

Estabelecimento de linhagens celulares em felídeos silvestres – Uma revisão dos efeitos das condições de cultivo e criopreservação sobre a qualidade celular

Establishment of cell lines in wild felids – A review of the effects of culture and cryopreservation conditions on cell quality

Maria Bárbara Silva¹, Alexandra Fernandes Pereira^{1*}

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

Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625900, Brasil

Resumo

Linhagens celulares, principalmente fibroblastos derivados da pele, podem ser ferramentas interessantes para a conservação e multiplicação de felídeos silvestres ameaçados de extinção. Esses animais em virtude de seu quantitativo reduzido têm nos bancos de células somáticas uma alternativa para a conservação de material biológico derivado de pequenas populações, garantindo assim o armazenamento da diversidade genética de diferentes grupos de indivíduos. Isso porque tais linhagens, quando apropriadamente estabelecidas por meio das técnicas de cultivo *in vitro* e criopreservação, permitem seu emprego na obtenção de embriões por clonagem por transferência nuclear de célula somática e produção de células induzidas à pluripotência. Assim, uma das etapas essenciais para o uso dessas linhagens de maneira eficiente consiste na avaliação dos efeitos das condições de cultivo *in vitro* e criopreservação das células, visando reconhecer os danos gerados pelas manipulações e identificar os ajustes necessários aos protocolos empregados. Portanto, o objetivo desta revisão consiste em reunir e explorar informações úteis sobre as condições de cultivo *in vitro* e criopreservação de células derivadas de felídeos silvestres, visando o estabelecimento de linhagens celulares na conservação e multiplicação destas espécies.

Palavras-chave: biobancos, fibroblastos, transferência nuclear, indução à pluripotência.

Abstract

*Cell lines, mainly fibroblasts derived from the skin, can be interesting tools for the conservation and multiplication of endangered wild felids. These animals, due to their reduced quantity, have somatic cell banks as an alternative for the conservation of biological material derived from small populations, thus guaranteeing the storage of the genetic diversity of different groups of individuals. This is because such lines, when properly established through *in vitro* culture and cryopreservation techniques, allow their use in obtaining embryos by cloning by somatic cell nuclear transfer and production of cells induced to pluripotency. Thus, one of the essential steps for the use of these lines in an efficient way consists of the evaluation of the effects of the conditions of *in vitro* culture and cryopreservation of the cells, aiming to recognize the damages generated by the manipulations and to identify the necessary adjustments to the employed protocols. Therefore, the aim of this review is to gather and explore useful information about *in vitro* culture and cryopreservation conditions of cells derived from wild felids, aiming at the establishment of cell lines in the conservation and multiplication of these species.*

Keywords: *biobanks, fibroblasts, nuclear transfer, pluripotency induction.*

Introdução

O termo linhagem celular é descrito para o cultivo de células previamente isoladas e caracterizadas, que apresentam um maior caráter proliferativo de acordo com as condições *in vitro* favoráveis e necessárias para o seu desenvolvimento e sobrevivência, como as condições ambientais e nutritivas (Ulrich e Pour, 2001). Convencionalmente, as linhagens celulares são classificadas como aquelas de crescimento finito, as quais apresentam um número limitado de passagens, enquanto aquelas de crescimento infinito são caracterizadas por tempo de cultivo infinito de células imortalizadas (Rebello, 2014). Em geral, para a conservação da diversidade genética e, posterior, conservação de felídeos

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

Recebido: 05 de março de 2020

Aceito: 01 de agosto de 2020



silvestres, as linhagens de crescimento finito têm sido empregadas (Yelisetti et al., 2016). Para tanto, após o estabelecimento das linhagens de células, estas podem ser empregadas na obtenção de embriões/crias clones por transferência nuclear de célula somática (TNCS, Gómez et al., 2003) e produção de células induzidas à pluripotência (iPS, Verma et al., 2012).

