



Estado atual da conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados da pele em mamíferos *Current status of conservation at 4°C of somatic tissues derived from the skin in mammals*

Luiza Bento de Queiroz Neta, Érika Almeida Praxedes, Maria Valéria de Oliveira Santos,
Alana Azevedo Borges, Alexandra Fernandes Pereira¹

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

¹Correspondência alexandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

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

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

Abstract

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

Keywords: somatic cells, postmortem recovery, cloning.

Introdução

Dentre as estratégias de conservação a serem empregadas para a manutenção e multiplicação das espécies, o emprego de amostras teciduais tem se destacado como uma ferramenta imediata de estocagem do material genético (Pereira et al., 2016). Além disso, o armazenamento de tecidos somáticos, especialmente derivados da pele, representa uma importante alternativa para a conservação de uma maior representação populacional das espécies, não existindo dependência de idade ou gênero (Pereira et al., 2016). Em geral, células recuperadas de tecidos somáticos podem ser usadas para diferentes finalidades, como produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (Wani; Hong, 2018), formação de criobancos (Caamaño et al., 2008) e pesquisas de pluripotencialidade (Verma et al., 2012).

Para todas essas finalidades, técnicas de conservação de tecidos somáticos têm sido empregadas em mamíferos, como a criopreservação por congelamento lento (Caamaño et al., 2008), por vitrificação (Borges et al., 2017b) e a refrigeração a 4°C (Tovar et al., 2008). Esta última técnica tem sido empregada especialmente para o transporte ou conservação em curto prazo de tecidos somáticos de indivíduos localizados em regiões de difícil acesso ou distantes dos laboratórios especializados (Queiroz Neta et al., 2018). Além disso, esse tipo de conservação é bastante empregado em virtude de sua simplicidade, eficiência e disponibilidade, já que não envolve o uso de materiais mais complexos e de alto custo (Silvestre et al., 2003).

Contudo, o emprego desta técnica depende de alguns fatores, como o período e as condições de armazenamento das amostras teciduais, os quais podem influenciar na recuperação das células após cultivo *in vitro* dos tecidos (Aoued e Singh, 2015). Em mamíferos domésticos, estudos têm mostrado variações quanto ao período de estocagem e a presença de meio nutritivo em diferentes espécies, como suínos (Ge et al., 2010) e caprinos (Okonkwo e Singh, 2014). Em mamíferos silvestres, pesquisas relacionadas ao conhecimento dos



fatores que influenciam no sucesso da técnica ainda são escassos.

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

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

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

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

Período de armazenamento

O período de armazenamento consiste num fator importante para a conservação eficiente das amostras somáticas da espécie de interesse (Praxedes et al., 2018) e possui variáveis períodos de acordo com a espécie e sua localização (Tovar et al., 2008). Em mamíferos domésticos (Tab. 1), diferentes períodos já foram apresentados em algumas espécies de produção. Em suínos, Silvestre et al. (2003) verificaram que tecidos somáticos da pele quando conservados a 4°C por até 10 dias mantinham a viabilidade celular após cultivo. Já Singh e Ma (2016) armazenaram amostras refrigeradas de ovinos por 65 dias e obtiveram células viáveis e geneticamente estáveis. Contudo, os mesmos autores não obtiveram células quando os explantes foram refrigerados por 70 dias.

Em geral, o período de armazenamento pode afetar a qualidade das células (Kim et al., 2014), bem como a capacidade de crescimento celular a partir dos explantes aderidos (Queiroz Neta et al., 2018). Kim et al. (2014) observaram que a taxa de proliferação de células oriundas de tecido cartilaginoso humano foi comprometida após sete dias de estocagem. Além disso, Birdsill et al. (2014) cultivando tecido cerebral humano, verificaram que o RNA foi degradado progressivamente com o aumento do período de armazenamento em sistema refrigerado, reduzindo a proporção de expressão gênica e confluência celular. Ainda, em tecidos da pele humana esse tempo também afetou a integridade morfológica dos tecidos pela presença de vacúolos (Gaucher et al., 2012). Portanto, o período de estocagem é estabelecido de acordo com a espécie de interesse e sua localização, podendo variar em média de uma a 65 h.

