



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

LUIZA BENTO DE QUEIROZ NETA

**CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu*
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

MOSSORÓ-RN

2018



LUIZA BENTO DE QUEIROZ NETA

**CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu*
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

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

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira.

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira.

MOSSORÓ–RN

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade da autora, sendo a mesma, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra 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 sua respectiva autora sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pela autora

Q3c Queiroz Neta , Luiza Bento de .
 CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS
 (Pecari tajacu LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A
 DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO / Luiza
 Bento de Queiroz Neta . - 2018.
 97 f. : il.

 Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
 Coorientador: Moacir Franco de Oliveira.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência Animal, 2018.

 1. Mamíferos silvestres. 2. recuperação post-
 mortem. 3. células somáticas. I. Pereira,
 Alexsandra Fernandes, orient. II. Oliveira,
 Moacir Franco de, co-orient. III. Título.

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



LUIZA BENTO DE QUEIROZ NETA

**CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu*
LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

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

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal.

Defendida em: 22/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Alessandra Fernandes Pereira (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dra. Gabriela Liberalino Lima (IFCE)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUIZA BENTO DE QUEIROZ NETA – Nascida em Mossoró, RN, no dia 09.08.1990, filha de Cicero Ramalho da Rocha e Rocilda Bento de Queiroz. Graduiu-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, 2011–2015). Estagiou no Laboratório de Biotecnologia Animal (Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica, UFERSA, 2013–2014, Programa de Iniciação Científica Institucional, UFERSA, 2014–2015). Em dezembro de 2015, foi aprovada no processo seletivo para o Mestrado acadêmico em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA) iniciando assim as atividades no Laboratório de Biotecnologia Animal com bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus pais Rocilda Bento de Queiroz e
Cicero Ramalho da Rocha pelo amor
incondicional e por sempre me apoiarem.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre está comigo e me dar força e coragem para enfrentar os obstáculos desta trajetória.

Aos meus pais, Rocilda Bento de Queiroz e Cicero Ramalho da Rocha, pelo amor, carinho, dedicação e por sempre estarem presentes na minha vida, apoiando nas minhas decisões e entendendo as minhas ausências. Vocês são tudo na minha vida. Muito obrigada pela dedicação e amor incondicional!

As minhas irmãs, Luiria Bento Ramalho e Antônia Lorena Bento Ramalho, pela linda e sincera amizade e amor. Obrigada por sempre estarem comigo!

À minha sobrinha/afilhada Maria Valentina Ramalho Menêzes, por ser meu refúgio nas horas tristes, trazendo felicidade e amor à minha vida. Muita obrigada minha pequena!

Ao Fernando Jackson Lopes de Lima, meu amor e companheiro, por sempre está me apoiando nas minhas decisões e me acompanhar em toda essa trajetória. Obrigada por acreditar em mim e por sempre está comigo nos momentos tristes e alegres.

À professora doutora Alexsandra Fernandes Pereira, minha orientadora, pelos ensinamentos, apoio, conselhos, paciência e dedicação. Muito obrigada por todos esses anos e por fazer de mim uma profissional melhor.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), por acompanharem e auxiliarem em todos os experimentos. Muito obrigada pelo companheirismo e a amizade construída durante todos esses anos! Agradeço especialmente a Gabriela Pereira de Oliveira Lira, Maria Bárbara Silva e Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira por sempre estarem presentes e disponíveis para auxiliar nos experimentos. Esse tempo foi importante para nós, pois aprendemos juntas a trabalhar em equipe.

As minhas amigas e companheiras de trabalho, Alana Azevedo Borges e Maria Valéria de Oliveira Santos, pelo companheirismo, conselhos e amizade construída durante todo esse tempo de aprendizado. A amizade de vocês foi/é muito importante para mim. Muito obrigada meninas!!

Aos professores doutores Alexandre Rodrigues Silva e Moacir Franco de Oliveira por permitirem o uso de seus laboratórios e do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) para a realização desse trabalho. Sem a parceria dos mesmos, seria bem mais difícil a finalização desse trabalho. Muito obrigada!

À UFRSA por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) por me permitir a formação de Mestre e pelos ensinamentos adquiridos durante a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite ao convite em contribuir com mais uma etapa deste aprendizado.

Finalmente, agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram nessa minha trajetória.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

QUEIROZ NETA, Luiza Bento de. CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2018.

RESUMO: A clonagem por transferência nuclear de células somáticas consiste numa atraente ferramenta para a conservação da biodiversidade e sua eficiência depende da obtenção e seleção de células doadoras de núcleo derivadas da pele de indivíduos de interesse. Especificamente para catetos, mamíferos silvestres encontrados algumas vezes em regiões de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados, o armazenamento a 4–6°C de tecidos da pele seria uma alternativa para a conservação do material genético desses animais. Portanto, o objetivo foi avaliar diferentes períodos de armazenamento e a presença de meio nutritivo sobre a recuperação de células somáticas derivadas da pele de catetos. Para tanto, 476 explantes auriculares (9,0 mm³) recuperados de onze animais adultos, oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA), foram distribuídos em sete grupos: amostras não refrigeradas (controle) e refrigeradas na ausência ou presença de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado com 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino e 2% de solução de antibiótico-antimicótico por 10, 30 e 50 dias de estocagem. Para as análises histológicas, amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4%, processadas e coradas com hematoxilina-eosina para avaliação da espessura da epiderme e derme, número de fibroblastos e halos. Além disso, fragmentos foram avaliados quanto à quantificação de regiões argirofílicas organizadoras nucleolares (AgNORs) e atividade metabólica por brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para as análises de cultivo *in vitro*, explantes foram cultivados e avaliados quanto à morfologia celular, qualidade do cultivo, viabilidade celular por azul de tripan, atividade proliferativa pela determinação da curva de crescimento e tempo de duplicação da população celular e atividade metabólica pelo ensaio de MTT. Comparações entre os fragmentos refrigerados e não refrigerados foram analisadas usando o software GraphPad Prisma. Quanto à espessura tecidual, apenas os fragmentos armazenados por 50 dias na ausência de meio nutritivo, apresentaram uma redução e aumento, respectivamente, da espessura da epiderme ($55,8 \pm 3,2$ µm vs. $64,8 \pm 2,1$ µm) e derme ($172,7 \pm 2,5$ µm vs. $147,6 \pm 2,5$ µm) quando comparado ao controle ($P < 0,05$). Além disso, o período de estocagem, independente da presença de meio, promoveu uma redução do número de fibroblastos e aumento no número de halos. Ainda, o número de AgNORs indicando atividade proliferativa, e atividade metabólica dos explantes, diminuíram com o período de armazenamento. Após o cultivo *in vitro* dos explantes, apenas os fragmentos armazenados sem meio por 50 dias não foram capazes de obter células somáticas. Além disso, células oriundas de explantes na presença de meio por 10 dias mostraram características similares às células de explantes não refrigerados, especialmente quanto à duração do cultivo, tempo de duplicação da população celular, dia de todos os explantes aderidos e tempo total de subconfluência. Desta forma, células viáveis de catetos podem ser recuperadas de fragmentos teciduais armazenados por até 50 dias na presença de meio nutritivo; contudo, tecidos somáticos refrigerados até 10 dias na presença de meio resultaram em células mais viáveis.

Palavras-chave: Mamíferos silvestres, recuperação *post-mortem*, células somáticas.

CONSERVATION OF SOMATIC TISSUE DERIVED FROM COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) SUBMITTED TO DIFFERENT STORAGE CONDITIONS

QUEIROZ NETA, Luiza Bento de. CONSERVATION OF SOMATIC TISSUE DERIVED FROM COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) SUBMITTED TO DIFFERENT STORAGE CONDITIONS. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2018.

ABSTRACT: Cloning by somatic cell nuclear transfer is an attractive tool for biodiversity conservation and its efficiency depends on the obtaining and selection of nucleus donor cells derived from the skin of individuals of interest. Specifically for collared peccaries, wild mammals found sometimes in regions difficult to access or far from specialized laboratories, the storage at 4–6°C of skin tissues would be an alternative for the conservation of the genetic material of these animals. Therefore, the aim was to evaluate different periods of storage and the presence of nutrient medium on the recovery of somatic cells derived from skin of collared peccaries. Thus, 476 ear explants (9.0 mm³) recovered from eleven adult animals from the Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) were distributed in seven groups: samples not refrigerated (control) and refrigerated in absence or presence of Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 2.2 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum and 2% antibiotic–antimycotic for 10, 30 and 50 days of storage. For the histological analyzes, samples were fixed in 4% paraformaldehyde, processed and stained with hematoxylin-eosin for evaluation of epidermal and dermal thickness, number of fibroblasts and halos. Moreover, fragments were evaluated for the quantification of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNORs) and metabolic activity by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). For *in vitro* culture analyzes, explants were cultured and evaluated for cell morphology, culture quality, cell viability by trypan blue, proliferative activity by determination of the growth curve and doubling time of the cell population and metabolic activity by MTT assay. Comparisons between the refrigerated and not refrigerated fragments were analyzed using the GraphPad Prisma software. As for the tissue thickness, only the fragments stored for 50 days in the absence of nutrient medium showed a reduction and increase, respectively, in the thickness of the epidermis (55.8 ± 3.2 µm vs. 64.8 ± 2.1 µm) and dermis (172.7 ± 2.5 µm vs. 147.6 ± 2.5 µm) when compared to control (P < 0.05). Moreover, the storage period, regardless of the presence of medium, promoted a reduction in the number of fibroblasts and increase in the number of halos. Also, the number of AgNORs indicating proliferative activity, and metabolic activity of the explants, decreased with the storage period. After the *in vitro* culture of the explants, only the fragments stored without medium for 50 days were not able to obtain somatic cells. Likewise, cells from explants in the presence of medium for 10 days showed similar characteristics to the cells of not refrigerated explants, especially regarding the duration of culture, doubling time of the cell population, day of all attached explants and subconfluence total time. Thus, viable cells derived from collared peccaries can be recovered from tissue fragments stored for up to 50 days in the presence of nutrient medium; nevertheless, refrigerated somatic tissues up to 10 days in the presence of medium resulted in more viable cells.

Keywords: Wild mammals, *postmortem* recovery, somatic cells.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Colheita e cultivo *in vitro* de tecidos somáticos de catetos. **a.** Captura de animais mantidos no CEMAS/UFERSA. **b.** Biópsia de pele da região auricular periférica de um indivíduo adulto. **c.** Fragmentação da biópsia de pele. **d.** Cultivo *in vitro* dos explantes (9,0 mm³) em DMEM suplementado.....21

Figura 2. Tecidos somáticos derivados da pele de catetos. **a.** Corte perpendicular de pele corado com hematoxilina-eosina. Seta preta indica a presença de halos perinucleares na epiderme. **b.** Quantificação de AgNORs. Seta vermelha apresenta o núcleo com proteínas argirofílicas nucleolares marcadas.29

CAPÍTULO 2 – INFLUENCE OF STORAGE PERIOD AND NUTRITIVE MEDIUM ON RECOVERY OF FIBROBLAST-LIKE CELLS FROM COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) REFRIGERATED SKIN

Figure 1. Histological sections of not-refrigerated and refrigerated skin derived from collared peccaries submitted to different storage periods and conditions. **a)** not-refrigerated tissues; and refrigerated tissues in the absence of medium for **b)** 10 days; **c)** 30 days; **d)** 50 days and in presence of medium for **b')** 10 days; **c')** 30 days; **d')** 50 days. Black arrow indicates the presence of perinuclear halos in the epidermis; triangle indicates fibroblasts in the dermis. Scale bar: 50 µm.69

Figure 2. Proliferative and metabolic activity of not-refrigerated and refrigerated skin derived from collared peccaries submitted to different storage periods and conditions. **a)** Quantification of AgNOR number /cell. **b)** Quantification of AgNOR area/cell. **c)** Metabolic assessment by the MTT assay. Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; different letters show statistically significant differences among the groups ($P < 0.05$). Bars represent standard error.70

Figure 3. Primary and subcultures of fibroblast-like cells from ear skin samples of collared peccaries. **a)** Cells from not-refrigerated tissues; and cell from refrigerated tissues in the

absence of medium for **b)** 10 days; **c)** 30 days; **d)** 50 days and in the presence of medium for **b')** 10 days; **c')** 30 days; **d')** 50 days. Magnification 40×71

Figure 4. The growth curves of cells derived from not-refrigerated and refrigerated skin tissues of collared peccaries using different storage periods and conditions. Each value represents mean of cells/mL in duplicate. Bars represent standard error72

Figure 5. Viability and metabolic activity of the non-refrigerated and refrigerated skin cells of collared peccaries using different storage periods and conditions. **a)** Cell viability by trypan blue stain. **b)** Metabolic assessment by the MTT assay. Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; different letters show statistically significant differences among the experimental groups ($P < 0.05$). Bars represent standard error....73

LISTA DE QUADRO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quadro 1. Conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados de pele de alguns mamíferos domésticos..	25
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – INFLUENCE OF STORAGE PERIOD AND NUTRITIVE MEDIUM ON RECOVERY OF FIBROBLAST-LIKE CELLS FROM COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) REFRIGERATED SKIN

Table 1. Thickness of the epidermis and dermis and mean number of fibroblasts and perinuclear halos of the ear skin derived from collared peccaries after conservation at 4°C using different storage periods and conditions.....66

Table 2. Establishment of primary cultures and subcultures of skin cells derived from collared peccaries after conservation at 4°C using different storage periods and conditions67

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que
±	mais ou menos
×	Vezes
µm	Micrômetro
abs	Absorbância
°C	Grau Celsius
AgNOR	Região argirofílica organizadora nucleolar
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cm ²	Centímetro quadrado
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
FBS	Fetal bovine serum
g/L	Gramas por litro
h	Hora
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
M	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
min	Minuto
mm ³	Milímetro cúbico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio

ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
PBS	Solução tampão fosfato
PDT	Tempo de duplicação da população (<i>Population Doubling Time</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer
SFB	Soro Fetal Bovino
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
USA	United States of America
VDC	Vitrificação direta em criotubos
vs.	<i>versus</i>
VSS	Vitrificação em superfície sólida

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1. USO DE TECIDOS SOMÁTICOS NA CONSERVAÇÃO DE CATETOS.....	20
2.2. FATORES QUE AFETAM A CONSERVAÇÃO A 4–6°C DE TECIDOS SOMÁTICOS.....	22
2.2.1. Período de armazenamento	23
2.2.2. Uso de meio nutritivo para a conservação em sistema refrigerado	27
2.3. FERRAMENTAS DE AVALIAÇÃO DE TECIDOS SOMÁTICOS REFRIGERADOS.....	28
2.3.1. Caracterização histológica da pele.....	28
2.3.2. Caracterização das células durante o cultivo <i>in vitro</i>	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1. OBJETIVO GERAL.....	34
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2 – INFLUENCE OF STORAGE PERIOD AND NUTRITIVE MEDIUM ON RECOVERY OF FIBROBLAST-LIKE CELLS FROM COLLARED PECCARY (<i>Pecari tajacu</i> LINNAEUS, 1758) REFRIGERATED SKIN	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	74
ANEXOS.....	75

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os catetos, mamíferos da família *Tayassuidae*, pertencentes à ordem Artiodátala, são exclusivos na América e estão amplamente distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo encontrados em todo o território brasileiro e ocupando os mais diversos ambientes (MINERVINO et al., 2014). Atualmente, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2018), sua população é considerada estável, estando a espécie classificada como menos preocupante. Em virtude das taxas contínuas de destruição de habitats (SANTOS et al., 2009) e a crescente caça predatória (PARRY et al., 2009), o status populacional requer monitoramento.

Em geral, o atrativo pelos catetos tem sido atribuído principalmente a sua função ecológica e científica. Esses indivíduos contribuem para o equilíbrio e a composição da cadeia alimentar de algumas espécies, como felinos (FONSECA et al., 1994), além de atuarem como predadores e dispersores de sementes (BODMER, 1991). Além disso, essa espécie pode representar um interessante modelo experimental para aquelas filogeneticamente próximas e em risco de extinção, como queixadas e taguás (IUCN, 2018). Adicionalmente, a qualidade de sua carne e couro, associada a sua ótima adaptação a cativeiros, tem possibilitado o uso dos mesmos em pesquisas científicas e interesses comerciais (SANTOS et al., 2009).

Em virtude de todas essas características, estratégias de conservação devem ser empregadas, visando à manutenção da espécie e, conseqüentemente, do ecossistema global (SILVA et al., 2012). Dentre as estratégias a serem empregadas, a conservação de amostras teciduais tem se destacado como ferramenta imediata de armazenamento de material genético (BORGES et al., 2017a, LIMA et al., 2012), sendo a estocagem de tecidos somáticos, especialmente derivados da pele, uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional da espécie de interesse (PEREIRA et al., 2014).

Assim, como técnicas de conservação de tecidos somáticos usados em mamíferos silvestres, têm-se a criopreservação por congelamento lento (CAAMAÑO et al., 2008), por vitrificação (BORGES et al., 2017b) e a refrigeração a 4–6°C (TOVAR et al., 2008). Esta última técnica tem sido empregada especialmente para o transporte ou conservação em curto prazo de tecidos somáticos de indivíduos localizados em regiões de difícil acesso ou distantes dos laboratórios especializados (TOVAR et al., 2008).

1 Contudo, o emprego desta técnica depende de alguns fatores, como o período e as
2 condições de armazenamento a 4–6°C das amostras teciduais, os quais podem influenciar na
3 recuperação das células após cultivo *in vitro* dos tecidos (AOUED; SINGH, 2015). Em
4 mamíferos domésticos, estudos têm mostrado variações quanto ao período de estocagem e a
5 presença de meio nutritivo em diferentes espécies, como suínos (GE et al., 2010) e caprinos
6 (OKONKWO; SINGH, 2014).

7 Em suínos, Ge et al. (2010) observaram que tecidos somáticos derivados da pele
8 desses indivíduos e conservados à 4°C por até 15 dias na presença de meio nutritivo
9 apresentaram 20% de atividade metabólica tecidual, percentual inferior quando os tecidos
10 foram refrigerados por quatro dias (70% de atividade metabólica tecidual). Em caprinos,
11 Okonkwo e Singh (2014) obtiveram células somáticas morfolologicamente viáveis derivadas de
12 tecidos da pele refrigerada a 4°C por até 41 dias na ausência de meio nutritivo. Já em ovinos,
13 Singh e Ma (2016) verificaram a possibilidade de obtenção de células a partir de tecidos
14 somáticos de pele refrigerados na ausência de meio nutritivo por 65 dias, porém essas células
15 apresentaram crescimento bastante lento. Além disso, esses autores não observaram nenhum
16 crescimento celular quando os fragmentos teciduais foram conservados por 70 dias.