Para a primeira aplicabilidade, o sucesso da TNCS em felídeos silvestres já pôde ser observado em várias espécies, como o gato-selvagem-africano (*Felis silvestris libica*, Gómez et al., 2003), gato-marmorado (*Pardofelis marmorata*, Thongphakdee et al., 2006), gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*, Yin et al., 2006), gato-de-cabeça-chata (*Prionailurus planiceps*, Thongphakdee et al., 2010) e chita-asiática (*Acinonyx jubatus venaticus*, Moulavi et al., 2017). Já na produção de iPS, estudos relacionados à reprogramação de células somáticas a partir de vetores retrovirais transfectados visando à obtenção de células pluripotentes já pôde ser observado em alguns felídeos silvestres, como leopardo-das-neves (*Panthera uncia*, Verma et al., 2012), tigre-de-Bengala (*Panthera tigris*, Verma et al., 2013), onça-pintada (*Panthera onca*, Verma et al., 2013), serval (*Leptailurus serval*, Verma et al., 2013), gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*, Sukparangsi et al., 2018) e leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*, Sukparangsi et al., 2018).

Nesse contexto, para que uma célula manipulada *in vitro* seja empregada nessas finalidades, a mesma deve apresentar características adequadas durante o cultivo *in vitro* e criopreservação (Pereira et al., 2019). Portanto, o estabelecimento é o primeiro passo para se conhecer as características e necessidades das células, quanto às suas exigências nutricionais, aspectos genéticos, estágio de diferenciação e ciclo celular, parâmetros fundamentais para a obtenção de embriões clones e estudos de reprogramação (Pereira et al., 2018). Contudo, quando células somáticas são cultivadas *in vitro* objetivando, possivelmente, a sua utilização na reprogramação nuclear, é importante ressaltar que estas podem sofrer modificações, devido às condições impostas pelo ambiente, condições de cultivo e criopreservação inadequadas e, conseqüentemente, o uso de células impróprias na TNCS, por exemplo, acarretará na produção de embriões clones defeituosos, comprometendo a eficiência e o sucesso da clonagem (Song et al., 2007; Gómez et al., 2008).

Portanto, o objetivo dessa revisão é reunir e explorar informações úteis acerca das necessidades no manuseio destas células sob condições de cultivo *in vitro* e criopreservação, visando o estabelecimento de linhagens celulares para suas posteriores aplicações.

Fontes, obtenção e caracterização de linhagens celulares

Em felídeos silvestres, células somáticas já foram obtidas da pele de diferentes regiões do animal, como a região auricular (Wittayarat et al., 2012; Praxedes et al., 2019), abdominal (Sukparangsi et al., 2018), inguinal (Mestre-Citrinovitz et al., 2016) e do tecido muscular esquelético (Thongphakdee et al., 2010), sendo o primeiro caso amplamente preferível na obtenção destas células (Praxedes et al., 2018). Além disso, amostras somáticas podem ser obtidas de ambos os gêneros (Wittayarat et al., 2011), tanto por biópsias (Moro et al., 2015), quanto por necropsias (Yelisetti et al., 2016; Moulavi et al., 2017).

Após a colheita das amostras teciduais, células podem ser cultivadas a partir de duas formas: por explante tecidual (Praxedes et al., 2019), ou por digestão enzimática tecidual (Moulavi et al., 2017). Em ambas as condições, os fibroblastos têm sido a célula de escolha na maioria de estudos de caracterização de linhagens celulares (Guan et al., 2010; Liu et al., 2010), especialmente por suas características morfológicas e de crescimento *in vitro* que favorecem seu emprego em reprogramação nuclear (Gómez et al., 2003; Praxedes et al., 2019). Contudo, durante o cultivo primário, além de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos podem estar presentes, sendo necessário um maior tempo de cultivo para a obtenção de um cultivo homogêneo de fibroblastos (Praxedes et al., 2020).

Para a caracterização de uma linhagem celular, diferentes ensaios têm sido empregados para a confirmação do tipo celular. Inicialmente, células têm sido avaliadas pelos seus aspectos morfológicos e de aderência celular. Assim, a morfologia fibroblástica, ou seja, formato fusiforme, núcleo central e oval tem sido observado em células na 3ª passagem de cultivo *in vitro* de onça-pintada (Mestre-Citrinovitz et al., 2016; Praxedes et al., 2020). Além disso, a expressão de proteínas fluorescentes tem sido empregada na confirmação do tipo e da qualidade de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, por meio da utilização de marcadores que avaliam a expressão e função das proteínas presentes em células, conforme observado em células de tigre-Siberiano (Song et al., 2007) e tigre-de-Bengala (Guan et al., 2010).

