

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE
FELINOS SILVESTRES**

BRASÍLIA

2018

LETÍCIA GOBBI ARANTES

**EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE
FELINOS SILVESTRES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília - UnB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Sônia Nair Bão

Co-orientador: Carlos Frederico Martins

BRASÍLIA

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a
minha família, que sempre
acreditou no meu
potencial, me dando força
para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar à minha família, pois sem o apoio de vocês não conseguiria chegar até aqui. Um obrigada mais que especial ao meu pai Marco e para minha mãe Ana, que sempre acreditaram em mim, e nunca pouparam esforços, fazendo sempre o possível e o impossível para que meus sonhos se realizassem, para que minha educação fosse a melhor, pois é através do conhecimento que conquistamos o mundo. Às minhas duas irmãs, Lívia e Izabella, pelo apoio e por me encorajarem sempre. Agradeço também a toda a família, avós, tios e primos que me apoiaram e entenderam em todos os meus momentos de ausência. Minha família é a base de tudo em minha vida.

À professora Dr^a Sônia Nair Bão, por me aceitar em seu laboratório, mesmo que não me conhecesse em um período prévio ao mestrado (como na graduação, por exemplo). Por ter me aceitado como aluna, aceitado o meu projeto, em uma linha de pesquisa não tão comum no laboratório, que são os animais silvestres. Obrigada por toda a orientação, pelas correções e correções realizadas, enfim, por toda a paciência comigo. Sou grata pelos ensinamentos que me fizeram crescer como pessoa e também profissionalmente, aprendendo a lidar com todos os desafios que enfrentei, nesta jornada de dois anos e meio.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins (Fred), que propôs o desafio do mestrado, me instigando no laboratório, com a parceria entre zoológico e Embrapa e mais adiante por aceitar me co-orientar nesta área de biotecnologia/reprodução animal que antes por mim havia sido uma área inexplorada. Obrigada por toda sua paciência no laboratório, nas reuniões mestrado + zoológico, nas análises de dados, enfim, por tudo.

À Heidi, por todos os ensinamentos no laboratório, tendo a paciência de começar praticamente do zero comigo, até os procedimentos mais complexos. Obrigada pela companhia, pelas conversas, pelos *helps* em dias que não conseguia chegar a tempo para buscar as amostras antes que fechassem os laboratórios. E por falar em *help*, muito obrigada também à Jessica, e às meninas que ajudam no laboratório da Embrapa CTZL.

Ao pessoal do Zoológico de Brasília, pelo apoio e em especial ao Gerson Norberto e à Ana Raquel por permitirem que eu concluísse este mestrado. Agradeço por acreditarem no meu potencial, me concedendo espaço dentro da Instituição para poder realizar a pesquisa. À Isabela

Abritta por sempre estar do meu lado, me incentivando e ouvindo meus “perrengues”, pelas idas na Embrapa, enfim, *gracias*.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e aos colegas de lá, que sempre se prontificaram a ajudar, Ingrid, Diogo e todos os que encontrei, que me receberam bem e ajudaram de alguma forma. À Thayssa, companheira de mestrado, fazendo matérias juntas, uma sendo sempre o braço direito da outra.

Ao Guilherme Tonelli! Gui, sem você não teria conseguido chegar nem na metade de todo o trabalho, no tempo que eu tinha para terminar o mestrado. Muito obrigada por todas as ajudas com a microscopia, com a fotografia, com os conselhos, correções, puxões de orelha e, claro, pelas conversas. Serei eternamente grata a você e saiba que para o que precisar, estarei aqui. Caso queira se aventurar pela área de animais silvestres, será sempre muito bem-vindo.

Às minhas amigas que sempre me deram força, sempre me ouviram reclamar, falar que ia desistir, falar que não ia dar conta, porém com o apoio de vocês, aqui estou eu, a um passo de ser mestre. Obrigada por toda a amizade, apoio, incentivo e pelas mil histórias que sempre teremos juntas nesses 12 anos de amizade né, Karoline e Luíza. Obrigada também à Taís, Nathy, Julia, enfim, a todas vocês que enchem minha vida de amor e alegria, me dando força pra realizar meus sonhos.

Ao Beto (Rafael Martins) que mesmo longe, sempre me ajudando. Mesmo longe, sempre companheiro de perrengues, desde a graduação, até o dia que escolhemos ingressar no mestrado. Obrigada pelas ajudas que eu sempre pedia desesperada, obrigada pelas correções de texto, traduções, enfim, por sempre estar presente para ajudar quando precisei. E para não esquecer de uma de nossas frases, “calma Lê, no final tudo vai dar certo. Se não deu é porque ainda não é o final”, rsrs.

À Dr^a Margort Dode por ceder o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) para a realização das análises de citometria de fluxo. À Andrielle pela paciente e atenciosa ajuda com o citômetro.

À Dr^a Ana Cristina e ao Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo uso do Ponto Crítico, para a realização de uma das etapas de preparação das amostras.

Ao Claudiomar, por toda a paciência do mundo comigo, principalmente na reta final. Por sempre me apoiar, me dando forças me fazendo saber a importância de se ter objetivos e atingi-

los. Obrigada por acreditar em mim, por estar sempre presente, nas idas ao laboratório mesmo sem entender muita coisa da área, pelas horas de estudo, cada um na sua área, mas um sempre dando força para o outro. Mais uma vez, obrigada. Te amo!

Às agências financiadoras UnB, EMBRAPA, CAPES, CNPq, FAPDF, FINEP pela infraestrutura e apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*“É preciso que eu suporte
duas ou três larvas se quiser
conhecer as borboletas”*
O Pequeno Príncipe

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Conservação da biodiversidade	14
1.2 Estratégias para conservação dos animais	15
1.3 Criopreservação	16
1.4 Viabilidade das células congeladas	18
1.5 Modelos biológicos do presente estudo	20
2. Justificativa	24
3. Objetivo	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos específicos	25
4. Material e Métodos	25
4.1. Cultivo celular	27
4.2. Morfologia	28
4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	28
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET	29
4.3. Criopreservação celular	29
4.3.2. Avaliação da viabilidade e apoptose celular por citometria de fluxo	30
4.4. Análise Estatística	31
5. Resultados	31
5.1. Morfologia dos fibroblastos	31
5.2. Curva de Crescimento	38
5.3. Viabilidade Celular	39
6. Discussão	46
7. Considerações Finais	51
9. Referências	52

