



Uso de bancos somáticos visando a clonagem por transferência nuclear na conservação de mamíferos silvestres – uma revisão

Use of somatic banks for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals – a review

Alexsandra Fernandes Pereira^{1,‡}, Alana Azevedo Borges¹, Érika Almeida Praxedes¹, Alexandre Rodrigues Silva²

¹Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Ufersa, Mossoró, RN, Brasil.

²Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Ufersa, Mossoró, RN, Brasil.

Resumo

Embora amostras gonadais e embriões sejam os bancos biológicos de primeira escolha para o desenvolvimento de estratégias *in vitro* de conservação, células e tecidos somáticos têm surgido como interessantes alternativas, especialmente para a conservação de mamíferos silvestres criticamente ameaçados de extinção. Assim, para a multiplicação destas espécies, bancos somáticos têm sido empregados como fonte de carioplasto na clonagem por transferência nuclear de células somáticas, em pesquisas voltadas para a reprogramação nuclear e obtenção de células induzidas à pluripotência. Nesse sentido, para atender a essas finalidades, é necessário inicialmente conhecer as condições adequadas de criopreservação e manipulação desses tecidos e células, visando a manutenção adequada de todas as características biológicas importantes para o estabelecimento das posteriores biotecnologias. Assim, o objetivo desta revisão é conceituar e apresentar as principais etapas técnicas fundamentais no estabelecimento da criopreservação e manipulação *in vitro* de células e tecidos somáticos, visando o emprego promissor e adequado destes recursos biológicos na conservação de mamíferos silvestres.

Palavras-chave: biotecnologia, carioplasto, criopreservação, ferramentas de conservação, reprogramação nuclear.

Abstract

Although gonadal samples and embryos are the first-choice biological banks for the development of in vitro conservation strategies, somatic cells and tissues have emerged as interesting alternatives, especially for the conservation of wild mammals critically endangered. Thus, for the multiplication of these species, somatic banks have been used as karyoplast source in the cloning by somatic cell nuclear transfer, in research aimed at nuclear reprogramming and obtaining cells induced by pluripotency. In this sense, in order to meet these purposes, it is necessary to initially know the proper conditions for cryopreservation and manipulation of these tissues and cells, aiming at the adequate maintenance of all biological characteristics for the establishment of subsequent biotechnologies. Thus, the aim of this review is to conceptualize and present the crucial technical steps in the establishment of cryopreservation and in vitro manipulation of somatic tissues and cells, aiming at the promising and adequate use of these biological resources in the conservation of wild mammals.

Keywords: biotechnology, karyoplast, cryopreservation, conservation tools, nuclear reprogramming.

Introdução

A perda da biodiversidade de mamíferos silvestres ocasionada por fatores naturais e antrópicos tem resultado no aumento de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de estratégias de conservação (Silva et al., 2016; Comizzoli, 2017; Praxedes et al., 2018). Assim, no intuito de aumentar e manter populações de mamíferos silvestres, várias ferramentas podem ser propostas, como as técnicas *in situ* e *ex situ* (Andrabi et al., 2007). Apesar das ferramentas *in situ* aplicadas na conservação de habitats naturais sejam as ideais, as mesmas podem não ser eficientes para a propagação de pequenas populações (Caputcu et al., 2013). Nesse sentido, técnicas *ex situ*, como aquelas voltadas para a formação de bancos de recursos biológicos, têm sido empregadas, especialmente para a conservação de indivíduos ameaçados e criticamente ameaçados de extinção (Tunstall et al., 2018).

Em geral, bancos biológicos são definidos como depósitos de gametas, embriões, tecidos gonadais, células e tecidos somáticos criopreservados após a colheita e processamento (León-Quinto et al., 2009). Ainda que as amostras gonadais e embriões sejam os bancos biológicos de primeira escolha, o interesse por amostras somáticas tem aumentado nos últimos anos (Tunstall et al., 2018). Uma das razões para esse interesse consiste na colheita tecidual ser realizada em um maior número de indivíduos de uma população, não se limitando ao gênero e a idade do animal (León-Quinto et al., 2011).

Além disso, os diversos órgãos que compõem a constituição do indivíduo apresentam vários tipos celulares somáticos que podem ser utilizados para a obtenção de amostras para conservação (Santos et al., 2015). Entre os órgãos que essas amostras podem ser colhidas, a pele de diferentes regiões do animal tem sido empregada, principalmente em virtude de uma maior facilidade na colheita dos fragmentos, não sendo considerado um procedimento muito invasivo

[‡]Correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 18 de janeiro de 2019



para o animal (Santos et al., 2016). Adicionalmente, a pele é constituída por uma abundância de células de interesse para a reprogramação nuclear (Fukuda et al., 2016), produção de células induzidas à pluripotência (Verma et al., 2012) e obtenção de crias por clonagem (Wani et al., 2017).

