



Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos silvestres - estado da arte *In vitro culture of wild mammals skin derived cells - state of art*

M.L.T. Santos, A.A. Borges, M.V.O. Santos, L.B. Queiroz Neta, M.F. Oliveira, A.R. Silva,
A.F. Pereira¹

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

¹Correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

O cultivo de células somáticas derivadas da pele consiste numa técnica de relevante aplicabilidade, tanto para a investigação básica quanto para o uso em biotécnicas reprodutivas. Além disso, o cultivo de células da pele derivadas de mamíferos silvestres tem sido uma etapa interessante na formação 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: biobanco, células somáticas, conservação.

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 culture derived from wild mammals has been an interesting step to build a cryobank, aimed at preserving genetic biodiversity. Thus, 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 showing the progress in some species.

Keywords: biobank, conservation, somatic cells.

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 de espécies, 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, pode auxiliar no processo de proliferação de uma população por meio 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 aqueles desenvolvidos por Harrison (1908), cultivando células embrionárias em anfíbios. Posteriormente, com o aprimoramento das condições assépticas de manipulação, formulação de meios adequados 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 estudos 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 ao uso em TNCS. No mesmo ano, o cultivo com células da pele de gato-silvestre-africano (*Felis silvestris lybica*) foi realizado, objetivando a TNCS e tendo como base 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, no goral-himalaio (*Naemorhedus goral*; Hashem et al., 2006), no veado-vermelho (*Cervus elaphus*; Berg et al., 2007) e no tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*; Song et al., 2007). Outros exemplos interessantes do emprego de células somáticas na obtenção de crias clones puderam ser evidenciados em mamíferos silvestres. Em 2001, Loi et al. obtiveram uma cria normal após procedimentos de TNCS usando citoplastos derivados de ovinos domésticos e carioplastos do *Ovis orientalis musimon*. Já em 2007, Kim et al. produziram dois indivíduos *Canis lupus*, indicando a clonagem como uma ferramenta apropriada na conservação de espécies em vias de extinção. Finalmente, em 2009, Folch et al. produziram o primeiro clone de uma subespécie extinta, a *Capra pyrenaica pyrenaica*.

Posteriormente, estudos de células da pele de mamíferos silvestres voltaram-se principalmente para o



estabelecimento e a conservação de criobancos (Santymire, 2016), além de estabelecer parâmetros básicos celulares para cada espécie, auxiliando na TNCS. Dessa maneira, esta revisão apresenta como propósito discriminar os progressos técnicos alcançados no cultivo de células somáticas em mamíferos silvestres.

Aspectos técnicos da obtenção, do cultivo e das 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 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. 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 acrescidos de antibióticos e antimicóticos (Guan et al., 2010; Borges et al., 2015).

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 (*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, como ocorre para a colheita de fragmentos de pele de *H. biculcus*, uma espécie silvestre nativa do Chile (Tovar et al., 2008).

Após a obtenção dos fragmentos, estes são colocados em placas contendo meio e incubados em condições de temperatura e umidade adequadas (5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37-39°C). A partir de então, as células são monitoradas a cada 24 ou 48h, a fim de ser observada a confluência celular e o consumo de meio (León-Quinto et al., 2014). Ao atingir uma confluência, realiza-se o subcultivo (Song et al., 2007; Guan et al., 2010). Após o estabelecimento e a formação do banco de células, estas podem ser utilizadas para TNCS para a conservação (Folch et al., 2009) ou o estudo dos mecanismos genéticos entre espécies domésticas e silvestres (Dong et al., 2015). Para ambas as situações, células recuperadas podem ser criopreservadas por congelamento lento, usando crioprotetores como dimetilsulfóxido a 10% sozinho ou em associação com sacarose a 0,1M ou 0,2M (León-Quinto et al., 2014). Em *P. tigris tigris*, a viabilidade das células não foi afetada após a criopreservação, apresentando valores de 97,6 e 95,7%, antes e após a congelamento (Guan et al., 2010).

Meios e suplementações usados no cultivo de células somáticas

A escolha do meio de cultivo é extremamente relevante, afetando significativamente o sucesso da proliferação celular. 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.

Independentemente 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 semissintéticos, com vitaminas, sais minerais, proteínas do soro, carboidratos e cofatores, são aplicados (Tab. 1).