17 Quanto ao uso da conservação a 4–6°C de amostras somáticas em mamíferos
18 silvestres, pesquisas relacionadas ao conhecimento dos fatores que influenciam no sucesso da
19 técnica ainda são escassos. Em felinos (LEÓN-QUINTO et al., 2011; TOVAR et al., 2008) e
20 roedores silvestres (TOVAR et al., 2008), apenas são relatados o uso da refrigeração como
21 ferramenta de transporte em curto prazo.

22 Especificamente para catetos, os quais podem ser encontrados algumas vezes em
23 regiões de difícil acesso, como florestas tropicais (FANG et al., 2008), a conservação a 4–6°C
24 de amostras somáticas poderia ser uma alternativa para a estocagem de uma maior
25 amostragem da população desta espécie. Nesse sentido, baseados em pesquisas em espécies
26 domésticas, fazem-se necessários avaliar as condições e períodos adequados de
27 armazenamento dos tecidos da pele de catetos.

28 Portanto, objetivou-se avaliar os períodos de armazenamento e a presença de meio
29 nutritivo sobre a recuperação de células somáticas derivadas de tecidos somáticos da pele de
30 catetos conservada a 4–6°C.

31
32
33
34

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. USO DE TECIDOS SOMÁTICOS NA CONSERVAÇÃO DE CATETOS

Dentre as estratégias de conservação a serem empregadas para a manutenção da biodiversidade, o uso de fragmentos teciduais tem se destacado como ferramenta imediata de estocagem do material genético (SILVA et al., 2015), sendo o armazenamento de tecidos somáticos, especialmente derivados da pele, uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional das espécies de interesse, não existindo dependência de idade ou gênero (PEREIRA et al., 2014). Em geral, células recuperadas de tecidos somáticos podem ser usadas para diferentes finalidades, como formação de criobancos (LEÓN-QUINTO et al., 2009), produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas ou TNCS (WANI; HONG, 2018; YELISETTI et al., 2016) e pesquisas de pluripotencialidade (VERMA et al., 2012).

Embora outros órgãos possam ser empregados como fontes de tecidos somáticos em alguns mamíferos silvestres, como ossos em cervídeos (BERG et al., 2007) e mucosa intestinal em lince ibérico (LEÓN-QUINTO et al., 2009), a pele ainda é considerada o principal órgão para obtenção de amostras somáticas e tem sido o órgão de escolha também para catetos (BORGES et al., 2017b; SANTOS et al., 2016).

Em catetos, os primeiros estudos relacionados à conservação de tecidos somáticos foram realizados por Santos et al. (2016), sendo estabelecidos protocolos de colheita e cultivo *in vitro* de fragmentos teciduais (**Figura 1**). Nesse estudo, os autores estabeleceram uma metodologia de colheita de explantes auriculares de indivíduos adultos vivos, bem como instituíram um meio de cultivo constituído por Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos. Além disso, nesse estudo, foi também observado que a maioria das células recuperadas foi morfolologicamente classificada como fibroblastos. Em geral, os fibroblastos são considerados células de maior interesse para a TNCS, uma vez que são caracterizadas como células mesenquimais não especializadas com alto potencial de proliferação, tendo a capacidade de se diferenciar em uma variedade de outros tecidos, como tecidos cartilaginoso e muscular (OBACK; WELLS, 2007).

Posteriormente, estudos relacionados à criopreservação de tecidos somáticos foram desenvolvidos em catetos. Inicialmente, Borges et al. (2017a) descreveram histologicamente a região auricular periférica, objetivando auxiliar no desenvolvimento de protocolos de

criopreservação mais específicos. Nesse estudo, os autores verificaram que a região auricular periférica de catetos possuem algumas variações marcantes em relação a outros mamíferos. Em catetos, apenas três camadas na epiderme foram visíveis: basal, intermediária e córnea, apresentando um tamanho total de 104,2 μm . Já na maioria dos mamíferos, como em suínos (JACOBI et al., 2005), a epiderme pode ser dividida em córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Além disso, foram evidenciadas diferenças quanto ao número de camadas de células epidermais (quatro camadas para catetos), resultado que diferiu de cervídeos (três camadas), e bovinos (cinco camadas) (NAGARAJU et al., 2012), mas que foi similar aos suínos (MONTEIRO-RIVIERE et al., 1990). Finalmente, a derme de catetos apresentou um alto perfil proliferativo evidenciado pela quantificação de regiões organizadoras nucleolares.

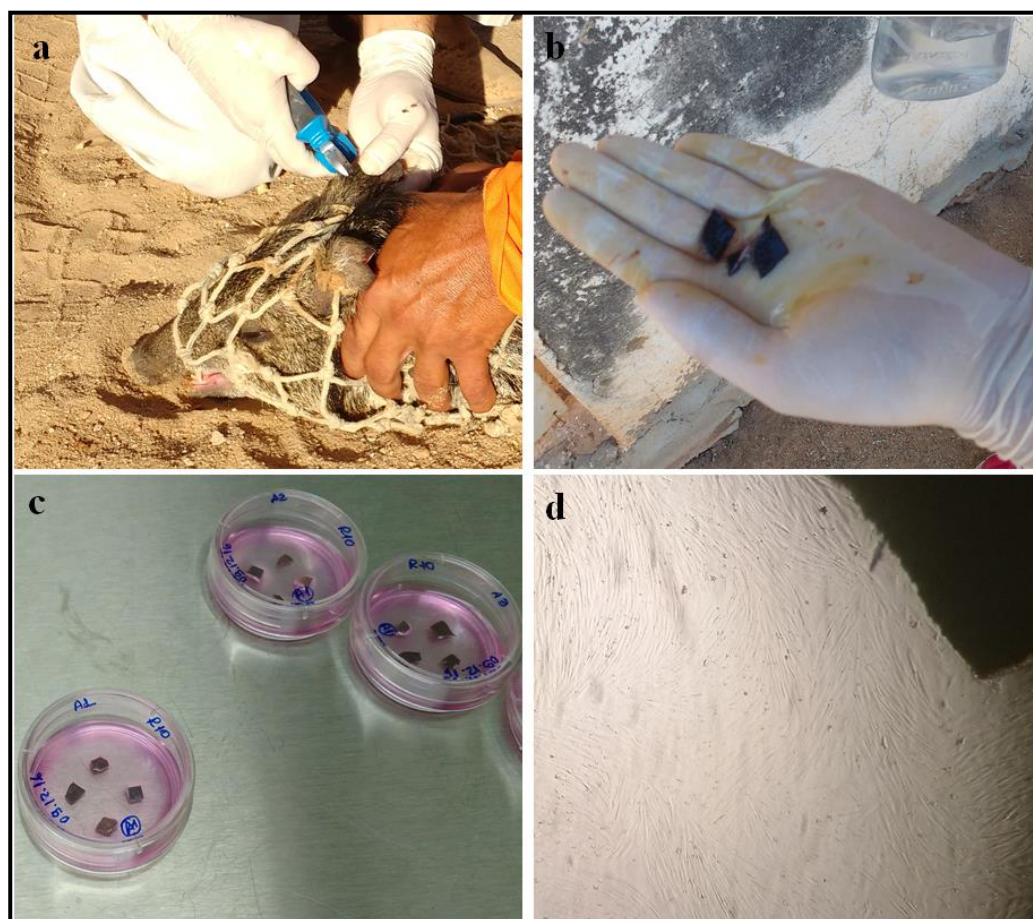


Figura 1. Colheita e cultivo *in vitro* de tecidos somáticos de catetos. **a.** Captura de animais mantidos no CEMAS/UFERSA. **b.** Biópsia de pele da região auricular periférica de um indivíduo adulto. **c.** Fragmentação da biópsia de pele. **d.** Cultivo *in vitro* dos explantes (9,0 mm^3) em DMEM suplementado.

Posteriormente, protocolos de criopreservação foram desenvolvidos quanto à escolha do método de vitrificação e solução crioprotetora. Assim, Borges et al. (2017b) observaram que apesar dos dois métodos de criopreservação, vitrificação em superfície sólida (VSS) e vitrificação direta em criotubos (VDC), serem capazes de manter as características normais do tecido auricular da região periférica de catetos após o aquecimento, o método VSS ainda foi o mais vantajoso para a manutenção das características proliferativas das células provenientes do tecido vitrificado. Em seguida, Borges et al. (2018) estabeleceram que a melhor solução crioprotetora para VSS no tecido somático de catetos foi a combinação de 3,0 M de etilenoglicol (EG), 10% de SFB e 0,25 M de sacarose.

Assim, dentro da temática de conservação imediata de material genético da espécie de interesse, o armazenamento de tecidos somáticos a 4–6°C pode ser empregado em situações onde os animais estejam localizados em regiões de difícil acesso e distante de laboratórios especializados (SILVESTRE et al., 2004; WALCOTT; SINGH, 2017). Para tanto, como estabelecido para os protocolos de criopreservação e cultivo *in vitro*, faz-se necessário avaliar as condições e períodos adequados de armazenamento dos tecidos da pele de catetos conservados a 4–6°C. Em outras espécies, esse tipo de conservação é bastante empregado em virtude de sua simplicidade, eficiência e disponibilidade, já que não envolve o uso de materiais mais complexos e de alto custo (BASARAN et al., 2006).

2.2. FATORES QUE AFETAM A CONSERVAÇÃO A 4–6°C DE TECIDOS SOMÁTICOS

Em geral, a conservação tecidual hipotérmica, ou seja, o armazenamento de tecidos em temperatura inferior à temperatura fisiológica normal e superior ao ponto de congelação (ACKERS, 2006), pode ser categorizado em diferentes estágios: leve (32–35°C), moderado (27–32°C), profundo (10–27°C) e ultraprofundo (0–10°C) (BAUST et al., 2015). Para todos os estágios, as condições hipotérmicas promovem uma desaceleração do metabolismo celular e uma redução da demanda de oxigênio e conservação da energia química (BROCKBANK; TAYLOR, 2006).

O emprego eficiente dessa técnica depende de alguns fatores, como os períodos e as condições de armazenamento a 4–6°C das amostras somáticas, os quais podem influenciar na recuperação das células após cultivo *in vitro* dos tecidos (AOUED; SINGH, 2015). Em mamíferos domésticos (**Quadro 1**), estudos têm mostrado variações quanto ao período de estocagem e a presença de meio nutritivo em diferentes espécies (GE et al., 2010; OKONKWO; SINGH, 2014).

Quanto ao uso da conservação a 4–6°C de amostras somáticas em mamíferos silvestres, pesquisas relacionadas ao conhecimento dos fatores que influenciam no sucesso da técnica ainda são escassos. Em felinos, cervídeos e roedores silvestres, Tovar et al. (2008) usaram sistemas refrigerados na presença de solução tampão fosfato para o transporte em curto prazo (até sete dias) de tecidos somáticos da pele derivados de algumas espécies nativas do Chile, como o gato-chileno (*Oncifelis guigna*), a chinchila (*Chinchilla lanígera*), o gambá chileno (*Rhyncholestes raphanurus*) e pudu do sul (*Pudu puda*), localizadas em diferentes regiões do Chile e distantes de laboratórios especializados. Nesse estudo, os autores obtiveram um total de 30 biópsias de pele e após o cultivo *in vitro*, 93,0% (28/30) alcançaram o crescimento celular ao redor dos explantes, resultando assim em 69 linhagens celulares com características morfolologicamente normais. Assim, amostras da pele podem ser mantidas a 4°C em armazenamento refrigerado até sete dias sem diminuição da viabilidade tecidual/celular (TOVAR et al., 2008).

2.2.1. Período de armazenamento

O período de armazenamento consiste num fator importante para a conservação eficiente das amostras somáticas da espécie de interesse (CAPUTCU et al., 2013) e possui variáveis períodos de acordo com a espécie e sua localização (TOVAR et al., 2008). Além disso, as informações sobre a causa da morte é também um parâmetro relevante que pode influenciar a viabilidade dos tecidos e das células recuperadas após o cultivo *in vitro* (SILVESTRE et al., 2003).

Em mamíferos domésticos (**Quadro 1**), diferentes períodos já foram apresentados em algumas espécies de produção. Em suínos, Silvestre et al. (2003) verificaram que tecidos somáticos derivados da pele quando conservados a 4°C por até 10 dias mantinham a viabilidade celular após o cultivo *in vitro*. Já Singh e Ma (2016) armazenaram amostras refrigeradas de ovelhas por 65 dias e obtiveram células viáveis e geneticamente estáveis. Contudo, os mesmos autores não obtiveram células quando os explantes foram refrigerados por 70 dias.

Em geral, o período de armazenamento pode afetar a qualidade das células recuperadas (KIM et al., 2014), bem como a capacidade de crescimento celular a partir dos explantes aderidos (CAPUTCU et al., 2013). Kim et al. (2014) observaram que a taxa de proliferação de células oriundas de tecido cartilaginoso humano foi comprometida após sete

1 dias de estocagem. Nesse estudo, os autores observaram que até sete dias, células viáveis e
2 semelhantes ao controle (não refrigerado) foram obtidas dos explantes cultivados.

3 Além disso, Birdsill et al. (2014) cultivando tecido cerebral humano, verificaram que o
4 RNA foi degradado progressivamente com o aumento do período de armazenamento em
5 sistema refrigerado, reduzindo a proporção de expressão gênica e confluência celular. Ainda,
6 em tecidos somáticos da pele humana esse tempo também afetou a integridade morfológica
7 dos tecidos pela observação de vacúolos (GAUCHER et al., 2012).

8 Apenas com o uso da refrigeração é possível manter a conservação de tecidos e células
9 em curto prazo. Contudo, com o prolongamento do tempo de refrigeração, efeitos indesejáveis
10 podem acontecer no armazenamento. Durante a hipotermia, a estrutura celular sofre alteração,
11 formando assim um edema. A bomba sódio-potássio tem sua atividade prejudicada, e como
12 resultado, o sódio entra passivamente na célula. Isso cria um ambiente intracelular
13 hiperosmolar e, posteriormente, um influxo de água, causando assim o inchaço celular
14 (MARK-HUGO et al., 2007). Assim, para prolongar o tempo de estocagem e neutralizar os
15 efeitos colaterais prejudiciais da hipotermia, faz-se necessário o uso de meio nutritivo.

16

17

Quadro 1. Conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados de pele de alguns mamíferos domésticos.

Espécie	Período (dias)	Meio	Principais resultados	Autores
Bovina	9,0	Ausência de meio	a) Eficiência total de 100% (246/246) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> . b) Células morfolologicamente normais e derivadas de tecido cartilaginoso.	CAPUTCU et al. (2013)
	49	Ausência de meio	a) Eficiência total de 58,73% (333/567) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> . b) Número de explantes com crescimento celular foi reduzido com o aumento do período de armazenamento. c) Células recuperadas morfolologicamente normais com expressão normal para o gene da proteína fluorescente verde (GFP).	WALCOTT; SINGH (2017)
Caprina	41	Ausência de meio	a) Eficiência total de 83,5% (450/539) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> , apresentando valores inferiores a 50% a partir dos 33 dias (40,7%, 11/27). b) Nível de confluência celular foi reduzido com o aumento do período de armazenamento. c) Células morfolologicamente semelhantes a fibroblastos com cariótipo normal para a espécie.	OKONKWO; SINGH (2014)
	160	DMEM com 10% de SFB	a) Eficiência total de 97,5% (383/393) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> . b) Nível de confluência celular foi reduzido com o aumento do período de armazenamento, sendo observado que células recuperadas de explantes conservados por 160 dias apresentavam crescimento ligeiramente lento. c) Células recuperadas morfolologicamente semelhantes a fibroblastos	AOUED; SINGH (2015)

			com cariótipo normal para a espécie. d) Viabilidade das células após descongelação foi maior que 67% para os diferentes dias de conservação dos explantes.	
Ovina	2,3	Ausência de meio	a) Número de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> e nível de confluência celular foi reduzido com o aumento do período de armazenamento. b) Células morfolologicamente normais com tempo de duplicação da população de 34,8 h.	SINGH et al. (2011)
	14,5	Ausência de meio	a) Eficiência total de 100% (44/44) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> .	SILVESTRE et al. (2004)
	65	Ausência de meio	a) Eficiência total de 77,6% (374/481) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> . b) Nível de confluência celular foi reduzido com o aumento do período de armazenamento. c) Células morfolologicamente semelhantes a fibroblastos com cariótipo normal para a espécie, porém com crescimento lento.	SINGH; MA (2016)
Suína	14	Ausência de meio	a) Eficiência total de 91,3% (21/23) de explantes com crescimento de células após o cultivo <i>in vitro</i> , tendo 14º dia apresentado uma eficiência de 17,0% (1/3).	SILVESTRE et al. (2003)
	15	DMEM com 10% de SFB	a) Eficiência de 70% e 20% de atividade metabólica após 4 e 15 dias de conservação, respectivamente. b) Diminuição da viabilidade das células com o aumento do período de armazenamento.	GE et al. (2010)

2.2.2. Uso de meio nutritivo para a conservação em sistema refrigerado

A conservação de tecidos somáticos a 4°C pode ser realizada tanto na ausência (SILVESTRE et al., 2003) quanto na presença de meio nutritivo (AOUED; SINGH, 2015). Em geral, condições de refrigeração na ausência de meio são estabelecidas visando conhecer a resistência do tecido em situações onde não há uma mínima condição de manipulação do armazenamento dos tecidos (SILVESTRE et al., 2003).

Por outro lado, a presença de meio nutritivo visa minimizar as lesões induzidas pelas temperaturas hipotérmicas, uma vez que os mesmos modulam a resposta fisiológica ao frio, mantendo a homeostase (ACKERS, 2006). Entre os meios nutritivos que podem ser empregados para essa finalidade, têm-se: solução salina (NaCl a 0,9%) como observado para tecido somático murino (BASARAN et al., 2006), solução tampão fosfato para felinos e roedores silvestres (TOVAR et al., 2008) e DMEM para suínos (GE et al., 2010).

Em geral, o meio mais empregado para essa finalidade consiste no DMEM suplementado com 2,2% de bicarbonato de sódio, 10% de SFB, podendo também ser adicionado de 2% de solução de antibióticos e antimicóticos (AOUED; SINGH, 2015). A suplementação com SFB atua como uma rica fonte de proteínas, minerais, lipídios, fatores de crescimento e hormônios, tendo a albumina sérica como a proteína mais abundante e com atividade antioxidante (KIMURA et al., 2013). Ainda, a presença de um tampão, como o bicarbonato de sódio, na composição do meio de conservação permite manter a viabilidade das células e a manutenção das características dos tecidos (KIMURA et al., 2013).

Assim, meios nutritivos durante a conservação a 4°C de tecidos somáticos podem auxiliar a neutralizar o efeito negativo das flutuações de pH e toxina, atuando na sobrevivência das células presentes nos tecidos por mais tempo. Além disso, dependendo da composição desses meios, os mesmos podem conter agentes antioxidantes que atuam em conjunto com antioxidantes endógenos das células contra as injúrias geradas pelo estresse oxidativo (AOUED; SINGH, 2015).

