



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

**CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO
AURICULAR DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) EM MEIO COM
DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES**

MOSSORÓ – RN
2016

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

**CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO
AURICULAR DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) EM MEIO COM
DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira – UFERSA.
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva – UFERSA.

MOSSORÓ – RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S237c Santos, Magda Lorena Turbano dos.

Cultivo in vitro de Células somáticas derivadas de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) em meio com diferentes suplementações. / Magda Lorena Turbano dos Santos -- Mossoró, 2016.

74f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira.

Coorientador: Alexandre Rodrigues Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2016.

1. conservação. 2. animais silvestres. 3. tecido somático. 4. fonte proteica. 5. fator mitótico. I. Pereira, Alexsandra Fernandes, orient. II. Silva, Alexandre Rodrigues, 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.

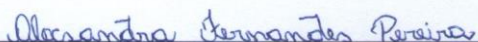
MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO
AURICULAR DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) EM MEIO COM
DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES

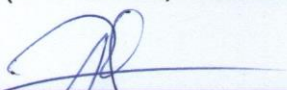
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-
Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título
de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

APROVADA EM: 30/03/2016

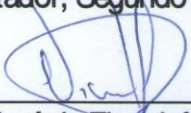
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Alexandra Fernandes Pereira – UFERSA
(Orientadora, Presidente)



Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva – UFERSA
(Coorientador, Segundo Membro)



Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas – UECE
(Examinador, Terceiro Membro)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS – Nascida no município de Jardim, CE, no dia 18.10.1991, filha de Francisco Sales Augusto dos Santos e Francisca Neiriland Turbano dos Santos. Graduiu-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2013.2. Durante a graduação foi Monitora da disciplina de Biologia Celular (Período: 2012.1 – 2013.2) ofertada para o curso de Biotecnologia e Bolsista de Iniciação Científica [(Programa de Iniciação Científica Institucional, PICI, Período: Agosto/2011 – Maio/2013) e Programa Voluntário de Iniciação Científica, PIVIC, Período: Junho/2013 – Março/2014)] no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABCEMOL/UFERSA). Em Dezembro de 2013 foi aprovada no processo seletivo para mestrado acadêmico pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), exercendo as atividades acadêmicas no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA) a partir de março de 2014 e possuindo bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Abril/2014 – Março/2016).

*A Deus, meu Guia, minha fonte de
coragem e fé, e aos meus pais,
Francisco Sales Augusto dos
Santos e Francisca Neiriland
Turbano dos Santos, meus
exemplos de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) através do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) por ter proporcionado esses anos de estudo e aprendizagem profissional.

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.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Prof. Dra. Alessandra Fernandes Pereira) pelos ensinamentos disponibilizados durante os dois anos de mestrado.

Ao Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva), ao Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões (LTG-PIV/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra), ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BIOMOL/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Wolgelsanger Oliveira Pereira), ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABCEMOL/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva), ao Laboratório de Engenharia Genética, Genômica e Proteômica (LEGPRO/UFERSA, responsável: Prof. M.Sc. Taffarel Melo Torres) e ao Laboratório de Imunologia e Parasitologia Animal (LIPAM/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra) pela disponibilidade do espaço e equipamentos para realização de etapas deste trabalho.

Ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) e ao Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira pela autorização e uso dos animais para o experimento.

A DEUS, que permitiu que tudo isso acontecesse; dando-me graças e ensinando-me sempre que Ele é o DEUS do impossível.

À minha orientadora Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira, pelo exemplo de pessoa e profissional, sempre sem medir esforços, estava preocupada com o nosso aprendizado, impulsionando cada vez mais o nosso crescimento.

Aos meus pais, Francisco Sales Augusto dos Santos e Francisca Neiriland Turbano dos Santos, que se dedicaram e me apoiaram sem medir esforços, sempre incentivando e dando força para que eu nunca desistisse, apesar da distância.

À minha irmã, Larisse Turbano dos Santos Barros e ao meu cunhado/irmão Theogenes Barros Galvão, que mesmo longe não deixaram de ser presentes. Obrigada por todos os momentos acolhedores.

A toda minha família, maior presente em minha vida. Eu tenho a honra de ter nascido entre vocês. Em especial, aos meus avós Maria Ducarmo Turbano Izidro e José Izidro Neto; aos meus tios/compadres Paula Neirianne Turbano Izidro Gomes e José Eladio Gomes Vital, a meu afilhado lindo Pedro Rian Turbano Izidro Gomes, e à minha prima e amiga Daniele Leite Santos.

Aos amigos Débora Alves de Carvalho Freire, Mário Luan Silva de Medeiros, Emerson Augusto de Medeiros, José Carlos da Silveira Pereira, Maria Carla da Silva Campelo, Emanuela de Oliveira Alves, Mirna Samara Dié Alves e Joelma Martins Pereira de Lima, pelos conselhos e companheirismo nos momentos difíceis. Obrigada.

A toda a equipe do LBA/UFERSA, em especial aos queridos Alana Azevedo Borges, Luiza Bento de Queiroz Neta, Maria Valéria de Oliveira Santos, Cibelle Anne dos Santos Costa e Pedro Henrique Fernandes França, por todo o período de convivência e companheirismo.

A banca examinadora, Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pela disponibilidade e aceite ao convite de participação.

CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO AURICULAR DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) EM MEIO COM DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES

SANTOS, Magda Lorena Turbano dos. CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO AURICULAR DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) EM MEIO COM DIFERENTES SUPLEMENTAÇÕES. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2016.

RESUMO: A manutenção das atividades metabólicas durante o cultivo *in vitro* de células somáticas de animais silvestres, especialmente catetos (*Pecari tajacu*), representa uma etapa interessante na conservação dessas células para aplicação na transferência nuclear (clonagem). Nesse contexto, faz-se necessário a otimização das condições de cultivo *in vitro* de células somáticas pelo estabelecimento de algumas suplementações adequadas aos meios, visando garantir a máxima preservação das características celulares viáveis. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a composição do meio de cultivo de células somáticas derivadas de tecido auricular de catetos, avaliando duas concentrações de soro fetal bovino (E1: SFB; 10% vs. 20%) e fator de crescimento epidermal (E2: EGF; 5 ng/mL vs. 10 ng/mL). Para tanto, fragmentos teciduais de 18 animais adultos foram submetidos ao cultivo primário e subcultivos por 40 dias, até a quarta passagem e as células resultantes foram analisadas quanto à morfologia, aderência, subconfluência, atividade proliferativa pela elaboração de curva de crescimento por sete dias e determinação do tempo de duplicação da população (PDT), viabilidade por azul de tripano e atividade funcional/metabólica pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Além disso, no E1, comparações quanto à adesão celular foram realizadas com células cultivadas na presença de albumina sérica bovina (BSA, 0,5% e 1,0%). Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido por teste *post-hoc*. No E1, nenhuma diferença ($P>0,05$) foi observada entre as concentrações de SFB para o número de fragmentos aderidos [SFB10: 39/39 vs. SB20: 35/39] e subconfluentes [SFB10: 39/39 vs. SB20: 35/39], dia de todas as amostras aderidas [SFB10: 3,5 vs. SFB20: 3,0], com crescimento [SFB10: 7,4 vs. SFB20: 7,2] e subconfluentes [SFB10: 11,8 vs. SFB20: 11,8]. Contudo, valores significativos foram observados em células cultivadas na presença de SFB a 20% quanto à viabilidade [SFB10: 85,6% vs. SFB20: 98,2%], PDT [SFB10: 155,4 h vs. 77,2 h] e ensaio de MTT [SFB10: 0,57-0,57 vs. SFB20: 0,82-0,99 (D5-D7)]. Adicionalmente, comparações da suplementação do BSA e SFB confirmaram o potencial de adesão celular do soro. Assim, SFB a 20% foi empregado no experimento seguinte. Já na avaliação da presença de EGF no cultivo, nenhuma diferença foi observada nos parâmetros avaliados para o número de fragmentos aderidos [EGF0: 31/31 vs. EGF5: 31/31 vs. EGF10: 31/31] e subconfluentes [EGF0: 31/31 vs. EGF5: 31/31 vs. EGF10: 31/31], dia de todas as amostras aderidas [EGF0: 4,9 vs. EGF5: 7,0 vs. EGF10: 3,5], em crescimento [EGF0: 7,2 vs. EGF5: 8,2 vs. EGF10: 7,9] e subconfluentes [EGF0: 12,6 vs. EGF5: 16,6 vs. EGF10: 12,6], viabilidade [EGF0: 84,3% vs. EGF5: 88,8% vs. EGF10: 87,0%], PDT [EGF0: 69,6 h vs. EGF5: 64,8 h vs. EGF10: 65,3 h] e ensaio de MTT [EGF0: 1,26-1,38 vs. EGF5: 1,06-1,14 vs. EGF10: 1,13-1,16 (D5-D7)]. Em todos os experimentos, as curvas de crescimento apresentaram nítidas fases log e lag de desenvolvimento. Em conclusão, o SFB a 20% é adequado para a recuperação de células somáticas *in vitro*; contudo, o EGF não melhora a qualidade do cultivo dessas células.

Palavras-chave: conservação, animais silvestres, tecido somático, fonte proteica, fator mitótico.

**IN VITRO CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF
COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) IN MEDIUM WITH
DIFFERENT SUPPLEMENTS**

SANTOS, Magda Lorena Turbano dos. *IN VITRO CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT SUPPLEMENTS*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2016.

ABSTRACT: The maintenance of metabolic activities during the *in vitro* culture of somatic cells of wild animals, especially collared peccary (*Pecari tajacu*), is an interesting step in the conservation of these cells for use in nuclear transfer (cloning). In this context, it is necessary to optimize the *in vitro* culture conditions of somatic cell by establishment of some appropriate supplementations to the media, in order to ensure the maximum preservation of the viable cell characteristics. Therefore, this study aimed to optimize the composition of the culture means of somatic cell derived from ear tissue of collared peccaries, evaluating two concentrations of fetal bovine serum (E1: FBS; 10% vs. 20%) and epidermal growth factor (E2: EGF, 5 ng/mL vs. 10 ng/mL). Thus, tissue fragments from 18 adult animals were submitted to primary culture and subcultures for 40 days until the fourth passage and the resulting cells were analyzed for morphology, adhesion, subconfluence, proliferative activity for developing growth curve for seven days and determining the population doubling time (PDT), viability by trypan blue and functional/metabolic activity by assay 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Moreover, in the E1, comparisons as cell adhesion were performed with cells cultured in the presence of bovine serum albumin (BSA, 0.5% and 1.0%). All data were analyzed by ANOVA followed by *post hoc* test. In the E1, no difference ($P>0.05$) was observed between the concentrations of FBS for the number of adhered [SFB10: 39/39 vs. SB20: 35/39] and subconfluent fragments [SFB10: 39/39 vs. SB20: 35/39], day all adhered [SFB10: 3.5 vs. SFB20: 3.0], with growth [SFB10: 7.4 vs. SFB20: 7.2] and subconfluent samples [SFB10: 11.8 vs. SFB20: 11.8]. However, significant values were observed in cells cultured in the presence of 20% FBS for viability [SFB10: 85.6% vs. SFB20: 98.2%], PDT [SFB10: 155.4 h vs. 77.25 h] and MTT assay [SFB10: 0.57-0.57 vs. SFB20: 0.82-0.99 (D5-D7)]. Additionally, comparisons of supplementation of BSA and FBS confirm the potential FBS cell adhesion. Thus, 20% FBS was used in the following experiment. In the evaluation of the presence of EGF in culture, no difference was observed in the evaluated parameters for the number of attached [EGF0: 31/31 vs. EGF5: 31/31 vs. EGF10: 31/31] and subconfluent fragments [EGF0: 31/31 vs. EGF5: 31/31 vs. EGF10: 31/31] day all adhered [EGF0: 4.9 vs. EGF5: 7.0 vs. EGF10: 3.5] growth [EGF0: 7.2 vs. EGF5: 8.2 vs. EGF10: 7.9] and subconfluent samples [0 EGF: 12.6 vs. EGF5: 16.6 vs. EGF10: 12.6], viability [EGF0: 84.3% vs. EGF5: 88.8% vs. EGF10: 87.0%], PDT [EGF0: 69.6 h vs. EGF5: 64.8 h vs. EGF10: 65.3 h] and MTT assay [EGF0: 1.26-1.38 vs. EGF5: 1.06-1.14 vs. EGF10: 1.13-1.16 (D5-D7)]. In all experiments, the growth curves showed clear log and lag phases of development. In conclusion, 20% FBS is suitable for the recovery of somatic cells *in vitro*; however, EGF does not improve the quality of growing these cells.

Keywords: conservation, wild animals, somatic tissue, protein source, mitotic factor.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
arc sen	Arco seno
BIOMOL	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
BSA	Albumin bovine serum (Albumina sérica bovina)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cells/mL	Células por mililitro
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética Animal
CLM	Cadeia leve de miosina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
D5	Dia 5
D7	Dia 7
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (meio essencial mínimo modificado por Dulbecco)
E1	Experimento 1
E2	Experimento 2
EGF	Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)
EGF0	Sem adição de EGF
EGF10	Adição de 10 ng/mL de EGF
EGF5	Adição de 5 ng/mL de EGF
EGFh	Epidermal growth fator human (Fator de crescimento epidermal humano)
FAD ²⁺	Flavina adenina dinucleotídeo
FBS	Fetal bovine serum
FBS10	10% of fetal bovine serum
FBS20	20% of fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor (Fator de crescimento fibroblástico)

FMN	Flavina mononucleótido
g/L	Gramas por litro
G0	Fase G-zero
G1	Fase G-um
h	Hora
H ⁺	Cátion hidrogênio
Hela	Células Hela
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IGF	Insulin-like growth factor (Fator de crescimento semelhante à insulina)
IUCN	International Union for Conservation of Nature (União Internacional de Conservação da Natureza)
KCl	Cloreto de potássio
LABCEMOL	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LEGPRO	Laboratório de Engenharia Genética, Genômica e Proteômica
LIPAM	Laboratório de Imunologia e Parasitologia Animal
Ln	Logaritmo neperiano
LTG-PIV	Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
m	Metro
MEM	Minimum Essential Medium (Meio essencial mínimo)
mg/mL	Miligramas por mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP ⁺	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
ng/mL	Nanogramas por mililitro
NGF	Nerve growth factor (Fator de crescimento do tecido nervoso)
Nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
PBS	Phosphate buffered saline (Solução tampão fosfato)

PDGF	Platelet growth factor (Fator de crescimento derivados de plaquetas)
PDT	Population doubling time (Tempo de duplicação da população)
pH	Potencial hidrogeniônico
rEGF	Recptor of EGF (Receptor de EGF)
SEM	Standard error of the mean (Erro padrão da média)
SFB	Soro fetal bovino
T	Tempo de incubação
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
U/mL	Unidade por mililitro
UERN	Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)
Xb	Número de células no início do período de incubação
Xe	Número de células no final do período de incubação

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DERIVADAS DE PELE EM MAMÍFEROS SILVESTRES – ESTADO DA ARTE

Tabela 1: Cultivo <i>in vitro</i> de células somáticas da pele em alguns mamíferos silvestres.....	40
---	----

CAPITULO II: *IN VITRO* CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT REQUIREMENTS

Table 1: Effect of fetal bovine serum (FBS) concentration on the ability of ear skin samples from collared peccaries <i>in vitro</i> cultured by 40 days.....	55
--	----

Table 2: Effect of fetal bovine serum (FBS) concentration on the adhesion of ear skin cells from collared peccaries <i>in vitro</i> cultured.....	55
--	----