Assim, diante da necessidade de multiplicação de mamíferos silvestres, esta revisão apresenta como propósito conceituar e apresentar as etapas técnicas cruciais no estabelecimento dos bancos de células e tecidos somáticos, objetivando o emprego nas biotecnologias de multiplicação do material biológico, especialmente a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Adicionalmente, nós apresentaremos alguns resultados obtidos pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Estabelecimento e formação de bancos de tecidos somáticos

Ainda que seja mais interessante ter os bancos de células somáticas após o cultivo dos fragmentos teciduais, algumas vezes a ausência de condições de cultivo *in vitro* inviabilizam esses bancos, resultando assim na formação daqueles voltados para os tecidos somáticos (Borges et al., 2018a,b; Queiroz Neta et al., 2018). Por essa razão, faz-se necessário o desenvolvimento dos protocolos de conservação tecidual, para que quando estes forem a última forma de conservação, a mesma seja eficiente.

Em mamíferos silvestres, três técnicas de conservação de tecidos somáticos podem ser observadas, a criopreservação por congelamento lento (Mestre-Citrinovitz et al., 2016), por vitrificação (Borges et al., 2017b) e a refrigeração a 4–6°C (Queiroz Neta et al., 2018). Esta última técnica tem sido especialmente empregada para a conservação em curto prazo de tecidos somáticos de populações localizadas em regiões de difícil acesso ou distantes dos laboratórios. Em catetos (*Pecari tajacu*), mamíferos silvestres encontrados no bioma Caatinga, e animais de estudos de nosso laboratório, foi observado que tecidos somáticos podem ser mantidos a 4–6°C por até 50 dias na presença de meio nutritivo sem afetar as características teciduais de espessura da epiderme, derme e tamanho total da pele (Queiroz Neta et al., 2018). Além disso, nós observamos que os tecidos conservados a 4–6°C por até 10 dias, independente da presença de meio nutritivo, resultaram em células mais viáveis, quando comparadas às células derivadas de tecidos conservados por 30 e 50 dias.

Contudo, as técnicas de maior interesse na formação de bancos somáticos consistem naquelas que permitem a conservação por longos períodos, ou seja, a criopreservação (Pereira et al., 2016). Os primeiros trabalhos voltados para a criopreservação de tecidos somáticos em mamíferos silvestres foram desenvolvidos por Caamaño et al. (2008) em urso pardo (*Ursus arctos*). Posteriormente, León-Quinto et al. (2009, 2011) demonstraram o papel fundamental desses bancos na conservação de material genético do lince-ibérico (*Lynx pardinus*), um felídeo silvestre criticamente ameaçado, os quais obtiveram amostras somáticas de 69 indivíduos diferentes. Adicionalmente, outros mamíferos silvestres, ameaçados ou não de extinção, tiveram seus tecidos somáticos criopreservados (Tab. 1).

Tabela 1. Estabelecimento de bancos de tecidos somáticos usando técnicas de criopreservação em alguns mamíferos silvestres.

Autores/Ano	Espécie	Objetivo do estudo	Crioprotetores	Principais conclusões
Caamaño et al., 2008	<i>Ursus arctos</i>	Comparar a congelamento lento ¹ e a vitrificação direta em criotubos ² na conservação tecidual	10% de DMSO e 10% de SFB ¹ . 20% de EG, 20% de DMSO e 20% de SFB ²	Vitrificação direta em criotubos resultou numa menor proliferação celular e maior número de dias para atingir a subconfluência, quando comparado a congelamento lento.
León-Quinto et al., 2011	<i>Lynx pardinus</i>	Comparar a influência da combinação de crioprotetores na conservação tecidual por congelamento lento	5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15% de DMSO, na ausência e presença de 0,1 M ou 0,2 M de sacarose	Combinação de 10% de DMSO associado à sacarose em ambas as concentrações foi mais eficiente na criopreservação tecidual, quando comparado às demais associações.
Mestre-Citrinovitz et al., 2016	<i>Panthera onca</i>	Descrever os aspectos de obtenção de bancos somáticos por congelamento lento	10% de DMSO	Descrição de um protocolo para obtenção de fibroblastos como modelo para espécies silvestres.
Borges et al., 2017b	<i>Pecari tajacu</i>	Comparar a vitrificação em superfície sólida e vitrificação direta em criotubos	20% de EG, 20% de DMSO, 0,25 de M de sacarose e 10% de SFB	Vitrificação em superfície sólida foi mais apropriada que a vitrificação direta em criotubos, de acordo com parâmetros histológicos e de cultivo <i>in vitro</i> .