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

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



Uso de meio nutritivo para a conservação em sistema refrigerado

A conservação de tecidos somáticos a 4°C pode ser realizada tanto na ausência (Silvestre et al., 2003) quanto na presença de meio nutritivo (Aoued e Singh, 2015). Em geral, condições de refrigeração na ausência de meio são estabelecidas visando conhecer a resistência do tecido em situações onde não há uma mínima condição de manipulação do armazenamento das amostras (Queiroz Neta et al., 2018).

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

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

Assim, meios nutritivos durante a conservação a 4°C de tecidos somáticos podem auxiliar a neutralizar o efeito negativo das flutuações de pH e toxina, atuando na sobrevivência das células presentes nos tecidos por mais tempo. Adicionalmente, dependendo da composição desses meios, os mesmos podem conter agentes antioxidantes, como a vitamina E, e outros antioxidantes presentes no próprio SFB que atuam em conjunto com componentes endógenos das células neutralizando as injúrias geradas pelo estresse oxidativo (Aoued e Singh, 2015).

Além disso, o uso de meios nutritivos durante a conservação por longos períodos permite atrasar os danos gerados pela isquemia (Guibert et al., 2011). Brevemente, quando o fluxo sanguíneo é rompido ou restrito, tanto glicose quanto oxigênio tornam-se reduzidos e, até mesmo, consumidos, levando as células a alterar seu metabolismo, assumindo um metabolismo anaeróbico e menos eficiente de energia. Ainda, ao longo do período de conservação, esses processos resultam em um déficit de oxigênio nas células com um acúmulo de metabólitos, como ácido láctico que conduzem a alterações do pH celular. Todas essas alterações finalizam com funções alteradas de enzimas e bombas de membranas mitocondriais e plasmáticas (Guibert et al., 2011). Adicionalmente, mudanças do quantitativo de eletrólitos causam injúrias no equilíbrio osmótico, podendo resultar na ruptura celular e, na ativação dos mecanismos de morte celular.

Finalmente, a presença de um meio nutritivo adequado poderá atuar reduzindo ou atrasando esses efeitos, fazendo os tecidos e células manterem sua atividade metabólica e viabilidade adequada. Em geral, sugere-se o uso de meio nutritivo na estocagem de amostras somáticas em sistema refrigerado por longos períodos.

Ferramentas de avaliação de tecidos somáticos refrigerados

Durante a conservação a 4°C, células e tecidos somáticos sofrem uma redução de seu metabolismo, retardando alguns processos degenerativos gerados pelas temperaturas hipotérmicas. Nesse sentido, após o período de conservação, faz-se necessário avaliar o grau de preservação dos tecidos usando diferentes ferramentas que evidenciem as características morfológicas (Ibrahim et al., 2018), atividades proliferativas e metabólicas (Boekema et al., 2015) e viabilidade das células após cultivo *in vitro* (Aoued e Singh, 2015).

Entre as ferramentas que podem ser empregadas para avaliar o grau de comprometimento da qualidade dos tecidos refrigerados, têm-se a análise histológica usando diferentes colorações (Castagnoli et al., 2003) e o cultivo dos fragmentos teciduais (Queiroz Neta et al., 2018).

Caracterização histológica da pele

Castagnoli et al. (2003) enfatizaram a importância das análises histológicas na avaliação da integridade morfológica do tecido após a conservação a temperaturas hipotérmicas. Dentre as colorações histológicas que podem ser empregadas têm-se a hematoxilina-eosina (Boekema et al., 2015) e a marcação da região argirofílica organizadora nucleolar (AgNOR) (Queiroz Neta et al., 2018). Entre os efeitos que podem ser identificados por essas análises têm-se a presença de vacúolos, halos perinucleares (Boekema et al., 2015) e demais alterações morfológicas (Gaucher et al., 2012).