Table 3: Effect of epidermal growth factor (EGF) concentration on the ability of ear skin samples from collared peccaries <i>in vitro</i> cultured by 40 days.....	59
---	----

Table 4: Viability by Trypan blue assay after each passage and before and after cryopreservation in skin cells from derived somatic tissue of collared peccary and culture in the EGF presence.....	61
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Catetos adultos mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS, UFERSA).....	19
---	----

CAPITULO II: *IN VITRO* CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT REQUIREMENTS

Figure 1: The growth curve of skin cells derived from somatic tissue of collared peccary and cultured in medium supplemented with FBS a and EGF b . *: Differ for same time in different groups ($p < 0.05$).....	56
---	----

Figure 2: Assessment of viability by Trypan blue and metabolic functional by MTT assay. a Cell viability after the primary culture of treatments using FBS; b metabolic activity assessed by MTT assay after the third passage of treatments using FBS; c cell viability after the primary culture of treatments using EGF; d metabolic activity assessed by MTT assay after the third passage using EGF; ^{a,b} : differ ($p < 0.05$).....	57
--	----

Figure 3: <i>In vitro</i> culture of ear tissue collared peccaries demonstrating the morphology, adhesion, and proliferation of cells. Primary culture: a early detachment and cell growth without addition of EGF; b early detachment and cell growth with addition of 5 ng/mL of EGF; c early detachment and cell growth with addition of 10 ng/mL of EGF. Subculture: d culture secondary and subconfluence without addition of EGF; e culture secondary and subconfluence with addition of 5 ng/mL of EGF; and f culture secondary and subconfluence with addition of 10 ng/mL of EGF. Scale bar: a-f 500 μ m.....	58
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, ECONÔMICA E CIENTÍFICA DOS CATETOS.....	19
2.2. SORO FETAL BOVINO.....	20
2.3. FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL.....	21
2.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM CULTIVO.....	22
2.4.1. Avaliação das características morfológicas e qualidade do cultivo.....	22
2.4.2. Atividade proliferativa pela elaboração da curva padrão de crescimento celular e determinação do tempo de duplicação da população (PDT).....	23
2.4.3. Avaliação da viabilidade por azul de Tripan e criopreservação.....	24
2.4.4. Avaliação da viabilidade funcional metabólica pelo ensaio de MTT.....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	26
4. HIPÓTESES.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. OBJETIVO GERAL.....	28
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
6. REFÊRENCIAS.....	29
CAPÍTULO I: CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS DERIVADAS DE PELE EM MAMÍFEROS SILVESTRES – ESTADO DA ARTE.....	35
CAPITULO II: IN VITRO CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (<i>Pecari tajacu</i> LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT REQUIREMENTS.....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	71
ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos animais consiste numa estratégia interessante tanto para a preservação da biodiversidade, quanto para o desenvolvimento sustentável através do estabelecimento de criatórios (PIOVEZAN et al., 2012). Dentre as principais interferências que ocasionam a redução da biodiversidade, destacam-se a caça de subsistência e predatória, além da destruição de habitats naturais das espécies. Nesse contexto, incluem-se os catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758), animais silvestres de importância ecológica, comercial e científica e que apresentam uma redução da população em alguns biomas, como a Caatinga e Floresta Atlântica (DESBIEZ et al., 2012).

Esses animais participam da cadeia alimentar de mamíferos, apresentam carne de considerada apreciação e couro de interesse internacional (BODMER et al., 1990). Além disso, podem ser utilizados como modelo experimental para outros animais silvestres próximos filogeneticamente, como o *Tayassu pecari* Link, 1795, também conhecido com queixada, animal considerado indicador de condições florestais e da paisagem (KEUROGHLIAN et al., 2014) e vulnerável em relação ao seu estado de conservação (KEUROGHLIAN et al., 2013); e o *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930, considerada uma espécie ameaçada de extinção (ALTRICHTER et al., 2015), conhecido como Solitário na Bolívia, Taguá no Paraguai e Quimilero na Argentina (MAFFEI et al., 2008).

Por essas razões, o desenvolvimento de estratégias reprodutivas é necessário para a preservação e otimização da população. Em geral, essas estratégias envolvem a criopreservação de células, gametas e embriões (ANDRABI & MAWXELL 2007; LEÓN-QUINTO et al., 2009). Em catetos, estudos relacionados à criopreservação de sêmen (CASTELO et al., 2010; SOUZA et al., 2016), tecido ovariano (LIMA et al., 2012; 2014) e tecido somático (BORGES et al., 2015) já foram descritos. Contudo, para alcançar uma completa representatividade genética da biodiversidade da população, é necessário também a criação de bancos de células somáticas (CETINKAYA & ARAT, 2011; LI et al., 2009a; LIU et al., 2014).

Em geral, bancos de tecidos e células somáticas possuem várias aplicações. Inicialmente, seu emprego pode ser observado em investigação básica pelo auxílio no conhecimento da biologia reprodutiva (GUEDES et al., 1998; LUO et al., 2013). Em seguida, esses bancos auxiliam na preservação de mais indivíduos, proporcionando ampla variabilidade genética (LEÓN-QUINTO et al., 2011) e permite a sua aplicação na transferência nuclear de células somáticas (TNCS, clonagem), visando programas de

conservação animal (KIM et al., 2007). Em complemento, a TNCS pode auxiliar na multiplicação de animais silvestres de valor zootécnico de forma sustentável.

A TNCS envolve múltiplas etapas importantes que são decisivas para a eficiência total da técnica (PEREIRA & FREITAS, 2009). Em geral, a escolha e o preparo do tipo de célula doadora (carioplastos) e suas condições de cultivo *in vitro* possuem papéis-chave na obtenção de carioplastos reprogramáveis (PEREIRA et al., 2014). Atualmente, células oriundas da pele são empregadas como carioplastos favoritos na TNCS e o estabelecimento de condições adequadas de cultivo dessas células tem-se tornado uma estratégia interessante na otimização da técnica. Nesse sentido, a composição do meio e suas suplementações durante todas as etapas do cultivo torna-se etapa importante, requerendo atenção.

Para tanto, o meio de cultivo deve ser capaz de manter a viabilidade celular no ambiente *in vitro*, promovendo a proliferação adequada dessas células (LEÓN-QUINTO et al., 2011). O sucesso de um cultivo primário a partir de fragmentos de pele pode ser determinado principalmente pela capacidade de reproduzir *in vitro* as condições encontradas no tecido original, sendo que cada tipo celular apresenta necessidades biológicas definidas, sendo da mesma espécie ou espécie diferente (SILVETRE et al., 2003; LEÓN-QUINTO et al., 2011; SHI et al., 2015).

Em diferentes linhagens de células somáticas, a suplementação do meio com 10% de soro fetal bovino (SFB) tem sido empregada (CETINKAYA & ARAT, 2011; PEREIRA et al., 2013); contudo, a adição de concentrações maiores poderia potencializar a proliferação do cultivo (LEÓN-QUINTO, et al., 2011), principalmente em situações onde a colheita dos fragmentos é dificultosa ou não há grande quantidade de material biológico (TOVAR et al., 2008). Além do SFB, a adição de fatores mitóticos, como o fator de crescimento epidermal (EGF) ao meio poderia ser uma estratégia para manter um crescimento adequado de células específicas dos explantes (GSTRAUNTHALER, 2003).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA, ECONÔMICA E CIENTÍFICA DOS CATETOS

O *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, também conhecido como cateto, caititu ou porco-domato, pertence à família Tayassuidae e da Ordem Cetartiodactyla (GONGORA et al., 2011). Em geral, é uma espécie silvestre encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo o seu habitat bastante diversificado (SOWLS, 1997). Sua ampla distribuição o classifica como um dos mamíferos terrestres mais bem distribuídos do continente americano, sendo sua dieta diferente de acordo com o bioma onde habita, alimentando-se principalmente de raízes, tubérculos, partes verdes de plantas e nozes (BODMER & SOWLS, 1996).

A carne de *P. tajacu* é considerada bastante saborosa e apresenta um teor de gordura inferior à carne do suíno doméstico. Além disso, o couro desses animais é usado para a confecção de bolsas, sapatos, luvas, calçados, casacos, carteiras e cintos (NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA, 2004). Contudo, em virtude do aumento da exploração dos habitats naturais dessa espécie, como também os seus respectivos produtos comercializados, há um aumento significativo de *P. tajacu* em cativeiros (**Figura 1**).



Figura 1: Catetos adultos mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS, UFERSA).

O aumento da caça de subsistência e predatória e a destruição dos seus habitats naturais têm ocasionado uma diminuição no nível populacional desta espécie e um desequilíbrio sobre os biomas Caatinga e Mata Atlântica (DESBIEZ et al., 2012). Portanto, estratégias de conservação têm sido desenvolvidas, como a conservação de tecidos e gametas (BORGES et al., 2015; CASTELO et al., 2010; LIMA et al., 2014).

Além de sua importância visando à conservação da biodiversidade pela formação de bancos de germoplasma, os catetos também podem ser utilizados como modelos experimentais para outros animais silvestres próximos filogeneticamente. A família Tayassuidae possui dois gêneros e três espécies (GROVES, 1993). Todos os membros são exclusivos das Américas, *Tayassu pecari* Link, 1795 (KEUROGHLIAN et al., 2013; 2014), *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930 (ALTRICHTER et al., 2015) e *P. tajacu* Linnaeus, 1758 (GONGORA et al., 2011).

2.2. SORO FETAL BOVINO

O SFB é um dos principais suplementos do meio de cultivo, fornece fatores hormonais que estimulam o crescimento das células e suas funções, como a produção de fatores de adesão, expansão e transporte de proteínas carreadoras. Na composição do soro comumente são encontrados: proteínas do soro fetal, de transporte, de adesão, de espalhamento e enzimas; hormônios (da tireoide e paratireoide, insulina, glucagon, corticoides e vasopressina, por exemplo), fatores de crescimento, citocinas, ácidos graxos, lipídios, vitaminas, carboidratos e nitrogênio de origem não proteica (BRUNNER et al., 2010). Contudo, a concentração de cada componente não é definida, uma vez que a mesma varia dependendo do lote em que o soro foi produzido. Em geral, no SFB existe cerca de 32 – 100 mg/mL de proteínas, das quais a albumina sérica bovina (BSA) consta de 20–36 mg/mL, sendo a mais abundante dentre as proteínas do plasma sanguíneo (GSTRAUNTHALER, 2003; USTA et al., 2014).

Apesar de o SFB ser amplamente utilizado, vários meios quimicamente definidos para o cultivo de células de mamíferos tem sido estudados e desenvolvidos (BRUNNER et al., 2010). Contudo, o acesso a essas informações ainda é bastante restrito e a definição desse meio para uma determinada espécie ainda é um processo que demanda tempo. Nesse sentido, no processo de estabelecimento de meios de cultivo para células da pele a utilização de meios isentos de soro não se torna uma alternativa viável e a definição da concentração de SFB deve ser estabelecida.

Para a criação de biobancos e em casos que se deseja acelerar a proliferação celular ou existe dificuldade na captura do animal e, conseqüentemente, na obtenção do tecido, tem sido testada a concentração de SFB de 10, 15 e 20%, como observado em *Lynx Pardinus* (LEON-QUINTO et al., 2011) e 30% em *Rhyncholestes raphanurus*, *Oncifelis guigna*, *Chinchilla lanigera*, *Pudu puda*, *Thylamys elegans* (espécies nativas do Chile) (TOVAR et al., 2008). Concentrações superiores a 20% podem conter variações nas concentrações dos seus componentes, além de conter diferentes quantidades de endotoxinas, hemoglobina, e outros fatores adversos (GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER et al., 2010).

2.3.FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

Os principais fatores mitóticos encontrados no soro, utilizados para iniciar o crescimento e proliferação celular no cultivo *in vitro* de células somáticas são: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do tecido nervoso (NGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Contudo, para o cultivo de células derivadas da pele são utilizados EGF e FGF (CARPENTER & COHEN, 1979; GOSPODAROWICZ et al. , 1987; HEBDA, 1988). Apesar de o soro fornecer todos esses fatores ao meio, o mesmo pode não ser capaz de suportar o crescimento de tipos de células específicas em cultivo de células primárias (GSTRAUNTHALER, 2003).

Neste sentido, com o intuito de uma maior diversidade de células epiteliais e melhorar o desempenho do cultivo *in vitro* de células derivadas da pele já suplementadas com SFB, a adição de EGF se torna o mais adequado em relação à adição de FGF. León-Quinto (2011) observaram que no cultivo de explantes da pele de *L. pardinus* as condições ótimas incluíam a suplementação de 4,5 g/L de glucose, 15% de SFB e 10 ng/mL de EGF ao meio. Adicionalmente, o uso do EGF a 10 ng/mL foi realizado para estabelecer a curva de crescimento de fibroblastos oriundo do tecido auricular de *Panthera tigris* (SONG et al., 2007).

Em fibroblastos, o EGF induz a fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM), promovendo a motilidade e contratilidade celular (ALLEN et al., 2002; IWABU et al., 2004). Contudo, a ocupação de cerca de 25% dos receptores de EGF (rEGF) na superfície da célula desencadeia a máxima estimulação da síntese de DNA pelo EGF (SCHLESSINGER et al.,

1983), indicando que concentrações menores (5 ng/mL) que as já aplicada possam ser testadas.

O EGF caracteriza-se como um polipeptídeo, o qual inicialmente foi isolado de glândulas submaxilares de ratos adultos constituindo uma cadeia de 53 aminoácidos. O EGF estimula a proliferação de vários tecidos, como do epitélio da córnea e epiderme, além de tecidos do fígado, rim e pulmão. Na epiderme, o EGF induz o crescimento celular, proporcionando um aumento da sua espessura e uma diminuição da camada de gordura. Esse fator também estimula o crescimento do tecido epitelial da glândula mamária (SCHLESSINGER et al., 1983). Além das respostas mitogênicas, o EGF induz tanto respostas precoces quanto tardias. As respostas precoces abrangem a estimulação de íons, transporte de nutrientes, auxílio na fosforilação de proteínas da membrana endógena (CARPENTER & COHEN, 1979), indução de alterações específicas na organização do citoesqueleto (SCHLESSINGER & GEIGER, 1981) e alterações na morfologia da célula (CHINKERS et al., 1979). Já as respostas tardias estão associadas à ativação da enzima ornitina descarboxilase (STASBURY & COHEN, 1972) e aumento da biossíntese de fibronectina (CHEN et al., 1977) e queratina (RHEINWALD & GREEN, 1977).

2.4.MÉTODOS DE ANÁLISE DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM CULTIVO

A proliferação de células em técnicas de cultivo *in vitro* difere consideravelmente das condições *in vivo*, existindo diversas barreiras na manutenção de células em condições artificialmente controladas (ALVES & GUIMARÃES, 2010). Assim, existem análises voltadas para o cultivo primário, o qual é considerado após o isolamento direto das células a partir do tecido de origem (PERES & CURI, 2005).

2.4.1. Avaliação das características morfológicas e qualidade do cultivo

A morfologia é um dos parâmetros qualitativos mais importantes e inicialmente avaliado para o estabelecimento de um cultivo de células, uma vez que parâmetros normais de morfologia, geralmente estão associados à expressão normal de produtos de diferenciação celular. Esta avaliação pode ocorrer com a utilização de um microscópio de luz ou eletrônico. Várias alterações decorrentes da apoptose podem ser observadas a um nível básico utilizando um microscópio de luz (FRESHNEY, 2005). A fragmentação e condensação nuclear e citoplasmática, além da formação de corpos apoptóticos e ocorrência de vesículas na

membrana, apesar de não serem parâmetros quantificáveis podem ser observados microscopicamente (BUTLER, 2004).