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

Espécie	Origem	Tipo celular	Finalidade	Meio base, SFB	Referência
<i>Bubalus arnee</i>	Adulta	Célula epitelial	TNCS	DMEM, 20% SFB	Saini et al., 2015
<i>Canis lupus</i>	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM 10% SFB	Oh et al., 2008
<i>Cervus elaphus</i>	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Berg et al., 2007
<i>Felis silvestris lybica</i>	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Gómez et al., 2003
<i>Mustela putorius furos</i>	Fetal	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Li et al., 2003
<i>Naemorhedus goral</i>	Adulta	Fibroblasto	Ciclo celular	DMEM, 10% SFB	Hashem et al., 2006
<i>Pecari tajacu</i>	Adulta	Célula epitelial	Criopreservação	DMEM, 10% SFB	Borges et al., 2015
<i>Panthera tigris</i>	Adulta	Fibroblasto	TNCS	DMEM, 10% SFB	Song et al., 2007
<i>Lynx pardinus</i>	Fetal/Adulta	Fibroblasto	Caracterização	DMEM, 15% SFB	León-Quinto et al., 2011, 2014
<i>Panthera tigris tigris</i>	Adulta	Fibroblasto	Criopreservação	DMEM, 10% SFB	Guan et al., 2010
<i>Rhyncholestes raphanurus</i> ; <i>Oncifelis guigna</i>	Adulta	Fibroblasto	Biobanco	DMEM, 30% SFB	Tovar et al., 2008



Os aminoácidos essenciais, como a glutamina, devem ser adicionados ao meio de cultivo de células da pele a fim de fornecer energia para o metabolismo secundário (Li et al., 2003), e os aminoácidos não essenciais também podem ser acrescentados ao meio (Kim et al., 2007).

Já os carboidratos sob a forma de açúcares são a principal fonte de energia, dentre os quais, a glicose é um dos mais empregados (León-Quinto et al., 2014). Além disso, como fontes proteicas mais presentes, têm-se a albumina, a transferrina e a fibronectina (Brunner et al., 2010). Finalmente, em relação às vitaminas, estas são adicionadas ao meio, promovendo crescimento e proliferação celular.

Contudo, para manter as condições ótimas de cultivo, faz-se necessária a manutenção do pH a partir de tamponantes. Nesse processo, podem ser utilizadas 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 (NaHCO₃), 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-piperazino)etanossulfônico) 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, fatores de crescimento, citocinas, ácidos graxos, lipídeos, vitaminas, carboidratos e nitrogênio de origem não proteica (Brunner et al., 2010). Contudo, a concentração de cada componente não é definida, uma vez que ela varia dependendo do lote em que o soro foi produzido.

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*; León-Quinto et al., 2011), de 20% também em búfalo-d'água-selvagem (*Bubalus arnee*; Saini et al., 2015) e de 30% em espécies nativas do Chile (Tovar et al., 2008). Concentrações superiores a 20% podem conter variações nas proporções dos componentes e diferentes quantidades de endotoxinas e hemoglobina (Brunner et al., 2010).

Um estudo interessante na investigação de requerimentos do cultivo *in vitro* de explantes auriculares de pele foi realizado em *L. pardinus* (León-Quinto et al., 2011). Nesse trabalho, os autores testaram duas diferentes estratégias de cultivo celular (explantes não tratados e tratados com colagenase) e várias combinações de suplementações (SFB, glicose, fator de crescimento epidermal, EGF, e fator de crescimento de fibroblastos, FGF), verificando que o SFB a 15%, a glicose a 4,5 g/L e o EGF a 10 ng/mL podem ser empregados no cultivo *in vitro* de explantes não tratados.

Análise das células somáticas em cultivo

Várias ferramentas podem ser empregadas para avaliar o cultivo de células somáticas, desde características morfológicas à 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-se 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-se, 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 se 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 cinco 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-se o crescimento de cinco-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. Esse processo pode ser realizado de quatro a 11 dias, dependendo das condições em que as células se encontram (Singh e 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 17,2h a partir da fase exponencial de crescimento celular (Song et al., 2007). Já no *L. pardinus*, constatou-se 5,2h como melhor valor de duplicação da população de células derivadas do tecido auricular (León-Quinto et al., 2011). Ainda, Guan et al. (2010), ao cultivarem células do tecido auricular de *P. tigris tigris*, observaram um PDT de 28h.