DMSO: Dimetilsulfóxido; EG: Etilenoglicol; SFB: Soro Fetal Bovino.



Em geral, três princípios são cruciais no emprego correto de um protocolo de criopreservação de tecidos somáticos. O primeiro consiste no conhecimento morfológico do tecido, visando encontrar similaridades e diferenças entre os tecidos derivados de mamíferos silvestres e domésticos filogeneticamente mais próximos, otimizando assim as escolhas das técnicas de criopreservação (Borges et al., 2017a). Após esse conhecimento, faz-se necessário estabelecer a técnica de criopreservação a ser empregada e nesse caso estudos têm mostrado a vitrificação como metodologia promissora para essa temática (Borges et al., 2017b). Finalmente, a escolha dos crioprotetores que mais eficientemente atuam nessas técnicas consiste na última etapa no estabelecimento destes bancos (Borges et al., 2018a,b).

Assim, para exemplificar esse passo a passo no estabelecimento de bancos de tecidos somáticos, nosso grupo descreveu essas etapas em catetos. Inicialmente, nós observamos diferenças histológicas entre a pele da região auricular periférica de catetos e suínos, mamíferos domésticos filogeneticamente próximos (Borges et al., 2017a), quanto à espessura da epiderme (104,2 vs. 79,5 μ m), número de camadas da epiderme (3 vs. 5 camadas), e atividade proliferativa (2,48 vs. 1,22 número de regiões organizadoras nucleolares/célula), respectivamente. Com essas diferenças, as quais poderiam ter uma relação com a resposta do método e de penetração de crioprotetores, nós observamos que a vitrificação em superfície sólida foi mais eficiente para a conservação de fragmentos teciduais, quando comparada a vitrificação direta em criotubos (Borges et al., 2017b). Adicionalmente, usando a técnica mais eficiente, nós identificamos que a combinação de crioprotetores mais adequada para a manutenção da viabilidade das células desses fragmentos foi a associação de 3,0 M de etilenoglicol (EG), 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Borges et al., 2018a,b).

Estabelecimento, caracterização e formação de bancos de células somáticas

Independente da formação de bancos de tecidos somáticos, os bancos de células são essenciais, pois funcionam como matéria-prima de uso imediato nas biotecnologias aplicadas, especialmente como carioplastos (células doadoras de núcleo) na clonagem por TNCS (Pereira et al., 2016). Nesse sentido, células recuperadas de fragmentos teciduais não criopreservados e criopreservados são inicialmente caracterizadas quanto aos seus requerimentos nutritivos e demais condições ambientais de cultivo (Santos et al., 2015). Quanto às exigências nutritivas, células somáticas derivadas da pele têm sido cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) associado, principalmente, a SFB (Santos et al., 2016), antibióticos, glicose e fator de crescimento epidermal (León-Quinto et al., 2014).

Em geral, para o estabelecimento em si, a obtenção das células ocorre a partir de cultivos primários e subcultivos, os quais permitem que as células sejam caracterizadas quanto aos seus aspectos morfológicos, condições de crescimento, viabilidade, atividade funcional e metabólica, além da homogeneidade da população celular (Santos et al., 2015). Tais informações são essenciais na qualidade dos carioplastos, uma vez que a manipulação inadequada dessas células pode afetar a capacidade de reprogramação nuclear (Trokovic et al., 2015). Além disso, a maioria das células encontrada em cultivo de fragmentos de pele são fibroblastos (Tab. 2), e a caracterização e a confirmação de uma linhagem desse tipo celular permite a manipulação adequada dos carioplastos nas etapas subsequentes.

Entre as informações importantes no estabelecimento de uma linhagem, além da avaliação morfológica e confirmação imunocitoquímica do tipo celular, o tempo de duplicação (em inglês, *population doubling time*, PDT) das células é essencial. Em catetos e onça-pintada (*Panthera onca*), nós observamos um PDT de 16 h (Borges et al., 2017b) e 26 h (Praxedes et al., 2017), respectivamente. Além disso, a viabilidade das células (Tab. 2) analisada principalmente pelo ensaio de azul de tripan permite conhecer a qualidade celular antes e após os protocolos de criopreservação (Santos et al., 2015).

Tabela 2. Estabelecimento de bancos de células somáticas em alguns mamíferos silvestres.