Assim, podem ser quantificados parâmetros relacionados a qualidade do cultivo primário, os quais são utilizados por serem os primeiros requisitos para permitir o desprendimento celular em torno dos explantes (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Esses parâmetros são: a eficiência do plaqueamento dos explantes, pela fixação/aderência; e a eficiência do desprendimento e crescimento celular ao redor do explantes, podendo em ambas as avaliações observar o número de explantes com esse comportamento nos dias de cultivo até a realização do subcultivo. Nesse processo, a determinação da concentração celular e do número de dias necessários para atingir a confluência de 70-90%, também pode ser considerada parâmetros qualitativos de avaliação do cultivo primário. Em se tratando de células oriundas de tecido epitelial, tem se observado o crescimento dessas células numa faixa de 5 a 14 dias após a fixação do explante (BAI et al., 2012; HU et al., 2013; LIU et al., 2014).

Em ensaios de adesão, motilidade celular e regulação de fatores crescimento, BSA a 1% é utilizado para bloquear a interação desses fatores, principalmente quando se quer avaliar o efeito sobre os mecanismos que desencadeiam a migração da célula (XIE et al., 1998; SATISH et al., 2005). Além disso, em ensaios de imunofluorescência, BSA a 2,0% também é utilizada como tampão de bloqueio. Assim, torna-se possível a suplementação de meios básicos com BSA, testados como controle negativo de adesão celular em relação a meios suplementados com SFB. Essa análise proporciona avaliar o potencial e o comportamento de adesão celular dos explantes em meios contendo SFB.

2.4.2. Atividade proliferativa pela elaboração da curva padrão de crescimento celular e determinação do tempo de duplicação da população (PDT)

A determinação do tempo de duplicação da população (PDT) é a principal metodologia utilizada para avaliar o perfil de crescimento (MEHRABANI et al., 2014; SINGH & MA, 2014). Em síntese, determinadas concentrações de células são cultivadas e contadas em intervalos de tempo. As médias das contagens celulares a cada tempo são registradas para determinar o perfil de crescimento celular (COSTA et al., 2005). Ainda do ensaio de PDT, a curva de crescimento pode ser gerada a partir da média $\pm$ erro padrão do número de células contadas a cada dia de cultivo. Este processo pode ser realizado de 4 a 11 dias dependendo das condições que as células se encontram (SINGH & MA, 2014).

Ao observar a curva de crescimento, a concentração celular adicionada no teste permanece constante ou diminui, sendo classificada como fase lag. Essa limitação se dá pela síntese de fatores de crescimento necessários antes da proliferação. Já na fase *log*, ocorre o aumento exponencial do número de células até atingir a população máxima de células, passando então para a fase estacionária. Em seguida, as células passam para a fase de morte ou declínio, decorrente do esgotamento de meio e/ou inibição pelo contato. A duração nas fases está diretamente relacionada à formulação do meio utilizado, concentração inicial e estado das células (PERES & CURI, 2005).

Para fibroblastos oriundos do tecido auricular de Tigre Siberiano (*P. tigris*) foram estabelecidos condições ótimas para determinação da curva de crescimento dessas células, tendo a sua população duplicado após 5,6 dias de cultivo, obtendo 17,16 h de PDT (SONG, et al., 2007). Em *L. pardinus* (Lince ibérico) León-Quinto et al. (2011), constataram 5,21 como melhor valor de duplicação da população de células derivadas do tecido auricular. Posteriormente, foi observado melhores valores da média de duplicação da população em células da pele fetais (5,86) em relação a células adultas (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Ainda, Guan et al. (2010), ao cultivar células também do tecido auricular de *Panthera tigris tigris*, observou PDT de 28 h.

2.4.3. Avaliação da viabilidade por azul de Tripano e criopreservação

Em um ensaio de viabilidade celular é observado o número de células viáveis dentro de uma população. A partir disso, a detecção da viabilidade celular está relacionada às análises da integridade e funcionalidade da membrana celular e sua atividade metabólica. A perda de viabilidade inclui a quebra ou colapso da membrana celular, nesse processo macromoléculas penetram mais facilmente e proteínas intracelulares são secretadas para o meio de cultura (COBB, 2013).

Para se avaliar a integridade da membrana, o corante azul de tripano é um dos métodos mais antigos e simples para determinar a viabilidade. Nessa metodologia, caso a membrana da célula esteja intacta, ao entrar em contato com o corante, o mesmo é impedido de atravessar a membrana, mantendo a célula incolor. Caso contrário, em células inviáveis ou nesse processo, as mesmas se apresentarão azuladas (COBB, 2013). A análise do teste é realizada utilizando câmara de Neubauer, observada sob microscópio de luz (LIU et al., 2008; 2014; LI et al., 2009b). Por ser uma técnica mais simples, a mesma é bastante utilizada para o

estabelecimento de fibroblastos de raças bovinas (LI et al., 2009a) ovinas (LI et al., 2009b), caprinas (INOSHIMA & ISHIGURO, 2009) e animais silvestres e/ou em vias de extinção (GUAN et al., 2010).

Além disso, a viabilidade celular esta diretamente relacionada a uma melhor resposta após o processo de criopreservação, sendo esse já bem estabelecido ou com respostas aceitáveis. Assim, as condições de cultivo devem proporcionar máximos valores possíveis antes da criopreservação. A técnica de criopreservação lenta é uma das metodologias aplicadas quando se trata de células somáticas (LIU et al., 2012). Valores de viabilidade antes e após a criopreservação de células do tecido auricular de *P. tigris tigris*, foram observados por Guan et al. (2010), obtendo viabilidade de 97,6% e 95,7%, respectivamente. Nesse sentido, a criopreservação poderia ser utilizada também como método de análise quanto à viabilidade celular posterior ao aquecimento.

2.4.4. Avaliação da viabilidade funcional metabólica pelo ensaio de MTT

Durante a proliferação celular, ocorre o aumento da liberação de transportadores de prótons H^+ , $NADP^+$, FAD^{2+} , FMN, e NAD^+ . Na presença de intermediários metabólicos, desidrogenases ou redutases, sais de tetrazólio reduzem a formazan, o qual pode ser detectado por mudanças colorimétricas (COBB, 2013). Esse princípio é utilizado pelo ensaio da medida de desidrogenase mitocondrial (MTT; brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Nesse ensaio, a funcionalidade das células viáveis pode ser mensurada, visto que a desidrogenase mitocondrial das células é ativada metabolicamente e cliva o anel tetrazólio, originando cristais de formazan púrpura, os quais são insolúveis em soluções aquosas (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Essa quantificação pode determinar a sobrevivência e proliferação celular, uma vez que o sinal colorimétrico gerado pelas células viáveis é dependente do grau de ativação das mesmas (MOSMANN, 1983).

O ensaio de MTT é aplicado ainda quando se quer avaliar a influência de determinados meios sobre o cultivo *in vitro* (LEÓN-QUINTO et al., 2011), e a influência de concentração de crioprotetores (SEO et al., 2011) e técnicas de criopreservação (CETINKAYA & ARAT, 2011; LEÓN-QUINTO et al., 2014). Além disso, é utilizado também na determinação de meios e sua suplementação (LEÓN-QUINTO et al., 2011; USTA et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o nível populacional de *P. tajacu* Linnaeus, 1758, em biomas como Caatinga e Mata Atlântica vem sendo reduzido e, portanto, estratégias de conservação da espécie necessitam ser propostos. Esses animais possuem carne e couro apreciáveis e se adaptam facilmente a cativeiros. Além do seu valor econômico, os mesmos apresentam grande potencial como modelo experimental de espécies próximas filogeneticamente que estejam vulneráveis ou em risco de extinção, como o *T. pecari* Link, 1795 e o *C. wagneri* Rusconi, 1930, respectivamente.

Nesse sentido, estratégias reprodutivas são necessárias para a conservação da população, como o desenvolvimento de banco de gametas, de tecidos e células somáticas. Essa última estratégia, abrange desde a preservação do material genético da espécie, incluindo indivíduos que morreram antes da sua fase reprodutiva, o uso em transferência nuclear de células somáticas, o estudo da espécie e pesquisa básica através do desempenho do cultivo *in vitro* de células. Contudo, para a formação de um banco de células somáticas, o acesso às biópsias de pele e a manutenção das condições do cultivo são critérios de relevância.

Em relação a animais silvestres, em que o número de explantes pode ser reduzido, devido ao número de indivíduos de cada espécie e a dificuldade de acesso aos mesmos, é necessário atenção para formulações de meios de cultivo utilizados. Nesse aspecto, os parâmetros relacionados ao rápido crescimento celular devem ser destacados, como a fonte proteica e a adição de fatores de crescimento. Em diferentes linhagens de células somáticas, a suplementação do meio com soro bovino fetal a 10% tem sido a mais amplamente utilizada. Contudo, a fim de melhorar o crescimento de células somáticas, concentrações mais elevadas podem ser testadas e definidas. Além disso, para determinar uma possível melhora adicional na proliferação das células em cultivo, o fator de crescimento epidermal, também pode ser utilizado, após o estabelecimento da sua concentração ideal.

Finalmente, a análise de alguns requerimentos para o cultivo *in vitro* de células somáticas oriundas de tecido auricular de catetos permitirá estabelecer protocolos adequados para a recuperação de células somáticas, auxiliando assim na conservação do material genético desse animal.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- I- A suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino na concentração de 20% é adequada para a adesão, proliferação, e viabilidade funcional/metabólica de células somáticas de catetos;
- II- A suplementação do meio com fator de crescimento epidermal aumenta as taxas de adesão, proliferação e viabilidade funcional/metabólica de células somáticas de catetos.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a composição do meio de cultivo de células somáticas derivadas de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) avaliando diferentes suplementações.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a adição de 10% vs. 20% de soro fetal bovino sobre a aderência, confluência, viabilidade, proliferação e atividade funcional/metabólica de células oriundas do tecido auricular de catetos;
- Verificar o efeito do fator de crescimento epidermal nas concentrações de 5 ng/mL vs. 10 ng/mL sobre a aderência, confluência, viabilidade, proliferação e atividade funcional/metabólica de células oriundas do tecido auricular de catetos.

6. REFERÊNCIAS

- ALLEN, F. D.; ASNES, C. F.; CHANG, P.; ELSON, E. L.; LAUFFENBURGER, D. A.; WELLS, A. Epidermal growth factor induces acute matrix contraction and subsequent calpain-modulated relaxation. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, p.67–76, 2002.
- ALTRICHTER, M.; TABER, A.; NOSS, A.; MAFFEI, L.; CAMPOS, J. 2015. *Catagonus wagneri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993.en>>. Acesso em: 10 out. 2015.
- ALVES, E. A; GUIMARÃES, A. C. R. G. **Conceitos e Métodos Para Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde**. Vol. 2, Rio de Janeiro: Fundação Osvaldo Cruz, 2010. 253p.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p.223–243, 2007.
- BAI, C.; WANG, D.; SU, X.; ZHANG, M.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and biological research of the Jining Grey goat fibroblast line. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.36, p.659–667, 2012.
- BODMER, R. E.; BENDAYAN, N. Y.; MOYA, L.; FANG, T. G. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. **Boletín de Lima**, v.70, p. 49–56. 1990.
- BODMER, R. E.; SOWLS, L. K. El pecary de collar. In: OLIVER, W. L. R. **Pecaries**. Quito, Ecuador: IUCN, p. 5–15. 1996.
- BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. B.; LIMA, G. L; SANTOS, M. V. O.; SANTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Atividade proliferativa de células provenientes de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu*) após distintas técnicas de vitrificação. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2015, Fortaleza. Anais eletrônicos do XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Disponível em: <<http://sis.gnious.com.br/admin/trabalhos.html?cl=zootec2015&title=Anais%20Zootec%202015&attach=1>>. Acesso em: 03 mar. 2016.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; DCHÖFF, H.; PFALLER, W. GSTRAUNTHALER, G. Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. **Altex**, v.27, p. 54–62, 2010.
- BUTLER, M. **Animal cell culture and technology**. 2.ed, v. 2, London and New York: BIOS Scientific Publishers Taylor & Francis Group, 2004. 288p.
- CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, p. 193–216, 1979.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v. 74, p.1060–1065, 2010.

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

CHEN, L. B.; GUDOR, R. C.; SUN, T. T.; CHEN, A. B.; MOSESSON, M. W. Control of a cell surface major glycoprotein by epidermal growth factor. **Science**, v. 197, p.776, 1977.

CHINKERS, M.; MC KANNA, T. J. A.; COHEN, S. Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. **Journal of Cellular Biology**, v.83, p. 260–265, 1979.

COBB, L. Cell based assays: the cell cycle, cell proliferation and cell death. **Materials and Methods**, v.3, p. 172, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.172>>. Acesso em: 07 de jan. 2015.

COSTA, U. M.; REISCHAK, D.; SILVA, J. Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen. **Journal of Virological Methods**, v.128, p. 72–78, 2005.

DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; BEISIEGEL, B. M.; MEDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; CAMPOS, C. B.; TÓFOLI, C. F.; MORAES JUNIOR, E. A.; AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. P.; SANTOS JUNIOR, T. S.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P. R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, p.74–83, 2012.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells, a manual of basic technique**, 5.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

GONGORA, J.; REYNA-HURTADO, R.; BECK, H.; TABER, A.; ALTRICHTER, M.; KEUROGHLIAN, A. 2011. *Pecari tajacu*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T41777A10562361.en>>. Acesso em: 08 out. 2015.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 8, p. 95–114, 1987.

GROVES, C. P. The suborder suiformes. Pigs, peccaries and hippos. Status survey and conservation action plan. IUCN, p. 1–4, 1993.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **Altex**, v. 20, p. 275–281, 2003.

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

GUEDES, A. C.; GOEDERT, C. O.; BUSTAMANTE, P. G. Estratégia nacional de diversidade biológica. Convenção sobre Diversidade Biológica – Artigo 9: Conservação *ex situ*. Ministério do Meio Ambiente. 1998.

HEBDA, P. A. Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 91, p. 440–445, 1988.

HU, P. F.; GUAN, W. J.; LI, X. C.; ZHANG, W. X.; LI, C. L.; MA, Y. H. Study on characteristics of in vitro culture and intracellular transduction of exogenous proteins in fibroblast cell line of Liaoning cashmere goat. **Molecular Biology Reports**, v.40, p. 327–336, 2013.

INOSHIMA, Y.; ISHIGURO, N. Establishment of vascular endothelial cell lines from the aortas of wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). **Cell Biology International**, v. 33, p. 617–620, 2009.

IWABU, A.; SMITH, K.; ALLEN, F. D.; LAUFFENBURGER, D. A.; WELLS, A. Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C δ -dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14551–14560, 2004.

KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A.; REYNA-HURTADO, R.; ALTRICHTER, M.; BECK, H.; TABER, A.; FRAGOSO, J. M. V. 2013. *Tayassu pecari*. In: (IUCN 2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T41778A44051115.en>>. Acesso em: 07 Nov. 2015.

KEUROGHLIAN, A.; ANDRADE SANTOS, M. D. C.; EATON, D. P. The effects of deforestation on white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) home range in the southern Pantanal. **Mammalia**. 2014.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F. J.; MORENOD, J. M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; 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.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v.68, p. 227–233, 2014.