Na conservação a 4°C de tecidos somáticos derivados de pele humana com diferentes meios nutritivos, Boekema et al. (2015) utilizando hematoxilina-eosina, quantificaram halos perinucleares na epiderme. Esses halos consistem em estruturas sinalizadoras do início da apoptose, sendo formados quando o núcleo é separado



do citoplasma. Além disso, usando ainda a hematoxilina-eosina, é possível também quantificar o número de fibroblastos da derme e mensurar os efeitos gerados na espessura da epiderme e derme (Borges et al., 2017a).

Já por AgNOR é possível identificar danos gerados na atividade proliferativa das células (Borges et al. 2017a). Essa metodologia baseia-se na ligação do reagente prata coloidal às proteínas ácidas, não histônicas, associadas às regiões organizadoras de nucléolos. Na marcação, o nitrato de prata marca as proteínas específicas ligadas à transcrição das regiões organizadoras de nucléolos, denominadas de proteínas argirofílicas nucleolares, podendo ser visualizadas como pontos escurecidos no núcleo celular (Queiroz Neta et al., 2018). Logo, quanto mais regiões organizadoras de nucléolos são marcadas, maior será a atividade proliferativa daquele tipo celular (Borges et al., 2017a). Portanto, as regiões organizadoras de nucléolos estão diretamente relacionadas com a atividade proliferativa das células, podendo assim indicar a atividade proliferativa das amostras teciduais.

Caracterização das células durante o cultivo in vitro

Estudos anteriores têm demonstrado que a conservação a 4°C de tecidos somáticos pode interferir na capacidade de aderência, confluência, atividade proliferativa e metabólica das células recuperadas desses tecidos e cultivadas *in vitro* (Silvestre et al., 2003; Queiroz Neta et al., 2018). Em ovinos, Singh e Ma (2016) não observaram crescimento de células após 70 dias dos tecidos refrigerados. Contudo, até 65 dias de estocagem foi possível obter células estáveis com morfologia normal e similar às células derivadas de tecidos não refrigerados.

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

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

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

Ainda sobre ferramentas usadas na avaliação da qualidade dos tecidos somáticos refrigerados, tem-se o uso do ensaio colorimétrico brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Santos et al., 2015), o qual é empregado para análise da atividade metabólica das células. Brevemente, o ensaio de MTT foi desenvolvido como uma metodologia simples, rápida, precisa e de baixo custo para avaliação da citotoxicidade e atividade proliferativa de células cultivadas *in vitro*. Além disso, o MTT também pode ser empregado tanto nas células em cultivo, quanto diretamente nos tecidos (Ge et al., 2010).