Ainda em células derivadas de tigre-Siberiano (Song et al., 2007), por cariotipagem, foi observada a manutenção do número de cromossomos da espécie ($2n = 38$) ao longo do cultivo *in vitro*.



Além disso, a análise isoenzimática tem sido aplicada na etapa de caracterização de linhagens celulares. Assim, os resultados obtidos quanto ao cariótipo em associação com os ensaios isoenzimáticos, podem contribuir na confirmação em relação à origem de uma determinada linhagem celular, bem como identificar prováveis contaminações cruzadas com outros tipos de células (Liu et al., 2010). Portanto, esta avaliação tem sido realizada em fibroblastos de tigre-Siberiano (Liu et al., 2010) e tigre-de-Bengala (Guan et al., 2010) com o intuito de determinar a origem das células e avaliar a ausência da contaminação cruzada, por meio da análise de lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH), que são enzimas que auxiliam na via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico. Os resultados usando esses ensaios evidenciaram que as atividades enzimáticas foram adequadas e positivas para a ausência de contaminação. Finalmente, ensaios de identificação da ausência de agentes microbiológicos têm sido propostos com o intuito de garantir uma linhagem celular de qualidade (Liu et al., 2010).

Fatores que influenciam no estabelecimento de linhagens celulares

Inúmeros fatores podem comprometer ou influenciar no estabelecimento de uma linhagem celular, como as condições de cultivo *in vitro* (composição do meio: León-Quinto et al., 2011; duração do cultivo: Song et al., 2007; uso constante da tripsina durante as passagens: Liu et al., 2010). Além disso, as condições de criopreservação (processo de congelamento/descongelamento: Gómez et al., 2008; concentrações de crioprotetores: León-Quinto et al., 2014) podem promover danos nas células, sendo essencial conhecer e estabelecer as condições adequadas no estabelecimento de linhagens celulares a serem empregadas em futuras biotecnologias (Pereira et al., 2019).

Efeitos das condições de cultivo *in vitro*

Durante o cultivo *in vitro*, células são avaliadas quanto as suas características e comportamento *in vitro*, os quais as condições *in vitro* devem melhor mimetizar as condições que ocorrem *in vivo*. Assim, as condições de cultivo são estabelecidas baseadas nas condições mais adequadas e necessárias para uma célula não sofrer danos. Em geral, células de felídeos silvestres têm sido cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos e, em alguns casos, suplementado com aminoácidos (Song et al., 2007), glicose e fatores de crescimento (León-Quinto et al., 2011). Essas células têm sido incubadas a uma temperatura entre 37°C a 38,5°C a 5% de CO₂ (Tab. 1). Em células de linco-ibérico (*Lynx pardinus*), León-Quinto et al. (2011) verificaram que a melhor composição do meio de cultivo para essas células foram meio básico suplementado com 15% de SFB, 4,5 g/L de glicose e 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF).

Além disso, a duração do cultivo pode promover alterações nas células. Contudo, em fibroblastos de tigre-Siberiano foram avaliados o cultivo *in vitro* até a oitava passagem, sendo observados padrões e características normais (Song et al., 2007). Por outro lado, a extensão de um cultivo celular pode promover um maior estresse para as células e, conseqüentemente, induzir a ativação dos mecanismos de morte celular (Liu et al., 2010), impossibilitando seu uso para fins de pesquisa e na conservação dos recursos genéticos.

Adicionalmente, o uso constante da tripsina também pode afetar as características biológicas e hereditárias em decorrência de um estresse provocado (Liu et al., 2010), afetando assim a integridade do DNA (Gómez et al., 2003). Em fibroblastos derivados de gato-selvagem-africano (*Felis silvestris libica*), após comparação da desagregação mecânica vs. enzimática com tripsina vs. pronase, células foram identificadas com danos ao DNA; contudo, a dissociação com pronase demonstrou uma redução destes efeitos negativos, sendo considerada a mais confiável, porém os mecanismos de atuação destas enzimas devem ainda ser mais bem compreendidos (Gómez et al., 2003). Assim, visando a obtenção de linhagens celulares normais e de ótima qualidade, medidas devem ser aplicadas como o uso de reagentes confiáveis, e pH rigorosamente controlado. Ainda, a troca do meio nutritivo deve ser realizada em intervalos padrões e o mínimo possível no número de passagens realizadas, assim como curtos intervalos entre passagens (Liu et al., 2010).

