, A.; ALEXANDER, M.; LAKEY, J.R. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. **Cell Transplantation**, v. 30, p. 1-12, 2021.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p.305-310, 2013.

YIN, X.J.; LEE, Y.H.; JIN, J.Y.; KIM, N.H.; KONG, I.K. Nuclear and microtubule remodeling and in vitro development of nuclear transferred cat oocytes with skin fibroblasts of the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*). **Animal Reproduction Science**, v.95, p.307-315, 2006.

ZARRATE-CHARRY, D.; GONZÁLEZ-MAYA, J.F.; HERNÁNDEZ-ARÉVALO, Á.; CEPEDA, A.A.; BALAGUERA-REINA, S.A.; CASTAÑO-URIBE, C.; ANGE, C. Usos tradicionais de felinos selvagens na região caribenha da Colômbia: novas ameaças para a conservação. **Revista Latino-Americana de Conservação**, v. 1, n. 1, pág. 64-69, 2010.