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

Considerações finais

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



Referências

- Ackers JP.** Biopreservation of cells and engineered tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v.103, p.157-187, 2006.
- Aoued HS, Singh M.** Recovery of fibroblast-like cells after 160 days of postmortem storage of goat skin tissues in refrigerated media. *J Vet Sci Techn*, v.6, p.1-5, 2015.
- Basaran O, Ozdemir H, Kut A, Sahin FI, Deniz M, Sakallioğlu EA, Haberal MA.** Effects of different preservation solutions on skin graft epidermal cell viability and graft performance in a rat model. *Burns*, v.32, p.423-429, 2006.
- Baust JM, Corwin WL, Vanbuskirk R, Baust JG.** Biobanking: the future of cell preservation strategies. In: *Biobanking in the 21st Century*. Springer International Publishing, 864p., 2015.
- Birdsill AC, Walker DG, Lue L, Sue LI, Beach TG.** *Postmortem* interval effect on RNA and gene expression in human brain tissue. *Cell Tissue Bank*, v.12, p.311-318, 2011.
- Boekema BKHL, Boekestijn B, Breederveld RS.** Evaluation of saline, RPMI and DMEM/F12 for storage of split-thickness skin grafts. *Burns*, v.41, p.848-852, 2015.
- Borges AA, Bezerra FVF, Costa FN, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Histomorphological characterization of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) ear integumentary system. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.69, p.948-954, 2017a.
- Borges AA, Lima GL, Queiroz Neta LB, Santos MV, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*, v.69, p.643-654, 2017b.
- Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreserv Biobank*, v.16, p.77-81, 2018.
- Brockbank K, Taylor M.** Tissue preservation. In: *Advances in Biopreservation*. CRC press Taylor; Francis Group, Boca Raton, p.157-191, 2006.
- Caamaño JN, Rodríguez A, Muñoz M, De Frutos C, Díez C, Gómez E.** Cryopreservation of Brown bear skin biopsies. *Cell Preserv Technol*, v.6, p.83-86, 2008.
- Caputcu AT, Akkoc T, Cetinkaya G, Arat S.** Tissue cryobanking for conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. *Cell Tissue Bank*, v.14, p.1-10, 2013.
- Castagnoli C, Alotto D, Cambieri I, Casimiri R, Aluffi M, Stella M, Alasia ST, Magliacani G.** Evaluation of donor skin viability: fresh and cryopreserved skin using tetrazolium salt assay. *Burns*, v.29, p.759-767, 2003.
- Gaucher S, Elie C, Vérola O, Jarraya M.** Viability of cryopreserved human skin allografts: effects of transport media and cryoprotectant. *Cell Tissue Bank*, v.13, p. 147-155, 2012.
- Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, Xiong F, Wu J, Wei H.** The viability change of pig skin *in vitro*. *Burns*, v.36, p.533-538, 2010.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ.** Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transf Med Hemoter*, v.38, p.125-142, 2011.
- Ibrahim SM, Kareem OH, Saffahah KM, Adamu AA, Khan MS, Rahman MBA, Noordin MM, Loqman MY.** Histological and mechanical evaluation of antifreeze peptide (Afp1m) cryopreserved skin grafts post transplantation in a rat model. *Cryobiology*, v.82, p.27-36, 2018.
- Kim BY, Nam BM, Lee KM, Jo YH, Nemenko JG, Yang W, Lee S, Kim H, Jang IJ, Takebe, T.; Lee, J.I.** Effect of preservation conditions on cartilage tissue for cell transplantation. *Transplant Proc*, v.46, p.1139-1144, 2014.
- Okonkwo C, Singh M.** Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up to 41 d of animal death. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.51, p.463-469, 2014.
- Pereira AF, Silva AR, Lima GL, Silva AM.** Somatic and gonadal tissue cryopreservation – an alternative tool for the germplasm conservation in wild mammals. In: *Germplasm: Characteristics, Diversity and Preservation*. Nova Science Publishers, New York, p. 80-117, 2016.
- Praxedes EA, Borges AA, Santos MVO, Pereira AF.** Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biol*, v.37, p.258-263, 2018.
- Queiroz Neta LB, Lira GPO, Borges AA, Santos MVO, Silva MB, Oliveira LRM, Silva AR, Oliveira MF, Pereira AF.** Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal*, v.5, p.486-495, 2018.
- Santos MLT, Borges AA, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Cultivo *in vitro* de células derivadas de pele em mamíferos silvestres - estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.382-386, 2015.
- Silvestre MA, Saeed AM, Cervera RP, Escrivá 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.
- Silvestre MA, Sánchez JP, Gómez EA.** Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear



extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Theriogenology*, v.49, p.221-229, 2004.

Singh M, Ma X. Recovery of fibroblast cells up to 65 d of postmortem storage of sheep ear skin at 4°C. *J Anim Sci*, v.94, p.837-838, 2016.

Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77, p.220-228, 2012.

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.

Walcott B, Singh M. Recovery of proliferative cells up to 15-and 49-day postmortem from bovine skin stored at 25°C and 4°C, respectively. *Cogent Biol*, v.3, p.1-9, 2017.

Wani NA, Hong SB. Source, treatment and type of nuclear donor cells influences *in vitro* and *in vivo* development of embryos cloned by somatic cell nuclear transfer in camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, v.106, p.186-191, 2018.