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplar de gato palheiro (<i>Leopardus colocolo</i>) do Zoológico de Brasília.	21
Figura 2. Exemplar de gato-do-mato (<i>Leopardus tigrinus</i>) do Zoológico de Brasília.....	22
Figura 3. Exemplares de onça pintada (<i>Panthera onca</i>) do Zoológico de Brasília.....	23
Figura 4. Delineamento experimental demonstrando as sequências de avaliações de caracterização, criopreservação e análise da viabilidade celular pós-criopreservação.	26
Figura 5. Fibroblastos de <i>Leopardus colocolo</i> (gato palheiro) em microscopia óptica e eletrônica de varredura	32
Figura 6. Fibroblasto de <i>Leopardus tigrinus</i> (gato-do-mato) em microscopia óptica e eletrônica de varredura	33
Figura 7. Fibroblasto de <i>Panthera onca</i> (onça preta) em microscopia óptica e eletrônica de varredura.....	33
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de <i>Leopardus colocolo</i> (gato palheiro).....	35
Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de <i>Leopardus tigrinus</i> (gato-do-mato).....	36
Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de <i>Panthera onca</i> (onça preta).	37
Figura 11. Curva de crescimento de 8 gerações de fibroblastos de <i>L. colocolo</i> , <i>L. tigrinus</i> e <i>P. onca</i>	39
Figura 12. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de <i>L. colocolo</i> mostrando populações de fibroblastos corados com Annexin V, Iodeto de Propídeo e não corados (viáveis).....	41
Figura 13. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de <i>L. tigrinus</i> mostrando populações de fibroblastos corados com Annexin V, Iodeto de Propídeo e não corados (viáveis).....	42
Figura 14. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de <i>P. onca</i> mostrando populações de fibroblastos corados com Annexin V, Iodeto de Propídeo e não corados (viáveis).....	43
Figura 15. Percentagem de fibroblastos viáveis, em apoptose e em necrose após a criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras. Diferenças significativas ($p < 0,05$) são indicadas por letras maiúsculas diferentes (entre diferentes tratamentos na mesma espécie).....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Viabilidade de fibroblastos das espécies <i>L. colocolo</i> , <i>L. tigrinus</i> e <i>P. onca</i> criopreservados em diferentes concentrações de DMSO e em meio CryoSOfree.	44
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTZL	Centro de Transferência de Tecnologia em Raças Zebuínas de Aptidão Leiteira
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FJZB	Fundação Jardim Zoológico de Brasília
FBS	Fetal Bovine Serum
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PAN	Plano de Ação Nacional das Espécies Ameaçadas de Extinção
PBS	Tampão fosfato salina
RPM	Rotações por minuto
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling

Resumo

A conservação de material genético de animais silvestres em botijões criogênicos, formando os bancos de germoplasma, representa uma alternativa viável para conservação das espécies e uma garantia para manutenção da diversidade biológica. Há uma necessidade de se criar protocolos de criopreservação para os diversos tipos celulares. O objetivo deste estudo é avaliar o melhor protocolo de criopreservação para manutenção da viabilidade de fibroblastos extraídos das espécies de onça preta (*Panthera onca*), Gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) e Gato palheiro (*Leopardus colocolo*) e caracterizar morfológicamente essas células. Os fibroblastos, isolados a partir de biópsias de peles já se encontravam criopreservados, em nitrogênio líquido, a uma temperatura de - 196°C. Os fibroblastos foram descongelados, e em um primeiro momento do estudo, feita a curva de crescimento, para acompanhamento do potencial de crescimento celular em um período de 8 dias. Nenhuma das espécies atingiu confluência no cultivo, ao final do oitavo dia, porém as culturas apresentaram crescimento exponencial até as primeiras 50 horas e, após isso, houve uma diminuição nos crescimentos. Ao observar as células em microscopia de campo claro e microscopia eletrônica de varredura, foi possível perceber uma diferença morfológica entre os fibroblastos dos três felídeos. As células de *L. colocolo* apresentavam-se fusiformes e com as características projeções citoplasmáticas comumente encontradas em fibroblastos. Já as células do *L. tigrinus* são mais esféricas, com ramificações curtas, enquanto as da *P. onca* são fibroblastos com aparência fusiforme com longas ramificações. Com a microscopia eletrônica de transmissão, foi possível identificar que os fibroblastos estavam com intensa atividade celular, demonstrada pela presença de inúmeras vesículas digestivas, vacúolos e grânulos de secreção. As superfícies das células apresentaram projeções percebida nos outros dois tipos de microscopia. Em relação à criopreservação, não houve diferenças significativas entre as concentrações de 2,5%, 5% e 10% de DMSO para as espécies *L. colocolo* e *L. tigrinus*, sendo ambas as concentrações eficientes. Para o material de *P. onca*, o crioprotetor mais eficiente também foi o DMSO, porém, nas concentrações de 2,5% e 10%. O CryoSOfree™, foi eficiente apenas para a espécie *L. colocolo* e *L. tigrinus*. O aprimoramento de protocolos técnicos irá permitir a reprodução direcionada de animais de interesse e este trabalho poderá contribuir na preservação da fauna silvestre tanto brasileira quanto mundial, bem como a otimização dos estudos, em se estabelecendo protocolos que garantam o maior sucesso no cultivo das células.

Palavras chaves: Felinos silvestres, Germoplasma, Crioprotetor, Caracterização morfológica.

Abstract

Cryopreservation of genetic material from wild animals, known as germplasm banks, are a viable form of species conservation and biological diversity safeguarding measure. Development of suitable cryopreservation protocols for each cell type is highly necessary considering genetic information banks. This study aims to determine which protocol is best at maintaining cell viability on fibroblasts of the following species; Jaguar (*Panthera onca*), Northern Tiger Cat (*Leopardus tigrinus*) and Pampas Cat (*Leopardus colocolo*) and characterize these cells morphologically. Morphology was examined under Light microscopy, Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy. Fibroblasts were isolated from skin biopsy and were already cryopreserved on liquid nitrogen (- 196°C). After thawing, the growth curve was determined for growth potential in eight days. None of the species reached confluence before the eighth day. Cultured cells presented exponential growth until the first 50 hours. After this period, reduction of growth speed was noted. Microscopy analysis made possible to note variation between the three wild cat's fibroblasts. *L. colocolo* cells are fusiform and presents several cytoplasmic projections common to fibroblasts. *L. tigrinus* cells are more spherical with short ramifications. *P. onca* fibroblasts are fusiform with longer ramifications. Using Transmission Electron Microscopy, it is noted that digestive vesicles, vacuoles and secretion granules are common, an indicative of intense cellular activity. In relation to cryopreservation, there were no significant differences between the concentrations of, 2.5%, 5% and 10% of DMSO for the *L. colocolo* and *L. tigrinus*, both concentrations being efficient in cryoprotecting the fibroblasts from these species. On the other hand, *P. onca* fibroblasts, were better preserved with solutions containing 2.5% and 10% DMSO. CryoSOfree™ was efficient to cryopreserve *L. colocolo* and *L. tigrinus* fibroblasts. Protocol enhancement will provide the necessary conditions to reproduction for species of interest both on local native fauna and worldwide fauna. Academic studies are also directly enhanced by optimization of such protocols.