Autores/Ano	Espécie	Meio de cultivo	Viabilidade antes da criopreservação	Viabilidade após a criopreservação
Fukuda et al., 2016	<i>Bubalus quarlesi</i>	DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos e antimicóticos	NI	NI
Magalhães et al., 2017	<i>Mazama gouazoubira</i>	DMEM suplementado com 10% de SFB e 2% de solução de antibióticos e antimicóticos	~95%	~80%
Sharma et al., 2018	<i>Camelus bactrianus</i>	HiFibroXL suplementado com 20% de SFB e solução de antibióticos e antimicóticos	98%	89%
Siengdee et al., 2018	<i>Elephas maximus</i>	DMEM suplementado com 20% de SFB e 2% de solução de antibióticos e antimicóticos	97,3%	95,5%

SFB: Soro Fetal Bovino; NI: não informado; HiFibroXL: Human specific fibroblast medium.



A formação de bancos de células somáticas tem sido realizada pelo emprego da congelação lenta (León-Quinto et al., 2014; Magalhães et al., 2017), tendo variações na escolha dos crioprotetores intracelulares, como o EG a 10%, dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e extracelulares, como a sacarose a 0,2 M e o SFB a 10% (León-Quinto et al., 2014; Lira et al., 2017). Em estudos realizados com o lince-ibérico, León-Quinto et al. (2014) observaram que a sacarose tem um efeito positivo na conservação da viabilidade celular, uma vez que promove uma diminuição na pressão osmótica durante a criopreservação pelo mecanismo de desidratação celular, resultando num aumento da viabilidade celular após a descongelação (Cetinkaya and Arat, 2011). Em estudos realizados em catetos (Lira et al., 2017) e onça-pintada (Praxedes et al., 2017), nosso grupo (LBA, UFERSA) também observou essa influência positiva da sacarose quando associada a crioprotetores intracelulares (DMSO e EG) sobre a conservação de células derivadas da pele.

Aplicações dos bancos somáticos na transferência nuclear de células somáticas

Após a obtenção dos bancos somáticos, a etapa seguinte para o seu emprego na clonagem por TNCS, consiste na sincronização das células somáticas em G0-G1 do ciclo celular (Wani et al., 2017). Em geral, a eficiência dessa etapa é variável e depende dos processamentos anteriores realizados nas células somáticas, bem como do tipo celular, espécie e método de sincronização empregado, o qual poderá ser a privação de SFB, inibição por contato e uso de inibidores químicos (Fukuda et al., 2016). Para exemplificar essa eficiência variável da sincronização, Gallegos et al. (2016) ao comparar diferentes métodos de sincronização de células do gato doméstico e do gato-chileno (*Leopardus guigna*), observaram diferenças no grau de apoptose apenas para células do gato-chileno sincronizadas por inibição por contato, sugerindo para esta espécie o método de privação de SFB seria interessante para a sincronização de células em G0-G1.

Em mamíferos silvestres, o sucesso da clonagem por TNCS já foi observado em várias espécies, sendo o uso da clonagem interspecífica, ou seja, citoplastos (oócitos receptores) de espécie diferente da espécie que se pretende clonar, a técnica mais empregada. Dois exemplos clássicos demonstram o sucesso da clonagem neste grupo de espécies. Inicialmente, Folch et al. (2009), usando citoplastos de caprinos domésticos, clonaram uma subespécie extinta, a *Capra pyrenaica pyrenaica*, usando carioplastos de uma fêmea que veio a óbito em 2000. Em 2017, Wani et al. clonaram o camelo bactriano (*Camelus bactrianus*), uma espécie criticamente ameaçada, usando citoplastos de camelos domésticos e fibroblastos da pele como carioplastos.

Finalmente, a produção de células induzidas à pluripotência (em inglês, *induced pluripotent stem cells*, iPS ou iPSC) poderia fornecer uma fonte única de células pluripotentes como fonte de carioplasto para a clonagem e para a diferenciação em gametas. Estudos relacionados a esta aplicação já foram desenvolvidos em alguns mamíferos silvestres, como dril (*Mandrillus leucophaeus*), rinoceronte branco do norte (*Ceratotherium simum cottoni*, Ben-Nun et al., 2011), e leopardo das neves (*Panther uncia*, Verma et al., 2012), onde esses autores geraram iPSC a partir de fibroblastos. Ainda, espera-se com o aprimoramento da técnica, sejam também aumentadas suas aplicabilidades e finalidades.