Finalmente, estudos em felídeos silvestres têm apresentado resultados positivos quanto às avaliações realizadas em células cultivadas *in vitro*, quanto à confluência, viabilidade celular pelo ensaio azul de Tripán, atividade metabólica e atividade proliferativa por meio da determinação do tempo de duplicação da população (PDT). Em relação ao crescimento celular, foi observado um crescimento adequado em células de onça-pintada entre 9 e 10 dias (Praxedes et al., 2020); no tigre-de-Bengala e



Tabela 1: Condições de cultivo de linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção.

Espécie	Classificação IUCN*	Condições de cultivo	Principais resultados	Autores
<i>Panthera tigris</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com 10% SFB, e 1% de solução de aminoácidos. Cultivo a 37°C em 5% de CO ₂ e 95% de ar, até oitava passagem.	Fibroblastos obtidos com sucesso por cultivo de tecidos com morfologia, curva de crescimento e quantidade de cromossomos normais.	Song et al. (2007)
<i>Panthera tigris altaica</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com 10% SFB e antibióticos. Cultivo a 37°C com 5% de CO ₂ , até a terceira passagem.	Fibroblastos foram estabelecidos com sucesso, favorecendo o fornecimento de um material valioso para fins de pesquisas.	Liu et al. (2010)
<i>Pardofelis marmorata</i> e <i>Prionailurus planiceps</i>	Quase ameaçado Ameaçado de extinção	DMEM com 20% SFB e antibióticos. Cultivo a 38,5°C com 5% de CO ₂ , até a quinta passagem.	Produção de embriões por meio da transferência nuclear utilizando linhagens celulares, resultando no nascimento de 11 filhotes vivos.	Thongphakdee et al. (2010)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	DMEM com HEPES, aminoácidos, mercaptoetanol, piruvato de sódio, antibióticos e variações de SFB (10% vs. 15% vs. 20%), glicose (1g/L vs. 4,5 g/L), FGF ou EGF (5 vs. 10 ng/mL). Cultivo a 37°C com 5% de CO ₂ .	A solução mais adequada foi meio básico suplementado com 15% de SFB, glicose a 4,5 g/L e EGF a 10 ng/mL.	León-Quinto et al. (2011)
<i>Pardofelis temminckii</i> , <i>Pardofelis marmorata</i> e <i>Panthera pardus</i>	Quase ameaçado Quase ameaçado Vulnerável	DMEM com 20% SFB e antibióticos. Cultivo a 37°C com 5% de CO ₂ , até a sexta passagem.	Linhagens foram sincronizadas com sucesso nos estágios G ₀ /G ₁ por diferentes métodos: privação de soro, inibição por contato e agente químico.	Wittayarat et al. (2013)
<i>Acinonyx jubatus venaticus</i>	Criticamente em perigo	DMEM com 10% SFB e antibióticos. Cultivo a 38°C com 5% de CO ₂ .	Linhagens criopreservadas na ausência de crioprotetores foram utilizadas na transferência nuclear de célula somática, possibilitando a obtenção de blastocistos.	Moulavi et al. (2017)
<i>Leopardus guigna</i>	Vulnerável	DMEM: F12 com 30% SFB, piruvato, L-glutamina, antibiótico e incubadas a 38,5°C em 5% de CO ₂ .	Sincronização do ciclo celular por supressão de soro por 3 dias proporcionou maior número de fibroblastos em G ₀ /G ₁ .	Veraguas et al. (2017)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado	DMEM com 10% SFB, antibiótico. Cultivo a 38,5°C e 5% de CO ₂ , até a terceira passagem.	Obtenção de fibroblastos viáveis após o cultivo <i>in vitro</i> .	Praxedes et al. (2019)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado	DMEM com 10% SFB e antibiótico. Cultivo a 38,5°C e 5% de CO ₂ , até a quarta passagem.	Fibroblastos foram obtidos com padrões normais quanto a morfologia, viabilidade e confluência.	Oliveira et al. (2020)