- LI, L. F.; YUE, H.; MA, J.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Establishment and characterization of a fibroblast line from Simmental cattle. **Cryobiology**, v. 59, p. 63–68, 2009a.
- LI, X. C.; YUE, H.; LI, C. Y.; HE, X. H.; ZHAO, Q. J.; MA, Y. H.; MA, J. Z. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Jining Black Grey goat for genetic conservation. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1, p. 17–26, 2009b.
- 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 Reprod**, v.9, p.957, 2012.
- LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, L. F.; LUZ, V. B.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, A. R. Short-term preservation of *Pecari tajacu* ovarian preantral follicles using phosphate buffered saline (PBS) or powdered coconut water ACP(r) media. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1623–1630, 2014.
- LIU C.; GUO, Y.; LIU, D.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and characterization of fibroblast cell line derived from Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). **Biopreservation and Biobanking**, v. 8, p. 99–105, 2010.
- 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.
- LIU, J.; PHY, J.; YEOMANS, E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. **Theriogenology**, v.78, p. 1641–1652, 2012.
- LUO, C.; LU, F.; WANG, X.; WANG, Z.; LI, X.; GONG, F.; JIANG, J.; LIU, Q.; SHI, D.; Treatment of donor cells with trichostatin A improves in vitro development and reprogramming of buffalo (*Bubalus bubalis*) nucleus transfer embryos. **Theriogenology**. v. 80, p. 878–886, 2013.
- MEHRABANI, D.; MAHBOOBI, R.; DIANATPOUR, M.; ZARE, S.; TAMADON, A.; HOSSEINI, S. E. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p. 1–5, 2014.
- MAFFEI, L.; CULLAR, R. L.; BANEGAS, J. Distribución del Solitario (*Cataognus wagneri*) en Bolivia. **Ecología en Bolivia**. v. 43, p. 141–145, 2008.
- 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.
- NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C. Captive breeding programs as an alternative for wildlife conservation in Brazil. In: **People in Nature: Wildlife conservation in South and Central America**, eds. SILVIUS, K. M.; BODMER, R. E.; FRAGOSO, J. M. V. Columbia University Press, New York, p. 171–190, 2004.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118–128, 2009.

PEREIRA, A. F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K. C.; CARNEIRO, I. S.; AVELARA, S. R. G.; ALCÂNTARA NETO, A. S.; SOUSA, F. C.; MELO, C. H. S.; MOURA, R. R.; TEIXEIRA, D. I. A.; BERTOLINI, L. R.; FREITAS, V. J. F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, v. 109, p.163–172, 2013.

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 (UFERSA)**, v. 8, p. 311–316, 2014.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Ed. Guanabara Koogan AS, 2005. 304p.

PIOVEZAN, U.; CARNEIRO, P. C. F.; MAUÉS, M. S.; PAIVA, S. R.; ALENCAR, J. R. M.; ALBUQUERQUE, N. I.; MARQUES, J. R. F.; PEREIRA, F. M.; PINHEIRO, S. M.; RESENDE, E. K. Rede de recursos genéticos animais da Embrapa: espécies nativas com potencial econômico. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/936036/1/10.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature**, v. 265, p. 421–424, 1977.

SATISH, L.; BLAIR, H. C.; GLADING, A.; WELLS, A. Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of μ -calpain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 1922–1941, 2005.

SCHLESSINGER, J.; GEIGER, B. Epidermal Growth Factor induces redistribution of actin and α -actinin in human epidermal carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 134, p. 273–279, 1981.

SCHLESSINGER, J.; SCHREIBER, A. B.; LEVI, A.; LAX, T.; LEBERMANN, T.; YARDEN, Y.; Regulation of cell proliferation by epidermal growth. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 14, p. 93–111, 1983.

SEO, J. M.; SOHN, M. Y.; SUH, J. S.; ATALA, A.; YOO, J. J.; SHON, Y. H. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. **Cryobiology**, v. 62, p. 167–173, 2011.

SHI, J.; ZHOU, R.; LUO, L.; MAI, R.; ZENG, H.; CAI, G.; JI, H.; TANG, F.; WANG, Q.; WU, Z.; LI, Z. Influence of embryo handling and transfer method on pig cloning efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.154, p. 121–127, 2015.

SILVESTRE, M. A.; SAEED, A. M.; CERVERA, R. P.; ESCRIBA, M. J.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and

temperature of the whole ear extirpated immediately after death. **Theriogenology**, v. 59, p. 1469–1477, 2003.

SINGH, M.; MA, X. L. In vitro culture of fibroblast-like cells from sheep ear skin stored at 25-26° C for 10 days after animal death. **International Journal of Biology**, v. 6, p. 96–102, 2014.

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

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Use of *Aloe vera*-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1432–1438, 2016.

SOWLS, L. K. Javelinas and other Peccaries: Their Biology, Management and Use. Texas A. and M. University Press, College Station, USA. 1997.

STASBURY, M.; COHEN, S. The stimulation of ornithine decarboxylase activity in tests of the neonatal mouse. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 261, p. 177–180, 1972.

TOVAR, H.; NAVARRETE, F.; RODRÍGUEZ, L.; SKEWES, O.; CASTRO, F. O. Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 44, p. 309–320, 2008.

USTA, S. N.; SCHARER, C. D.; XU, J.; FREY, T. K.; NASH, R. J. Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, p. 1–9, 2014.

XIE, H.; PALLERO, M. A.; GUPTA, K.; CHANG, P.; WARE, M. F.; WITKE, W.; WELLS, A. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v.111, p.615–624, 1998.

**CAPÍTULO I: CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DERIVADAS DE PELE EM
MAMÍFEROS SILVESTRES – ESTADO DA ARTE**

CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DERIVADAS DE PELE EM MAMÍFEROS SILVESTRES – ESTADO DA ARTE

RESUMO: O cultivo de células somáticas derivadas da pele consiste numa técnica de relevante aplicabilidade, tanto para a investigação básica, quanto o uso em biotécnicas reprodutivas. Além disso, cultivos de células da pele derivadas de mamíferos silvestres tem sido uma etapa interessante na obtenção de criobancos, visando à preservação da biodiversidade genética. Assim, o objetivo desta revisão é apresentar os progressos técnicos alcançados no cultivo de células somáticas em mamíferos silvestres, destacando as principais variações encontradas nos meios e evidenciando os avanços em algumas espécies.

Palavras-chave: células somáticas, conservação, biobanco.

ABSTRACT: The culture of somatic cells derived from skin is a technique of important applicability, both for basic research and for the use in reproductive biotechnologies. Moreover, skin cell cultures derived from wild mammals has been an interesting step in obtaining of cryobanking, aimed at preserving genetic biodiversity. Thun, the aim of this review is to present the technical progress achieved in the somatic cell culture in wild mammals, highlighting the main variances found in the media and highlights the progress in some species.

Keywords: somatic cells, conservation, biobank.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de células somáticas em animais silvestres visa principalmente à formação de criobancos, resultando numa alternativa para a manutenção da biodiversidade. Inúmeras razões justificam o emprego de células somáticas para a conservação animal, como a facilidade de obtenção de amostras, a preservação de um maior número de indivíduos e a manutenção de uma maior variabilidade genética (MEN et al., 2012). Além disso, auxilia no processo de proliferação de uma população através da clonagem e fornece dados para a pesquisa genômica (GUAN et al., 2010).

Os primeiros estudos em animais, avaliando os fenômenos *in vivo* com técnicas *in vitro* foram àqueles desenvolvidos por Ross Harrison (1908) cultivando células embrionárias em anfíbios. Posteriormente, com o aprimoramento das condições assépticas de manipulação, formulação de meios nutritivos e desenvolvimento de técnicas precisas de análises, o cultivo celular tornou-se ferramenta importante para todas as espécies.

A partir de 1999, pesquisas utilizando células derivadas de espécies silvestres foram desenvolvidas. Nesse contexto, Liu et al. (1999) iniciaram pesquisas sobre o cultivo de células musculares esqueléticas de panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*). No mesmo ano, Chen et al. (1999) cultivaram, além dessas células, aquelas oriundas do epitélio uterino e da glândula mamária, objetivando otimizar a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) nessa espécie. Posteriormente, Han et al. (2003) analisaram o ciclo de fibroblastos de panda gigante, comparando métodos de sincronização celular para o estágio do ciclo em G0 e/ou G1 visando uso em TNCS. No mesmo ano, o cultivo com células da pele de gato silvestre africano (*Felis silvestris libica*) foi realizado, objetivando a TNCS e baseado em estudos em gatos domésticos (GÓMEZ et al., 2003). Assim, nesse período e nos quatro anos seguintes, a maioria dos estudos relacionados ao cultivo de células derivadas da pele de animais silvestres foi associada à TNCS, como em furão (*Mustela putorius furos*) usando células fetais (LI et al., 2003) e adultas em goral Himalaio (*Naemorhedus goral*; HASHEM et al., 2006), lobo (*Canis lupus*; KIM et al., 2007), veado-vermelho (*Cervus elaphus*; BERG et al., 2007) e tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*; SONG et al., 2007).

Posteriormente, estudos de células da pele de mamíferos silvestres voltaram-se principalmente para o estabelecimento e conservação pela formação de criobancos (SANTYMIRE, 2016), além de estabelecer parâmetros básicos celulares para cada espécie, auxiliando na TNCS. Desta maneira, esta revisão apresenta como propósito discriminar os progressos técnicos alcançados no cultivo de células somáticas em mamíferos silvestres, destacando as principais variações encontradas nos meios e evidenciando os avanços obtidos em algumas espécies.

2. ASPECTOS TÉCNICOS DA OBTENÇÃO, CULTIVO E APLICAÇÕES DE CÉLULAS SOMÁTICAS

O cultivo *in vitro* de células somáticas derivadas da pele inicia-se pela colheita de fragmentos teciduais. Para tanto, esses fragmentos podem ser obtidos a partir de animais vivos (LEÓN-QUINTO et al., 2014) ou *post-mortem* (OH et al., 2008). Nesse último caso, informações sobre a causa e o tempo *post-mortem* são importantes para os procedimentos assépticos. Para tecido auricular de ovinos foi determinado o período de dez dias, a uma temperatura de 25-26 °C, como máximo para obtenção de células viáveis a serem preservadas (SINGH & MA, 2014). Visto que, a exposição dos tecidos à temperatura ambiente por

período prologado está diretamente relacionada à viabilidade das células recuperadas (SILVESTRE et al., 2003). Em geral, temperaturas de 4 °C durante o transporte até o processamento são as mais adequadas (SILVESTRE et al., 2003). Adicionalmente, como solução de transporte dos fragmentos pode ser usada a solução tampão fosfato ou meios de cultivo (GUAN et al., 2010).

Para ambas as situações (animais vivos ou *post-mortem*) antes da colheita dos fragmentos, a região que será manipulada no animal deverá ser higienizada e tricotomizada. Fragmentos teciduais podem ser recuperados da região auricular (*Panthera tigris tigris*; GUAN et al., 2010), abdominal (*C. lupus*; OH et al., 2008) e em regiões específicas, como couro cabeludo (*C. elaphus*; BERG et al., 2007) ou utilizando dardos, para animais de difícil captura (*Hippocamelus bisulcus*; TOVAR et al., 2008), ou ainda de origem fetal (*Lynx pardinus*; LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Após a colheita, no laboratório, as biópsias devem ser lavadas em meio de cultivo, suplementado com antibióticos, tampões e fontes proteicas. Depois, a determinação do tamanho do fragmento e o protocolo de isolamento são critérios importantes (XIA et al., 2013). Os fragmentos utilizados como explantes geralmente possuem a partir de 1,0 mm³ (SONG et al., 2007). Contudo, existem variações dependentes da disponibilidade do tecido (TOVAR et al., 2008).

Após a obtenção dos fragmentos, os mesmos são colocados em placas contendo meio e incubados em condições de temperatura e umidade adequadas (5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C–39°C). A partir de então, as células são monitoradas a cada 24 ou 48 h, a fim de ser observada a confluência celular (efeito de encontro das células em crescimento *in vitro*) e o consumo de meio (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Ao atingir a subconfluência (efeito de recobrimento em torno de 70% da placa pelas células) realiza-se o subcultivo (SONG et al., 2007; GUAN et al., 2010). Após o estabelecimento e formação do banco de células, as mesmas podem ser utilizadas para TNCS para a conservação (SAINI et al., 2015) ou estudo dos mecanismos genéticos entre espécies domésticas e silvestres (DONG et al., 2015)

3. MEIOS E SUPLEMENTAÇÕES USADAS NO CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A escolha do meio de cultivo é extremamente relevante, afetando significativamente o sucesso da proliferação celular. Neste sentido, a seleção do mesmo depende do tipo de célula

a ser isolada (WELLER & WHEELDON, 1982) e o objetivo do cultivo, uma vez que diferentes tipos de células têm um crescimento muito específico. Em consequência, o meio mais adequado para cada tipo de célula deve ser determinado experimentalmente (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Atualmente, para as células da pele, o meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) associado a diferentes suplementações, principalmente o soro fetal bovino, SFB (GUAN et al., 2010) além de glicose e fator de crescimento epidermal (LEÓN-QUINTO et al., 2014) tem sido comumente empregado.

Independente das combinações para a elaboração do meio, sais inorgânicos, aminoácidos, carboidratos, proteínas, peptídeos, ácidos graxos, lipídeos, vitaminas, tamponantes e antibióticos, são os componentes básicos necessários, além das suplementações. Para o estabelecimento de células somáticas oriundas da pele de animais silvestres, o uso de meios de cultivo semi-sintéticos, como vitaminas, sais minerais, proteínas do soro, carboidratos e cofatores, são aplicados (**Tabela 1**).

Os aminoácidos essenciais são necessários para a síntese de proteínas e, como não são produzidos pelas células, obrigatoriamente, devem ser adicionados ao meio. Um exemplo seria a glutamina que fornece energia para o metabolismo secundário sendo adicionada ao cultivo de células da pele (LI et al., 2003). Aminoácidos não essenciais também podem ser adicionados ao meio (KIM et al., 2007) para substituir os que foram esgotados durante o crescimento, prolongando a viabilidade celular.

Já os carboidratos sob a forma de açúcares são a principal fonte de energia, dentre o qual, glicose é um dos mais empregados (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Além disso, como fontes proteicas mais presentes tem-se a albumina, transferina e fibronectina (BRUNNER et al., 2010). Finalmente, em relação às vitaminas, as mesmas são adicionadas ao meio, promovendo crescimento e proliferação celular.

Tabela 1. Cultivo in vitro de células somáticas da pele em alguns mamíferos silvestres.