Key-words: Wild cats, Germplasm, Cryoprotectant, Morphological characterization

1. Introdução

1.1 Conservação da biodiversidade

A variação biológica é de extrema importância para a manutenção da vida, porém, sua diversidade vem sendo ameaçada principalmente por ações antrópicas (e.g. desmatamento de áreas para agropecuária, crescimento de cidades, queimadas, dentre outros fatores) (LOSKUTOFF, 1998; SANTOS, 2002; ANDRABI & MAXWELL, 2007).

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), apoiada por organizações e pesquisadores, é responsável por monitorar os recursos naturais, dedicando-se à conservação da biodiversidade, fornecendo informações de distribuição, características e *status* de conservação de plantas, fungos e animais. Os dados são avaliados globalmente utilizando sete categorias: segura ou pouco preocupante, quase ameaçada, vulnerável, em perigo, criticamente em perigo, extinta na natureza e extinta. No Brasil, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) é o órgão responsável pela avaliação do risco de extinção das espécies, sendo monitorado no país aproximadamente 8200 espécies de vertebrados, e este monitoramento resulta periodicamente em uma lista que segue as mesmas categorias preestabelecidas pela IUCN (ICMBIO, 2017).

Com estes monitoramentos realizados, constata-se que com a velocidade que a degradação ambiental vem ocorrendo, estima-se que em alguns anos espécies em risco de extinção sejam extintas, e tantas outras que se encontram ameaçadas tornem-se mais raras e mais próximas à extinção (HOUGHTON *et al.*, 2001; MACHADO *et al.*, 2016; ICMBIO, 2017).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, tendo já catalogado parte das espécies de vertebrados, subdividida nas classes: mamíferos, aves, répteis e anfíbios, com 713, 182, 721 e 875 espécies, respectivamente (PERES *et al.*, 2011).

1.2 Estratégias para conservação dos animais

Com a iniciativa de combater as ameaças que colocam em riscos as populações das diferentes espécies, bem como os seus ambientes naturais, o Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio do ICMBio, criou políticas públicas, que identificam e orientam as principais ações pela preservação das espécies, na tentativa de minimizar os efeitos da extinção. São os chamados Planos de Ação Nacional para a Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção (PAN) ou do Patrimônio Espeleológico, que atuam tanto com ações que envolvem os animais em seus habitats naturais como *ex situ* e estimulam pesquisas com o foco em reprodução assistida, com o objetivo de manter populações geneticamente viáveis (PAULA, 2013; BRASIL, 2015; ARAÚJO, 2016).

Devido às dificuldades de se implementar e executar programas de conservação para os animais em seus *habitats* naturais, a opção de conservação *ex situ* é trabalhada em zoológicos, santuários e criadouros, devido principalmente à sua praticidade. Porém estes locais não suportam um grande número de indivíduos de uma mesma espécie coexistindo, sendo incapazes de conservar e proteger todos os habitats e também todas as espécies de interesse (COSTA & MARTINS, 2008; SILVA *et al.*, 2012).

Com isso, a manutenção da diversidade biológica e genética em botijões criogênicos, formando os chamados bancos de Germoplasma, pode ser uma alternativa viável na conservação das espécies, principalmente as ameaçadas de extinção, formando coleções-base, com uma ampla variabilidade genética. Os bancos são formados pelo congelamento de gametas, células somáticas e embriões de animais mantidos em nitrogênio líquido a -196°C (SONG *et al.*, 2007; GUAN *et al.*, 2010; BLUME *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

Isto pode permitir futuros estudos e desenvolvimento de técnicas que favoreçam o aumento populacional *in situ* necessário, através da técnica de Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), conhecida popularmente como clonagem, além de proporcionar troca de diversidade genética entre instituições mantenedoras destes bancos (WILSON, 1997; LEON-QUINTO *et al.*, 2009; MATTOS, 2016;).

Existe no Brasil uma Plataforma Nacional de Recursos Genéticos, que coordena, através de um sistema, os bancos de Germoplasma no Brasil, que estão distribuídos em universidades federais, estaduais e órgãos ambientais. Esta plataforma é monitorada pela

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A grande maioria dos bancos são de animais domésticos, ligados à produção pecuária, porém o número de instituições que mantêm material de animais silvestres vem crescendo no país (SILVA *et al.*, 2012; MAPA, 2017).

A Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB) juntamente com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), unidade Embrapa Cerrados, desde 2010, mantém um Banco de Germoplasma, em um programa de Reprodução para a Conservação, onde estão armazenados diferentes tipos celulares, como células somáticas, ovócitos e espermatozoides de animais silvestres. Grande parte do material foi coletado de fragmentos da orelha ou de tecido adiposo de animais mortos por causas naturais, bem como de ovários e testículos provenientes do procedimento de castração, seguindo os protocolos padrões amplamente utilizados na literatura. Atualmente este Banco de Germoplasma conta com 23 espécies criopreservadas (MARTINS *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2014; MATTOS, 2016).

Diversas outras instituições de zoológico pelo mundo, mantêm bancos genéticos de animais silvestres, porém estudos mais aprofundados envolvendo o desenvolvimento de protocolos de criopreservação dos materiais biológicos, visando a conservação e perpetuação das espécies, são necessários, já que atualmente se conhece pouco a respeito da utilização de biotécnicas reprodutivas em animais silvestres (ERDMANN, 2005; ANDRABI, 2007; PAZ, ZÜGE & BARNABE, 2007; MATTOS, 2016).

1.3 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica que consiste na conservação de material biológico, em nitrogênio líquido, tendo como princípio básico a redução de temperatura para o negativo. O material pode ser mantido por tempo indeterminado, tendo seu metabolismo celular reduzido e, quando descongelado, o material prossegue seu desenvolvimento normal, podendo vir a ser utilizado posteriormente para inseminação artificial, fecundação *in vitro* e transferência nuclear (DAY & STACEY, 2007; CASTRO *et al.*, 2011; MATTOS, 2016).

A técnica é importante por permitir a avaliação do tempo de crescimento das células, estudos de expressão gênica para programas de genômica, além de proporcionar apoio técnico e teórico para armazenagem de recursos genéticos de outros animais, contribuindo assim para o apoio para a conservação das espécies silvestres ameaçadas de extinção (GUAN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2016).