Considerações finais

Desde que o primeiro mamífero foi clonado usando células somáticas, a clonagem por TNCS tem permitido a obtenção de crias em diferentes mamíferos silvestres, especialmente aqueles criticamente ameaçados de extinção. Isso porque tanto os bancos somáticos quanto suas aplicações, seja na multiplicação de indivíduos ou na produção de iPSC, tem surgido como medidas altamente emergenciais na conservação da biodiversidade. Assim, estabelecer, caracterizar e formar os bancos de células e tecidos somáticos consiste numa abordagem promissora, uma vez que criopreservar esse material biológico permite conservar amostras de diferentes indivíduos e gerações de populações para futuras aplicações.

Referências

- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Rep Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Loring JF.** Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods*, v.8, p.829, 2011.
- 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, 2018a.
- Borges AA, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Pesq Vet Bras*, v.38, p.350-356, 2018b.



- Caamaño JN, Rodriguez A, Muñoz M, De Frutos C, Diez 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.
- Cetinkaya G, Arat S.** Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. *Cryobiology*, v.63, p.292-297, 2011.
- Comizzoli P.** Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Anim Reprod*, v.14, p.30-33, 2017.
- 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.
- Fukuda T, Iino Y, Eitsuka T, Onuma M, Katayama M, Murata K, Kiyono T.** Cellular conservation of endangered midget buffalo (*Lowland Anoa*, *Bubalus quarlesi*) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators. *Cytotechnology*, v.68, p.1937-1947, 2016.
- Gallegos PF, Veraguas D, Castro FO, Rodriguez-Alvarez L.** Cell cycle synchronization analysis of skin fibroblasts from domestic cat (*Felis silvestris catus*) and kodkod (*Leopardus guigna*). *Anim Reprod*, v.13, p.677, 2016.
- León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Jones J, Martínez-Hernandez FJ, Moreno JM, Vargas, A, Martínez 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. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.347-361, 2009.
- León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Martínez Á, 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 A, 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.
- Lira GPO, Borges AA, Nascimento LE, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Influência de diferentes crioprotetores sobre a viabilidade de células somáticas de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). In: Anais do Encontro de Biotecnologia do Nordeste, Natal, RN, 2017.
- Magalhães LC, Bhat MH, Freitas JLS, Melo LM, Teixeira DIA, Pinto LCA, Câmara LMC, Duarte JMB, Freitas VJF.** The effects of cryopreservation on different passages of fibroblast cell culture in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Biopreserv Biobank*, v.15, p.463-468, 2017.
- Mestre-Citrinovit AC, Sestelo AJ, Ceballos MB, Barañao JL, Saragüeta P.** Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. *Curr Protoc Molec Biol*, v.116, p.1-14, 2016.
- 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.
- Praxedes EA, Queiroz Neta LB, Silva HVR, Ribeiro LR, Borges AA, Silva MB, Santos MVO, Silva AR, Pereira AF.** Isolation and *in vitro* culture of somatic cells derived from Jaguar (*Panthera onca*) ear tissue. *Anim Reprod*, v.14, p.873, 2017.
- 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.54, p.486-495, 2018.
- Santos MLT, Borges AA, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. *Pesq Vet Bras*, v.36, p.1194-1202, 2016.
- Santos MLT, Borges AA, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** *In vitro* culture of wild mammals skin derived cells – state of art. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, p.382-386, 2015.
- Sharma R, Sharma H, Ahlawat S, Aggarwal R, Vij P, Tantiya M.** First attempt on somatic cell cryopreservation of critically endangered *Camelus bactrianus* of India. *Gene Rep*, v.10, p. 109-115, 2018.
- Siengdee P, Klinhom S, Thitaram C, Nganvongpanit K.** Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*). *PeerJ*, v.6, p.e4302, 2018.
- Silva AR, Pereira AF, Lima GL, Peixoto GCX, Souza ALP.** Assisted reproductive techniques on South American wild mammals. In: *Insights from Animal Reproduction*. InTech, Rijeka, p.39-66, 2016.
- Trokovic R, Weltner J, Noisa P, Raivio T, Otonkoski T.** Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*, v.15, p.254-262, 2015.
- Tunstall T, Kock R, Vahala J, Diekhans M, Fiddes I, Armstrong J, Paten B, Ryder OA, Steine CC.** Evaluating recovery potential of the northern white rhinoceros from cryopreserved somatic cells. *Genome Res*, v.28, p.780-788 2018.
- 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.
- Wani NA, Vettical BS, Hong SB.** First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: A step towards preserving the critically endangered wild Bactrian camels. *Plos One*, v.17, p.e0177800, 2017.