Ademais, o uso de meios nutritivos durante a conservação por longos períodos permite atrasar os danos gerados pela isquemia (GUIBERT et al., 2011). Brevemente, quando o fluxo sanguíneo é rompido ou restrito, tanto glicose quanto oxigênio tornam-se reduzidos e, até mesmo, consumidos, levando as células a alterar seu metabolismo, assumindo um metabolismo anaeróbico e menos eficiente de energia. Ainda, ao longo do período de conservação, esses processos resultam em um déficit de oxigênio nas células com um acúmulo de metabólitos intracelulares, como ácido lático que conduzem a alterações do pH

celular. Todas essas alterações finalizam com funções alteradas de enzimas e bombas de membranas mitocondriais e plasmáticas. Adicionalmente, mudanças do quantitativo de eletrólitos causam injúrias no equilíbrio osmótico, podendo resultar na ruptura da célula e, conseqüentemente, na ativação dos mecanismos de morte celular (WANG et al., 2008; KREZDORN et al., 2017).

Finalmente, a presença de um meio nutritivo adequado poderá atuar reduzindo ou atrasando esses efeitos, fazendo os tecidos e células manterem sua atividade metabólica e viabilidade adequada.

2.3. FERRAMENTAS DE AVALIAÇÃO DE TECIDOS SOMÁTICOS REFRIGERADOS

Durante a conservação a 4°C, células e tecidos somáticos sofrem uma redução de seu metabolismo, retardando alguns processos degenerativos gerados pelas temperaturas hipotérmicas. Nesse sentido, após o período de conservação, faz-se necessário avaliar o grau de preservação dos tecidos usando diferentes ferramentas que evidenciem as características morfológicas (KREZDORN et al., 2017), atividades proliferativas e metabólicas (BOEKEMA et al., 2015) e viabilidade das células após cultivo *in vitro* (AOUED; SINGH, 2015).

Entre as ferramentas que podem ser empregadas para avaliar o grau de comprometimento da qualidade dos tecidos refrigerados, têm-se a análise histológica usando diferentes colorações (CASTAGNOLI et al., 2003) e o cultivo *in vitro* dos fragmentos teciduais (SINGH et al., 2011).

2.3.1. Caracterização histológica da pele

Em mamíferos, a pele é constituída por duas camadas, a epiderme e a derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A epiderme, a qual é a camada mais superficial, é constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado e pode ser dividida em cinco camadas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. Já a derme é constituída por tecido conjuntivo e dividida em duas regiões: papilar e reticular.

Castagnoli et al. (2003) enfatizaram a importância das análises histológicas na avaliação da integridade morfológica do tecido após a conservação a temperaturas hipotérmicas. Dentre as colorações histológicas que podem ser empregadas têm-se a hematoxilina-eosina (Figura 2a, BOEKEMA et al., 2015) e a marcação da região argirofílica

organizadora nucleolar ou AgNOR (Figura 2b, CHACUR et al., 2015). Entre os efeitos que podem ser identificados por essas análises têm-se a presença de vacúolos (STERNE et al., 2000) e halos perinucleares (BOEKEMA et al., 2015) e alterações morfológicas (GAUCHER et al., 2012).

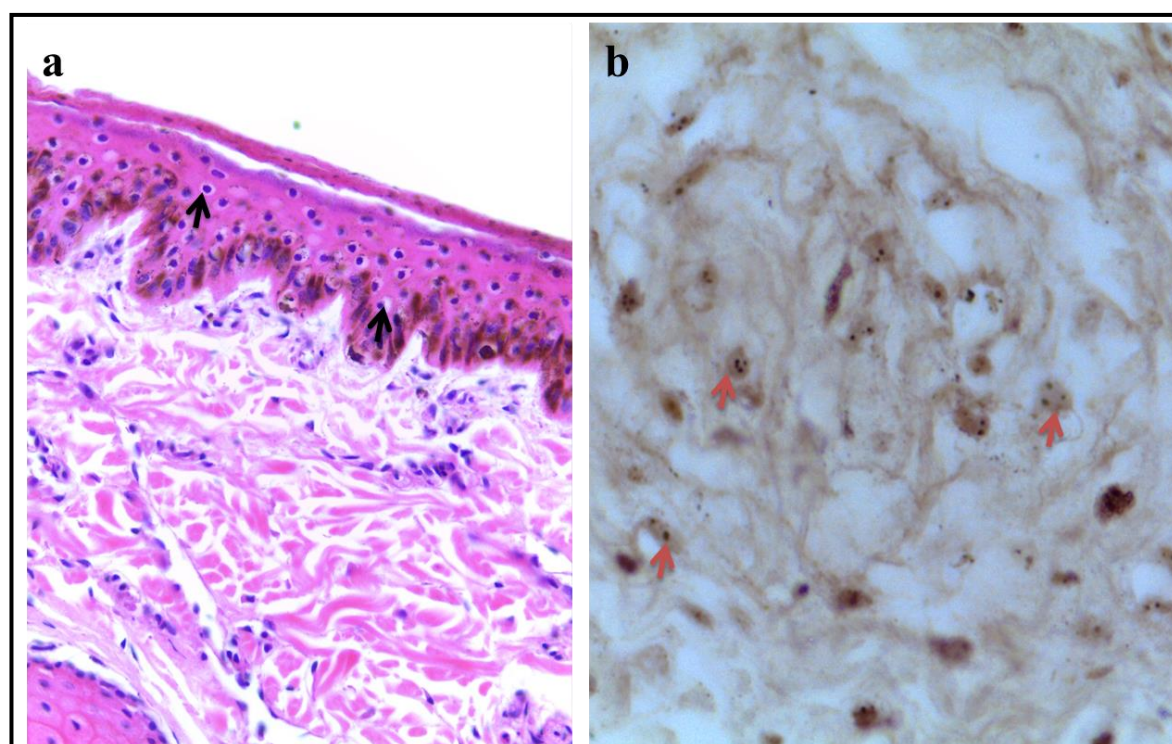


Figura 2. Tecidos somáticos derivados da pele de catetos. **a.** Corte perpendicular de pele corado com hematoxilina-eosina. Seta preta indica a presença de halos perinucleares na epiderme. **b.** Quantificação de AgNORs. Seta vermelha apresenta o núcleo com proteínas argirofílicas nucleolares marcadas. Barra de escala: 50 μ m.

Na conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados de pele humana com diferentes meios nutritivos, Boekema et al. (2015) utilizando hematoxilina-eosina, quantificaram halos perinucleares na epiderme. Esses halos consistem em estruturas sinalizadoras do início da apoptose, sendo formados quando o núcleo é separado do citoplasma. Além disso, usando ainda a hematoxilina-eosina, é possível também quantificar o número de fibroblastos da derme e mensurar os efeitos gerados na espessura da epiderme e derme (BORGES et al., 2017a).

Já pela marcação de AgNOR é possível identificar danos gerados na atividade proliferativa das células (CHACUR et al., 2015). Essa metodologia baseia-se na ligação do

reagente prata coloidal às proteínas acídicas, não histônicas, associadas às regiões organizadoras de nucléolos (CAVALLI et al., 2014). Na marcação, o nitrato de prata marca as proteínas específicas ligadas à transcrição das regiões organizadoras de nucléolos, denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares, podendo assim ser visualizadas como pontos escurecidos no núcleo celular. Logo, quanto mais regiões organizadoras de nucléolos são marcadas, maior será a atividade proliferativa daquele tipo celular (RIVERO et al., 2004). Portanto, as regiões organizadoras de nucléolos estão diretamente relacionadas com a atividade proliferativa das células, podendo assim indicar a atividade proliferativa de diferentes amostras teciduais, como somático (BORGES et al., 2017a), ovariano (BANDEIRA et al., 2015) e testicular (CHACUR et al., 2015).

2.3.2. Caracterização das células durante o cultivo *in vitro*

Estudos anteriores têm demonstrado que a conservação a 4°C de tecidos somáticos pode interferir na capacidade de aderência, confluência, atividade proliferativa e metabólica das células recuperadas desses tecidos e cultivadas *in vitro* (SILVESTRE et al., 2003; SINGH et al., 2011). Em ovinos, Singh e Ma (2016) não observaram crescimento de células após 70 dias dos tecidos refrigerados. Contudo, até 65 dias de estocagem foi possível obter células estáveis com morfologia normal e similar às células derivadas de tecidos não refrigerados.

Durante o cultivo *in vitro*, células podem ser avaliadas quanto à sua morfologia e crescimento por microscopia de luz (BORGES et al., 2018), viabilidade por ensaio de exclusão com azul de tripan (BORGES et al., 2017b), atividade funcional e metabólica por ensaios colorimétricos (CAPUTCU et al., 2013), atividade proliferativa pela elaboração de curva de crescimento (PRIYA et al., 2014) e a estimativa do tempo de duplicação da população de células (OKONKWO; SINGH, 2014). Todas essas análises fornecem indícios da qualidade dos tecidos submetidos aos procedimentos de conservação e, consequentemente, a viabilidade das células recuperadas.

Em geral, a morfologia das células, embora não seja uma metodologia decisiva para avaliação da qualidade celular, consiste na primeira análise a ser realizada sobre as células em cultivo (PEREIRA et al., 2014). Já o ensaio com azul de tripan consiste numa metodologia clássica e rápida de avaliação da viabilidade celular (BORGES et al., 2017b). Esse corante analisa a integridade da membrana pela identificação das células com membranas danificadas,

as quais permitem a penetração do corante e, conseqüentemente, são classificadas como não viáveis.

Além disso, outras ferramentas importantes podem ser realizadas durante o cultivo *in vitro*, com o objetivo de conhecer o perfil das células e o efeito da conservação sobre a atividade proliferativa das mesmas (LIU et al., 2014). Assim, através da elaboração da curva de crescimento e a determinação do tempo de duplicação celular (*population doubling time*, PDT) é possível verificar o efeito do período de estocagem sobre as características das células recuperadas, reduzindo suas taxas de proliferação (KIM et al., 2014).

Ainda sobre ferramentas usadas na avaliação da qualidade dos tecidos somáticos refrigerados, tem-se o uso do ensaio colorimétrico brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou MTT (LEÓN-QUINTO et al., 2011), o qual é empregado para análise da atividade metabólica das células. Brevemente, o ensaio de MTT foi desenvolvido como uma metodologia simples, rápida, precisa e de baixo custo para avaliação da citotoxicidade e atividade proliferativa de células cultivadas *in vitro* (MOSMANN, 1983).

Além disso, o MTT também pode ser empregado tanto nas células em cultivo, quanto diretamente nos tecidos (GE et al., 2010). Adicionalmente, o ensaio de MTT vem sendo empregado em associação com o teste de azul de tripan, numa relação de metabolismo e viabilidade celular (CETINKAYA et al., 2014). Resumidamente, ele se baseia na conversão do MTT em cristais de formazan e essa conversão tem uma relação direta com o funcionamento mitocondrial e citoplasmático celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo para um composto azul escuro (formazan) e a produção deste composto reflete no estado funcional da cadeia respiratória (PERES et al., 2008).

Finalmente, todas essas ferramentas permitem uma análise das condições de conservação a 4°C pela determinação além da morfologia celular, também do efeito de como essa conservação pode interferir na atividade proliferativa e metabólica das células. Isso porque a conservação em temperaturas hipotérmicas pode afetar negativamente a estrutura mitocondrial e a integridade lisossômica e das membranas celulares (GUIBERT et al., 2011).

3. JUSTIFICATIVA

As células somáticas recuperadas de tecidos da pele apresentam diferentes finalidades, como a formação de bancos de células, estudos relacionados à pluripotência e a produção de embriões por TNCS. Essa última aplicação permite não somente a conservação da biodiversidade de mamíferos silvestres, mas também aumentar a produtividade dos rebanhos desses animais pela seleção de indivíduos com melhores características zootécnicas, além de investigar os mecanismos embrionários e de interações núcleo-citoplasma.

Assim, em virtude de todas essas finalidades, a recuperação de células somáticas que servirão como doadoras de núcleo (carioplastos) na biotécnica de TNCS devem ser conservadas em condições adequadas a fim de garantir a qualidade das células que serão reprogramadas para suportar o desenvolvimento embrionário e fetal. Nesse contexto, células que apresentam uma morfologia e perfil normal durante o cultivo *in vitro*, incluindo ainda viabilidade e a taxa de proliferação são selecionadas para a criopreservação e uso na TNCS.

Nesse sentido, a conservação a 4-6°C consiste numa ferramenta imediata de armazenamento do material genético, sendo a estocagem de tecidos somáticos, especialmente derivados da pele, uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional da espécie de interesse. Por essa razão, baseados em estudos em mamíferos domésticos, fazem-se necessários avaliar as condições e os períodos adequados de armazenamento dos tecidos somáticos da pele de catetos sobre a recuperação e a viabilidade das células somáticas, visando à formação de criobancos desta espécie.

Finalmente, as condições estabelecidas para a conservação a 4-6°C de tecidos somáticos de catetos permitirão não somente o desenvolvimento de condições para obtenção de células viáveis de indivíduos localizados em regiões de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados, mas também para outras espécies filogeneticamente próximas aos catetos. Tais células somáticas poderão ser aplicadas tanto na formação de bancos biológicos destas espécies, como no emprego na biotécnica de clonagem por TNCS.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I – A recuperação de células somáticas derivadas de tecidos conservados a 4–6°C de catetos é influenciada pelo período longo de armazenamento de 50 dias.

II – A presença de meio nutritivo durante a conservação a 4–6°C de tecidos somáticos derivados de catetos não interfere na recuperação de células viáveis.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes condições de armazenamento a 4–6°C de tecidos somáticos derivados da pele sobre a recuperação de células somáticas de catetos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a influência dos períodos de armazenamento de 10, 30 e 50 dias na conservação a 4–6°C de tecidos somáticos derivados da pele de catetos sobre a qualidade tecidual e a recuperação de células viáveis.

- Analisar a influência do meio nutritivo sobre conservação a 4–6°C de tecidos somáticos derivados da pele de catetos sobre a qualidade tecidual e a recuperação de células viáveis.

REFERÊNCIAS

- ACKERS, J.P. Biopreservation of cells and engineered tissues. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 103, p. 157–187, 2006.
- AOUED, H.S.; SINGH, M. Recovery of fibroblast-like cells after 160 days of *postmortem* storage of goat skin tissues in refrigerated media. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 6, p. 1–5, 2015.
- BANDEIRA, F.T.; CARVALHO, A.A.; CASTRO, S.V.; LIMA, L.F.; VIANA, D.A.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; PEREIRA, M.J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 177–185, 2015.
- BASARAN, O.; OZDEMIR, H.; KUT, A.; SAHIN, F.I.; DENIZ, M.; SAKALLIOGLU, E. A.; HABERAL, M.A. Effects of different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat model. **Burns**, v. 32, p. 423–429, 2006.
- BAUST, J.M.; CORWIN, W.L.; VANBUSKIRK, R.; BAUST, J.G. Biobanking: the future of cell preservation strategies. In: *Biobanking in the 21st Century*. Springer International Publishing, 864p., 2015.
- BERG, D.K.; LI, C.; ASHER, G.; WELLS, D.N.; OBACK, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 384–394, 2007.
- BIRDSILL, A.C.; WALKER, D.G.; LUE, L.; SUE, L.I.; BEACH, T.G. *Postmortem* interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. **Cell and Tissue Banking**, v. 12, p. 311–318, 2011.
- BODMER, R.E. Influence of digestive morphology on resource partitioning in Amazonian ungulates. **Oecologia**, v. 85, p. 361–365, 1991.

- 1 BOEKEMA, B.K.H.L.; BOEKESTIJN, B.; BREEDERVELD, R.S. Evaluation of saline,
2 RPMI and DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. **Burns**, v. 41, p. 848–852,
3 2015.
- 4
- 5 BORGES, A.A.; BEZERRA, F.V.F.; COSTA, F.N.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.
6 V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Histomorphological characterization
7 of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system. **Arquivo**
8 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 948–954, 2017a.
- 9
- 10 BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, M.F.;
11 SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries
12 (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques.
13 **Cytotechnology**, v. 69, p. 643–654, 2017b.
- 14
- 15 BORGES, A.A.; LIRA, G.P.O.; NASCIMENTO, L.E.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS,
16 M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Influence of cryopreservation
17 solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu*
18 Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, no prelo, 2018.
- 19
- 20 BROCKBANK, K.; TAYLOR, M. Tissue preservation. In: *Advances in Biopreservation*.
21 CRC press Taylor; Francis Group, Boca Raton, p.157–191, 2006.
- 22
- 23 CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; DE FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ,
24 E. Cryopreservation of Brown bear skin biopsies. **Cell Preservation Technology**, v. 6, p. 83–
25 86, 2008.
- 26
- 27 CAPUTCU, A.T.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; ARAT, S. Tissue cryobanking for
28 conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. **Cell and Tissue**
29 **Banking**, v. 14, p. 1–10, 2013.
- 30
- 31 CASTAGNOLI, C.; ALOTTO, D.; CAMBIERI, I.; CASIMIRI, R.; ALUFFI, M.; STELLA,
32 M.; ALASIA, S.T.; MAGLIACANI, G. Evaluation of donor skin viability: fresh and
33 cryopreserved skin using tetrazolium salt assay. **Burns**, v. 29, p. 759–767, 2003.
- 34

- CAVALLI, D.; MODOLO, F.; RIVERO, E.R.C. Avaliação do metabolismo epitelial em cistos radiculares pela técnica de AgNORs. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, p. 77–81, 2014.
- CETINKAYA, G; HATİPOĞLU, I; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, v. 68, p. 65–70, 2014.
- CHACUR, M.G.M.; IBRAHIM, D.B.; ARREBOLA, T.A.H.; SANCHES, O.C.; GIUFFRIDA, R.; OBA, E.; RAMOS, A.A. Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 447–454, 2015.
- FANG, T.G.; PUERTAS, R.E.; APARICIO, P.M.; PEÑA, P.P.; VILLANES, P.A.; HAYMAN, D.T.S. Certificación de pieles de pecaríes en la Amazonía peruana. Wust: Peru, p. 202p., 2008.
- FONSECA, A.B.; RYLANDS, A.B.; COSTA, C.M.R.; MACHADO, R.B.; LEITE, Y.L.R. Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 459p., 1994.
- GAUCHER, S.; ELIE, C.; VÉROLA, O.; JARRAYA, M. Viability of cryopreserved human skin allografts: effects of transport media and cryoprotectant. **Cell and Tissue Banking**, v. 13, p. 147–155, 2012.
- GE, L.; SUN, L.; CHEN, J.; MAO, X.; KONG Y.; XIONG, F.; WU, J.; WEI, H. The viability change of pig skin *in vitro*. **Burns**, v. 36, p. 533–538, 2010.
- GUIBERT, E.E.; PETRENKO, A.Y.; BALABAN, C.L.; SOMOV, A.Y.; RODRIGUEZ, J.V.; FULLER, B.J. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 38, p. 125–142, 2011.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.1. Disponível em: < www.iucnredlist.org >. Acessado em: 02 jan. 2018.