O sucesso dessa técnica depende de alguns cuidados como a tolerância ao método, a utilização do melhor crioprotetor (compostos responsáveis por substituir a água intracelular e estabilizar as membranas), controlando seus volumes e concentrações, apesar de que estes agentes ainda não são completamente esclarecidos na literatura e dependem do material em que se quer preservar, desidratação e a velocidade de redução da temperatura (CASTRO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; BALCI & CAN, 2013).

Com a queda de temperatura, durante o processo de criopreservação, as moléculas de água organizam-se em cristais. A formação destes cristais concentra os solutos na água não congelada aumentando a osmolaridade do meio extracelular promovendo a desidratação celular. Quando a amostra é resfriada de forma rápida, dificulta a migração da água do meio intracelular para o meio extracelular, o que ocasiona uma maior formação de cristais de gelo dentro da célula. Porém, quando o material é congelado de forma mais lenta, a desidratação pode ser percebida, levando ao “efeito solução”, ou seja, elevada concentração de soluto no interior da célula. Nessas situações, os componentes celulares poderão alterar-se, comprometendo funções biológicas por meio da inviabilização de enzimas e proteínas (GONZALES, 2004; JANZ *et al.*, 2012).

Existem dois métodos de criopreservar materiais biológicos. O primeiro, congelação lenta, como sugere o nome, há a realização de uma redução lenta da temperatura, diminuindo o estresse térmico da solução no estágio de solidificação, evitando a formação de cristais de gelo. Para este processo, acompanha-se a redução da temperatura, iniciando em um freezer, para que a temperatura chegue a -80°C (temperatura para desidratação celular), em seguida a amostra é transportada para o botijão, contendo nitrogênio líquido a -196°C. Como o processo é gradativo, a crioproteção da célula pode ser realizada em baixas concentrações de crioprotetores (DAY & STACEY, 2007; CASTRO *et al.*, 2011).

O segundo método é a vitrificação, tem em seu protocolo a mudança brusca de temperatura, formando um sólido vítreo, sem formação de cristais de gelo, necessitando de uma

quantidade de crioprotetor mais elevada que o processo anterior, para a obtenção de alta viscosidade e maior sucesso na crioproteção do material biológico (DAY & STACEY, 2007; CASTRO *et al.*, 2011).

O processo de criopreservação de células resulta em diminuição da viabilidade celular, quando comparado às células frescas. O prejuízo pode ser percebido através de morte celular e danos na sua capacidade funcional, analisando-se, por exemplo, o período de replicação celular bem como integridade de membrana celular (GONZALES, 2004; CASTRO *et al.*, 2011).

O fibroblasto é o tipo celular mais criopreservado, devido ao fato de sua obtenção ser simples, podendo ser oriundo de um pequeno fragmento de pele de orelha, ou base da cauda, por exemplo. Além do seu cultivo ser o mais apropriado para o uso em TNCS (LEON-QUINTO *et al.*, 2009; MATTOS, 2016).

Os fibroblastos são um tipo celular comumente encontrados no tecido conjuntivo, de origem embrionária mesodérmica. São responsáveis por secretar a matriz extracelular rica em colágeno, possuindo a facilidade de migrarem e se proliferam em outros tecidos danificados ou em cultivos celulares (JOHNSON, RALF & WALTER, 2004; SRIRAMA, BIGLIARDI & BIGLIARDI, 2015).

Estudos com fibroblastos indicam que são um tipo celular de sucesso quando submetidos ao cultivo e que permanecem com sua morfologia típica normal e funcional, mantendo a curva de crescimento adequada. Portanto, quando cultivados *in vitro* podem ser utilizados como células doadoras para futuras transferências nucleares (SONG *et al.*, 2007; SRIRAMA, BIGLIARDI & BIGLIARDI, 2015). Porém, a dificuldade de se cultivar células, é conseguir reproduzir seu meio, como se estivessem *in vivo*, simulando o tecido original, garantindo o fornecimento de aminoácidos, vitaminas, proteínas e sais orgânicos (MATTOS, 2016).

1.4 Viabilidade das células congeladas

O que influencia a viabilidade das células congeladas é o tipo de crioprotetor que é utilizado no momento de congelamento, pois estes possuem a função de maximizar a viabilidade

celular, diminuindo os estresses provocados por choque osmótico ou pela formação do gelo intracelular. Os crioprotetores são substâncias orgânicas que agem protegendo as células durante o período que ela se mantém a baixa temperatura e também dos possíveis danos causados pelo descongelamento desse material (HARDING *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2011; MATTOS, 2016).

Existem dois tipos de crioprotetores. Os intracelulares, que possuem baixo peso molecular, com isso, maior capacidade de penetrar nas células (diminuindo possíveis lesões). Possuem também alta solubilidade e capacidade de formar ligações entre o hidrogênio e a água, evitando a formação dos cristais de gelo no meio intracelular. Estes crioprotetores são à base de glicerol, amidas e principalmente dimetilformamida (GONZALES, 2004; JANZ *et al.*, 2012; MATTOS, 2016).

O segundo tipo de crioprotetor, o extracelular, composto por moléculas de alto peso molecular, que não penetram a membrana celular. Eles agem aumentando a osmolaridade do meio extracelular, ou seja, aumentam a quantidade de partículas dissolvidas no interior da célula, forçando as moléculas de água lá presentes passarem para o meio extracelular, impedindo a formação de cristais de gelo no seu interior. Esses crioprotetores são à base de açúcares, lipoproteínas (lactose, glicose, sacarose, trealose) ou de alguns aminoácidos (GONZALES, 2004; JANZ *et al.*, 2012; MATTOS, 2016).

Dentre os crioprotetores, o dimetilsulfóxido (Me₂SO- DMSO) é o crioprotetor, da categoria dos intracelulares, mais usado. O DMSO preserva a integridade de proteínas isoladas e da membrana lipídica das células durante o processo de resfriamento e aquecimento. Sua desvantagem é a alta toxicidade além da dificuldade de emprego, já que apresenta a necessidade de preparo no momento do uso, em função de sua capacidade de absorver água do ambiente (higroscopia) (VILLAMIN, 2009; JANZ *et al.*, 2012).

O sucesso da criopreservação é evidenciado pelo número de células que permaneceram viáveis após o processo de descongelamento da amostra. Atualmente existem diversas formas para testar a viabilidade celular. O teste mais utilizado é o do Azul de Trypan (Trypan Blue). A membrana plasmática das células é impermeável a este corante, para tanto, uma vez que há a

penetração do corante na célula, irá indicar perda de integridade da membrana, comprovando morte celular (MARTINEZ *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2015).