*Grau de ameaça de extinção de acordo com a IUCN (2020). DMEM: Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco; SFB: Soro Fetal Bovino.



tigre-Siberiano entre 5 a 12 dias (Guan et al., 2010; Liu et al., 2010). Além disso, a obtenção da confluência celular deu-se entre 10 a 15 dias na onça-pintada com taxa de 70% de confluência (Praxedes et al., 2020), e no leopardo, com cerca de 70-80% de confluência (Wittayarat et al., 2013). Quanto à viabilidade celular, foram obtidas taxas de 90% para células da onça-pintada (Praxedes et al., 2019); 98,5% para o tigre-Siberiano (Liu et al., 2010) e 97,6% para o tigre-de-Bengala (Guan et al., 2010). Além disso, fibroblastos de lince-ibérico e onça-pintada apresentaram atividade metabólica de 100% durante o cultivo *in vitro* (León-Quinto et al., 2014; Praxedes et al., 2019). Quanto ao PDT, foram obtidos os respectivos valores: 26 h para a onça-pintada (Praxedes et al., 2019); 24 h para o tigre-Siberiano (Liu et al., 2010); 28 h para o tigre-de-Bengala (Guan et al., 2010), e 26,7; 27,2 e 34,7 h para o leopardo, leão e tigre (Yelisetti et al., 2016). Portanto, estes resultados podem estar associados às condições de cultivo utilizadas e o número de passagens realizadas, assim como a idade dos animais (Yelisetti et al., 2016).

Efeitos das condições de criopreservação

A criopreservação possibilita o armazenamento de amostras biológicas por longos períodos de tempo, sendo uma técnica integrante e necessária realizada no exercício do cultivo de células somáticas. Assim, conhecer os efeitos que os processos de congelamento/descongelamento podem causar em cultivos celulares, visando sempre a obtenção de células viáveis é etapa essencial (Praxedes et al., 2019; Oliveira, et al., 2021).

Células de felídeos silvestres, como o tigre-Siberiano (Song et al., 2007) e onça-pintada (Mestre-Citrinovitz et al., 2016; Praxedes et al., 2019), têm sido criopreservadas por meio da congelamento lenta, na qual a temperatura é reduzida de forma gradual e controlada, utilizando baixas concentrações de crioprotetores (Praxedes et al., 2018). É importante ressaltar que o uso de concentrações elevadas de crioprotetores podem provocar certa toxicidade para as células, favorecendo o surgimento de modificações na camada lipídica e, conseqüentemente, comprometendo a atividade e sobrevivência celular (Praxedes et al., 2019).

Nesse contexto, a fim de minimizar esses efeitos negativos da criopreservação, a associação de crioprotetores tem sido amplamente empregada visando a redução do estresse osmótico (Tab. 2). Portanto, para o sucesso da criopreservação, o conhecimento sobre o tipo celular, os crioprotetores empregados, bem como a sua concentração e o tempo de exposição em relação às células, são pontos a serem explorados. León-Quinto et al. (2011) avaliaram três diferentes soluções crioprotetoras (10% de dimetilsulfóxido, DMSO, na ausência e presença de 0,1 ou 0,2 M de sacarose) em fibroblastos de lince-ibérico, e observaram que estas foram capazes de manter a viabilidade celular. Posteriormente, em 2014, o mesmo grupo utilizando a mesma espécie e condições de criopreservação, observaram que a solução que apresentou a combinação de sacarose foi mais eficiente de acordo com os parâmetros celulares estudados. Além disso, nos estudos de Oliveira et al. (2021), diferentes soluções crioprotetoras (DMSO e etilenoglicol, EG na ausência e presença de 0,2 M de sacarose) usando meio básico contendo 10% SFB foram avaliadas em fibroblastos de onça-pintada, sendo a solução mais eficiente e que garantiu a qualidade celular aquela constituída por 10% de DMSO, 10% de SFB e 0,2 M de sacarose (Tab.2).