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



Outra metodologia consiste no ensaio da mensuração de desidrogenase mitocondrial (MTT; brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio), em que a funcionalidade das células viáveis pode ser mensurada (León-Quinto et al., 2014) e ele pode ser aplicado 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 a criação de biobancos, a análise citogenética também é bastante empregada, avaliando-se principalmente até quantas passagens as células podem ser submetidas sem sofrer alterações genéticas significativas (Song et al., 2007).

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 por meio 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.

Referências

- Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B.** Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol Reprod*, v.77, p.384-394, 2007.
- Borges AA, Queiroz Neta LQ, Santos MVO, Santos MLT, Lima GL, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Isolation of somatic cell derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) submitted to different vitrification techniques. *Anim Reprod*, v.12, p.842, 2015. Abstract.
- 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.
- Chan LLY, Kuksin D, Laverty DJ, Saldi S, Qiu J.** Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology*, v.67, p.461-473, 2015.
- Chen JX, Rong XZ, Fan GC, Li SZ, Li QH.** Effects of different concentrations of putrescine on proliferation, migration and apoptosis of human skin fibroblasts[in Chinese]. *J Southern Med Univ*, v.35, p.758-762, 2015.
- 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. *Life Sci*, v.42, p.346-353, 1999.
- 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, Kijas JW, Salekdeh GH, 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.
- Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Vignon X.** First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v.71, p.1026-1034, 2009.
- Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE.** Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod*, v.69, p.1032-1041, 2003.
- Guan WJ, Liu CQ, Li CY, Liu D, Zhang WX, Ma YH.** Establishment and cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). *Cryo Letters*, v.31, p.130-138, 2010.
- Han ZM, Chen DY, Li JS, Sun QY, Wang PY, Du J, Zhang HM.** Flow cytometric cell-cycle analysis of cultured fibroblasts from the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca* L. *Cell Biol Int*, v.27, p.349-353, 2003.
- Harrison RG.** Embryonic transplantation and development of the nervous system. *Anat Rec*, v.2, p.385-410, 1908.
- Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, Lee BC, Suk HW.** Cell cycle analysis of *in vitro* cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. *Cell Biol Int*, v.30, p.698-703, 2006.
- Hu PF, Guan WJ, Li XC, Zhang WX, Li CL, Ma YH.** Study on characteristics of *in vitro* culture and intracellular transduction of exogenous proteins in fibroblast cell line of Liaoning Cashmere goat. *Mol Biol Rep*, v.40, p.327-336, 2013.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.130-137, 2007.
- 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, Simón MA, Sánchez Á, Martín F, Soria B.** Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology*, v.62, p.145-151, 2011.
- Li Z, Sabet MR, Zhou Q, Liu X, Ding W, Zhang Y, Renard JP, Engelhardt JF.** Developmental capacity of ferret embryos by nuclear transfer using G0/G1-phase fetal fibroblasts. *Biol Reprod*, v.68, p.2297-2303, 2003.
- 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 JL, Chen YC, Sun QY, Song XF, Chen DY.** Culture of skeletal muscular cells from giant Panda. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.35, p.553-554, 1999.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M.** Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.19, p.962-964, 2001.
- Men H, Walters EM, Nagashima H, Prather RS.** 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 HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC.** Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected post-mortem. *Theriogenology*, v.70, p.638-647, 2008.
- Saini M, Selokar NL, Raja AK, Sahare AA, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS, 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*). *Reprod Fertil Dev*, 2016. doi: 10.1071/RD15461.
- Seo JM, Sohn MY, Suh JS, Atala A, Yoo JJ, Shon YH.** 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. *Exp Biol Med*, v.130, p.305-310, 1969.
- Silvestre MA, Saeed AM, Cervera RP, Escriba MJ, 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.** *In vitro* culture of fibroblast-like cells from sheep ear skin stored at 25-26°C for 10 days after animal death. *Int J Biol*, v.6, p.96-102, 2014.
- Song J, Hua S, Song K, Zhang Y.** Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.43, p.203-209, 2007.
- Tovar, H, Navarrete, F, Rodríguez, L, Skewes, O, Castro, FO.** Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.44, p.309-320, 2008.
- Xia Z, Xin D, Murray D, Triffitt JT, Price AJ.** A method of isolating viable chondrocytes with proliferative capacity from cryopreserved human articular cartilage. *Cell Tissue Bank*, v.14, p.267-276, 2013.
-