	Espécie	Nome vulgar	Origem	Tipo celular	Finalidade	Meio base, SFB	Referência
Carnívoros	<i>Canis lupus</i>	Lobo cinzento	Adulta	Fibroblasto	TNCS*	DMEM, 10% SFB	Oh et al., 2008
	<i>Felis silvestris libica</i>	Gato silvestre africano	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Gómez et al., 2003
	<i>Lynx pardinus</i>	Lince ibérico	Fetal/Adulta	Fibroblasto	Caracterização	DMEM, 15% SFB	León-Quinto et al., 2011; 2014
	<i>Mustela putorius furos</i>	Furão	Fetal	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Li et al., 2003
	<i>Oncifelis guigna;</i>	Gato chileno	Adulta	Células epiteliais	Biobanco	DMEM, 30% SFB	Tovar et al., 2008
	<i>Panthera tigris</i>	Tigre siberiano	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Song et al., 2007
	<i>Panthera tigris tigris</i>	Tigre de bengala	Adulta	Fibroblasto	Criopreservação	DMEM, 10% SFB	Guan et al., 2010
Marsupiais	<i>Rhyncholestes raphanuru</i>	Gambá de nariz comprido	Adulta	Células epiteliais	Biobanco	DMEM, 30% SFB	Tovar et al., 2008
Ungulados	<i>Bubalus arnee</i>	Búfalo selvagem	Adulta	Células epiteliais	TNCS	DMEM, 20% SFB	Saini et al., 2015
	<i>Cervus elaphus</i>	Veado vermelho	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Berg et al., 2007
	<i>Naemoredus caudatus</i>	Goral de cauda longa	Adulta	Fibroblasto	Ciclo celular	DMEM, 10% SFB	Hashem et al., 2006
	<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	Adulta	Células epiteliais	Criopreservação	DMEM, 10% SFB	Borges et al., 2015
	<i>Pudu puda</i>	Pudu chileno	Adulta	Células epiteliais	Biobanco	DMEM, 30% SFB	Tovar et al., 2008
Roedores	<i>Chinchilla lanigera;</i>	Chinchila de cauda longa	Adulta	Células epiteliais	Biobanco	DMEM, 30% SFB	Tovar et al., 2008

*TNCS: Transferência Nuclear de Células Somáticas

Contudo, para manter as condições ótimas de cultivo, faz-se necessária a manutenção do pH a partir de tamponantes. Nesse processo podem ser utilizados uma ou mais combinações, como a utilização de tamponamento natural, controlando as condições atmosféricas ou a adição de tamponantes químicos. Nesse caso, é utilizado o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) mantendo o pH em torno de 7,2–7,4 em condições atmosféricas controladas (KIM et al., 2007; OH et al., 2008). Já o HEPES (4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico) mantém essa faixa de pH, não necessitando de atmosfera controlada (SHIPMAN, 1969).

A principal fonte proteica largamente utilizada para o cultivo de células é o SFB. Na composição do soro são encontrados: proteínas de transporte, de adesão, de espalhamento, enzimas, hormônios (da tireoide e paratireoide, insulina, glucagon, corticoides e vasopressina, por exemplo), fatores de crescimento, citocinas, ácidos graxos, lipídios, vitaminas, carboidratos e nitrogênio de origem não proteica (BRUNNER et al., 2010). Contudo, a concentração de cada componente não é definida, uma vez que a mesma varia dependendo do lote em que o soro foi produzido.

Apesar de o SFB ser amplamente utilizado, vários meios quimicamente definidos para o cultivo de células de mamíferos têm sido desenvolvidos (BRUNNER et al., 2010). Contudo, o acesso a essas informações ainda é bastante restrito e a definição desse meio para uma determinada espécie ainda é um processo que demanda tempo. Nesse sentido, no estabelecimento de meios de cultivo para células da pele, a utilização de meios isentos de soro não se torna uma alternativa viável e a definição da concentração de SFB deve ser estabelecida.

Para a criação de biobancos e em casos em que se deseja acelerar a proliferação celular ou existe dificuldade na captura do animal e, conseqüentemente, na obtenção do tecido, tem sido avaliada a concentração de SFB de 10, 15 e 20%, como observado para o lince ibérico (*L. pardinus*; LEON-QUINTO et al., 2011), 20% também em búfalo de água selvagem (*Bubalus arnee*; SAINI et al., 2015) e 30% em espécies nativas do Chile (TOVAR et al., 2008). Concentrações superiores a 20% podem conter variações nas proporções dos componentes e conter diferentes quantidades de endotoxinas e hemoglobina (BRUNNER et al., 2010).

4. ANÁLISE DAS CÉLULAS SOMÁTICAS EM CULTIVO

Várias ferramentas podem ser empregadas para avaliar o cultivo de células somáticas, desde características morfológicas a atividade metabólica/funcional durante o cultivo primário e subcultivos. Em geral, a morfologia é um dos parâmetros qualitativos mais importantes, uma vez que parâmetros normais de morfologia, geralmente estão associados à expressão normal de produtos de diferenciação celular. Algumas alterações decorrentes da apoptose podem ser observadas a um nível básico utilizando microscópio de luz (OH et al., 2008; GUAN et al., 2010; CHEN et al., 2015).

Assim, podem ser quantificados parâmetros relacionados à qualidade do cultivo primário, como a eficiência do plaqueamento dos explantes, pela fixação/aderência; e do desprendimento e crescimento celular ao redor do explantes, podendo em ambas as avaliações observar o número de explantes com esse comportamento até o subcultivo (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Nesse processo, a determinação da concentração celular e do número de dias necessários para atingir a confluência de 70-90%, também pode ser considerada um parâmetro de avaliação do cultivo primário (SONG et al., 2007). Em se tratando de células epiteliais tem-se observado o crescimento celular numa faixa de 5 a 14 dias após a fixação do explante (HU et al., 2013; LIU et al., 2014). Para mamíferos silvestres, esse padrão também é válido, como em *P. tigris tigris* observando o crescimento de 5–12 dias (GUAN et al., 2010).

Outra ferramenta importante para avaliar a qualidade do cultivo seria a determinação do tempo de duplicação da população (PDT) juntamente com a elaboração de uma curva de crescimento. Este processo pode ser realizado de 4 a 11 dias dependendo das condições que as células se encontram (SINGH & MA, 2014). Para fibroblastos oriundos do tecido auricular de *P. tigris altaica* foram estabelecidas condições ótimas a partir da determinação da curva de crescimento, tendo a sua população duplicado após 17,2 h a partir da fase exponencial de crescimento celular (SONG et al., 2007). Já no *L. pardinus* constatou-se 5,2 h como melhor valor de duplicação da população de células derivadas do tecido auricular (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Ainda, Guan et al. (2010), ao cultivar células do tecido auricular de *P. tigris tigris*, observaram um PDT de 28 h.

Já para avaliar a integridade da membrana, o corante azul de tripano é um dos métodos mais antigos e simples para determinar a viabilidade (CHAN et al., 2015). Por ser uma técnica mais simples, a mesma é bastante utilizada para o estabelecimento de fibroblastos de animais silvestres e/ou em vias de extinção (GUAN et al., 2010).

Durante a proliferação celular, ocorre o aumento da liberação de transportadores de prótons H^+ , $NADP^+$, FAD^{2+} , FMN, e NAD^+ . Na presença de metabólitos intermediários, desidrogenases ou redutases, sais de tetrazólio reduzem a formazan, o qual pode ser detectado por mudanças colorimétricas. Esse princípio é utilizado pelo ensaio da mensuração de desidrogenase mitocondrial (MTT; brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio). Nesse ensaio, a funcionalidade das células viáveis pode ser mensurada, uma vez que a desidrogenase mitocondrial das células é ativada metabolicamente e cliva o anel tetrazólio, originando cristais de formazan púrpura (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

O ensaio de MTT é aplicado ainda quando se quer avaliar a influência de determinados meios sobre o cultivo *in vitro* (LEÓN-QUINTO et al., 2011), a influência de concentração de crioprotetores (SEO et al., 2011) e as técnicas de criopreservação (LEÓN-QUINTO et al., 2014). Além disso, é utilizado também na determinação de meios e suplementações (LEÓN-QUINTO et al., 2011).

Finalmente, para o estabelecimento de células e criação de biobancos, a análise citogenética também é bastante empregada, avaliando principalmente até quantas passagens as células podem ser submetidas sem sofrer alterações genéticas significativas (SONG et al., 2007).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, pode-se observar que o cultivo de células somáticas de mamíferos silvestres tem tomado um grande impulso, principalmente para conservação da biodiversidade através da formação de bancos de germoplasma. Nesse contexto, vários aspectos são constantemente estabelecidos para a otimização da eficiência dessas células em cultivo. Além disso, o número de espécies estudadas ainda é reduzido, comparado ao número de espécies silvestres em risco de extinção.

6. REFERÊNCIAS

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.

BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; LIMA, G.L; SANTOS, M.V.O.; SANTOS, M.L.T.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Atividade proliferativa de células

provenientes de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu*) após distintas técnicas de vitrificação. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2015, Fortaleza. Anais eletrônicos do XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Disponível em: <<http://sis.gninus.com.br/admin/trabalhos.html?cl=zootec2015&title=Anais%20Zootec%202015&attach=1>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; DCHÖFF, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. **Altex**, v.27, p. 54–62, 2010.

CHEN, D.; SUN, Q.; LIU, J.; LI, G.; LIAN, L.; WANG, M.; CHEN, Y. The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 42, p. 346–353, 1999.

CHEN, J.X.; RONG, X.Z.; FAN, G.C.; LI, S.Z.; LI, Q.H. Effects of different concentrations of putrescine on proliferation, migration and apoptosis of human skin fibroblasts. **Journal of Central South University of Technology**, v.35, p.758–762, 2015.

DONG, Y.; ZHANG, X.; XIE, M.; AREFNEZHAD, B.; WANG, Z.; WANG, W.; FENG, S.; HUANG, G.; GUAN, R.; SHEN, W.; BUNCH, R.; MCCULLOCH, R.; LI, Q.; LI, B.; ZHANG, G.; XU, X.; KIJJAS, J. W.; SALEKDEH, G.H.; WANG, W.; JIANG, Y. Reference genome of wild goat (*Capra aegagrus*) and sequencing of goat breeds provide insight into genic basis of goat domestication. **BMC Genomics**, v.16, p.431–441, 2015.

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

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

HAN, Z. M.; CHEN, D. Y.; LI, J. S.; SUN, Q. Y.; WANG, P. Y.; DU, J.; ZHANG, H. M. Flow cytometric cell-cycle analysis of cultured fibroblasts from the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca* L. **Cell Biology International**, v.27, p. 349–353, 2003.

HARRISON, R.G. Embryonic transplantation and development of the nervous system. **The Anatomical Record**, v.2, p. 385–410, 1908.

HASHEM, M. A.; BHANDARI, D. P.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; SUK, H. W. Cell cycle analysis of *in vitro* cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. **Cell Biology International**, v.30, p. 698–703, 2006.

HU, P. F.; GUAN, W. J.; LI, X. C.; ZHANG, W. X.; LI, C. L.; MA, Y. H. Study on characteristics of *in vitro* culture and intracellular transduction of exogenous proteins in fibroblast cell line of Liaoning cashmere goat. **Molecular Biology Reports**, v.40, p. 327–336, 2013.

KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; HWANG, W. S.; HOSSEIN, M. S.; KIM, J. J.; SHIN, N. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. **Cloning and Stem Cells**, v.9, p. 130–137, 2007.

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.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v.68, p. 227–233, 2014.

LI, Z.; SABET, M. R.; ZHOU, Q.; LIU, X.; DING, W.; ZHANG, Y.; RENARD, J. P.; ENGELHARDT, J. F. Developmental capacity of ferret embryos by nuclear transfer using G0/G1-phase fetal fibroblasts. **Biology of reproduction**, v.68, p. 2297–2303, 2003.

LIU, J. L.; CHEN, Y. C.; SUN, Q. Y.; SONG, X. F.; CHEN, D. Y. Culture of skeletal muscular cells from giant panda. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 35, p. 553–554, 1999.

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.

MEN, H.; WALTERS, E. M.; NAGASHIMA, H.; PRATHER, R. S. Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. **Theriogenology**, v. 78, p. 1720–1729, 2012.

OH, H. J.; KIM, M. K.; JANG, G.; KIM, H. J.; HONG, S. G.; PARK, J. E.; PARK, K.; PARK, C.; SOHN, S. H.; KIM, D. Y.; SHIN, N. S.; LEE, B. C. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. **Theriogenology**, v.70, p. 638–647, 2008.

SAINI, M.; SELOKAR, N. L.; RAJA, A. K.; SAHARE, A. A.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R.S.; PALTA, P. Effect of donor cell type on developmental competence, quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. **Theriogenology**, v.84, p.101–108, 2015.

SANTYMIRE, R. Implementing the use of a biobank in the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). **Reproduction, Fertility and Development**, 2016, No prelo.

SEO, J. M.; SOHN, M. Y.; SUH, J. S.; ATALA, A.; YOO, J. J.; SHON, Y. H. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. **Cryobiology**, v. 62, p. 167–173, 2011.

Shipman, C. Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Experimental Biology and Medicine*, v.130, p.305-310, 1969.

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

SINGH, M.; MA, X. L. In vitro culture of fibroblast-like cells from sheep ear skin stored at 25-26°C for 10 days after animal death. **International Journal of Biology**, v. 6, p. 96–102, 2014.

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

TOVAR, H.; NAVARRETE, F.; RODRÍGUEZ, L.; SKEWES, O.; CASTRO, F. O. Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. **In Vitro Cellular Developmental and Biology-Animal**, v. 44, p. 309–320, 2008.

WELLER, T.; WHEELDON, S. The cultivation in vitro of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. I. Methodology; criteria for evaluation of cultures; and development of media. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, p. 335–348, 1982.

XIA, Z.; XIN, D.; MURRAY, D.; TRIFFITT, J. T.; PRICE, A. J. A method of isolating viable chondrocytes with proliferative capacity from cryopreserved human articular cartilage. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, p. 267–276, 2013.

**CAPÍTULO II: *IN VITRO* CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR
TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari Tajacu* LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM
WITH DIFFERENT REQUIREMENTS**

IN VITRO CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (*Pecari Tajacu* LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT REQUIREMENTS

ABSTRACT: The maintenance of metabolic activities during the *in vitro* culture of somatic cells of wild animals, especially collared peccary (*Pecari tajacu*), is an interesting step in the conservation of these cells for the use in nuclear transfer. In this context, it is necessary to optimize the culture conditions of somatic cells by the establishment of appropriate supplementations to the media. Therefore, this study aimed to analyze the composition of the culture means of somatic cell derived from ear tissue of collared peccaries, evaluating concentrations of fetal bovine serum (FBS; 10% vs. 20%) and epidermal growth factor (EGF; 5 ng/mL vs. 10 ng/mL). Thus, tissues were submitted to primary culture and subcultures for 40 days and cells were analyzed for morphology, adhesion, subconfluence, and proliferative activity for developing the growth curve and determining the population doubling time (PDT), viability, and functional/metabolic activity. No difference was observed between the concentrations of FBS for several parameters, except for viability [FBS10: 85.6% vs. FBS20: 98.2%], PDT [FBS10: 155.4 h vs. 77.2 h], and functional/metabolic assay [FBS10: 0.57–0.55 vs. FBS20: 0.82–0.99 (D5–D7)]. For the EGF in culture, no difference was observed in the evaluated parameters. In all experiments, the growth curves were typical S-shape and the cells passed through a lag, logarithmic, and plateau phase. In conclusion, 20% FBS is suitable for the recovery of somatic cells; nevertheless, EGF does not improve the quality of growing these cells. To our knowledge, this is the first study culturing somatic cells of collared peccaries.

Keywords: wild animals; conservation; somatic tissue; protein source; mitotic factor.

1. INTRODUCTION

The conservation of animal genetic resources is an interesting strategy for both the preservation of biodiversity and a sustainable development through the establishment of captivities (PIOVEZAN et al., 2012). In this context, study of the collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758), wild animals of ecological, commercial and scientific importance is included. These animals participate in the food chain of mammals; have meat of considered appraisal and international interest leather (BODMER et al., 1990). Furthermore, they can be used as an experimental model for other wild animals, phylogenetically close (ALTRICHTER et al., 2015; KEUROGHLIAN et al., 2013; 2014).

Nevertheless, the population of collared peccary is critically decreasing in some natural biomes, as the Caatinga and Atlantic Forest (DESBIEZ et al., 2012). Therefore, the development of reproductive strategies is necessary for their preservation and optimization of

the population. In general, these strategies involve the cryopreservation of gametes and embryos (ANDRABI & MAWXELL, 2007; LÉON-QUINTO et al., 2009). In collared peccary, studies related to the cryopreservation of semen (CASTELO et al., 2010; SOUZA et al., 2016), ovarian tissue (LIMA et al., 2012; 2014) and somatic tissue (BORGES et al., 2015) have already been developed. However, to have a complete genetic representative of the population biodiversity, it is necessary to also consider banks of somatic cells and tissues (CETINKAYA & ARAT, 2011; LI et al., 2009; LIU et al., 2014).