Portanto, o DMSO é um crioprotetor intracelular universal e que possui alta capacidade de penetração, além de uma ótima solubilidade em água (León-Quinto et al., 2011), e tem sido rotineiramente empregado na criopreservação de linhagens celulares de felídeos silvestres em uma concentração de 10% (Tab. 2). Já o SFB é considerado um agente extracelular, e um antioxidante que atua como protetor celular, podendo ser utilizado em diferentes concentrações como é observado no tigre-Siberiano: 40% e 50% de SFB (Song et al., 2007; Liu et al., 2010) e no leopardo: 90% (Verma et al., 2012). Finalmente, a sacarose é classificada como um crioprotetor extracelular que tem a capacidade de equilibrar a pressão osmótica nos processos de congelamento/descongelamento e que permite uma proteção adicional (León-Quinto et al., 2011). Apesar de tudo que foi abordado quanto a criopreservação em felídeos silvestres, ainda faz-se necessária a otimização de protocolos de criopreservação, buscando análises de avaliação mais precisas que possam garantir a qualidade celular e um armazenamento prolongado para células desses mamíferos ameaçados.

Considerações finais

O conhecimento quanto ao estabelecimento de linhagens celulares tem possibilitado a aplicação destas células na conservação de felídeos silvestres ameaçados de extinção. Assim, essa revisão abordou



Tabela 2: Condições de criopreservação por congelamento lento em linhagens celulares de felídeos silvestres ameaçados de extinção.

Espécie	Classificação IUCN*	Condições de criopreservação	Principais resultados	Autores
<i>Panthera tigris</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 40% SFB	Fibroblastos obtidos apresentaram morfologia, curva de crescimento e quantidade de cromossomos normais.	Song et al. (2007)
<i>Panthera tigris tigris</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 90% SFB	Congelamento teve pouca influência na viabilidade dos fibroblastos, apresentando uma taxa superior a 90%.	Guan et al. (2010)
<i>Panthera tigris altaica</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO e 50% SFB	Células apresentaram uma viabilidade superior a 90% após o processo de congelamento.	Liu et al. (2010)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO na ausência e presença da sacarose (0,1 vs. 0,2 M).	As três soluções de congelamento apresentaram altas taxas de sobrevivência celular após a descongelamento (90% de viabilidade).	León-Quinto et al. (2011)
<i>Panthera uncia</i>	Vulnerável	10% DMSO e 90% SFB	Fibroblastos apresentaram uma viabilidade de 90% após a descongelamento.	Verma et al. (2012)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	10% DMSO na ausência e presença de sacarose (0,1 vs 0,2 M).	A combinação de sacarose apresentou um efeito positivo nas taxas de viabilidade celular. Valores superiores a 70%.	León-Quinto et al. (2014)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçado	Diferentes soluções: 10% DMSO vs. 10% DMSO acrescido de 0,2 M sacarose vs. 10% EG. vs. 10% EG acrescido de 0,2 M sacarose.	A solução constituída por 10% DMSO, 10% SFB e 0,2 M sacarose foi a mais eficiente em garantir a qualidade celular.	Oliveira et al. (2021)

*Grau de ameaça à extinção de acordo com a IUCN (2020). DMSO: Dimetilsulfóxido; SFB: Soro Fetal Bovino; EG: Etilenoglicol.



os principais critérios que podem influenciar na obtenção e na qualidade de uma linhagem celular, visando sempre a melhoria dos aspectos quanto às avaliações dos efeitos nas condições de cultivo *in vitro* e da criopreservação destas células para suas aplicações em estudos de reprogramação, visando à produção de embriões/clones e células induzidas à pluripotência. Essas células são as principais responsáveis pelo sucesso da reprogramação nuclear, tendo em vista que células que apresentam qualidade celular afetada são consideradas inviáveis e não podem ser utilizadas, e seu uso implicaria no surgimento de embriões defeituosos e falhas na reprogramação. Assim, a otimização de protocolos que visam a melhoria das condições de manipulação *in vitro* e de criopreservação faz-se necessário, de modo que possam evitar os danos e garantir a qualidade celular e sua utilização na conservação das espécies.

Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico. AF Pereira é pesquisadora do CNPq (nº 306963/2017-5).