- JACOBI, U.; TOLL, R.; AUDRING, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. The porcine snout—an in vitro model for human lips? **Experimental Dermatology**, v.14, p.96-102, 2005.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto & Atlas*. Brasil: GUANABARA KOOGAN, p. 354–365, 2013.
- KIM, B.Y.; NAM, B.M.; LEE, K.M.; JO, Y.H.; NEMENO, J.G.; YANG, W.; LEE, S.; KIM, H.; JANG, I.J.; TAKEBE, T.; LEE, J.I. Effect of preservation conditions on cartilage tissue for cell transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 46, p. 1139–1144, 2014.
- KIMURA, Y.; OKITSU, T.; XIBAO, L.; TERAMAE, H.; OKONOGI, A.; TOYODA, K.; UEMOTO, S.; FUKUSHIMA, M. Improved hypothermic short-term storage of isolated mouse islets by adding serum to preservation solutions. **Islets**, v. 5, p. 45–52, 2013.
- KREZDORN, N.; TASIGIORGOS, S.; WO, L.; TURK, M.; LOPDRUP, R.; KIWANUKA, H.; POMAHAC, B. Tissue conservation for transplantation. **Innovative Surgical Sciences**, 2017.
- 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, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**, v. 62, p. 145–151, 2011.
- LIMA, G.L.; LUZ, V.B.; ALVES, A.M.C.V.; LUNARDI, F.O.; SOUZA, A.L.P.; PEIXOTO, G.C.X.; RODRIGUES, A.P.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Vitrification of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) ovarian tissue using various cryoprotectants. Preliminary results. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 957, 2012.

LIU, C.; GUO, Y.; LU, T.; LI, X.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and genetic characteristics analysis of *in vitro* culture a fibroblast cell line derived from Wuzhishan miniature pig. **Cryobiology**, v. 68, p. 281–287, 2014.

MARK-HUGO, M.J.; LEUVENINK, H.G.D.; PLOEG, R.J. Perspectives in organ preservation. **Transplantation**, v. 83, p. 1289-1298, 2007.

MINERVINO, A.H.H.; ARAÚJO, C.A.S.C.; BARRÊTO-JÚNIOR, R.A.; SOARES, H.S.; OLIVEIRA, M.F.; MORI, C.S.; NEVES, K.A.L.; VALE, W.G.; GENNARI, S.M.; ORTOLANI, E.L. Serum biochemistry of collared peccaries (*Pecari tajacu*) in captivity in Northeastern Brazil. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 34, p. 538–540, 2014.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; BRISTOL, D.G.; MANNING, T.O.; ROGERS, R.A.; RIVIERE, J.E. Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species. **Journal of Investigative Dermatology**, v.95, p.582-586, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63. 1983.

NAGARAJU, G.N.; PRASAD, R.V.; JAMUNA, K.V.; RAMKRISHNA, V. Histomorphological features in the differentiation of skin of spotted deer (*Axis axis*), Cattle (*Bos indicus*) and Goat (*Capra hircus*). **Indian Journal of Veterinary Anatomy**, v.24, p.10-12, 2012.

OBACK, B.; WELLS, D.N. Cloning cattle: the methods in the madness. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 591, p. 30–57, 2007.

OKONKWO, C.; SINGH, M. Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up to 41 d of animal death. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 51, p. 463–469, 2014.

PARRY, L.; BARLOW, J.; PERES, C.A. Hunting for sustainability in tropical secondary forests. **Conservation Biology**, v. 23, p. 1270–1280, 2009.

PEREIRA, A.F.; SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FEITOSA, A.K.N. Isolamento e caracterização de células doadoras derivadas da pele para a transferência nuclear. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 311–316, 2014.

PERES, L.A.B.; DELFINO, V.D.A.; MOCELIN, A.J.; TUTIDA, L.A.; FAVERO, M.E.; MATSUO, T. Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 30, p. 48–53, 2008.

PRIYA, D.; SELOKAR, N.L.; RAJA, A.K.; SAINI, M.; SAHARE, A.A.; NALA, N.; SINGLA, S.K. Production of wild buffalo (*Bubalus arnee*) embryos by interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 343–351, 2014.

RIVERO, E.R.C.; CALIARI, M.V.; TARQUÍNIO, S.B.C.; ADRIANO MOTA LOYOLA, A.M.; AGUIAR, M.C.F. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. **Journal of Oral Science**, v. 46, p. 87–92, 2004.

SANTOS, D.O.; MENDES, A.; NOGUEIRA, S.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G. Criação comercial de caititus (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 1–10, 2009.

SANTOS, M.L.T.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1194–1202, 2016.

SILVA, A.R.; SOUZA, A.L.P.; dos SANTOS, E.A.A.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, P.C.; CASTELO, T.S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, p. 219–234, 2012.

- 1 SILVA, A.R.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, A.L.P. Cryopreservation in
2 mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Research and**
3 **Reports in Biodiversity Studies**, v. 4, p. 1–8, 2015.
- 4
- 5 SILVESTRE, M.A.; SAEED, A.M.; CERVERA, R.P.; ESCRIBÁ, M.J.; GARCÍA-
6 XIMÉNEZ, F. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and
7 temperature of the whole ear extirpated immediately after death. **Theriogenology**, p. 1469–
8 1477, 2003.
- 9
- 10 SILVESTRE, M.A.; SÁNCHEZ, J.P.; GÓMEZ, E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle
11 skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times
12 and temperatures. **Theriogenology**, v. 49, p. 221–229, 2004.
- 13
- 14 SINGH, M.; MA, X. Recovery of fibroblast cells up to 65 d of postmortem storage of sheep
15 ear skin at 4°C. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 837–838, 2016.
- 16
- 17 SINGH, M.; MA, X.; AMOAH, E.; KANNAN, G. *In vitro* culture of fibroblast-like cells
18 from postmortem skin of Katahdin sheep stored at 4°C for different time intervals. **In Vitro**
19 **Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 47, p. 290–293, 2011.
- 20
- 21 STERNE, G.D.; TITLEY, O.; CHRISTIE, J.L. A qualitative histological assessment of
22 various storage conditions on short term preservation of human split skin grafts. **British**
23 **Journal of Plastic Surgery**, v. 53, p. 331–336, 2000.
- 24
- 25 VERMA, R.; HOLLAND, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; VERMA, P.J. Inducing pluripotency
26 in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid.
27 **Theriogenology**, v. 77, p. 220–228, 2012.
- 28
- 29 TOVAR, H.; NAVARRETE, F.; RODRÍGUEZ, L.; SKEWES, O.; CASTRO, F. O. Cold
30 storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and
31 subsequent isolation of primary culture cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental**
32 **Biology Animal**, v. 44, p. 309–320, 2008.
- 33

1 WALCOTT, B.; SINGH, M. Recovery of proliferative cells up to 15-and 49-day postmortem
2 from bovine skin stored at 25°C and 4°C, respectively. **Cogent Biology**, v. 3, p. 1–9, 2017.

3
4 WANG, W.Z.; FANG, X.H.; STEPHENSON, L.L.; KHIABANI, K.T.; ZAMBONI, W.A.
5 Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal
6 muscle. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, p. 351–356, 2008.

7
8 WANI, N.A.; HONG, S.B. Source, treatment and type of nuclear donor cells influences *in*
9 *vitro* and *in vivo* development of embryos cloned by somatic cell nuclear transfer in camel
10 (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, v. 106, p. 186-191, 2018.

11
12 YELISETTI, U.M.; KOMJETI, S.; KATARI, V.C.; SISINTHY, S.; BRAHMASANI, S.R.
13 Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected
14 postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients. **In Vitro Cellular &**
15 **Developmental Biology Animal**, v. 52, p. 632–645, 2016.

**CAPÍTULO 2 – INFLUENCE OF STORAGE PERIOD AND NUTRITIVE MEDIUM
ON RECOVERY OF FIBROBLAST-LIKE CELLS FROM COLLARED PECCARY
(*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) REFRIGERATED SKIN**

Artigo experimental: Influência do período de armazenamento e meio nutritivo sobre a recuperação de células semelhantes a fibroblastos de pele refrigerada de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).

Periódico: In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal

Qualis (Medicina Veterinária): B1

Submetido em: 20/01/2018

**Influence of storage period and nutritive medium on recovery of fibroblast-like cells
from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) refrigerated skin**

Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Gabriela Pereira de Oliveira Lira¹, Alana Azevedo Borges¹,
Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Maria Bárbara Silva¹, Lhara Ricarliany Medeiros de
Oliveira¹, Alexandre Rodrigues Silva², Moacir Franco de Oliveira³, Alexsandra Fernandes
Pereira^{1*}

¹Laboratory of Animal Biotechnology. ²Laboratory of Animal Germplasm Conservation.

³Laboratory of Applied Animal Morphophysiology. Federal Rural University of Semi-Arid,
Mossoró, RN, Brazil.

*Corresponding author: Alexsandra Fernandes Pereira

Laboratory of Animal Biotechnology

Federal Rural University of Semi-Arid

Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil

Phone: +55 84 3317 8361

E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Running head: Cell recovery from refrigerated tissues.

Abstract

Animal cloning is an interesting technology for the biodiversity conservation and its success depends of the recovery of nucleus donor cells. Specifically for collared peccaries found sometimes in regions of difficult access, the storage at 4–6°C of skin tissues would be an alternative for the conservation of the genetic material. Therefore, we aimed to evaluate different storage periods and the presence of nutritive medium at 4–6°C on the recovery of somatic cells from skin of eleven collared peccaries. Thus, ear explants were distributed in non-refrigerated and refrigerated samples for 10, 30 and 50 days in the absence or presence of medium. All explants were analyzed by histology and cultured. Only the fragments stored for 50 days in the absence of medium showed an increase in the skin total thickness. Moreover, the storage period, regardless of the presence of medium, promoted an increase in the halo number and a reduction in the metabolic activity. After the culture, only the fragments stored without medium for 50 days were not able to obtain somatic cells. Likewise, cells from explants in the presence of medium for 10 days showed similar characteristics to the cells of non-refrigerated explants, especially for culture duration, cell population doubling time, day of all attached explants and subconfluence total time. In conclusion, viable cells derived from collared peccaries can be recovered from somatic tissues stored for up to 50 days in the presence of medium; nevertheless, refrigerated tissues up to 10 days in the presence of medium resulted in more viable cells.

Keywords: Wild mammals; Cold storage; Postmortem cell recovery; Somatic cells.

Introduction

Animal cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is an attractive tool for biodiversity conservation (Moulavi et al. 2017), pluripotency studies (Verma et al. 2012) and mechanisms

involved during embryonic development and nucleus-cytoplasmic interaction (Lanza et al. 2000). For these reasons, it is necessary to obtain success in all its stages, among them the conservation of somatic tissues (León-Quinto et al. 2009). Different types of somatic cells have been used successfully to perform SCNT (Wani and Hong 2018); nevertheless, fibroblasts are the most frequently used, especially when recovered of skin tissues (Pereira et al. 2014).

Thus, somatic tissue conservation techniques include cryopreservation by slow freezing (Caamaño et al. 2008), vitrification (Borges et al. 2017b) and refrigeration at 4°C (Okonkwo and Singh 2014). The latter technique has been used especially for the transport or short-term preservation of somatic tissues of individuals located in regions difficult to access or distant from specialized laboratories (Silvestre et al. 2003). Moreover, its use has been observed in both domestic (Singh et al. 2011) and wild mammals (Tovar et al. 2008) and its efficiency depends on some factors, such as storage periods (Walcott and Singh 2017) and conditions (Aoued and Singh 2015) at 4°C of the tissue samples, which may influence the recovery of the cells after tissue culture *in vitro*.

In domestic mammals, studies have shown variations regarding the period of storage and the presence of nutrient medium in different species, such as swine (Ge et al. 2010) and goat (Okonkwo and Singh 2014). In swine, Ge et al. (2010) observed that somatic tissues derived from skin of these individuals and preserved at 4°C for up to 15 days in the presence of nutritive medium had 20% tissue metabolic activity, lower percentage when the tissues were refrigerated for four days (70% activity metabolic tissue). In goat, Okonkwo and Singh (2014) obtained morphologically viable somatic cells derived from skin tissues refrigerated to 4°C for up to 41 days in the absence of nutrient medium. In sheep, Singh and Ma (2016) verified

the possibility of obtaining cells from refrigerated skin somatic tissues in the absence of nutritive medium for 65 days; however these cells presented a very slow growth. Additionally, these authors did not observe any cell growth when the tissue fragments were conserved for 70 days.

Already, in wild mammals, research related to the knowledge of the factors that influence the success of the technique is still scarce. In wild felids (León-Quinto et al. 2011; Tovar et al. 2008) and rodents (Tovar et al. 2008), only the use of refrigeration as a transportation tool in the short-term is reported. Specifically for collared peccaries, which can sometimes be found in regions of difficult access, such as tropical forests (Fang et al. 2008), the conservation at 4°C of somatic samples could be an alternative for the storage of a larger sampling of this species. In this sense, based on research on domestic species, it is necessary to evaluate the adequate conditions and periods of storage of the skin tissues of collared peccaries.

The collared peccaries are exclusive to America, being distributed from the southern United States to Argentina and in all Brazilian biomes (Desbiez et al. 2012). Currently, this species is not threatened (IUCN 2018); nevertheless, in the Brazilian biomes as Caatinga and Atlantic Forest, this species presents a critical decrease in its population (Desbiez et al. 2012). In general, the attractiveness of SCNT in collared peccaries is justified by the ecological, scientific and economic importance that these individuals exert on the global ecosystem (Santos et al. 2009). These animals contribute to the balance and composition of the food chain of some species (Fonseca et al. 1994), and act as predators and seed dispersers (Bodmer 1991). Moreover, this species may represent an interesting experimental model for those phylogenetically close and at risk of extinction, such as *Tayassu pecari* and *Catagonus wagneri* (IUCN 2018). Additionally, the quality of their meat and leather, combined with their

excellent adaptation to captivity, has made it possible to use them in scientific research and commercial interests (Santos et al. 2009).

Therefore, the aim was to evaluate different periods of storage and the presence of nutritive medium on the recovery of somatic cells derived from skin of collared peccaries stored at 4–6°C.

Materials and Methods

Chemicals, reagents, and media

The chemicals, reagents and media used were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Gibco-BRL (Carlsbad, USA) and Labimpex (São Paulo, Brazil). When necessary, the pH was adjusted to 7.2–7.4 for all media and solutions. Media were filtered through 0.22 µm system (Corning, USA).

Ethics, animals and sample collection

All experimental protocols and animal care were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Rural University of Semi-Arid (CEUA/UFERSA, no. 23091.001072/2015-92), and the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio; no. 48633-2). Eleven animals, six males and five females, were used and obtained at the Centre for Wild Animals Multiplication (Mossoró, RN, Brazil; 5°10'S, 37°10'W), registered at the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) as a scientific breeding site (no. 1478912). In management systems of collared peccaries, their identification has been recorded by ear fragments and these tissues were used for the experiments. Thus, the skin samples of ear sections (1–2 cm²) were selected of animals according to their health and body parameters and within the same age group (3–6 months).

Experimental design and refrigeration

After sample collection, the tissue fragments were chopped into 9.0 mm³ and washed in 70% ethanol and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) composed of 2.2 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS) and 2% antibiotic–antimycotic. The present study was divided in seven groups: non-refrigerated (control) and refrigerated (4–6°C) fragments for 10, 30, 50 days of storage in falcon tubes in the presence or absence of DMEM composed of 2.2 g/L sodium bicarbonate, 10% FBS and 2% antibiotic–antimycotic. For all experiments, analyses were performed in the fragments [hematoxylin-eosin, argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) and metabolic activity] and in the cells after *in vitro* culture [morphological evaluation, viability, proliferative and metabolic activities]. A total of 84 fragments derived from each animal were distributed equally into seven groups, which resulted in twelve fragments per group of each animal that were divided equally for all analysis.

Evaluation of the explants by hematoxylin-eosin, AgNOR and metabolic activity

For hematoxylin-eosin, samples were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for embedding in paraffin according to Borges et al (2017a). Sections of 5.0 µm thickness were stained with hematoxylin-eosin dyes. The histological analysis and morphometry were analyzed using the ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and calculated as the following: the thickness of the epidermis and dermis and quantification of the number of fibroblast and perinuclear halos.

The histochemical staining of AgNOR in the slides was performed in silver solution prepared in 1 part of 2% gelatin in 1% aqueous formic acid and 2 parts of 50% aqueous silver nitrate solution and the slides were exposed in a dark room for 30 min. Subsequently, the slides were

washed in 5% thiosulfate solution for 10 min (Borges et al. 2017a). For analyses of each slide (animal/group), AgNOR dots were counted in 100 fibroblasts by ImageJ software in 1000× magnification. The quantification of AgNOR was performed as: AgNOR number/cell and AgNOR area/cell.

For metabolic assay, tissue samples were pre-incubated in DMEM composed of 2.2 g/L sodium bicarbonate for 30 min (38.5°C, 5% CO₂) to allow the tissues to adapt to new conditions. Afterward, the samples were incubated in 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 2 mg/mL for 3 h (Borges et al. 2017a). Then, the samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and measured at 595 nm. The mean values of non-refrigerated explants were considered 100% as compared to the other groups.

Evaluation of the explants by primary culture and subcultures

The tissue fragments were cultured in DMEM composed of 2.2 g/L sodium bicarbonate, 10% FBS and 2% antibiotic–antimycotic at 38.5°C, 5% CO₂ in air and 95% relative humidity. The culture medium was changed every 48 h. Cells were harvested when they reached 70% subconfluency and were subcultured into petri dishes. The subconfluence of 70% was defined when 70% of the petri dishes presented somatic cells (Santos et al. 2016). After the cells reach the subconfluence, the cell passages were performed, through the process of trypsinization (Borges et al. 2018).

Assessment of morphological characteristics and cellular viability

Daily assessment of the cell culture from the onset until the subconfluence stage was performed under inverted microscope (Nikon TS100, Tokyo, Japan) and the following parameters were evaluated: morphology, number of attached explants, number of explants

with subconfluence, day of all attached explants, number of explants with grown to subconfluence, day of subconfluence explants, subconfluence total time and culture duration.

The viability analysis was performed by cells stained with trypan blue assay in the first passage. For each animal, the viability test was performed in duplicate. Briefly, the cells were centrifuged and suspended in 1.0 mL of the medium; an aliquot of cells was stained with 0.4% trypan blue (in PBS) in the ratio 1:1 and counted in a Neubauer chamber (Strober 2001).