Outra forma de testar a viabilidade das células, é a realização do teste TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), que irá detectar danos no DNA celular. A técnica consiste na incorporação de nucleotídeos, marcados com corante fluorescente, na região livre 3'OH das quebras do DNA, seja fita simples ou dupla. Essa reação ocorre por ação de uma enzima catalizadora, denominada terminal deoxynucleotidyl transferase que irá polimerizar os nucleotídeos das regiões de fragmentação de DNA. A ação enzimática pode ser percebida por microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo e as células que tiverem seu DNA fragmentado são identificadas TUNEL positivas, devido a coloração verde, determinada pela ação do corante isotiocianato de fluoresceína-FITC, ou TUNEL negativas quando possui integridade de DNA, sendo então coradas de azul, devido à contra coloração com o corante Hoechst 3342 (MARTINS, *et al.*, 2007b).

A citometria de fluxo também se apresenta como uma técnica para análise de viabilidade celular. Realiza, através de marcadores, a análise quantitativa de células e fornece informações a respeito da cinética do ciclo celular, funcionalidade das células, indicando as fases iniciais e finais da apoptose, bem como células necróticas (TAVARES & TAVARES, 2009).

Uma suspensão de células é analisada ao passar por um feixe de luz que tem a capacidade de analisar 10000 eventos (células) por segundo. A dispersão da luz irá depender da estrutura interna das células da sua forma e seu tamanho. A estas suspensões são inseridas substâncias fluorescentes importantes pois atuam como receptoras de luz com determinados comprimentos de ondas, demonstrando por sua vez, os eventos apoptóticos, que se dá através da penetração de corantes fluorescentes pela membrana plasmática que se encontram danificadas (TAVARES & TAVARES, 2009).

1.5 Modelos biológicos do presente estudo

Leopardus colocolo (MOLINA, 1782), o gato palheiro, é um felino de pequeno porte, medindo de 60 a 100 cm e peso aproximado de 3,5 kg. Possui pelagem longa, face larga e orelhas

pontiagudas. Sua coloração é em grande parte do seu corpo, avermelhada, com faixas escuras nas patas dianteiras e traseiras, sendo 3 e 5 faixas respectivamente e sua cauda peluda também com faixas pretas, conforme demonstrado na figura 1 (NOWELL, 1996; SIGRIST, 2012; QUEIROLO *et al.*, 2017).



Figura 1. Exemplar de gato palheiro (*Leopardus colocolo*) do Zoológico de Brasília.
Foto: Luiz Filipe Carneiro

A espécie é encontrada nos países sulistas como Argentina, Bolívia, Chile, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e no Brasil ocorre no pantanal, cerrado e nos pampas gaúchos. Possuem hábitos crepusculares e noturno, vivendo solitário, principalmente em área de campo aberto (REIS, 2010; QUEIROLO *et al.*, 2017).

Em animais de cativeiro, a reprodução é anual, gerando apenas um filhote, de uma gestação média de 83 dias. São carnívoros, alimentando-se de pequenos mamíferos, aves terrestres e alguns répteis como, por exemplo, lagartos (SIGRIST, 2012).

Para o ICMBio, o animal é classificado como vulnerável, já na lista da IUCN, seu *status* de ameaça é classificado como quase ameaçado (LUCHERINI, 2016; QUEIROLO *et al.*, 2017).

Leopardus tigrinus (SCHREBER, 1775), popularmente conhecido como gato-do-mato-pequeno, é um felino de pequeno porte, com aproximadamente 3 kg, de pelagem amarelada, com fileiras de manchas escura no dorso, formando anéis e no ventre apresentam-se mais claras. É o

menor felídeo brasileiro com tamanho semelhante ao gato doméstico (*Felis catus*) de aproximadamente 79 cm cabeça-cauda (figura 2).



Figura 2. Exemplar de gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) do Zoológico de Brasília
Foto: Luiz Filipe Carneiro

Ocorre da América Central (Costa Rica) ao sul da América do Sul e no Brasil, tem sua ocorrência em todos os biomas, vivendo, como a maioria dos felinos, solitário, necessitando de uma área em média de 3 km² para fêmeas e 10,5 km² para os machos e com hábitos noturnos (REIS, 2010; PAYAN, 2016). Sua expectativa de vida em cativeiro é de até 20 anos, enquanto em natureza pode chegar a 15.

Os animais cativos ao se reproduzirem podem gerar até 2 filhotes, de um período gestacional de 63 a 78 dias (em vida livre ainda não há informações). Os gatos-do-mato são animais carnívoros, tendo em sua dieta itens como aves, pequenos e médios mamíferos, como por exemplo quatis, pacas, lagartos e insetos (NOWELL, 1996; SIGRIST, 2012).

Devido à perda de habitat por desmatamento, atropelamento e caça, a IUCN considera a espécie vulnerável, enquanto que para o ICMBio, a espécie é classificada como em perigo (ICMBIO, 2017a; PAYAN, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Panthera onca (LINNAEUS, 1758), é o maior felino do continente americano, podendo ter de comprimento corpo-cauda até 223 cm, pesando de 56 a 158 kg, com corpo musculoso.

A onça pintada possui pelagem amarelada, com exceção do peito e do ventre, que apresentam cor branca e possuem rosetas ao longo de todo o corpo, perceptível na figura 3A. Espécimes melânicos também são comuns, ou seja, possuem o escurecimento da cor de fundo, tendendo ao preto (conhecido como jaguar-preto) representado na figura 3B (NOWELL, 1996; REIS, 2010; SIGRIST, 2012).



Figura 3. Exemplos de onça pintada (*Panthera onca*) do Zoológico de Brasília. Em A, indivíduo com expressão de coloração normal. Em B, indivíduo melânico.

Foto: Luiz Filipe Carneiro

Ocorrem desde a região costeira do México até o norte da Argentina e assim como o gato-do-mato, encontra-se presente em todos os biomas brasileiros, tendo hábitos terrestres, porém se mostram bons escaladores e nadadores. Podem necessitar de uma área de até 300 km², sempre com a presença de curso d'água. Possui hábito noturno e solitário, como quase todos os felinos (MORATO *et al.*, 2017). Esta espécie em cativeiro pode viver até 22 anos, com períodos reprodutivos em qualquer época do ano, dando origem de 1 a 4 filhotes, com gestação de 90 a 111 dias e cuidam de seus filhotes até que completem dois anos. São carnívoros, alimentando-se de grandes mamíferos (antas, tatu, tamanduá-bandeira, gado de fazendas, etc.), répteis como jacarés, tartarugas e cágados (REIS, 2010; MORATO *et al.*, 2017).

Na lista da IUCN, seu *status* de ameaça é classificado como quase ameaçado, já pela avaliação do ICMBio, encontra-se vulnerável. As onças já se encontram extintas nos Estados Unidos, El Salvador e Uruguai (QUIGLEY, 2017; MORATO *et al.*, 2017).