The somatic cell bank has different applications, ranging from the preservation of the genetic material of the species, avoiding the total loss of biodiversity in individuals who died prior to the reproductive stage, use in somatic cell nuclear transfer, study of the species by the performance of the *in vitro* culture of cells and basic research (CAPUTCU et al., 2013; FOLCH et al., 2009; LEÓN-QUINTO et al., 2011, 2014; PEREIRA et al., 2013). Regardless of the purpose, the obtaining of a banking of somatic cells begins with the skin biopsy and *in vitro* culture of recovered cells.

The banking of cells is closely linked to cellular culture conditions. In wild animals, the number of explants can be reduced because of the number of individuals per species, special attention is required for the composition of the culture medium (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Two factors are important as the protein source and growth factor that favor the rapid cell growth (GIBBS et al., 2000; GOISSIS et al., 2007; LI & LU, 2005). In different somatic cell lines, medium supplementation with 10% of fetal bovine serum has been the most widely used protocol (CETINKAYA & ARAT, 2011; PEREIRA et al., 2013); however, in order to improve the somatic cell growth, higher concentrations have been tested and set (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Moreover, to determine a possible further improvement to the cell culture and proliferation, the epidermal growth factor has also been used, which becomes possible after the establishment of its ideal concentration (LI & LU, 2005).

Thus, this study aimed to analyze the composition of the culture means of somatic cell derived from ear tissue of collared peccaries, evaluating different concentrations of fetal bovine serum and epidermal growth factor. To our knowledge, this is the first *in vitro* study culturing somatic cells of collared peccaries. The work could therefore be useful for the rest of peccaries, resulting as a starting point to initiate the implementation of nuclear transfer in this species.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. ETHICS AND ANIMALS

The use and care of animal were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Rural University of Semiarid (CEUA/UFERSA, No. 23091.001072/2015-92), in compliance with the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, No. 48633-1). A total of 18 animals, seven males and 11 females was used, obtained at the Centre for Wild Animals Multiplication of Federal Rural University of Semiarid (CEMAS, UFERSA, No. 1478912). The animals were selected according to their health and body parameters and within the same age group (3–6 months).

2.2. CHEMICALS, REAGENTS, AND MEDIA

All reagents used *in vitro* culture were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and the medium and solutions were obtained from Gibco-BRL (Carlsbad, USA). 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) prior to use.

2.3. SKIN BIOPSY AND EXPERIMENTAL DESIGN

Ear tissues from collared peccaries were obtained from the CEMAS/UFERSA and transported to the laboratory in phosphate buffer saline (PBS) supplemented with antibiotic solution (10,000 U/mL penicillin G, 10,000 mg/mL streptomycin) at 37 °C for 30 min. In collared peccary management systems, their identification is recorded by ear sections and these fragments were used for the experiments. Then, small tissue fragments (9.0 mm³; 3 × 3 × 1 mm³) were washed in 70% ethanol and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) added with sodium bicarbonate, penicillin G, streptomycin, and amphotericin B.

After that, all small pieces were distributed into two experiments. In the first experiment, we evaluated the optimal concentration of protein source using fetal bovine serum (FBS) for the primary culture and sequential subcultures. Culture medium was supplemented with 10% or 20% FBS (FBS10 or FBS20). In the second experiment, we evaluated the influence of epidermal growth factor (EGF) at the *in vitro* culture medium until the third passage using two concentrations, 5 ng/mL and 10 ng/mL (EGF5 and EGF10). In the second experiment, comparisons were performed among EGF5, EGF10, and the best group of the first experiment (EGF0). For both experiments, qualitative and quantitative parameters

were evaluated: morphological characteristics and quality of the cell culture during the primary culture and subcultures, proliferating activity for the preparation of the cell growth curve and determination of population doubling time (PDT), viability by Trypan blue, and functional/metabolic activity measured by 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

2.4. PRIMARY CULTURE AND SUBCULTURES PREPARATIONS

Tissue fragments were cultured in DMEM added with sodium bicarbonate, penicillin G, streptomycin, amphotericin B, and FBS and/or EGF at 38.5 °C, 5% CO₂ in air, and 95% relative humidity. The culture medium was changed daily. The cells were harvested when they reached 70% subconfluence and were subcultured into petri dishes (PEREIRA et al., 2013) for 40 days of culture. The 70% subconfluence was defined when 70% of the petri dishes show somatic cells.

2.5. ASSESSMENT OF CULTURE QUALITY

The 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 grow to subconfluence, day of subconfluence explants, subconfluence total time, cell concentration in first passage, and adhesion ability of fragments in comparison with fragments cultured in medium using albumin bovine serum (BSA) as control group. BSA was added to the culture medium without FBS at the concentrations of 0.5% or 1% and the number of adhered explants was measured on days 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 20.

2.6. 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 four-well plates at cell density of 1.0×10^4 cells/well for the determination of the PDT. Cells were trypsinized from two wells and counted at 24 h intervals for up to 168 h of

culture. The mean cell counts were recorded every time and so cell growth curve was prepared (COSTA et al., 2005). Finally, the PDT was calculated using the following formula (RORTH, 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.

2.7. CELL VIABILITY

The viability analysis was performed by cells stained with Trypan blue assay. 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 1:40 and counted in a Neubauer chamber (STROBER, 2001). Viability was measured at the end of primary culture in all experiments. Additionally, in second experiment, cells were frozen (URIO et al., 2010; León-Quinto et al., 2014) and the viability was evaluated before and after freezing. Briefly, cells were frozen in a solution containing 10% of DMSO and 0.2 M sucrose in culture medium, stored in cryovials, and cooled at -1 °C/min down to -80 °C using Mr. Frosty® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). After, the cryovials were transferred to liquid N₂ tanks. After two weeks, frozen cryovials were thawed by immersion in a water bath at 37 °C for 3–4 min. Subsequently, cellular content was subjected to two washes to remove the cryoprotectants; the first was performed using culture medium containing 0.2 M sucrose at 4 °C for 15 min. After centrifugation, the second wash was conducted using only culture medium, maintained at 25 °C for 15 min. The cell pellet was suspended in 1.0 mL of culture medium and the viability evaluated (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

2.8. MTT ASSAY

To evaluate the functionality and integrity of the membrane and cell metabolism, 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 35 × 15 mm petri dishes. After 5–7 days, 1.5 mL of the MTT solution (5 mg/mL in DMEM) was added

and the petri dishes incubated for a period of 3 h at 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.

2.9. DATA ANALYSES

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. A total of ten and eight animals for the first and second experiment were used, respectively. The PDT assay and viability were performed in duplicate for each animal of each treatment. Moreover, before the analysis of the cell viability, data were transformed to Arcsin. All data were analyzed by ANOVA and *post hoc* analysis test (paired and unpaired t-test) using the StatView 5.0 (SAS Institute, Inc. Cary, New York, USA), considering a significance value of $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. ESTABLISHMENT OF FBS CONCENTRATION IN CULTURE MEDIUM OF SKIN CELLS

Table 1 summarizes the results obtained for the culture quality and PDT assay between FBS10 and FBS20. Thus, the efficiency of total number of attached explants on the culture was 100% in all the cases. No differences were observed in attachment or subconfluence rates between experimental groups ($p > 0.05$). Additionally, epithelial-like and fibroblast-like cells migrated from tissues fragments 7.0 (7.2–7.4) days after explanting. As time passed, cells continued to proliferate and were subcultured when they reached 70% confluences on the 11th (11.7–11.8) day. After two to three passages, the cells showed morphologically consistent as fibroblast with fusiform aspect and central oval nucleus. They were viable and grew well after some passages. Nevertheless, the differences, detected between FBS10 and FBS20 samples, were observed for the PDT assay (155.4 h vs. 77.2 h, $p < 0.05$, **Table 1**), while in the same time period, cells cultured in the presence of 20% of FBS showed a greater potential for further division as compared to those cultured with 10% of FBS. Thus, it was observed that the proliferative activity was higher after the addition of 20%

of FBS to the medium and a significant difference ($p = 0.03$) was demonstrated when compared to the FBS10 treatment (**Table 1**).

For the evaluation of the ability of cellular adhesion of FBS, skin samples were cultured in the presence of FBS (10% or 20%) and BSA (0.5% or 1.0%) as negative control. Thus, in all *in vitro* culture days, both FBS concentrations showed higher values of attached explants with cell growth around it from D6 when compared those cells cultured in BSA (**Table 2**). On the ninth day of culture, all cells grown in the presence of FBS fragments remained attached, while those grown in the presence of BSA reduced their cell adhesion, obtaining the complete inhibition of adhesion on the 18th and the 20th days for the BSA concentrations of 0.5% and 1%, respectively.

After the third passage, the cells were submitted to the growth profile analysis by duplication rate of the population (PDT) assay. The growth curve of both treatments was established with FBS addition in the medium; they had the typical form of an S (**Figure 1a**). It was observed that the latency phase (lag phase) length was lagging about 48 h. Then, the cells rapidly proliferated entering exponential growth (the log phase). The transition was achieved from log phase to stationary phase between 4–5 and 5–6 days of culture for FBS20 and FBS10, respectively. After this period, the population began to degenerate and enter the decline or death phase after the 6th culture day for both treatments.

The Trypan blue viability assay and the functional/metabolic viability by MTT assay were employed for cultured cells (**Figure 2a** and **2b**). A higher percentage of cell viability was observed in the treatment using 20% of FBS after primary culture cells when compared the cells cultured with 10% of FBS (Fig. 2a, $p = 0.03$). The treatments showed 85.6% and 98.2% of cell viability for the FBS10 and FBS20 groups, respectively.

In relation to the evaluation of metabolic/functional viability by MTT assay (**Figure 2b**), the results were expressed in absorbance (abs) and comparisons between groups were performed. After 5 and 7 days of culture, a greater metabolic activity was observed, 0.57 and 0.82 for cultures with 10% of FBS addition and 0.55 and 0.99 for cultures with 20% of FBS addition, for the respective days. In this analysis, a significant difference between the treatments was found; however, the results within treatments showed no difference ($p > 0.05$).

Table 1: Effect of fetal bovine serum (FBS) concentration on the ability of ear skin samples from collared peccaries *in vitro* cultured by 40 days.

	No of samples			No of attached samples					Concentration	
	Initial	Attached	Day all attached	Grow	to	Day all cell	Subconfluence	in first passage	PDT ± SEM	
FBS		(%)	explants ± SEM	subconfluence	grow	explants	total	time	(10 ⁴ cell/mL) ± SEM	(h)
				(%)	± SEM		(days) ± SEM			
FBS10	39 ^a	39 (100) ^a	3.5 ± 0.3 ^a	39 (100) ^a	7.4 ± 0.4 ^a		11.8 ± 0.6 ^a	4.4 ± 0.2 ^a	155.4 ± 29.9 ^a	
FBS20	35 ^a	35 (100) ^a	3.0 ± 0.5 ^a	35 (100) ^a	7.2 ± 0.5 ^a		11.7 ± 0.7 ^a	5.1 ± 0.3 ^a	77.2 ± 2.1 ^b	

^{a,b} in same column differ ($p < 0.05$).

Table 2: Effect of fetal bovine serum (FBS) concentration on the adhesion of ear skin cells from collared peccaries *in vitro* cultured.

Protein source	[] in %	Samples							
		Initial	Attached D3 (%)	Attached D6 (%)	Attached D9 (%)	Attached D12 (%)	Attached D15 (%)	Attached D18 (%)	Attached D20 (%)
FBS	10	39	18 (46.1) ^{ac}	37 (94.9) ^a	39 (100.0) ^a	39 (100.0) ^a	39 (100.0) ^a	39 (100.0) ^a	39 (100.0) ^a
	20	35	25 (71.4) ^a	34 (97.1) ^a	35 (100.0) ^a	35 (100.0) ^a	35 (100.0) ^a	35 (100.0) ^a	35 (100.0) ^a
BSA	0.5	35	12 (34.3) ^{bc}	17 (48.6) ^b	15 (42.9) ^b	10 (28.6) ^b	7 (20.0) ^b	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^b
	1.0	40	10 (25.0) ^{bc}	15 (37.5) ^b	8 (20.0) ^b	11 (27.5) ^b	3 (7.5) ^b	3 (7.5) ^b	0 (0.0) ^b

^{a,b,c} in same column differ ($p < 0.05$). Attached samples: number of explants with detachment or cell growth around them in their day.

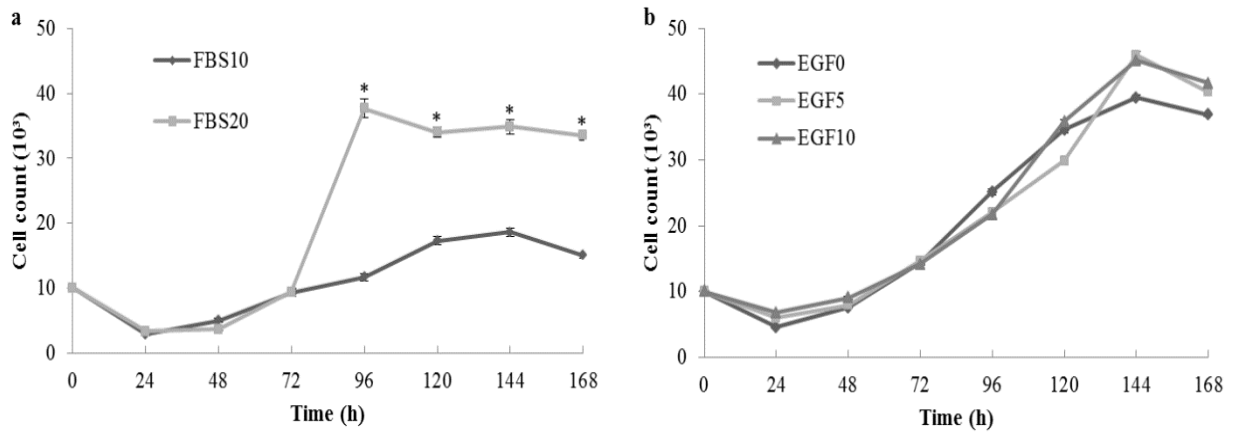


Figure 1: The growth curve of skin cells derived from somatic tissue of collared peccary and cultured in medium supplemented with FBS **a** and EGF **b**. *: Differ for same time in different groups ($p < 0.05$).