Analysis of proliferative activity

Proliferative activity was quantified according to the determination of population doubling time (PDT), which was calculated as follows: skin cells on the third passage were seeded in twenty four-well dishes at cell density of 1.0×10^4 cells/well for the determination of the PDT. Cells were trypsinized from duplicate and counted at 24 h intervals for up to 120 h of culture. The mean cell counts were recorded every time and so cell growth curve was delineated. Finally, the PDT was calculated using the following formula (Roth 2006):

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

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

Evaluation of metabolic activity

MTT assay was performed according to Mosmann (1983) with adaptations. Then, a concentration of 5.0×10^4 cells/mL was grown in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 38.5°C in twelve-well dishes. After 5 days, 1.0 mL of the MTT solution (5 mg/mL in DMEM) was added to each well over a period of 3 h under the same conditions. The MTT solution was then removed and 1.0 mL of DMSO was added for 5 min under light stirring to solubilize the

MTT. After the total dissolution of formazan crystals, samples were read in spectrophotometer (Shimadzu® UV-mini-1240, Kyoto, Japan), using an absorbance wavelength of 595 nm.

Statistical analyses

Data of eleven animals (six animals for histological evaluation and five animals for *in vitro* culture) were expressed as mean $\pm$ standard error (one animal/one repetition) and analyzed using the GraphPad Prisma 6.0 software (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA) to a significance of $P < 0.05$. All results were verified for normality by the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity by Levene’s test. Since data regarding the trypan blue test, and metabolic activity did not show a normal distribution, they were arcsine transformed. Data of morphometric analysis and metabolic assay were analyzed by ANOVA (multiple comparisons) followed by Tukey test. Already the results of AgNOR quantification, fibroblast and perinuclear halo numbers were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn (multiple comparisons) tests. All *in vitro* culture data, were analyzed by ANOVA followed by unpaired t-test.

Results

Effect of storage period and nutritive medium on characteristics of explants stored in refrigerated system

In order to test the storage period and medium, we analyzed 336 skin explants by histological assessment (Fig 1). The refrigeration did not affect the thickness of the epidermis and dermis, except in the fragments refrigerated for 50 days in the absence of medium, where they presented a reduction and increase, respectively, in the thickness of the epidermis and dermis with an increase in the total thickness (Table 1, $P < 0.05$). Likewise, differences were

observed for number of fibroblasts between non-refrigerated and refrigerated explants ($P < 0.05$). Nevertheless, the number of fibroblast was similar among refrigerated groups, independent of storage period and medium (Table 1). Additionally, the perinuclear halo number increased with the increase of storage period, regardless of the medium presence (Table 1).

Moreover, the number of AgNOR per cell, indicating proliferative activity, decreased with the increase of storage period (Fig. 2a). Already, the AgNOR area per cell was maintained in all explants preserved for 10 days in the absence or presence of medium (Fig. 2b). Finally, for metabolic activity using MTT test (Fig. 2c), all groups differed from the control ($P < 0.05$). Moreover, only the 10 days group in the presence of medium maintained a metabolic rate greater than 50%. Additionally, the metabolic rate of explants decreased with the increase of storage time, independent of the presence of medium.

Effect of storage period and nutritive medium on in vitro culture of cells from skin stored in refrigerated system

We analyzed 140 skin explants by evaluations during primary culture and subcultures to third passage (Fig. 3). Thus, explants stored in medium by 10, 30 and 50 days were capable to obtain fibroblast-like cells (Fig. 3). However, explants refrigerated for 50 days without medium were not able to obtain cells (Table 2, Fig 3d). The twenty fragments of this group were kept in culture during the period of 45 days, in which only two fragments presented cell growth, but did not reach the subconfluence. Moreover, throughout the culture, detachment was observed in the fragments, thus generating the presence of cellular debris in the culture medium.

All cultured cells were morphologically consistent with fibroblast with fusiform aspect and a central oval nucleus. The non-refrigerated and refrigerated groups presented growth curves, typical sigmoid form, consisting of the lag phase and the exponential phase (Fig. 4). Moreover, in all the growth curves, it was not possible to observe the stationary phase. Only the non-refrigerated group showed a delay phase of up to 24 h and all refrigerated treatments maintained the lag phase of up to 48 h.

Moreover, cells of the explants stored in presence or absence of medium by 10 days showed similarities with non-refrigerated explants, especially for PDT e duration of culture (Table 2). The other treatments obtained high PDT (Table 2), differing from the control ($P < 0.05$). Moreover, the day of adherence of all explants and subconfluence total time, only the 10 days with medium was similar to the control group (Table 2, $P < 0.05$). It was possible to observe that after the storage of 10 days in the absence of medium, the fragments needed a longer time to adhere to the dish.

In relation to cell viability (Fig. 5a), only cells recovered from fragments stored for 50 days in the presence of medium had reduced viability when compared to the control. Finally, in the MTT metabolic assay, the storage period, regardless of the presence of medium, promoted a reduction in the metabolic activity in all cells (Fig. 5b).

Discussion

In this study, we did observe that the storage period and nutritive medium influenced the tissue quality and the cell recovery of refrigerated skin derived from collared peccaries.

Although viable cells derived from collared peccaries can be recovered from somatic tissues stored for up to 50 days in the presence of medium, the obtainment of more viable cells was

1 verified in refrigerated tissues up to 10 days in the presence of medium. These cells
2 maintained their *in vitro* growth similar to the cells derived from the non-refrigerated
3 explants. Moreover, cells derived from refrigerated skin at 30 and 50 days showed slower cell
4 growth.

5
6 The conservation of somatic tissues at 4°C can be performed both in the absence (Silvestre et
7 al. 2003) and presence of nutritive medium (Aoued and Singh 2015). In general, refrigeration
8 conditions in the absence of medium are established in order to know the resistance of the
9 tissue in situations where there is no minimum condition of manipulation of tissue storage
10 (Silvestre et al. 2003). The presence of nutrient medium aims to minimize the lesions induced
11 by hypothermic temperatures, since they modulate the physiological response to cold,
12 maintaining homeostasis (Ackers 2006). Thus, the most commonly used medium for this
13 purpose is DMEM supplemented with 2.2% serum bicarbonate, 10% FBS, and 2% of the
14 antibiotic-antimycotic solution (Aoued and Singh 2015).

15
16 In present study, we observe a positive effect of nutritive medium on tissue quality and the
17 cell recovery of refrigerated skin. The use of FBS supplementation acts as a rich source of
18 proteins, minerals, lipids, growth factors and hormones, with albumin as the most abundant
19 protein and with antioxidant activity (Kimura et al. 2013). Furthermore, the presence of a
20 buffer, such as sodium bicarbonate, in the composition of the storage medium allows
21 maintenance of cell viability and maintenance of tissue characteristics (Kimura et al. 2013).
22 Thus, nutrient media during the conservation at 4°C of somatic tissues may help to neutralize
23 the negative effect of pH and toxin fluctuations, acting on the survival of the cells present in
24 the tissues for longer.

1 Already for the storage period, we observed a negative influence on tissue quality and the cell
2 recovery of refrigerated skin derived from collared peccaries. In general, the storage period
3 may affect the quality of the recovered cells (Kim et al. 2014), as well as the cell growth
4 capacity from the adherent explants (Caputcu et al. 2013). Kim et al. (2014) observed that the
5 rate of proliferation of cells from human cartilage tissue was compromised after seven days of
6 storage. In this study, the authors observed that up to seven days, viable and control-like (not-
7 refrigerated) cells were obtained from cultured explants. Therefore, short-term tissue
8 preservation at 4°C is viable; nevertheless, when the storage is long-term the cell viability
9 decreases (Kim et al. 2014).

10
11 Moreover, Birdsill et al. (2011) cultivating human brain tissue, found that RNA was
12 progressively degraded with increased storage in the refrigerated system, reducing the rate of
13 gene expression and cellular confluence. Additionally, in somatic tissues of human skin this
14 time also affected the morphological integrity of the tissues by the observation of vacuoles
15 (Gaucher et al. 2012).

16
17 Through histological analysis, in general, 50 days of storage in the absence of medium
18 provoked evident damages in the skin thickness of the refrigerated tissues in comparison to
19 the not-refrigerated tissues. This could be a consequence of the absence of nutritive medium
20 in the long term storage, which can alter the morphology of the tissue, causing an increase
21 and/or swelling in the tissue. These results corroborated with a study using human cornea,
22 which for hypothermic preservation, the use of solutions supplemented with buffers was
23 essential for tissue conservation (Taylor and Hunt 1989).

24

Moreover, in our study, the storage period, regardless of the presence of medium, promoted a reduction in the number of fibroblasts and increase in the number of halos. These halos consist of structures that signal the onset of apoptosis and are formed when the nucleus is separated from the cytoplasm (Turhan-Haktanir et al. 2011; Boekema et al. 2015). Likewise, the conservation at 4°C is applied globally to tissue preservation to minimize the rate of energy consumption processes and decrease the rate of tissue autolysis (Salehi et al. 2004). Nevertheless, during long periods of storage and due to ischemia, there is a rapid reduction of energy reserves, resulting in the process of cell apoptosis and consequently decreasing the viability of the tissue and/or cell (Salehi et al. 2004).

Already by the staining of AgNOR was possible to identify damages generated in the proliferative activity of the cells. Thus, the number of AgNORs per cell indicating proliferative activity decreased with the storage period. Moreover, the conservation at 4–6°C of tissues refrigerated for 30 days and 50 days, regardless of the presence of medium, provoked a decrease in the AgNOR area/cell. Therefore, regardless of the presence of medium, the cell proliferative activity was decreased with increasing of storage time, especially for 30 and 50 days.

In relation the metabolic activity of the tissues by MTT assay, it was observed that fragments stored after 30 days in the presence or absence of medium decreased their viability below 50%. This decrease can be explained by the high number of perinuclear halos present in the epidermis of the refrigerated tissues, thus initiating the apoptotic process of the cells. In swine, Ge et al. (2010) evaluated the viability of refrigerated ear fragments stored up to 15 days in the presence of medium and these fragments presented viability of 20%. In humans, skin fragments stored for nine days in the presence of nutritive medium had a viability rate of

20% and, on the 29th day, this rate reduced further to 6% (Bravo et al. 2000). Additionally, Boekema et al. (2015) evaluated the storage time of refrigerated humans skin fragments, where at 21 days of storage these fragments had a viability rate of 30%. In this work, the presence of perinuclear halos was evaluated, where at 21 days of storage, these tissues presented a series of 60 perinuclear halos. These results of metabolic viability and perinuclear halos are approximate to those found in this work for collared peccaries.

For the *in vitro* culture, we observed attached samples with grow to subconfluence in all groups, such as observed in cattle skin refrigerated by nine days (Caputcu et al., 2013). Nevertheless, in cattle skin refrigerated by 41 days was verified a percentage of 58.7% of tissues with grow to subconfluence (Walcott and Singh 2017). In swine, Silvestre et al. (2003) observed 91.3% of skin tissues refrigerated by 14 days with grow to subconfluence.

Moreover, the cell growth was slower with the increase of storage periods. According to Aoued and Singh (2015), this is due to the reduced number of viable skin stem-cells in tissues with increasing storage time. Moreover, Birdsill et al. (2011) have shown that is necessary a longer time to reach cellular confluence in relation to not-refrigerated tissue. In similar studies, the reduction of confluence of cells with increased storage periods has been reported in different domestic species (Silvestre et al. 2003; Singh and Ma 2016). In swine and rabbits, the fragments stored for 14 days in the absence of medium had a cell growth rate of 33% (Silvestre et al. 2003). In goats, a 19% rate of cell growth was obtained from refrigerated storage fragments in the absence of medium for 41 days (Okonkwo and Singh 2014). Ear tissue of cattle stored for 49 days obtained a rate of 16.7% cell growth in cultured explants (Walcott and Singh 2017). Singh and Ma (2016) showed that refrigerated sheep fragments stored in the absence of medium up to 65 days may reach cell growth, but when stored for 70

1 days, no explants obtained cell growth. Thus, with increasing storage time, the cell growth
2 rate of the explants decreases and may not show cell growth, as obtained in our work, where it
3 was not possible to obtain cell growth in the fragments stored for 50 days in the absence of
4 medium.

5
6 The treatment of 30 and 50 days in the absence and presence of medium required a longer
7 time in the culture than the refrigerated treatments for 10 days in the absence and presence of
8 medium, showing that the cell growth of these fragments was slower. This may have occurred
9 due to increased storage time and lack of nutritive medium in the storage of samples (Aoued
10 and Singh 2015; Silvestre et al. 2003).

11
12 The morphology of cells derived from tissues of different storage periods in the presence and
13 absence of medium was similar to the control. Nevertheless, according to the results of the
14 PDT and the growth curve, it was observed that, from the 30 day storage, the cell populations
15 derived from these tissues appeared to grow slightly slower in comparison to the control cell
16 populations and fragments stored for 10 days in the presence or absence of medium.

17 According to Rudd et al. (1989), this slow growth may be due to a chromosomal imbalance in
18 the cells. Additionally, the conservation at 4°C may have affected the activity of genes
19 responsible for cell growth (Kaji and Matsuo 1980).

20
21 The MTT assay showed that cells of tissues stored after 30 days in the presence or absence of
22 medium had their metabolic activity decreased by more than 50%. This may account for the
23 reason for the slow growth during *in vitro* culture of cells derived from explants of 30 days of
24 storage in the absence and presence of medium and 50 days in the presence of medium.

Finally, the trypan blue assay showed that the storage time of 50 in the presence of medium affected the viability of the cells in the culture.

In summary, collared peccary skin up to 50 day in refrigerated medium allowed the cell recovery; nevertheless, tissues refrigerated up to 10 day in the presence of medium resulted in more viable cells. The conditions established for the preservation at 4°C of somatic tissues of collared peccaries will not only allow the development of conditions for obtaining viable cells from individuals located in regions difficult to access or distant from specialized laboratories, but also for other species phylogenetically close to the collared peccaries. Such somatic cells can be applied both to in the formation of biological banks of these species and to the use in the biotechnology of cloning by SCNT.

Acknowledgement

This study was supported by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The authors thank the Centre for Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA) for providing the animals.

References

- Ackers JP (2006) Biopreservation of cells and engineered tissues. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 103:157–187.
- Aoued HS, Singh M (2015) Recovery of fibroblast-like cells after 160 days of postmortem storage of goat skin tissues in refrigerated media. *J Vet Sci Technol* 6:1–5.
- Bodmer RE (1991) Influence of digestive morphology on resource partitioning in Amazonian ungulates. *Oecol* 85:361–365.

- 1 Boekema BKHL, Boekestijn B, Breederveld RS (2015) Evaluation of saline, RPMI and
2 DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns* 41:848–852.
- 3 Borges AA, Bezerra FVF, Costa FN, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR,
4 Pereira, AF (2017a) Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari*
5 *tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system. *Arq Bras Med Vet Zootec* 69:948–954.
- 6 Borges AA, Lima GL, Queiroz Neta LB, Santos MV, Oliveira M.F, Silva AR, Pereira AF
7 (2017b) Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu*
8 Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*
9 69:643–654.
- 10 Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva
11 AR, Pereira AF (2018) Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of
12 skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreserv*
13 *Biobank*, doi: 10.1089/bio.2017.0090.
- 14 Bravo D, Rigley TH, Gibran N, Strong DM, Newman-Gage H (2000) Effect of storage and
15 preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* 26:367–
16 378.
- 17 Birdsill AC, Walker DG, Lue L, Sue LI, Beach TG (2011) Postmortem interval effect on
18 RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank* 12:311–318.
- 19 Caamaño JN, Rodriguez A, Muñoz M, Frutos C, Diez C, Gómez E (2008) Cryopreservation
20 of Brown bear skin biopsies. *Cell Preserv Technol* 6:83–86.
- 21 Caputcu AT, Akkoc T, Cetinkaya G, Arat S (2013) Tissue cryobanking for conservation
22 programs: effect of tissue type and storage time after death. *Cell Tissue Bank* 14:1–10.
- 23 Desbiez ALJ, Keuroghlian A, Beisiegel BM, Medici EP, Gatti A, Pontes ARM, Campos CB,
24 Tofoli CF, Moraes Junior EA, Azevedo FC, Pinho GM, Cordeiro JLP, Santos Junior TS,

- 1 Morais AA, Mangini PR, Flesher K, Rodrigues LF, Almeida LB (2012) Avaliação do risco
2 de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. Biod Bras 3:74–83.
- 3 Fang TG, Puertas RE, Aparicio PM, Peña PP, Villanes PA, Hayman, DTS (2008)
4 Certificación de pieles de pecaríes en la Amazonía peruana. Una estrategia para la
5 conservación y manejo de fauna silvestre en la Amazonía peruana Wust, Lima, Peru.
- 6 Fonseca AB, Rylands AB, Costa CMR, Machado RB, Leite YLR (1994) Livro vermelho dos
7 mamíferos brasileiros ameaçados de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte,
8 Brazil.
- 9 Gaucher S, Elie C, Vérola O, Jarraya M (2012) Viability of cryopreserved human skin
10 allografts: effects of transport media and cryoprotectant. Cell Tissue Bank 13:147–155.
- 11 Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, Xiong F, Wu J, Wei H (2010) The viability change of
12 pigskin *in vitro*. Burns 36:533–538.
- 13 International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species.
14 Version 2015.4 (2018) <http://www.iucnredlist.org/>. Cited 18 January 2018.
- 15 Kaji K, Matsuo M (1980) Aging of chick embryo fibroblasts *in vitro*—IV. Doubling potential
16 and metabolic time. Exp Gerontol 15:481–485.
- 17 Kim BY, Nam BM, Lee KM, Jo YH, Nemeno J G, Yang W, Lee S, Kim H, Jang IJ, Takebe
18 T, Lee JI (2014) Effect of preservation conditions on cartilage tissue for cell
19 transplantation. Transplant Proc 46:1139–1144.
- 20 Kimura Y, Okitsu T, Xibao L, Teramae H, Okonogi A, Toyoda K, Uemoto S, Fukushima M
21 (2013) Improved hypothermic short-term storage of isolated mouse islets by adding serum
22 to preservation solutions. Islets 5:45–52.
- 23 Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD,
24 Damiani P (2000) Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies
25 nuclear transfer. Cloning 2:79–90.