Referências

- Borges AA, Pereira AF.** Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote*, v.27, p.111-117, 2019.
- 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.
- Gómez MC, Pope CE, Ricks DM, Lyons J, Dumas C, Dresser BL.** Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reprod Fert Develop*, v.21, p.76-82, 2008.
- 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.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)** Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/15953/0>>. Acessado em 20 de fevereiro de 2020.
- León-Quinto T, Simón MA, 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.
- Liu C, Guo Y, Liu D, Guan W, Ma Y.** Establishment and characterization of fibroblast cell line derived from Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Biopreserv Biobank*, v.8, p.99-105, 2010.
- Mestre-Citrinovitz 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 Mol Biol*, v.116, p.28.7.1–28.7.14, 2016.
- Moulavi F, Hosseini SM, Tanhaie-Vash N, Ostadhosseini S, Hosseini SH, Hajinasrollah M, Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD, Nasr-Esfahani MH.** Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from *post-mortem* frozen tissue in absence of cryoprotectant and *in vitro* matured domestic cat oocytes. *Theriogenology*, v.90, p.197-203, 2017.
- Moro LN, Hiriart MI, Buemo C, Jarazo J, Sestelo A, Veraguas D., Rodriguez-Alvarez L, Salamone DF.** Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. *Reproduction*, v.150, p.1-10, 2015.
- Oliveira LRM, Praxedes EA, Silva MB, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF.** Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *An Acad Bras Ciênc*, no prelo, 2021.
- Pereira AF, Borges AA, Praxedes EA, Silva AR.** Uso de bancos somáticos visando a clonagem por transferência nuclear na conservação de mamíferos silvestres—uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, v.42 p.104-108, 2018.
- Pereira AF, Borges AA, Santos MVO, Lira GPO.** Use of cloning by nuclear transfer in the conservation and multiplication of wild mammals. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, p.242-247, 2019.
- 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, Oliveira LRM, Silva MB, Borges AA, Santos MVO, Silva HVR, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – an alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology*, v.88, p.15-22, 2019.

Praxedes EA, Queiroz Neta LB, Borges AA, Silva MB, Santos MVO, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF. Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. *Anat Histol Embryol*, v.49, p.121-129, 2020.

Rebello MA. Fundamentos da Cultura de Tecido e Células Animais. 1ed, Rio de Janeiro: Rubio, p.208, 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.

Sukparangsi W, Bootsri R, Sikeao W, Karoon S, Thongphakdee A. Establishment of induced pluripotent stem cells from Fishing Cat and Clouded Leopard using integration-free method for wildlife conservation. *Reprod Fertil Dev*, v.30, p.230-230, 2018.

Thongphakdee A, Numchaisrika P, Omsongkram S, Chatdarong K, Kamolnorrath S, Dumnui S, Techakumphu M. *In vitro* development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.219-226, 2006.

Thongphakdee A, Siriaroonrat B, Manee-In S, Klincumhom N, Kamolnorrath S, Chatdarong K, Techakumphu M. Intergeneric somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat. *Theriogenology*, v.73, p.120-128, 2010.

Ulrich AB, Pour PM. Cell Lines. In: *Encyclopedia of Genetics*. Brenner S, Miller JH, Eds. New York: Academic Press, p.310-311, 2001.

Wittayarat M, Thongphakdee A, Saikhun K, Chatdarong K, Otoi T, Techakumphu M. Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family Felidae. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.305-310, 2013.

Veraguas D, Gallegos PF, Castro FO, Rodriguez-Alvarez L. Cell cycle synchronization and analysis of apoptosis-related gene in skin fibroblasts from domestic cat (*Felis silvestris catus*) and kodkod (*Leopardus guigna*). *Reprod Domest Anim*, v.52, p.881-889, 2017.

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.

Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *BioResearch*, v.2, p.72-76, 2013.

Yelisetti UM, Komjeti S, Katari VC, Sisinthy S, Brahmasani SR. Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected *post mortem* as donor cells and rabbit oocytes as recipients. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.52, p.632-645, 2016.

Yin X, Lee Y, Lee H, Kim N, Kim L, Shin H, Kong I. *In vitro* production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silvestris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology*, v.66, p.275-282, 2006.