2. Justificativa

Diante da necessidade de conservação dos animais silvestres, o MMA trabalha com metas para reduzir a perda de biodiversidade brasileira e parte de suas ações estão ligadas ao PAN. Este é um conjunto de políticas públicas, pactuadas com a sociedade, que identificam e orientam as ações com o objetivo de reduzir a vulnerabilidade das espécies, combatendo as ameaças que põem em risco estas populações. As ações do PAN incluem pesquisas *ex situ* que suportam um estudo focado no aumento do número de indivíduos de cada uma das espécies, bem como garantam a variabilidade genética dos mesmos.

O estabelecimento de uma metodologia eficiente de criopreservação de células somáticas, como os fibroblastos de alguns dos felinos silvestres ameaçados de extinção, como por exemplo, a onça preta, gato do mato e gato palheiro, podem constituir uma grande ferramenta de conservação dessas espécies. Estas células, quando bem estocadas podem ser recultivadas para uso emergencial na clonagem por transferência nuclear, em estratégias de conservação *in situ*.

Estas células, estocadas nos bancos de Germoplasma, atuam como uma estratégia para auxiliar no combate à extinção de espécies, pois permitem a conservação de material genético por longos períodos e, aliado ao desenvolvimento da biotecnologia aplicada a animais silvestres, torna viável o aumento na variabilidade genética dos animais reproduzidos para manutenção em cativeiro ou mesmo para a reintrodução de indivíduos na natureza.

Além disso, não há, na literatura, informações sobre a caracterização de fibroblastos destes felídeos, sendo necessários esforços para realização de estudos destes animais.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o melhor protocolo de criopreservação para manutenção da viabilidade celular de fibroblastos isolados das espécies de felinos silvestres selecionadas: *Panthera onca* (onça preta); *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato); *Leopardus colocolo* (gato palheiro), bem como caracterizá-los morfológicamente.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Caracterizar a morfologia dos fibroblastos das espécies estudadas;

3.2.2. Testar o melhor tipo de crioprotetor, bem como sua concentração no meio diluente para cada uma das espécies estudadas;

3.2.3. Analisar a viabilidade dos fibroblastos após a criopreservação;

3.2.4. Verificar a percentagem de células apoptóticas e necróticas dos fibroblastos criopreservados das três espécies de felinos estudadas.

4. Material e Métodos

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília e aprovado sob o UNBDoC nº 66706/2016.

As células que foram utilizadas neste experimento encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido, seguindo o protocolo padrão do Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Transferência de Tecnologia em Raças Zebuínas de Aptidão Leiteira (CTZL), publicado por MARTINS *et al.*, (2013) compondo um Banco de Germoplasma, mantido por uma parceria entre a Fundação Jardim Zoológico de Brasília e Embrapa Cerrados, ligada ao projeto de “Recuperação e criopreservação de Germoplasma de mamíferos silvestres para estudos de biotécnicas de reprodução. Uma estratégia para a conservação animal *ex situ*”.

MARTINS *et al.*, (2013) isolou os fibroblastos a partir de biópsias de animais que vieram a óbito no Zoológico de Brasília. Após lavadas com PBS, as biópsias foram cortadas em pequenos pedaços (de 1 a 2mm) de depositadas, bem aderidas, no fundo de placas de pétri de 35mm e adicionado 2mL de meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e antibióticos- Penicilina G e Estreptomicina). O material foi mantido em estufas de gás carbônico (tensão de 5% CO², temperatura de 39°C e umidade saturada) por uma semana e após este período as biópsias foram retiradas e o monitoramento do crescimento celular foi realizado de 2-3 dias, até o estágio de

confluência de 80%, momento este de repique da cultura para uma garrafa de cultivo de 25cm². Após o estágio de confluência das garrafas terem sido atingidos, adicionou-se 2mL de meio Tripsina e EDTA, aguardou-se a dissociação das células por aproximadamente 5 minutos, centrifugou-se o material a 200 x g, descartou-se o sobrenadante e reconstituiu o *pellet* com 1mL de meio de congelamento- DMEM suplementado com 10% de DMSO e transferiu-se o conteúdo para palhetas de 0,25mL. O congelamento foi realizado de forma lenta, reduzindo a temperatura primeiramente para -80°C para posterior estocagem no botijão de nitrogênio líquido.

O cultivo celular, congelamento e os testes de viabilidade por citometria de fluxo foram realizados no laboratório de Reprodução Animal do CTZL e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As análises morfológicas dos fibroblastos, realizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). O delineamento experimental encontra-se descrito na Figura 4.

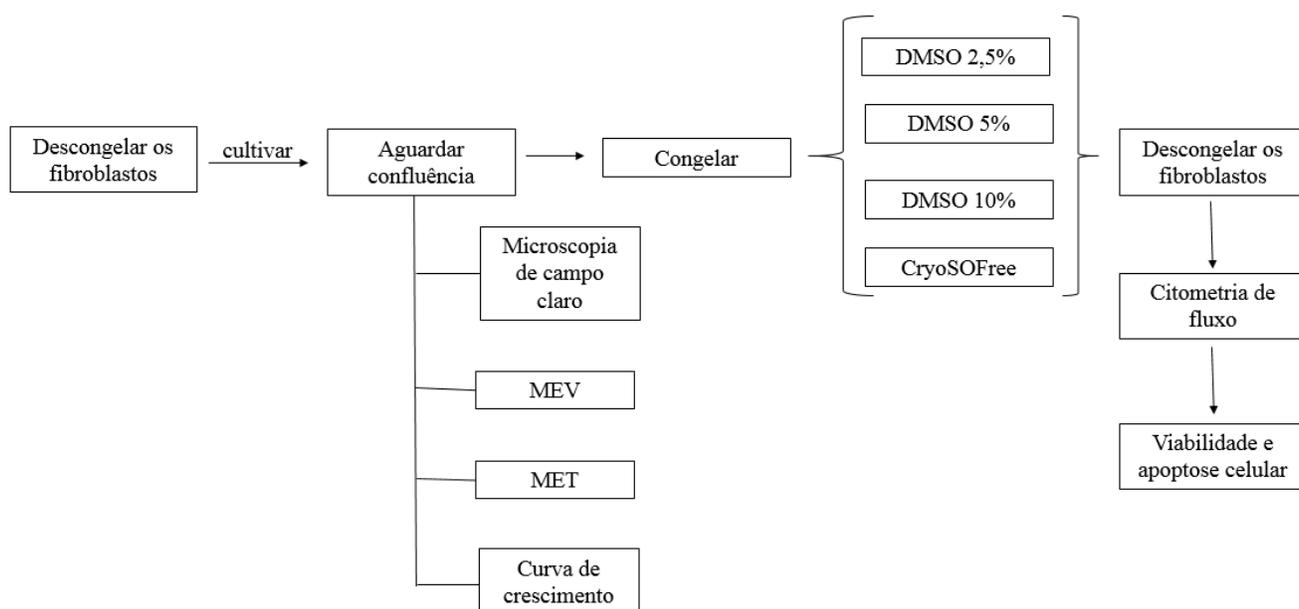


Figura 4. Delineamento experimental demonstrando as sequências de avaliações de caracterização, criopreservação e análise da viabilidade celular pós-criopreservação.