- 1 León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Jones J, Martinez Hernandez FJ, Moreno JM, Soria B
2 (2009) Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction
3 and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim*
4 *Reprod Sci* 112:347–361.
- 5 León-Quinto T, Simón MA, Sánchez Á, Martín F, Soria B (2011) Cryobanking the genetic
6 diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies.
7 Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells.
8 *Cryobiology* 62:145–151.
- 9 Moulavi F, Hosseini SM, Tanhaie-Vash N, Ostadhosseini S, Hosseini S H, Hajinasrollah M,
10 Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD, Nasr-Esfahani MH (2017)
11 Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-
12 mortem frozen tissue in absence of cryoprotectant and *in vitro* matured domestic cat
13 oocytes. *Theriogenology* 90:197–203.
- 14 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
15 proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- 16 Okonkwo C, Singh M (2014) Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up
17 to 41 d of animal death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51:463–469.
- 18 Pereira AF, Santos MLT, Borges AA, Santos MVO, Feitosa AKN (2014) Isolation and
19 characterization of skin-derived donor cells for nuclear transfer. *Acta Vet Bras* 8:311–316.
- 20 Roth V (2006) <http://www.doubling-time.com/compute.php>. Cited 14 May 2015.
- 21 Rudd NL, Hoar DI, Williams SE, Hennig U GG (1989) Genotype and the cryopreservation
22 process affect the levels of aneuploidy and chromosome breakage in cultured human
23 fibroblasts. *Genome* 32:196–202.
- 24 Salehi P, Spratlin J, Chong TF, Churchill TA (2004) Beneficial effects of supplemental buffer
25 and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology* 48: 245–253.

- 1 Santos DO, Mendes A, Nogueira S, Nogueira-Filho SLG (2009) Criação comercial de caititus
2 (*Pecari tajacu*): uma alternativa para o agronegócio. Ver Bras Saúde Prod An 10:1–10.
- 3 Santos MLT, Borges AA, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF
4 (2016) *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari*
5 *tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. Pesq Vet Bras 36:1194–
6 1202.
- 7 Silvestre MA, Saeed AM, Cervera RP, Escriba MJ, García-Ximénez F (2003) Rabbit and pig
8 ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear
9 extirpated immediately after death. Theriogenology 59:1469–1477.
- 10 Singh M, Ma X (2016) Recovery of fibroblast cells up to 65 d of postmortem storage of sheep
11 ear skin at 4°C. J Anim Sci 94:837–838.
- 12 Singh M, Ma X, Amoah E, Kannan G (2011) *In vitro* culture of fibroblast-like cells from
13 postmortem skin of Katahdin sheep stored at 4°C for different time intervals. In Vitro Cell
14 Dev Biol Anim 47:290–293.
- 15 Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol A. 3B.
- 16 Taylor MJ, Hunt CJ (1989) Hypothermic preservation of corneas in a hyperkalaemic solution
17 (CPTES): II. Extended storage in the presence of chondroitin sulphate. Br J Ophthalmol
18 73:792–802.
- 19 Tovar H, Navarrete F, Rodríguez L, Skewes O, Castro FO (2008) Cold storage of biopsies
20 from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation
21 of primary culture cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim 44:309–320.
- 22 Turhan-Haktanır N, Dilek FH, Köken G, Demir Y, Yılmaz G (2011) Evaluation of amniotic
23 fluid as a skin graft storage media compared with RPMI and saline. Burns 37:652–655.

- 1 Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ (2012) Inducing pluripotency in somatic
2 cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*
3 77:220–228.
- 4 Walcott B, Singh M (2017) Recovery of proliferative cells up to 15-and 49-day postmortem
5 from bovine skin stored at 25°C and 4°C, respectively. *Cogent Biol* 3:1333760.
- 6 Wani NA, Hong SB (2018) Source, treatment and type of nuclear donor cells influences in
7 vitro and in vivo development of embryos cloned by somatic cell nuclear transfer in camel
8 (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 106:186–191.
9

- 1 Table 1. Thickness of the epidermis and dermis and mean number of fibroblasts and perinuclear halos of the ear skin derived from collared
 2 peccaries after conservation at 4°C using different storage periods and conditions.

Groups		Thickness (µm)			No. of fibroblast		No. of perinuclear halos	
Time	Medium	Epidermis ± S.E.	Dermis ± S.E.	Total ± S.E.	Mean ± S.E.	Range	Mean ± S.E.	Range
10	Control	64.8 ± 2.1 ^a	147.6 ± 2.5 ^a	212.4 ± 2.7 ^a	27.6 ± 1.1 ^a	20–34	31.2 ± 1.9 ^a	19–40
	-	65.8 ± 2.4 ^a	146.3 ± 3.2 ^a	212.1 ± 3.4 ^a	23.6 ± 0.9 ^b	18–31	50.3 ± 2.8 ^b	30–67
	+	66.5 ± 3.4 ^a	145.4 ± 3.2 ^a	211.9 ± 2.6 ^a	19.7 ± 1.0 ^b	12–22	42.7 ± 1.9 ^b	33–59
30	-	66.1 ± 2.4 ^a	152.6 ± 4.0 ^a	218.7 ± 3.0 ^a	19.4 ± 1.0 ^b	12–26	46.7 ± 2.6 ^b	8–65
	+	68.1 ± 2.5 ^a	142.3 ± 2.8 ^a	210.4 ± 3.5 ^a	13.6 ± 0.6 ^b	9–18	65.0 ± 2.1 ^c	52–80
50	-	55.8 ± 3.2 ^b	172.7 ± 2.5 ^b	228.5 ± 3.3 ^b	18.5 ± 0.9 ^b	15–22	60.9 ± 3.2 ^c	43–75
	+	69.0 ± 3.1 ^a	146.4 ± 2.8 ^a	215.4 ± 3.0 ^a	17.7 ± 0.8 ^b	13–21	57.9 ± 3.0 ^c	40–76

- 3 Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; (+) presence of medium; (-) absence of medium;
 4 S.E.: standard error. Different letters show differences statistically significant in the same column (P < 0.05).

- 1 Table 2. Establishment of primary cultures and subcultures of skin cells derived from collared peccaries after conservation at 4°C using different
 2 storage periods and conditions.

Groups		No. of samples			No. of attached samples			PDT (h) ± S.E.	Duration of culture (days) ± S.E.
Time	Medium	Initial	Attached (%)	Day all attached explants ± S.E.	Grow to subconfluence (%)	Day all cell grow explants ± S.E.	Subconfluence total time (days) ± S.E.		
10	Control	20	20 (100) ^a	2.0 ± 0.0 ^a	20 (100) ^a	8.2 ± 1.3 ^a	10.6 ± 1.0 ^a	81.7 ± 15.1 ^a	28.0 ± 5.0 ^a
	-	20	20 (100) ^a	5.4 ± 1.1 ^b	20 (100) ^a	12.6 ± 0.2 ^b	14.0 ± 0.0 ^b	61.5 ± 9.5 ^a	39.0 ± 1.0 ^a
	+	20	20 (100) ^a	3.2 ± 1.0 ^a	20 (100) ^a	12.6 ± 0.6 ^b	12.8 ± 0.5 ^a	94.2 ± 15.4 ^a	39.0 ± 1.0 ^a
30	-	20	20 (100) ^a	9.6 ± 2.0 ^b	20 (100) ^a	20.6 ± 1.5 ^c	22.8 ± 1.5 ^c	200.2 ± 31.5 ^b	81.0 ± 9.0 ^b
	+	20	20 (100) ^a	7.2 ± 1.7 ^b	20 (100) ^a	15.0 ± 1.3 ^d	18.8 ± 0.8 ^c	366.7 ± 10.8 ^c	42.0 ± 0.0 ^c
50	-	20	20 (100) ^a	8.0 ± 3.8 ^b	2 (10.0) ^b	NV	NV	NV	NV
	+	20	20 (100) ^a	6.7 ± 2.3 ^b	20 (100) ^a	17.5 ± 0.9 ^e	19.0 ± 1.2 ^c	203.4 ± 10.4 ^b	51.0 ± 3.0 ^c

- 1 Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; (+) presence of medium; (-) absence of medium;
- 2 S.E.: standard error. PDT: population doubling time. NV: non-verified. Different letters show differences statistically significant in the same
- 3 column ($P < 0.05$).

4

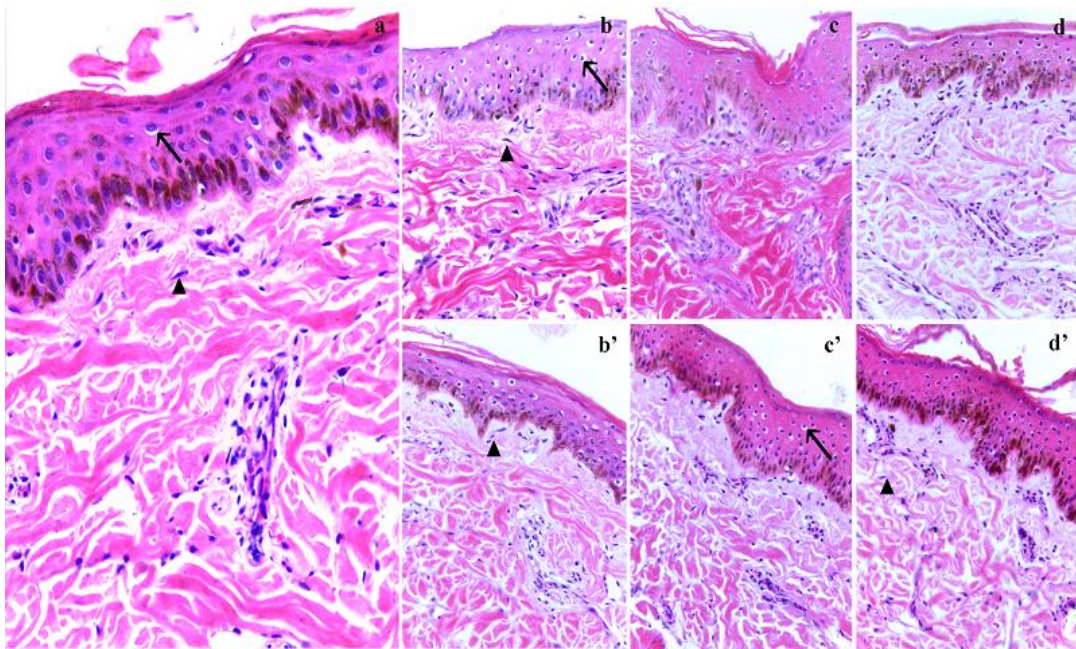


Figure 1. Histological sections of not-refrigerated and refrigerated skin derived from collared peccaries submitted to different storage periods and conditions. **a)** not-refrigerated tissues; and refrigerated tissues in the absence of medium for **b)** 10 days; **c)** 30 days; **d)** 50 days and in presence of medium for **b')** 10 days; **c')** 30 days; **d')** 50 days. Black arrow indicates the presence of perinuclear halos in the epidermis; triangle indicates fibroblasts in the dermis. Scale bar: 50 μm .

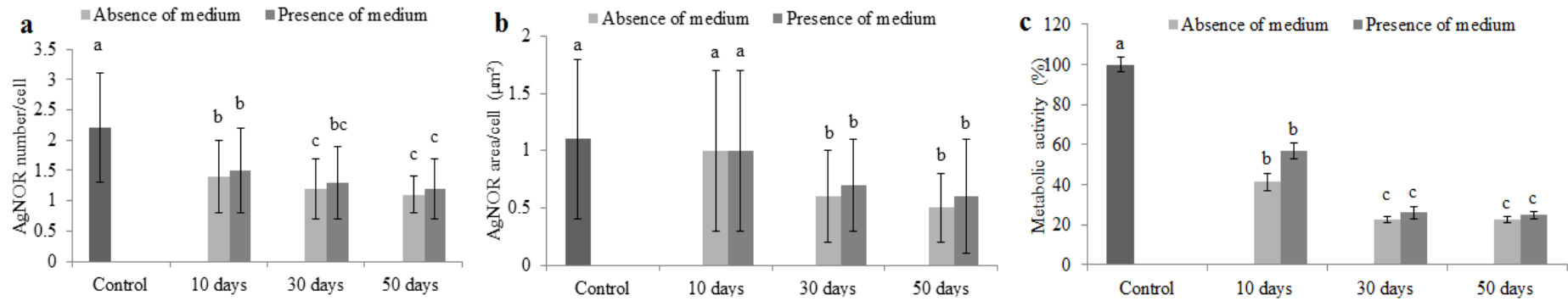
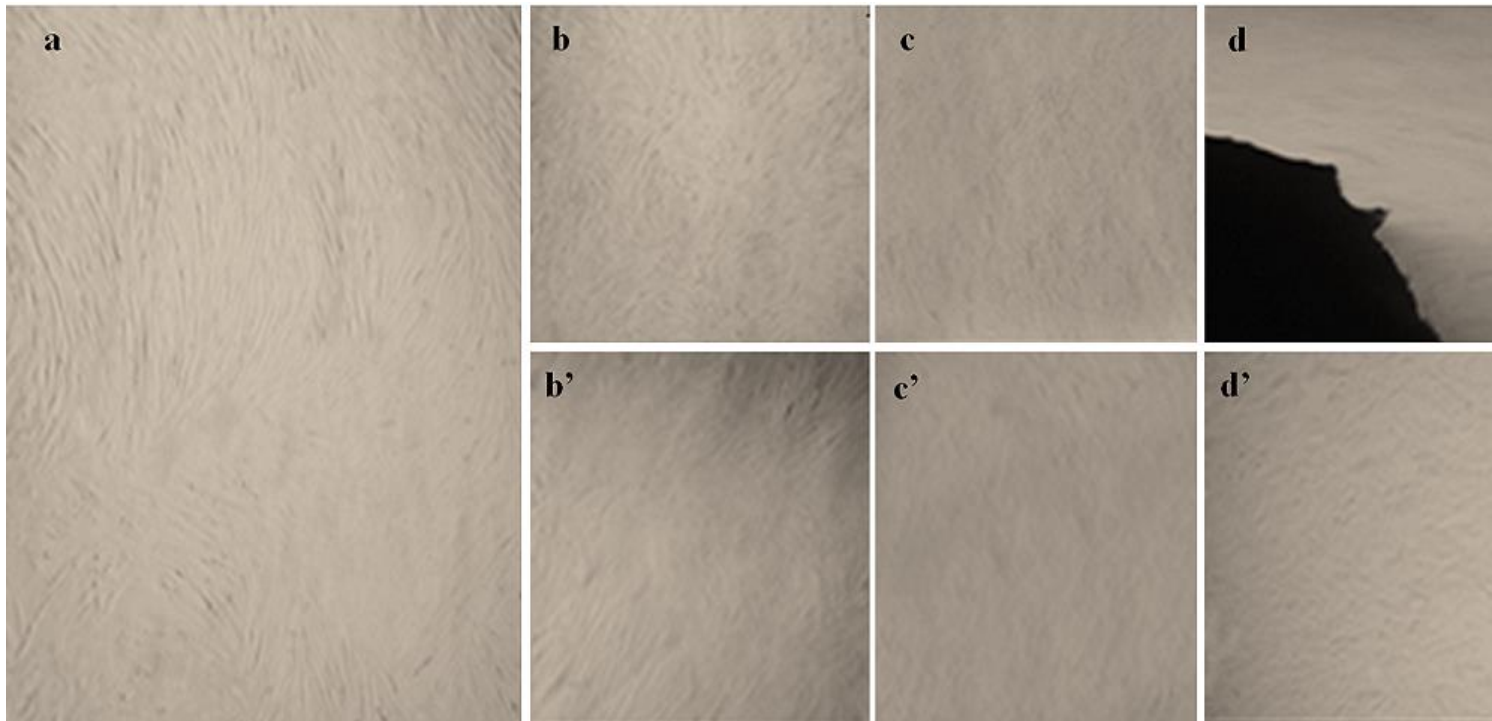


Figure 2. Proliferative and metabolic activity of not-refrigerated and refrigerated skin derived from collared peccaries submitted to different storage periods and conditions. **a)** Quantification of AgNOR number /cell. **b)** Quantification of AgNOR area/cell. **c)** Metabolic assessment by the MTT assay. Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; different letters show statistically significant differences among the groups ($P < 0.05$). Bars represent standard error.



1 Figure 3. Primary and subcultures of fibroblast-like cells from ear skin samples of collared peccaries. **a)** Cells from not-refrigerated tissues; and
 2 cell from refrigerated tissues in the absence of medium for **b)** 10 days; **c)** 30 days; **d)** 50 days and in the presence of medium for **b')** 10 days; **c')**
 3 30 days; **d')** 50 days. Magnification 40 $\times$.

4
5
6

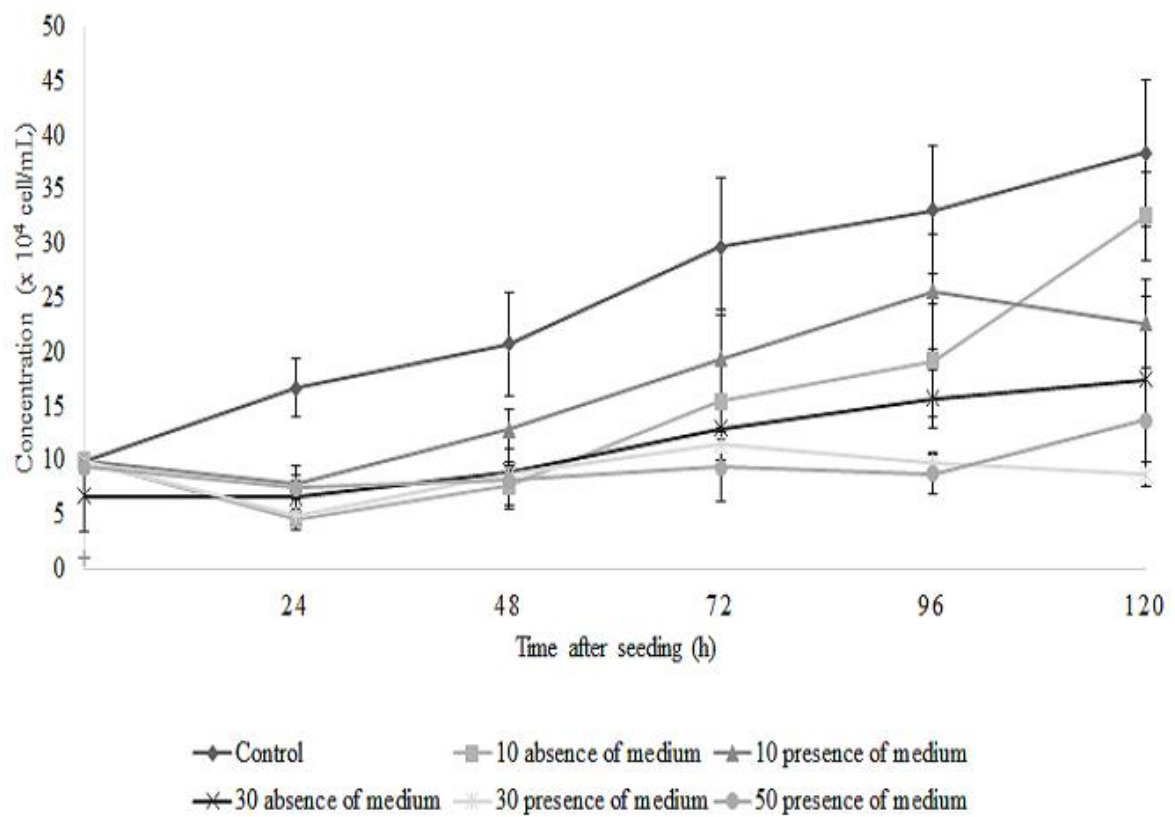


Figure 4. The growth curves of cells derived from not-refrigerated and refrigerated skin tissues of collared peccaries using different storage periods and conditions. Each value represents mean of cells/mL in duplicate. Bars represent standard error.