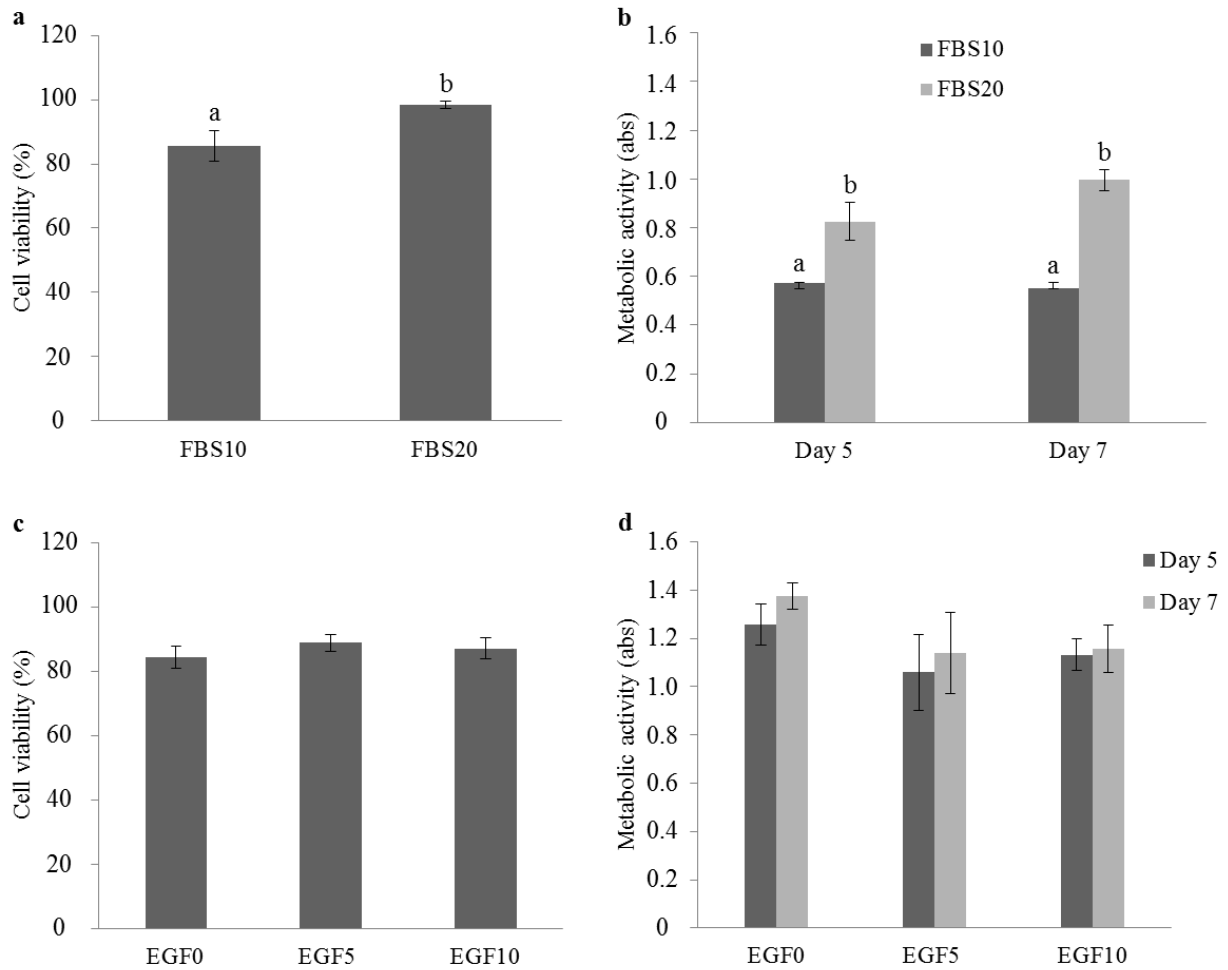


Figure 2: Assessment of viability by Trypan blue and metabolic functional by MTT assay. **a** Cell viability after the primary culture of treatments using FBS; **b** metabolic activity assessed by MTT assay after the third passage of treatments using FBS; **c** cell viability after the primary culture of treatments using EGF; **d** metabolic activity assessed by MTT assay after the third passage using EGF; ^{a,b}: differ ($p < 0.05$).

3.2. INFLUENCE OF EGF DURING IN VITRO CULTURE OF SKIN CELLS

For treatments with the addition of 0, 5, and 10 ng/mL EGF, 31 initial explants were used per concentration. All grown explants obtained 100% (31) of attached samples on days 4.9, 7.0, and 3.5 of culture ($p > 0.05$) for 0, 5, and 10 ng/mL EGF, respectively. Analysis of subconfluence around the explants for all treatment showed 100% (31) attached explants at the end of the primary culture. Therefore, no differences in attachment, subconfluence rates and PDT assay were observed among experimental groups (**Table 3**). Additionally, all primary cultures showed

70% subconfluence after 12.6 culture days. Regarding morphology, all cells showed the same aspect as shown in Experiment 1, without influence of EGF (**Figure 3a-3f**).

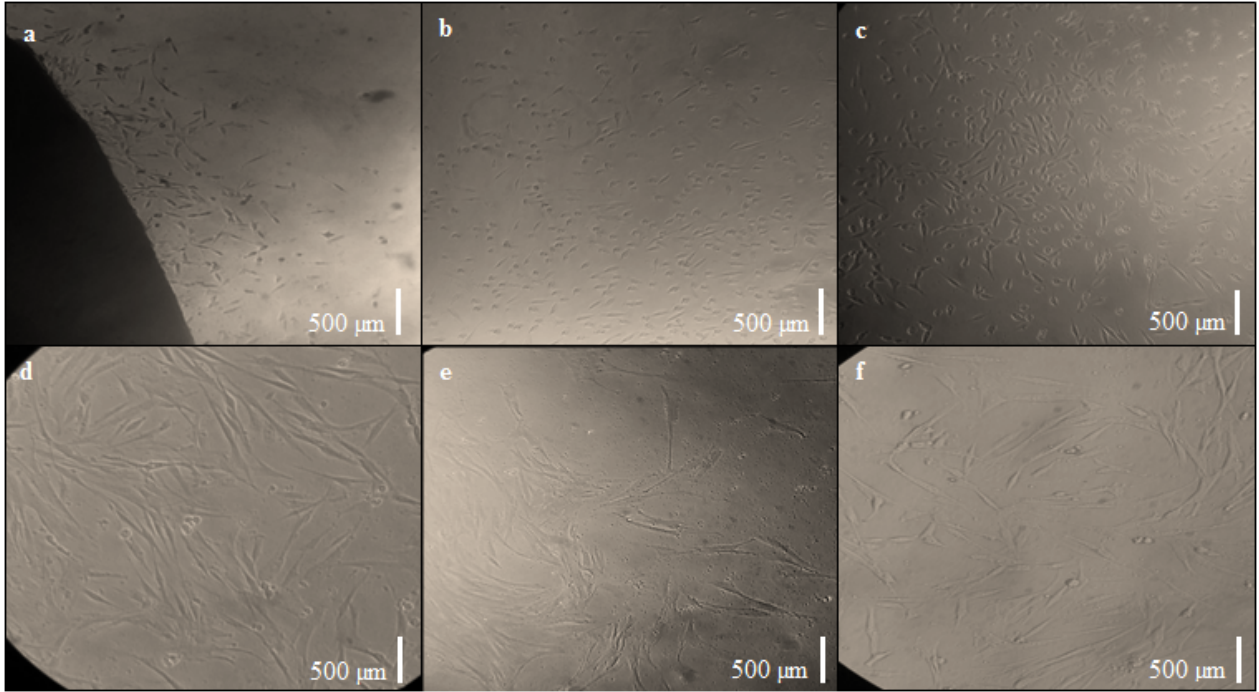


Figure 3: *In vitro* culture of ear tissue collared peccaries demonstrating the morphology, adhesion, and proliferation of cells. Primary culture: a early detachment and cell growth without addition of EGF; b early detachment and cell growth with addition of 5 ng/mL of EGF; c early detachment and cell growth with addition of 10 ng/mL of EGF. Subculture: d culture secondary and subconfluence without addition of EGF; e culture secondary and subconfluence with addition of 5 ng/mL of EGF; and f culture secondary and subconfluence with addition of 10 ng/mL of EGF. Scale bar: **a–f** 500 μm

Table 3: Effect of epidermal growth factor (EGF) concentration on the ability of ear skin samples from collared peccaries *in vitro* cultured by 40 days.

EGF (ng/mL)	No of samples			No of attached samples			PDT ± SEM (h)
	Initial	Attached (%)	Day all attached explants ± SEM	Grow to subconfluence (%)	Day all cell grow explants ± SEM	Subconfluence total time (days) ± SEM	
EGF0	31	31 (100)	4.9 ± 0.9	31 (100)	7.2 ± 0.7	12.6 ± 0.2	69.6 ± 5.5
EGF5	31	31 (100)	7.0 ± 1.8	31 (100)	8.2 ± 0.8	12.6 ± 0.2	64.8 ± 4.0
EGF10	31	31 (100)	3.5 ± 0.9	31 (100)	7.9 ± 0.6	12.6 ± 0.2	65.8 ± 5.8

No difference in same column ($p > 0.05$).

After establishing the growth curve for the different supplementations in culture (EGF, EGF5, or EGF10), all cells showed typical behavior in the form of S (**Figure 1b**). All cells showed the lag phase and the exponential growth (the log phase) presented a duration time of about 48 h and all treatments showed no significant difference between them ($p > 0.05$). The transition from log to stationary phase was achieved between 5–6, 6–7, and 6–7 days of culture for EGF0, EGF5, and EGF10, respectively. After this period, the population began to degenerate and enter the decline or death phase after the 6th day of culture for all concentrations.

After the cell trypsinization, no difference was observed among the all groups for viability by Trypan blue assay (EGF0: 84.3% vs. EGF5: 88.8% vs. EGF10: 87.1%; **Figure 2c**). After 5 and 7 days of culture (**Figure 2d**), no difference was also observed for metabolic activity among groups for D5 (EGF0: 1.26 vs. EGF5: 1.13 vs. EGF10: 1.14) and D7 (EGF0: 1.06 vs. EGF5: 1.38 vs. EGF10: 1.16). Additionally, a viability by Trypan blue and concentration were evaluated in cells after even passage, before and after cryopreservation (**Table 4**). No significant difference was observed among treatments, confirming that the EGF had no effect on cell viability at each passage and after cryopreservation.

Table 4: Viability by Trypan blue assay after each passage and before and after cryopreservation in skin cells from derived somatic tissue of collared peccary and culture in the EGF presence.

EGF	Before of the cell cryopreservation (Mean $\pm$ SEM)						After the cell cryopreservation (Mean $\pm$ SEM)		
	First passage		Second passage		Third passage		Viability before cryopreservation (%)	Viability (%)	Relative viability (%)
	Viability (%)	Concentration (10^4 cel/mL)	Viability (%)	Concentration (10^4 cel/mL)	Viability (%)	Concentration (10^4 cel/mL)			
EGF0	84.3 $\pm$ 3.3	7.8 $\pm$ 1.5	87.9 $\pm$ 1.5	32.3 $\pm$ 2.5	89.4 $\pm$ 1.4	20.0 $\pm$ 1.4	84.5 $\pm$ 2.5	61.2 $\pm$ 2.4	72.4 $\pm$ 2.1
EGF5	88.8 $\pm$ 2.8	6.3 $\pm$ 1.0	84.1 $\pm$ 1.7	28.1 $\pm$ 5.4	88.7 $\pm$ 2.0	17.7 $\pm$ 2.5	86.9 $\pm$ 0.8	61.0 $\pm$ 3.0	70.3 $\pm$ 3.6
EGF10	87.0 $\pm$ 3.1	8.8 $\pm$ 0.8	85.7 $\pm$ 2.3	36.5 $\pm$ 5.1	90.7 $\pm$ 1.2	23.4 $\pm$ 3.3	88.1 $\pm$ 1.9	55.2 $\pm$ 3.1	62.9 $\pm$ 4.2

No difference in same column ($p > 0.05$).

4. DISCUSSION

The addition of serum to the culture media has an important significance on cell growth, supporting the cells as a protein and growth factors source, as well as providing cell adhesion and expansion through factors, as collagen and fibronectin (HOSOKAWA et al., 1997). The addition of 10% of serum has been the most widely used for fibroblasts culture establishment in different species (BAI et al., 2012; CAAMAÑO et al., 2008; HAN et al., 2003; LIU et al., 2010). Nevertheless, in order to enhance cells culture of skin cells deriving from collared peccary, in this study the addition of 20% of FBS was also used to the culture medium, since for some species, this percentage may vary for the same cell type (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Moreover, in swine, domestic species phylogenetically nearest to the collared peccary, the serum concentration also varied between 10% and 20% (SILVESTRE et al., 2002; 2003; SHI et al. 2015). Additionally, a serum concentration greater than 10% may be useful in situations where the number of fragments is reduced. On endangered wild species, the number of fragments and their size are important factors that can be solved with culture media with high ability for cell growth (LEÓN-QUINTO et al., 2011).

For both FBS concentrations tested in the culture, we have obtained a maximum number of attached explants and maximum subconfluence around them, possibly due to the favorable conditions in the culture medium. In swine skin cells, explants cultured in 20% of SFB also showed 100% of attached samples after 7–14 days of culture; however, only 88% attached samples were observed with the growth to subconfluence evaluated up to 28 days of culture (SILVESTRE et al., 2002). Moreover, we observed that the addition of 20% of serum caused greater cell proliferation in the early days of culture, since a significant increase was observed in the number of cells after primary culture. In FBS composition, these are commonly found: transportation, adhesion proteins and enzymes, hormones, growth factors, cytokines, fatty acids, lipids, vitamins, carbohydrates, and nitrogen nonprotein source (BRUNNER et al., 2010) and a larger amount of these substances favor greater cell proliferative activity.

To evaluate the extent to which FBS influences the cell adhesion, the number of explants that presented the detachment or the cell growth around it was quantified for each day and compared to the BSA, a negative control commonly used in embryo culture systems and gametes in two different concentrations. BSA is added to the medium as a protein source, since it is widely used in the oocytes and embryos culture and maintenance (EVENCE et al., 2004) and is also present in the composition of some synthetic media for the culture of

adherent somatic cells (KAN & YAMANE, 1982) and cells grown in suspension (MAGALHÃES et al., 2012). Nevertheless, it inhibits cell adhesion, requiring the addition of adhesion factors, as fibronectin (KAN & YAMANE, 1982).

It was observed that the explants continued adhered during the first 6 days of culture, suggesting that the washings carried out in medium containing FBS prior to fixation could be related to this behavior. Furthermore, these observations may also be linked to the growth and adhesion factors that are still present in the explant. However, after 6 days of culture, the percentage of explants with detachment around the explant decreased until it reached 0%, confirming the inhibition of adhesion when using only BSA.

Regarding the assessments carried out for the subcultures, it was possible to confirm the high performance of culture with the addition of 20% of FBS to the medium when compared to treatment with 10% of FBS. Since after the third passage of cells were subjected to analysis of their growth profile or PDT assay and the values for treatment with addition of 20% of FBS were significantly greater. It was observed for both curves that the lag phase duration was about 48 h. This characteristic is similar to the culture of the same cell type in other species using DMEM culture medium with 10% of FBS (NA et al., 2010; BAI et al., 2012). In this lag phase duration is lower than the one found by Li et al. (2009) in sheep cultured fibroblasts. Both treatments showed satisfactory latency periods, since this period is required for cell recovery after mechanical damage and exposure to trypsin.

For the cell viability in different cultures, other study aimed at establishing fibroblasts derived from ear tissue in sheep (LI et al., 2009) using as culture medium, DMEM, plus 10% of FBS and achieved a well higher viability rate, 97.6%. Equivalent results were found in Wuzhishan miniature pig, 97.8% in the same growing conditions (LIU et al., 2014). This suggests a greater reliance for FBS in the culture medium in the case of cells derived from ear tissue of peccaries in relation to their cell viability maintenance because equivalent results were achieved in our study only with the addition of 20% of FBS to the culture medium. Moreover, the behavior exhibited by the collared peccary skin cells approached the behavior of *Lynx pardinus* fibroblasts (LEÓN-QUINTO et al., 2011). In this study, the optimal culture tested when related to FBS concentration of 15% and did not differ from the result achieved with the addition of 20% of FBS to the medium containing the same cells.