4.1. Cultivo celular

Para iniciar o cultivo celular 6 palhetas de 0,25 mL foram descongeladas, sendo duas de cada espécie selecionada para o experimento (*L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca*). Os fibroblastos de pele de orelha armazenados nas palhetas encontravam-se variando entre cultura secundária (P2) e terciária (P3) e a uma concentração aproximada de 50×10^4 células/mL.

O procedimento para o descongelamento das amostras se deu retirando-se as palhetas do nitrogênio líquido e inserindo-as em um banho maria, com água aquecida a uma temperatura de 37 °C por 30 segundos. Após a retirada do material do calor, transferiu-se o conteúdo das duas palhetas de cada espécie para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, previamente identificados de acordo com a espécie em questão, contendo 1 mL de meio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e antibióticos- Penicilina G e Estreptomicina). Os tubos foram centrifugados por 5 minutos na rotação de 200 x g. Após a formação do *pellet* celular, desprezou-se o sobrenadante e reconstituiu-se a amostra com mais 1 mL do meio de cultivo (descrito anteriormente). O conteúdo foi transferido para uma placa de Petri de 60x15mm, preenchida com 2 mL de meio de cultivo (descrito anteriormente). Após as células atingirem o estado de confluência, elas foram tripsinizadas e depositadas em garrafas de cultivo celular de 50 mL. Esta etapa de replicar a cultura foi realizada para garantir que não houvessem resquícios de crioprotetor nas células, além de aumentar o número de células da cultura.

As placas com fibroblastos das diferentes espécies de felinos foram mantidas em condições de cultivo em uma estufa com 5% de CO₂, 90% de umidade e temperatura de 38,5°C. O cultivo celular foi monitorado diariamente e a cada 3 dias era renovado o meio de cultivo, adicionando-se novos 2 mL de DMEM. A confluência celular foi acompanhada via observação em microscópio óptico invertido, monitorando-se o espaço ainda disponível na garrafa de cultivo para a multiplicação das células.

Para a avaliação da cinética de crescimento, a cultura foi realizada em placa de cultivo de 24 poços, com a contagem da concentração celular realizada previamente, para que todos os poços iniciassem o cultivo com a mesma quantidade de células. No dia 0 foram colocadas 2×10^4 /mL de células por cada poço, em 2 mL meio de cultivo DMEM suplementado com 20%

de soro fetal bovino (FBS). A cada dois dias o meio de cultivo dos poços era totalmente trocado. Vinte e quatro horas após o início do cultivo, contou-se a quantidade de células do poço 1. No segundo dia, 48 horas de cultivo, contou-se a quantidade de células do poço 2 e assim sucessivamente até completar oito dias (192 horas) de cultivo consecutivos. Para a contagem do quantitativo de células utilizou-se uma câmara de Neubauer. Foram feitas tréplicas para cada uma das três espécies.

4.2. Morfologia

Para a caracterização morfológica das células, estudou-se a morfologia dos fibroblastos bem como seus componentes internos, utilizando-se de microscopia óptica, com microscópio invertido (Eclipse TS100, Nikon, Japão), microscopia eletrônica de varredura (MEV), em microscópio eletrônico de varredura Jeol 7001-F (Jeol, Japão) e em microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio Jeol 1011 (Jeol, Japão).

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Na avaliação de MEV, após tripsinização das células nas placas de cultivo, foram fixadas em temperatura ambiente com fixador Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose, 5mM de CaCl₂ em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2). Em seguida centrifugadas e lavadas 2 vezes com solução tampão. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8%, 5 mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0.1 M e lavadas 2 vezes com tampão e depois em água destilada. O sedimento foi diluído com água destilada e as células espalhadas sobre lamínula coberta com poli-L-lisina. A desidratação foi realizada em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%). A secagem foi realizada em equipamento Ponto Crítico, modelo Critical Point Dryer (CPD030, Balzers) com CO₂ e em seguida a metalização de sua superfície com ouro, utilizando o metalizador modelo SPUTTER COATER- SCD050 (Leica, Alemanha).

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a avaliação no MET, a amostra foi fixada com fixador Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose, 5mM de CaCl₂ em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) por no máximo 24 horas e em seguida, lavada 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (15 minutos cada etapa). No momento da pós-fixação a amostra passou uma hora em um recipiente com tetróxido de ósmio + ferricianeto de potássio, na concentração 1:1. A etapa subsequente foi lavar o material uma vez na água destilada, antes da etapa de contrastação *in block*, etapa realizada com acetato de uranila 0,5% (por 2 horas na geladeira, coberto com papel alumínio). Ao retirar da geladeira, o material foi novamente lavado com água destilada, por duas vezes e após isso seguiu a etapa de desidratação com gradientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%), por 10 minutos em cada uma das etapas. A etapa subsequente é a de infiltração gradual de resina Spurr, substituindo a acetona na proporção seguindo respectivamente, 2:1 (6 horas ou *overnight*), 1:1 (6 horas), 1:2 (6 horas ou *overnight*) e resina pura por até 6 horas. No momento de emblocar o material, foi preciso deixá-lo em resina pura, em forma de silicone, na estufa a 65°C por 72 horas. Por fim, realizou-se os cortes semifinos, com 5 µm de espessura e cora-se o material com azul de toluidina para escolha das regiões de interesse. Depois de cortes ultrafinos de 50 nm, com ultramicrótomo EM UC7 (Leica, Alemanha) colocou-se sobre telas de cobre de 300 *mesh*, os quais foram contrastados com acetato de uranila a 2% por 40 minutos, seguido por citrato de chumbo, por 10 minutos.

4.3. Criopreservação celular

Após atingirem o estágio de confluência celular em garrafas de cultivo de 25cm², os fibroblastos das diferentes espécies foram criopreservados em três concentrações de DMSO (2,5%, 5%, 10%) em meio base DMEM associado a 5% de soro fetal bovino. Além disso também foi testado o crioprotetor CryoSOfree[™], Sigma-Aldrich (cod. C9249), que segundo o fabricante, é um meio livre de proteína animal e com uma porção adequada de grupos amino e carboxila.