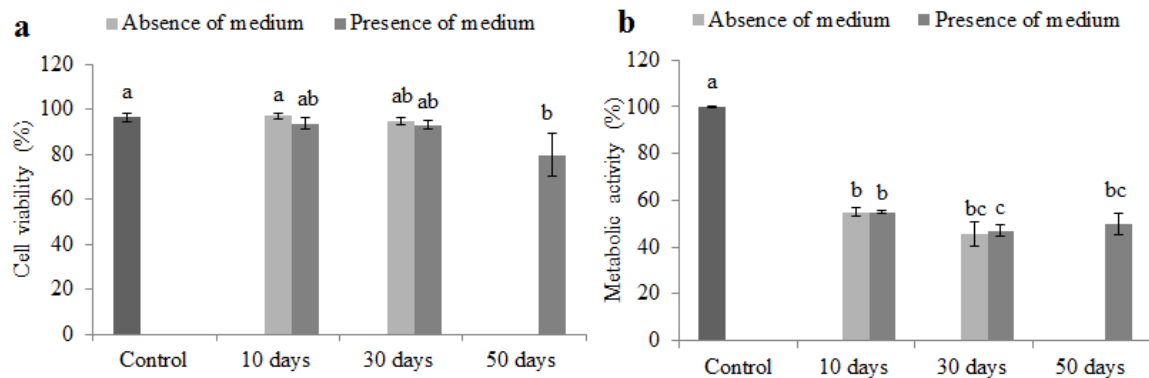


Figure 5. Viability and metabolic activity of the non-refrigerated and refrigerated skin cells of collared peccaries using different storage periods and conditions. **a)** Cell viability by trypan blue stain. **b)** Metabolic assessment by the MTT assay. Control: non-refrigerated; 10, 30, 50: duration in days of the fragments in refrigerated system; different letters show statistically significant differences among the experimental groups ($P < 0.05$). Bars represent standard error.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A presente pesquisa avaliou a influência de diferentes períodos e condições de conservação a 4–6°C de tecidos somáticos derivados da pele de catetos sobre a recuperação de células somáticas. Assim, o estudo evidenciou que tais parâmetros influenciam sobre a qualidade tecidual e as características das células em cultivo. Nesse sentido, células viáveis podem ser recuperadas de fragmentos teciduais armazenados por até 50 dias na presença de meio nutritivo; contudo, tecidos somáticos refrigerados até 10 dias na presença de meio resultaram em células mais viáveis.

Portanto, os resultados alcançados tornam-se relevantes para a conservação de amostras somáticas de catetos, uma vez que foi estabelecida uma metodologia de armazenamento de tecidos somáticos a 4–6°C desta espécie, visando seu uso em condições onde os indivíduos estejam em regiões de difícil acesso ou distante de laboratórios especializados. Além disso, tal metodologia também poderá ser útil para espécies filogeneticamente próximas, como queixadas e tágua. Finalmente, a eficiência desse protocolo garantirá a obtenção de células somáticas, fontes doadoras de núcleo para a técnica de clonagem.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

ANEXOS

ANEXO A - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E METABÓLICA DO TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.

Resumo: Avaliação histológica e metabólica do tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de armazenamento.

Congresso: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), Santos - SP, 2017.



Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 22, 2017, Santos, SP. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2017.

Avaliação histológica e metabólica do tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de armazenamento

*Histological and metabolic evaluation of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) after different storage periods*

Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Maria Bárbara Silva¹, Lhara Ricarlany Medeiros de Oliveira¹, Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Alana Azevedo Borges¹, Alexandre Rodrigues Silva², Moacir Franco de Oliveira³, Alexsandra Fernandes Pereira^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal; ²Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal; ³Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

*E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

A preservação de tecido somático de mamíferos silvestres é uma alternativa viável para a conservação da diversidade genética. Nesse sentido, o resfriamento pode ser empregado como ferramenta para o armazenamento em curto prazo de amostras teciduais, especialmente quando se trata de animais silvestres, os quais na maioria das vezes estão em locais de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o resfriamento em diferentes períodos do tecido somático de catetos, usando as técnicas de histologia convencional e atividade metabólica. Para tanto, amostras auriculares foram coletadas de seis animais, oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Fragmentos (9,0 mm³) foram armazenados em tubos cônicos com meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio a 4–6°C em diferentes períodos de armazenamento (10D, 30D, 50D dias), totalizando três grupos experimentais e o controle (amostras não resfriadas). As amostras do grupo controle e dos grupos resfriados foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4%, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, inclusas em parafina, seccionadas em cortes de 5,0 µm e coradas com hematoxilina-eosina. Comparações foram realizadas entre os fragmentos resfriados e não resfriados, avaliando a quantidade de fibroblastos e halos nas camadas da derme e epiderme. Ainda, esses parâmetros foram avaliados pelo software Image J, através da análise de 15 campos aleatórios a uma magnitude de 40x. Para a determinação da atividade metabólica, os fragmentos foram incubados em brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 2 mg/mL) durante 3 h a 38,5°C. Após esse período foi acrescido dimetilsulfóxido (DMSO) como solução de solubilização do MTT e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a histologia, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis associado com teste de Dunn. Os dados provenientes do ensaio de MTT foram transformados em arc sen e analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. Em relação ao número de fibroblastos não houve diferença entre os períodos resfriados [10D (16,8 ± 6,8); 30D (13,6 ± 6,0); 50D (17,7 ± 57,9)]; contudo, todos diferiram do grupo controle (27,6 ± 10,0). Em relação ao número de halos todos os grupos resfriados também diferiram do controle (31,2 ± 18,3). Além disso, dentre os resfriados, o grupo 10D (46,8 ± 19,3) apresentou o melhor resultado comparado com o 30D (65,0 ± 20,2) e 50D (57,9 ± 28,3). Para o ensaio de MTT, o controle foi considerado como 100% de viabilidade. Apesar de todos os grupos diferirem do controle, o grupo 10D manteve o melhor padrão de viabilidade das amostras (10D: 57,1% ± 19,9). Não foram observadas diferenças entre os grupos de 30D (26,1% ± 14,8) e 50D (25,0% ± 8,8). Em geral, de acordo com os resultados obtidos, o armazenamento de amostras somáticas de catetos a partir de 30 dias diminui a viabilidade do tecido e aumenta a quantidade de halos, denotando que as células do tecido iniciam o processo apoptótico. Em conclusão, o resfriamento até 10 dias na presença de meio de amostras somáticas de catetos conserva as características viáveis teciduais, visando à recuperação de células para biotecnologias, como a clonagem.

Palavras-chave: conservação, resfriamento, tecido somático, animais silvestres.

Keywords: conservation, cooling, somatic tissue, wild animals.

**ANEXO B - AVALIAÇÃO METABÓLICA DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS
(*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE
RESFRIAMENTO.**

Resumo: Avaliação metabólica de tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)
após diferentes períodos de resfriamento.

Congresso: RENORBIO – Encontro de Biotecnologia do Nordeste, Natal – RN, 2017

Avaliação metabólica de tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) após diferentes períodos de resfriamento

Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira¹, Luiza Bento de Queiroz Neta¹, Alana Azevedo Borges¹, Maria Valéria de Oliveira Santos¹, Maria Bárbara Silva¹, Gabriela Pereira de Oliveira Lira¹, Alexandre Rodrigues Silva², Moacir Franco de Oliveira³, Alexsandra Fernandes Pereira¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, ²Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, ³Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil. E-mail: lharagirs@hotmail.com

O resfriamento pode ser empregado como uma alternativa para a conservação de amostras teciduais de mamíferos silvestres que são coletadas em locais de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados. Nesse contexto, é necessário estabelecer condições ideais de resfriamento para cada tecido/espécie. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar por análise da atividade metabólica o efeito do resfriamento após diferentes períodos de armazenamento de tecido somático de catetos. Para tanto, amostras teciduais da região auricular periférica foram coletadas de seis animais oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestre (CEMAS/UFERSA). Fragmentos teciduais (9,0 mm³) foram armazenados em tubos cônicos a 4–6°C por diferentes períodos (10D vs. 30D vs. 50D dias), totalizando três grupos experimentais e o controle (amostras não resfriadas). Após cada período de resfriamento, para a determinação da atividade metabólica, os fragmentos foram incubados em brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 2 mg/mL) por 3 h a 38,5°C. Após esse período foi acrescido dimetilsulfóxido (DMSO) por 4 minutos como solução de solubilização do MTT e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Todos os dados foram transformados em arc sen e analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. O grupo controle foi considerado como 100% da atividade metabólica. Apesar de todos os grupos diferirem do controle, o grupo 10D manteve o melhor padrão de viabilidade das amostras (10D: 41,4% ± 20,7) quando comparado aos demais grupos resfriados ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos de 30D (22,5% ± 7,4) e 50D (22,6% ± 8,2). De acordo com os resultados obtidos, o resfriamento de amostras somáticas de catetos na ausência de meio nutritivo a partir de 30 dias diminuiu bastante a atividade metabólica do tecido. Em conclusão, o resfriamento durante dez dias na ausência de meio nutritivo foi o mais eficiente para armazenar os fragmentos somáticos de catetos, permitindo a conservação das características viáveis teciduais, visando a obtenção de células para técnicas reprodutivas com o intuito de conservação da espécie.

Suporte financeiro: CNPq e CAPES.

Palavras-Chaves: mamíferos silvestres, conservação tecidual; ensaio colorimétrico, MTT.

**ANEXO C - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE TECIDO SOMÁTICO DE
CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) APÓS O RESFRIAMENTO.**

Resumo: Avaliação da viabilidade de tecido somático de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) após o resfriamento.

Congresso: XXIII Seminário de Iniciação Científica (SEMIC), Mossoró – RN, 2017.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE TECIDO SOMÁTICO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) APÓS O RESFRIAMENTO

Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira¹; Maria Bárbara Silva²; Maria Valéria de Oliveira Santos³; Luiza Bento de Queiroz Neta⁴; Alexsandra Fernandes Pereira⁴

¹Graduanda em Biotecnologia, IC-PIVIC (lharagirs@hotmail.com); ²Graduanda em Biotecnologia, IC-PIVIC; ³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Bolsista CAPES; ⁴Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Bolsista CAPES; ⁵Orientadora, Laboratório de Biotecnologia Animal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

A preservação de tecido somático de mamíferos silvestres é uma alternativa viável para a conservação da diversidade genética. Nesse sentido, o resfriamento pode ser empregado como ferramenta para o armazenamento em curto prazo de amostras teciduais, especialmente quando se trata de animais silvestres, os quais na maioria das vezes estão em locais de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o resfriamento por 10 dias do tecido somático de catetos, usando a técnica de atividade metabólica. Para tanto, amostras auriculares foram coletadas de oito animais, oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA). Fragmentos (9,0 mm³) foram armazenados em tubos cônicos sem nenhum meio nutritivo a 4–6°C por 10 dias. Amostras não resfriadas foram avaliadas imediatamente e consideradas como grupo controle. As amostras do grupo controle e do grupo resfriado foram incubadas em brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 2 mg/mL) durante 3 h a 38,5°C. Após esse período foi acrescido dimetilsulfóxido (DMSO) como solução de solubilização do MTT e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Todos os dados foram transformados em arc sen e analisados por ANOVA seguido de teste Tukey. Para o ensaio de MTT, o controle foi considerado como 100% de viabilidade. Após oito repetições (um animal/uma repetição), amostras resfriadas diferiram das amostras do grupo controle, apresentando uma viabilidade de 42,6% (P<0,05). Em conclusão, o resfriamento de amostras somáticas de catetos na ausência de meio nutritivo durante 10 dias diminuiu a viabilidade tecidual. Contudo, o resfriamento mesmo sem meio nutritivo pode ser usado como alternativa viável em situações de emergência para a colheita de material biológico de mamíferos silvestres, especialmente os catetos.

Palavras-chave: Mamíferos silvestres; Conservação tecidual; Banco somático.

Agência Financiadora: UFERSA-PICI. CNPq. CAPES.

**ANEXO D - ESTADO ATUAL DA CONSERVAÇÃO A 4°C DE TECIDOS
SOMÁTICOS DERIVADOS DA PELE EM MAMÍFEROS.**

Artigo de revisão: Estado atual da conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados da pele em mamíferos.

Periódico: Revista Brasileira de Reprodução Animal

Qualis (Medicina Veterinária): B4

Submetido em: 20/01/2018

Estado atual da conservação a 4 °C de tecidos somáticos derivados da pele em mamíferos

Current status of conservation at 4 °C of somatic tissues derived from the skin in mammals

L.B. Queiroz Neta¹, E.A. Praxedes¹, M.V.O. Santos¹, A.A. Borges¹, A.F. Pereira¹²

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. ²Correspondente:
alexandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas consiste numa atraente ferramenta para a conservação e multiplicação de espécies e sua eficiência depende da obtenção e seleção de células doadoras de núcleo derivadas da pele de indivíduos de interesse. Em alguns mamíferos encontrados em regiões de difícil acesso ou distantes de laboratórios especializados, o armazenamento a 4 °C de tecidos somáticos da pele seria uma alternativa para a conservação do material genético desses animais. Contudo, o emprego desta técnica depende de alguns fatores, como os períodos e as condições de armazenamento a 4 °C das amostras teciduais, os quais podem influenciar na recuperação das células após cultivo *in vitro* dos tecidos. Em mamíferos domésticos, estudos têm mostrado variações quanto ao período de estocagem e a presença de meio nutritivo. Já em mamíferos silvestres, apenas são relatados o uso da refrigeração como ferramenta de transporte em curto prazo. Assim, o objetivo desta revisão é apresentar os diferentes períodos e condições de armazenamento a 4 °C de tecidos somáticos, evidenciando a importância dessa técnica para a conservação da biodiversidade.

Palavras-chave: células somáticas, recuperação *post-mortem*, clonagem.

Abstract

Cloning by somatic cell nuclear transfer is an attractive tool for conservation multiplication of species and its efficiency depends on the obtaining and selection of nucleus donor cells derived from the skin of individuals of interest. In some mammals found in regions difficult to access or distant from specialized laboratories, the storage at 4 °C of somatic tissues of the skin would be an alternative for the conservation of the genetic material of these animals. Nevertheless, the use of this technique depends on some factors, such as periods and storage conditions at 4 °C of the tissue samples, which may influence the recovery of the cells after tissue culture *in vitro*. In domestic mammals, studies have shown variations regarding the period of storage and the presence of nutrient medium. Already, in wild mammals, only is related the use of refrigeration as transportation tool in the short term. Thus, the aim of this review is to present the different periods and conditions of storage at 4 °C of somatic tissues, evidencing the importance of this technique for the conservation of biodiversity.

Key-words: somatic cells, *postmortem* recovery, cloning.

Introdução

Dentre as estratégias de conservação a serem empregadas para a manutenção e multiplicação das espécies, o emprego de amostras teciduais tem se destacado como uma ferramenta imediata de estocagem do material genético (Pereira et al., 2014), sendo o armazenamento de tecidos somáticos, especialmente derivados da pele, uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional das espécies de interesse, não existindo dependência de idade ou gênero (Pereira et al., 2014). Em geral, células recuperadas de tecidos somáticos podem ser usadas para diferentes finalidades, como produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas ou TNCS (Wani; Hong, 2018), formação de criobancos (Caamaño et al., 2008) e pesquisas de pluripotencialidade (Verma et al., 2012).

Para todas essas finalidades, técnicas de conservação de tecidos somáticos têm sido empregadas em mamíferos, como a criopreservação por congelação lenta (Caamaño et al., 2008), por vitrificação (Borges et al., 2017b) e a refrigeração a 4 °C (Tovar et al., 2008). Esta última técnica tem sido empregada especialmente para o transporte ou conservação em curto prazo de tecidos somáticos de indivíduos localizados em regiões de difícil acesso ou distantes dos laboratórios especializados (Silvestre et al., 2004). Além disso, esse tipo de conservação é bastante empregado em virtude de sua simplicidade, eficiência e disponibilidade, já que não envolve o uso de materiais mais complexos e de alto custo (Basaran et al., 2006).

Contudo, o emprego desta técnica depende de alguns fatores, como o período e as condições de armazenamento das amostras teciduais, os quais podem influenciar na recuperação das células após cultivo *in vitro* dos tecidos (Aoued; Singh, 2015). Em mamíferos domésticos, estudos têm mostrado variações quanto ao período de estocagem e a presença de meio nutritivo em diferentes espécies, como suínos (Ge et al., 2010) e caprinos (Okonkwo; Singh, 2014). Em mamíferos silvestres, pesquisas relacionadas ao conhecimento dos fatores que influenciam no sucesso da técnica ainda são escassos.

Assim, esta revisão apresenta como propósito discriminar os diferentes períodos e condições de armazenamento de tecidos somáticos, evidenciando a importância dessa técnica para a conservação da biodiversidade em mamíferos domésticos e silvestres.

Fatores que influenciam na conservação a 4 °C de tecidos somáticos

A conservação tecidual hipotérmica, ou seja, o armazenamento de tecidos em temperatura inferior à temperatura fisiológica normal e superior ao ponto de congelação (Ackers, 2006), pode ser

1 categorizado em diferentes estágios: leve (32–35 °C), moderado (27–32 °C), profundo (10–27 °C) e
2 ultraprofundo (0–10 °C) (Baust et al., 2015). Para todos os estágios, as condições hipotérmicas
3 promovem uma desaceleração do metabolismo celular e uma redução da demanda de oxigênio e
4 conservação da energia química (Brockbank; Taylor, 2006).

5
6 O emprego eficiente desta técnica depende de alguns fatores, como os períodos e as condições de
7 armazenamento, os quais podem influenciar na recuperação das células após cultivo *in vitro* dos
8 tecidos (Aoued; Singh, 2015). Em mamíferos domésticos, estudos têm mostrado variações quanto ao
9 período de estocagem e a presença de meio nutritivo em diferentes espécies (Ge et al., 2010;
10 Okonkwo; Singh, 2014). Em felinos e roedores silvestres, Tovar et al. (2008) usaram sistemas
11 refrigerados para o transporte em curto prazo (até sete dias) de tecidos somáticos da pele derivados
12 de algumas espécies nativas do Chile, como o gato-chileno (*Oncifelis guigna*) e pudu do sul (*Pudu*
13 *puda*), localizadas em diferentes regiões do Chile. Nesse estudo, os autores obtiveram um total de 30
14 biópsias de pele e após o cultivo *in vitro*, 93,0% (28/30) alcançaram o crescimento celular ao redor
15 dos explantes, resultando assim em 69 linhagens celulares com características morfolologicamente
16 normais.