In relation to the functional/metabolic viability MTT assay, the results are consistent with the data provided by the Trypan blue viability assay and the growth curve and these results allow relating metabolic activity with cell concentration. Since after 7 days of culture

for both treatments metabolic/functional viability no significant difference was observed compared to day 5 of culture, indicating persistence of metabolic activity and integrity of the cells after 7 days of culture. These characteristics were also observed by Cetinkaya and Arat (2011) using fibroblasts derived from bovine ear cartilage grown in DMEM with 20% of FBS. Studies of the property of skin cells have differences in their behavior, as the growth curve in the days of culture under similar culture conditions. In cases of cooled tissue curve, cells reached the stationary phase on day 7 of culture as observed by Sing et al. (2011) and Sing and Xiaoling (2014). Nevertheless, Mahesh et al. (2012) observed the same culture conditions at the beginning of the stationary phase on day 4 of the curve. Furthermore, it was observed that the cells were already in the decline phase in the curve in day 7 (LIU et al., 2011). Therefore, the evaluation of the MTT in days 5 and 7 of culture was proposed to determine the maximum proliferative and metabolic activity of the collared peccary skin cells in our conditions.

With the aim to try an additional positive effect on the already high performance obtained for the cell culture in the presence of 20% of FBS, we add the EGF mitogenic agent at 5 or 10 ng/mL. However, the fact this supplementation did not present any difference in relation to the parameters evaluated for the initial culture, compared to EGF0, we evaluated the subcultures in more detail. For this reason, the viability by Trypan blue assay in cell freezing and determining the cell concentration was performed for every subculture. Still it did not demonstrate any difference compared to the addition of EGF to 5 or 10 ng/mL. In addition, cryopreservation as a method of analysis can be applied, comparing the possible damage caused by this process (CETINKAYA & ARAT, 2011). This behavior is related to the fact that epithelial tissue consists overall of about 80% keratinocytes. Since these cells have good response to EGF due to the large number of receptors epidermal growth factor receptor (EGFr). EGFr is directly related to various functions in this cell type, it is important for autocrine growth in tissue renewal, to promote cell survival, and cell migration regulation (HUDSON & MCCAWLEY, 1998). Accordingly, the study on the epithelium of the ear tissue of collared peccary is necessary to determine more specific mitotic agents. For the explant culture of the ear tissue of *L. pardinus* studied by León-Quinto et al. (2011), the EGF had a beneficial effect.

Therefore, we believe that during the course of subculturing, the number of epithelial cells has decreased, being composed predominantly of fibroblasts and this greater amount of fibroblast cells may have caused the noninterference of EGF added to the culture medium. It

is explained by the fact that the cells are mixed during the primary culture, which can grow in both group and dispersed (GUAN et al., 2005). However, fibroblasts give off more rapidly from the petri dishes after addition of trypsin, may be removed while the epithelial cells are still adhered, brought about in obtaining a uniform culture (LIU et al., 2008; WU et al., 2008). Also, probably, the treatment containing only 20% of FBS provided a similar response when compared to treatments with EGF because the presence of 20% of FBS has a satisfactory amount of this factor in the serum composition.

Moreover, comparing the values in Experiments 1 and 2 regarding the addition of only 20% of FBS to the culture medium, we observed a good reproducibility of *in vitro* culture because the values were very close for all analyzes. Additionally, the variation of animals from 3 to 6 months of age and gender did not affect the reproducibility of the data on analysis conditions and tested.

In conclusion, 20% of FBS is suitable for the recovery of somatic cells, shown to be effective for the growth and proliferation of skin cells for 40 days and until the fourth passage. However, EGF does not improve the quality of these growing cells, having no influence on the proliferative activity of the cells in the tested concentrations. To our knowledge, this is the first *in vitro* study culturing somatic cells of collared peccaries and it could be useful for the rest of peccaries, aiming the implementation of nuclear transfer.

5. ACKNOWLEDGMENTS

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, the Laboratory Gonadal Transplantation and *In Vitro* Embryo Production (LTG-PIV/UFERSA) and the Laboratory Biochemistry and Molecular Biology (BIOMOL/UERN) for technical assistance. A. R. Silva and M. F. Oliveira were recipients of CNPq grants.

6. REFERENCES

- ALTRICHTER, M.; TABER, A.; NOSS, A.; MAFFEI, L.; CAMPOS, J. 2015. *Catagonus wagneri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T4015A72587993.en>>. Acesso em: 10 out. 2015.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p.223–243, 2007.
- BAI, C.; WANG, D.; SU, X.; ZHANG, M.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and biological research of the Jining Grey goat fibroblast line. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.36, p.659–667, 2012.
- BODMER, R. E.; BENDAYAN, N. Y.; MOYA, L.; FANG, T.G. Manejo de ungulados en la Amazonia Peruana: Analisis de su caza y comercializacion. **Boletin de Lima**, v.70, p. 49–56. 1990.
- BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. B.; LIMA, G. L.; SANTOS, M. V. O.; SANTOS, M. L. T.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Atividade proliferativa de células provenientes de tecido auricular de catetos (*Pecari tajacu*) após distintas técnicas de vitrificação. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2015, Fortaleza. Anais eletrônicos do XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. Disponível em: <<http://sis.gnious.com.br/admin/trabalhos.html?cl=zootec2015&title=Anais%20Zootec%202015&attach=1>>. Acesso em: 03 mar. 2016.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; DCHÖFF, H.; PFALLER, W. GSTRAUNTHALER, G. Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. **Altex**, v.27, p. 54–62, 2010.
- CAAMAÑO, J. N.; RODRIGUEZ, A.; SALAS, A.; MUNOZ, M.; DIEZ, C.; PRATHER, R. S.; GOMEZ, E. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured brown bear fibroblast cells. **Cell Biology International**, v.32, p. 855–859, 2008.
- CAPUTCU, A. T.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; ARAT, S. Tissue cryobanking for conservation programs: effect the tissue type and storage time after death. **Cell Tissue Bank**, v.14, p. 1–10, 2013.
- CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, v. 74, p. 1060–1065, 2010.
- CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, v.63, p. 292–297, 2011.
- DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; BEISIEGEL, B. M.; MEDICI, E. P.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; CAMPOS, C. B.; TÓFOLI, C. F.; MORAES JUNIOR, E. A.;

AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. P.; SANTOS JUNIOR, T. S.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P. R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, p.74–83, 2012

EVECEN, M.; PABUCÇUOGLU, S.; ALKAN, S.; ILERI, I. K. The effects of various BSA levels in different media on development in *in vitro* culture of mouse. **Turk Journal of Veteterinary Animal Science**, v.28, p. 337–342, 2004.

FOLCH, J.; COCERO, M. J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J. L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ROCHE, A.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; MARTÍ, J. I.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J. F.; BONASTRE, A. S.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, v.1, p. 1026–1034, 2009.

GIBBS, S.; SILVA-PINTO, A. N.; MURLI, S.; HUBER, M.; HOLS, D.; PONEC, M. Epidermal growth fator and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth and differentiation. **Wound Repair and Regeneration**, v.8, p. 192–203, 2000.

GOISSIS, M. D.; CAETANO, H. V. A.; MARQUES, M. G.; DE BARROS, F. R. O.; FEITOSA, W. B.; MILAZZOTTO, M. P.; BINELLI, N.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. Effects of serum deprivation and cycloheximide on cell cycle of low and high passage porcine fetal fibroblasts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 660–663, 2007.

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

HAN, Z. M.; CHEN, D. Y.; LI, J. S.; SUN, Q. Y.; WANG, P. Y.; DU, J.; ZHANG, H. M. Flow cytometric cell-cycle analysis of cultured fibroblasts from the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca* L. **Cell Biology International**, v.27, p. 349–353, 2003.

HOSOKAWA, M.;FIJISAWA, H.; BING-HUA, Z.; JUJO, H.; HIGUCHI, K. *In vitro* study of the mechanisms of senescence acceleration. **Experimental Gerontology**, v.32, p. 197–203, 1997.

HUDSON, L.G.; MCCAWLEY, L. J. Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. **Microscopy Research and Technique**, v.43,p. 444–455, 1998.

KAN, M.; YAMANE, I., In vitro proliferation and lifespan of human diploid fibroblasts in serum-free BSA-containing medium. **Journal of Cellular Physiology**, v. 111, p. 155–162, 1982.

KEUROGHLIAN, A.; ANDRADE SANTOS, M. D. C.; EATON, D. P. The effects of deforestation on white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) home range in the southern Pantanal. **Mammalia**. 2014.

KEUROGHLIAN, A.; DESBIEZ, A.; REYNA-HURTADO, R.; ALTRICHTER, M.; BECK, H.; TABER, A.; FRAGOSO, J. M. V. 2013. *Tayassu pecari*. In: (IUCN 2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. <Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T41778A44051115.en>>. Acesso em: 07 Nov. 2015.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v.68, p. 227–233, 2014.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F. J.; MORENOD, J. M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; 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.

LI, T.; LU, L. Epidermal growth factor-induced proliferation requires down-regulation of pax6 in corneal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 12988–12995, 2005.

LI, X. C.; YUE, H.; LI, C. Y.; HE, X. H.; ZHAO, Q. J.; MA, Y. H.; MA, J. Z. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Jining Black Grey goat for genetic conservation. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1, p. 17–26, 2009.

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 Reprod**, v.9, p.957, 2012.

LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, L. F.; LUZ, V. B.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, A. R. Short-term preservation of Pecari tajacu ovarian preantral follicles using phosphate buffered saline (PBS) or powdered coconut water ACP(r) media. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1623–1630, 2014.

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

LIU, C. Q.; Guo, Y.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Mongolian sheep. **Animal Science Journal**, v. 82, p. 215–222, 2011.

LIU, C.; GUO, Y.; GUAN, W.; MA, Y.; ZHANG, H.H.; TANG, X. Establishment and biological characteristics of Luxi cattle fibroblast bank. **Tissue and Cell**, v.40, p. 417–424, 2008.

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.

MAGALHÃES, R.; NUGRAHA, B.; PERVAIZ, S.; YU, H.; KULESHOVA, L. L. Influence of cell culture configuration on the post-cryopreservation viability of primary rat hepatocytes. **Biomaterials**, v. 33, p. 829–836, 2012.

MAHESH, Y.; RAO, B. S.; KATARI, V. C.; KOMJETI, S.; CHRISTO, D.; LAKSHMIKANTAN, U.; SHIVAJI, S. Cell Cycle synchronization of Bison (*Bos Gaurus*) fibroblasts derived from ear piece collected *post-mortem*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p. 799–805, 2012.

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.

NA, R. S.; ZHAO, Q. J.; SU, X. H.; CHEN, X. W.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Establishment and biological characteristics of Ujumqin sheep fibroblast line. **Cytotechnology**, v.62, p. 43–52, 2010.

PEREIRA, A. F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K. C.; CARNEIRO, I. S.; AVELARA, S. R. G.; ALCÂNTARA NETO, A. S.; SOUSA, F. C.; MELO, C. H. S.; MOURA, R. R.; TEIXEIRA, D. I. A.; BERTOLINI, L. R.; FREITAS, V. J. F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the *in vitro* production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, v. 109, p.163–172, 2013.

PIOVEZAN, U.; CARNEIRO, P. C. F.; MAUÉS, M. S.; PAIVA, S. R.; ALENCAR, J. R. M.; ALBUQUERQUE, N. I.; MARQUES, J. R. F.; PEREIRA, F. M.; PINHEIRO, S. M.; RESENDE, E. K. Rede de recursos genéticos animais da Embrapa: espécies nativas com potencial econômico. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/936036/1/10.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

ROTH, V. 2006. Disponível em <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>. Acesso em: 14 mai. 2015.

SHI, J.; ZHOU, R.; LUO, L.; MAI, R.; ZENG, H.; XIAOYAN, H.; LIU, D.; ZENG, F.; CAI, G.; JI, H.; TANG, F.; WANG, Q.; WU, Z.; LI, Z. Influence of embryo handling and transfer method on pig cloning efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.154, p. 21–127, 2015.

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

SINGH, M.; MA, X. L. In vitro culture of fibroblast-like cells from sheep ear skin stored at 25–26° C for 10 days after animal death. **International Journal of Biology**, v. 6, p. 96–102, 2014.

SINGH, M.; MA, X. L.; AMOAH, E.; KANNAN, G. In vitro culture of fibroblast-like cells from postmortem skin of Katahdin sheep stored at 4 C for different time intervals. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 47, p. 290–293, 2011.

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Use of *Aloe vera*-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1432–1438, 2016.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, Appendix 3: Appendix 3B. 2001.

URIO, M.; DUARTE, C. R. A.; FLEITH, R. C.; MUNHOZ, M. L.; ZAGO, F. C.; FORELL, F.; MEZZALIRA, A.; BERTOLINI, M.; COSTA, U. M. Cryopreservation of somatic cells in 0.5 mL or 0.25 mL straws and propylene glycol or ethylene glycol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 454, 2011.

WU, H. M.; GUAN, W. J.; LI, H.; MA, Y. H. Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. **Cell Biology International**, v.32, p. 1478–1485, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Portanto, todas as informações obtidas na presente pesquisa, proporcionarão uma maior facilidade para se estabelecer células viáveis da espécie em questão, visando sua posterior utilização para a criopreservação celular, e TNCS, as quais podem ser aplicada na multiplicação de animais silvestres com valor zootécnico. Finalmente, as condições estabelecidas podem servir como parâmetro inicial para o cultivo de células somáticas de outras espécies próximas filogeneticamente, como o *Tayassu pecari* Link, 1795 e o *Catagonus wagneri* Rusconi, 1930.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DERIVADAS DE PELE EM MAMÍFEROS SILVESTRES – ESTADO DA ARTE À REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL 17 – MAR – 2016

----- Mensagem encaminhada -----

De: RBRA <rbra@cbra.org.br>

Data: 17 de março de 2016 13:10

Assunto: RES: Submissão de artigo de revisão Santos et al.

Para: Alexsandra Fernandes Pereira <alexsandra.pereira@ufersa.edu.br>

Prezado(a) Autor(a). Dra. Alexsandra Fernandes Pereira,

Recebemos o manuscrito “Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos silvestres – estado da arte – RB601”, submetido à Revista Brasileira de Reprodução Animal. O trabalho será enviado para a análise do Corpo Editorial e faremos contato tão logo tenhamos uma posição sobre a situação corrente do mesmo.

Atenciosamente,

Secretaria das Publicações/RBRA/

ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: *IN VITRO* CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM EAR TISSUE OF COLLARED PECCARY (*PECARI TAJACU* LINNAEUS, 1758) IN MEDIUM WITH DIFFERENT REQUIREMENTS À REVISTA CYTOTHECNOLOGY 01 – MAR – 2016

01/03/2016

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)

[Fechar](#)

De: **Cytotechnology (CYTO)** (em@editorialmanager.com)

Enviada: terça-feira, 1 de março de 2016 21:11:07

Para: **Magda Lorena Turbano dos Santos** (magdalorena_2@hotmail.com)

Re: "In vitro culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements"

Full author list: Magda Lorena Turbano dos Santos, Gratuated; Alana Azevedo Borges, Gratuated; Luiza Bento de Queiroz Neta, Gratuated; Maria Valéria de Oliveira Santos, Gratuated; Moacir Franco de Oliveira, Doctor; Alexandre Rodrigues Silva, Doctor; Aleksandra Fernandes Pereira, Ph.D

Dear Mrs dos Santos,

We have received the submission entitled: "In vitro culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements" for possible publication in Cytotechnology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Aleksandra Fernandes Pereira who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Cytotechnology