17 *Período de armazenamento*

18
19 O período de armazenamento consiste num fator importante para a conservação eficiente das
20 amostras somáticas da espécie de interesse (Caputcu et al., 2013) e possui variáveis períodos de
21 acordo com a espécie e sua localização (Tovar et al., 2008). Em mamíferos domésticos (Tab. 1),
22 diferentes períodos já foram apresentados em algumas espécies de produção. Em suínos, Silvestre et
23 al. (2003) verificaram que tecidos somáticos derivados da pele quando conservados a 4 °C por até 10
24 dias mantinham a viabilidade celular após o cultivo. Já Singh e Ma (2016) armazenaram amostras

1 refrigeradas de ovelhas por 65 dias e obtiveram células viáveis e geneticamente estáveis. Contudo, os
2 mesmos autores não obtiveram células quando os explantes foram refrigerados por 70 dias.

3
4 Em geral, o período de armazenamento pode afetar a qualidade das células recuperadas (Kim et al.,
5 2014), bem como a capacidade de crescimento celular a partir dos explantes aderidos (Caputcu et al.,
6 2013). Kim et al. (2014) observaram que a taxa de proliferação de células oriundas de tecido
7 cartilaginoso humano foi comprometida após sete dias de estocagem. Além disso, Birdsill et al.
8 (2014) cultivando tecido cerebral humano, verificaram que o RNA foi degradado progressivamente
9 com o aumento do período de armazenamento em sistema refrigerado, reduzindo a proporção de
10 expressão gênica e confluência celular. Ainda, em tecidos somáticos da pele humana esse tempo
11 também afetou a integridade morfológica dos tecidos pela presença de vacúolos (Gaucher et al.,
12 2012).

13 *Uso de meio nutritivo para a conservação em sistema refrigerado*

14 A conservação de tecidos somáticos a 4 °C pode ser realizada tanto na ausência (Silvestre et al.,
15 2003) quanto na presença de meio nutritivo (Aoued; Singh, 2015). Em geral, condições de
16 refrigeração na ausência de meio são estabelecidas visando conhecer a resistência do tecido em
17 situações onde não há uma mínima condição de manipulação do armazenamento das amostras
18 (Silvestre et al., 2003).

19
20
21 Por outro lado, a presença de meio nutritivo visa minimizar as lesões induzidas pelas temperaturas
22 hipotérmicas, uma vez que os mesmos modulam a resposta fisiológica ao frio, mantendo a
23 homeostase (Ackers, 2006). Entre os meios nutritivos que podem ser empregados para essa
24 finalidade, têm-se: solução salina (NaCl a 0,9%) como observado para tecido somático murino

(Basaran et al., 2006), solução tampão fosfato para felinos e roedores silvestres (Tovar et al., 2008) e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) para suínos (Ge et al., 2010).

Em geral, o meio mais empregado para essa finalidade consiste em DMEM suplementado com 2,2% de bicarbonato de soro, 10% de soro fetal bovino (SFB), podendo também ser adicionado de 2% de solução de antibióticos e antimicóticos (Aoued; Singh, 2015). A suplementação com SFB atua como uma rica fonte de proteínas, minerais, lipídios, fatores de crescimento e hormônios, tendo a albumina sérica como a proteína mais abundante e com atividade antioxidante (Santos et al., 2015). Ainda, a presença de um tampão, como o bicarbonato de sódio, na composição do meio de conservação permite manter a viabilidade das células e a manutenção das características dos tecidos.

Assim, meios nutritivos durante a conservação a 4 °C de tecidos somáticos podem auxiliar a neutralizar o efeito negativo das flutuações de pH e toxina, atuando na sobrevivência das células presentes nos tecidos por mais tempo. Adicionalmente, dependendo da composição desses meios, os mesmos podem conter agentes antioxidantes que atuam em conjunto com antioxidantes endógenos das células contra as injúrias geradas pelo estresse oxidativo (Aoued; Singh, 2015).

Além disso, o uso de meios nutritivos durante a conservação por longos períodos permite atrasar os danos gerados pela isquemia (Guibert et al., 2011). Brevemente, quando o fluxo sanguíneo é rompido ou restrito, tanto glicose quanto oxigênio tornam-se reduzidos e, até mesmo, consumidos, levando as células a alterar seu metabolismo, assumindo um metabolismo anaeróbico e menos eficiente de energia. Ainda, ao longo do período de conservação, esses processos resultam em um déficit de oxigênio nas células com um acúmulo de metabólitos intracelulares, como ácido lático que conduzem a alterações do pH celular. Todas essas alterações finalizam com funções alteradas de enzimas e bombas de membranas mitocondriais e plasmáticas. Adicionalmente, mudanças do quantitativo de

1 eletrólitos causam injúrias no equilíbrio osmótico, podendo resultar na ruptura da célula e,
2 consequentemente, na ativação dos mecanismos de morte celular.

3
4 Finalmente, a presença de um meio nutritivo adequado poderá atuar reduzindo ou atrasando esses
5 efeitos, fazendo os tecidos e células manterem sua atividade metabólica e viabilidade adequada.

6 7 **Ferramentas de avaliação de tecidos somáticos refrigerados**

8 Durante a conservação a 4 °C, células e tecidos somáticos sofrem uma redução de seu metabolismo,
9 retardando alguns processos degenerativos gerados pelas temperaturas hipotérmicas. Nesse sentido,
10 após o período de conservação, faz-se necessário avaliar o grau de preservação dos tecidos usando
11 diferentes ferramentas que evidenciem as características morfológicas (Borges et al., 2017b),
12 atividades proliferativas e metabólicas (Boekema et al., 2015) e viabilidade das células após cultivo
13 *in vitro* (Aoued; Singh, 2015).

14
15 Entre as ferramentas que podem ser empregadas para avaliar o grau de comprometimento da
16 qualidade dos tecidos refrigerados, têm-se a análise histológica usando diferentes colorações
17 (Castagnoli et al., 2003) e o cultivo *in vitro* dos fragmentos teciduais (Singh et al., 2011).

18 19 *Caracterização histológica da pele*

20 Castagnoli et al. (2003) enfatizaram a importância das análises histológicas na avaliação da
21 integridade morfológica do tecido após a conservação a temperaturas hipotérmicas. Dentre as
22 colorações histológicas que podem ser empregadas têm-se a hematoxilina-eosina (Boekema et al.,
23 2015) e a marcação da região argirofílica organizadora nucleolar ou AgNOR. Entre os efeitos que
24 podem ser identificados por essas análises têm-se a presença de vacúolos, halos perinucleares
25 (Boekema et al., 2015) e alterações morfológicas (Gaucher et al., 2012).

Na conservação a 4 °C de tecidos somáticos derivados de pele humana com diferentes meios nutritivos, Boekema et al. (2015) utilizando hematoxilina-eosina, quantificaram halos perinucleares na epiderme. Esses halos consistem em estruturas sinalizadoras do início da apoptose, sendo formados quando o núcleo é separado do citoplasma. Além disso, usando ainda a hematoxilina-eosina, é possível também quantificar o número de fibroblastos da derme e mensurar os efeitos gerados na espessura da epiderme e derme (Borges et al., 2017a).

Já pela marcação de AgNOR é possível identificar danos gerados na atividade proliferativa das células. Essa metodologia baseia-se na ligação do reagente prata coloidal às proteínas acídicas, não histônicas, associadas às regiões organizadoras de nucléolos. Na marcação, o nitrato de prata marca as proteínas específicas ligadas à transcrição das regiões organizadoras de nucléolos, denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares, podendo assim ser visualizadas como pontos escurecidos no núcleo celular. Logo, quanto mais regiões organizadoras de nucléolos são marcadas, maior será a atividade proliferativa daquele tipo celular. Portanto, as regiões organizadoras de nucléolos estão diretamente relacionadas com a atividade proliferativa das células, podendo assim indicar a atividade proliferativa das amostras teciduais.

Caracterização das células durante o cultivo in vitro

Estudos anteriores têm demonstrado que a conservação a 4°C de tecidos somáticos pode interferir na capacidade de aderência, confluência, atividade proliferativa e metabólica das células recuperadas desses tecidos e cultivadas *in vitro* (Silvestre et al., 2003; Singh et al., 2011). Em ovinos, Singh e Ma (2016) não observaram crescimento de células após 70 dias dos tecidos refrigerados. Contudo, até 65 dias de estocagem foi possível obter células estáveis com morfologia normal e similar às células derivadas de tecidos não refrigerados.

1
2 Durante o cultivo *in vitro*, células podem ser avaliadas quanto à sua morfologia e crescimento por
3 microscopia de luz (Borges et al., 2018), viabilidade por ensaio de exclusão com azul de tripan
4 (Borges et al., 2017b), atividade funcional e metabólica por ensaios colorimétricos (Caputcu et al.,
5 2013), atividade proliferativa pela elaboração de curva de crescimento (Borges et al., 2017b) e a
6 estimativa do tempo de duplicação da população de células (Okonkwo; Singh, 2014). Todas essas
7 análises fornecem indícios da qualidade dos tecidos submetidos aos procedimentos de conservação e,
8 consequentemente, a viabilidade das células recuperadas.

9
10 Em geral, a morfologia das células, embora não seja uma metodologia decisiva para avaliação da
11 qualidade celular, consiste na primeira análise a ser realizada sobre as células em cultivo (Santos et
12 al., 2015). Já o ensaio com azul de tripan consiste numa metodologia clássica e rápida de avaliação
13 da viabilidade celular (Borges et al., 2017b). Esse corante analisa a integridade da membrana pela
14 identificação das células com membranas danificadas, as quais permitem a penetração do corante e,
15 consequentemente, são classificadas como não viáveis.

16
17 Além disso, outras ferramentas importantes podem ser realizadas com o objetivo de conhecer o perfil
18 das células e o efeito da conservação sobre a atividade proliferativa das mesmas. Assim, através da
19 elaboração da curva de crescimento e a determinação do tempo de duplicação celular foi possível
20 verificar o efeito do período de estocagem sobre as características das células recuperadas, reduzindo
21 suas taxas de proliferação (Kim et al., 2014).

22
23 Ainda sobre ferramentas usadas na avaliação da qualidade dos tecidos somáticos refrigerados, tem-se
24 o uso do ensaio colorimétrico brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou MTT
25 (Santos et al., 2015), o qual é empregado para análise da atividade metabólica das células.

Brevemente, o ensaio de MTT foi desenvolvido como uma metodologia simples, rápida, precisa e de baixo custo para avaliação da citotoxicidade e atividade proliferativa de células cultivadas *in vitro*. Além disso, o MTT também pode ser empregado tanto nas células em cultivo, quanto diretamente nos tecidos (Ge et al., 2010).

Finalmente, todas essas ferramentas permitem uma análise das condições de conservação a 4 °C pela determinação além da morfologia celular, também do efeito de como essa conservação pode interferir na atividade proliferativa e metabólica das células. Isso porque a conservação em temperaturas hipotérmicas pode afetar negativamente a estrutura mitocondrial e a integridade lisossômica e das membranas celulares (Guibert et al., 2011).

Considerações finais

As células somáticas recuperadas de tecidos da pele apresentam diferentes finalidades e as mesmas têm impulsionado as pesquisas relacionadas à conservação e multiplicação de amostras teciduais em mamíferos. Em geral, os estudos são voltados para avaliações das condições adequadas de conservação a fim de garantir a qualidade das células que serão reprogramadas para suportar o desenvolvimento embrionário e fetal. Assim, células que apresentam uma morfologia e perfil normal durante o cultivo *in vitro*, incluindo ainda viabilidade e a taxa de proliferação são selecionadas para a criopreservação e uso na TNCS. Finalmente, a conservação a 4 °C consiste numa ferramenta imediata de armazenamento do material genético, sendo a estocagem de tecidos somáticos uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional da espécie de interesse.

Referências

- 1 **Ackers JP.** Biopreservation of cells and engineered tissues. *Adv Biochem Eng/Biotechnol*, v.103,
2 p.157-187, 2006.
- 3 **Aoued HS, Singh M.** Recovery of fibroblast-like cells after 160 days of postmortem storage of goat
4 skin tissues in refrigerated media. *J Vet Sci Techn*, v.6, p.1-5, 2015.
- 5 **Basaran O, Ozdemir H, Kut A, Sahin FI, Deniz M, Sakallioglu EA, Haberal MA.** Effects of
6 different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat
7 model. *Burns*, v.32, p.423-429, 2006.
- 8 **Baust JM, Corwin WL, Vanbuskirk R, Baust JG.** Biobanking: the future of cell preservation
9 strategies. In: *Biobanking in the 21st Century*. Springer International Publishing, 864p., 2015.
- 10 **Birdsill AC, Walker DG, Lue L, Sue LI, Beach TG.** *Postmortem* interval effect on RNA and gene
11 expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank*, v.12, p.311-318, 2011.
- 12 **Boekema BKHL, Bokestijn B, Breederveld RS.** Evaluation of saline, RPMI and DMEM/F12 for
13 storage of split-thickness skin grafts. *Burns*, v.41, p.848-852, 2015.
- 14 **Borges AA, Bezerra FVF, Costa FN, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR,**
15 **Pereira AF.** Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)
16 ear integumentary system. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.69, p.948-954, 2017a.
- 17 **Borges AA, Lima GL, Queiroz Neta LB, Santos MV, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.**
18 Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using
19 direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*, v.69, p.643-654, 2017b.
- 20 **Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR,**
21 **Pereira AF.** Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived
22 from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreserv Biobank*, no prelo, 2018.
- 23 **Brockbank K, Taylor M.** Tissue preservation. In: *Advances in Biopreservation*. CRC press Taylor;
24 Francis Group, Boca Raton, p.157-191, 2006.

- 1 **Caamaño JN, Rodriguez A, Muñoz M, De Frutos C, Diez C, Gómez E.** Cryopreservation of
2 Brown bear skin biopsies. *Cell Preserv Technol*, v.6, p.83-86, 2008.
- 3 **Caputcu AT, Akkoc T, Cetinkaya G, Arat S.** Tissue cryobanking for conservation programs: effect
4 of tissue type and storage time after death. *Cell Tissue Bank*, v.14, p.1-10, 2013.
- 5 **Castagnoli C, Alotto D, Cambieri I, Casimiri R, Aluffi M, Stella M, Alasia ST, Magliacani G.**
6 Evaluation of donor skin viability: fresh and cryopreserved skin using tetrazolium salt assay. *Burns*,
7 v.29, p.759-767, 2003.
- 8 **Gaucher S, Elie C, Vérola O, Jarraya M.** Viability of cryopreserved human skin allografts:
9 effects of transport media and cryoprotectant. *Cell Tissue Bank*, v.13, p. 147-155, 2012.
- 10 **Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, Xiong F, Wu J, Wei H.** The viability change of pig
11 skin *in vitro*. *Burns*, v.36, p.533-538, 2010.
- 12 **Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ.** Organ
13 preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transf Med Hemoter*,
14 v.38, p.125-142, 2011.
- 15 **Kim BY, Nam BM, Lee KM, Jo YH, Nemenko JG, Yang W, Lee S, Kim H, Jang IJ,**
16 **Takebe, T.; Lee, J.I.** Effect of preservation conditions on cartilage tissue for cell
17 transplantation. *Transplant Proc*, v.46, p.1139-1144, 2014.
- 18 **Okonkwo C, Singh M.** Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up to 41
19 h of animal death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.51, p.463-469, 2014.
- 20 **Pereira AF, Santos MLT, Borges AA, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Feitosa AKN.**
21 Isolamento e caracterização de células doadoras derivadas da pele para a transferência
22 nuclear. *Acta Vet Bras*, v.8, p.311-316, 2014.
- 23 **Santos MLT, Borges AA, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR,**
24 **Pereira AF.** Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos silvestres - estado da
25 arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p. 382-386, 2015.

- 1 **Silvestre MA, Saeed AM, Cervera RP, Escribá MJ, García-Ximénez F.** Rabbit and pig ear
2 skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated
3 immediately after death. *Theriogenology*, v.59, p.1469-1477, 2003.
- 4 **Silvestre MA, Sánchez JP, Gómez EA.** Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples
5 from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and
6 temperatures. *Theriogenology*, v.49, p.221-229, 2004.
- 7 **Singh M, Ma X.** Recovery of fibroblast cells up to 65 d of postmortem storage of sheep ear
8 skin at 4°C. *J Anim Sci*, v.94, p.837-838, 2016.
- 9 **Singh M, Ma X, Amoah E, Kannan G.** *In vitro* culture of fibroblast-like cells from
10 postmortem skin of Katahdin sheep stored at 4°C for different time intervals. *In Vitro Cell*
11 *Dev Biol Anim*, v.47, p.290-293, 2011.
- 12 **Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ.** Inducing pluripotency in somatic
13 cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77,
14 p.220-228, 2012.
- 15 **Tovar H, Navarrete F, Rodríguez L, Skewes O, Castro FO.** Cold storage of biopsies from
16 wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of
17 primary culture cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.44, p.309-320, 2008.
- 18 **Walcott B, Singh M.** Recovery of proliferative cells up to 15-and 49-day postmortem from
19 bovine skin stored at 25 °C and 4 °C, respectively. *Cogent Biol*, v.3, p.1-9, 2017.
- 20 **Wani NA, Hong SB.** Source, treatment and type of nuclear donor cells influences *in vitro* and
21 *in vivo* development of embryos cloned by somatic cell nuclear transfer in camel (*Camelus*
22 *dromedarius*). *Theriogenology*, v.106, p.186-191, 2018.

1 Tabela 1. Conservação a 4 °C de tecidos somáticos derivados de pele de alguns mamíferos domésticos na ausência de meio nutritivo.

Espécie	Período (dias)	Principais resultados	Referência
Bovina	9,0	Todos os explantes apresentaram crescimento de células [100%, (246/246)] morfolologicamente normais.	Caputcu et al. (2013)
	49	Apenas 58,7% (333/567) dos explantes apresentaram crescimento de células normais, sendo esse percentual reduzido com o período de armazenamento.	Walcott; Singh (2017)
Caprina	41	Somente 84,5% (450/539) dos explantes apresentaram crescimento de células morfolologicamente semelhantes a fibroblastos, tendo valores inferiores a 50% em explantes armazenados a 33 dias (40,7%, 11/27).	Okonkwo; Singh (2014)
Ovina	14,5	Todos os explantes cultivados apresentaram crescimento de células [100%, (44/44)].	Silvestre et al. (2004)
	65	Somente 77,6% (374/481) dos explantes apresentaram crescimento de células morfolologicamente semelhantes a fibroblastos	Singh; Ma (2016)
Suína	14	Apenas 91,3% (21/23) dos explantes apresentaram crescimento de células, tendo 14° dia apresentado 17,0% (1/3).	Silvestre et al. (2004)