Para realizar o congelamento celular, as células foram alocadas em palhetas de 0,25 mL e em seguida resfriadas por 24 h à -80°C. Finalmente, o material foi imerso no nitrogênio líquido,

permanecendo armazenado até o momento das avaliações. Foram congeladas 6 palhetas para cada tratamento com DMSO, para as três espécies de felinos. Para o meio CryoSOfree™ seguiu-se a orientação do fabricante, congelando-se os fibroblastos em 1 ml de meio dentro de criotubos de 1,5 ml. Foram congelados 3 criotubos para cada espécie. Em cada uma das amostras congeladas (palhetas e criotubos) padronizou-se aproximadamente 3×10^4 células.

4.3.2. Avaliação da viabilidade e apoptose celular por citometria de fluxo

As avaliações em citometria de fluxo foram realizadas com o objetivo de verificar a percentagem de células viáveis (membrana plasmática íntegra), bem como a percentagem de células em apoptose e necrose após a criopreservação dos fibroblastos nas diferentes soluções crioprotetoras. Para a avaliação da integridade de membrana plasmática e apoptose foi utilizado o kit *Dead Cell Apoptosis* (AlexaFluor® 488 anexin V, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA) em associação com Iodeto de Propídeo.

Foram descongeladas três amostras para cada um dos tratamentos de criopreservação propostos, por espécie trabalhada. As células foram descongeladas em banho maria à 37°C e centrifugadas por 3 a 5 minutos a 1,3 RPM. Em seguida foi retirado o sobrenadante e as amostras (10µL) foram diluídas e incubadas à 37 °C por 15 a 30min, em solução de trabalho (20µL), preparada de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

Cinco mil eventos foram analisados a cada momento/tratamento. Com o intuito de excluir possíveis debris celulares ou sujidades, o corante nuclear Hoechst 33342 (bisBenzimide H33342 trihydrochloride) foi utilizado em todas as soluções de trabalho. Além disso, para a obtenção das amostras foi criado um raio específico com as coordenadas: eixo x (área) = 145,925 a 1949,779, e eixo y (relação de aspecto) = 1,022 a 0,371 para a seleção de apenas fibroblastos. As amostras foram então analisadas através do software IDEAS v6.1, AMNIS FlowSight (AmnisCorp. Seattle, WA).

As emissões do AlexaFluor foram captadas através do canal 2 (505-560 nm) e excitadas através do laser 488nm a 30 mW. Os sinais emitidos pelo Iodeto de Propídeo foram captados pelo canal 4 (595- 642 nm) e excitados através do laser 488 a 30 mW. Os sinais emitidos pelo Hoechst 33342 foram coletados através do canal 7 (435-505 nm), após excitação a laser de 405 nm a 50

mW. O laser SSC foi utilizado a 10mW. Os resultados adquiridos foram posteriormente analisados com o uso do software IDEAS v6.1.

4.4. Análise Estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigma Plot 12. A verificação estatística do efeito dos crioprotetores sobre a viabilidade das células das diferentes espécie pós-descongelamento foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Para o cálculo da curva de crescimento foi considerado o número médio de células em função do tempo. Com estes resultados um gráfico de dispersão com curvas de tendências foi estabelecido.

5. Resultados

5.1. Morfologia dos fibroblastos

Quando observadas em microscopia de campo claro e em microscopia eletrônica de varredura, foi possível perceber uma diferença morfológica entre os fibroblastos dos três felídeos, porém as três apresentaram evidentes projeções citoplasmáticas. As células de *L. colocolo* apresentaram forma fusiformes, conforme evidenciado na figura 5A. Na microscopia de varredura, com um aumento de 1.400x, ficou evidenciado as projeções citoplasmáticas (setas, figura 5B), porém foi notório o menor tamanho destas projeções em relação às duas outras espécies.

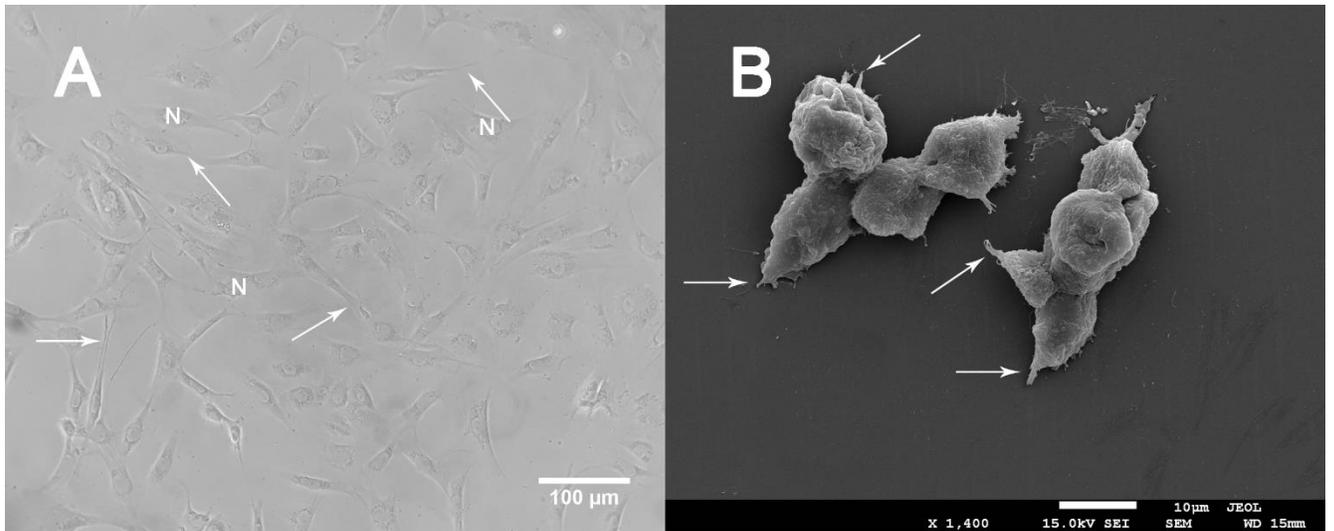


Figura 5. Fibroblastos de *Leopardus colocolo* (gato palheiro) em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Setas indicando projeções citoplasmáticas. (A) Cultivo celular em microscopia óptica (400x) com presença de Núcleo (N). (B) Microscopia eletrônica de varredura. (x1,400).

As células do *L. tigrinus* apresentaram-se esféricas e com projeções citoplasmáticas mais curtas, segundo demonstrado via microscopia óptica, com aumento de 400x, evidenciado na figura 6A. Porém, com um aumento de 1.400x, via microscopia eletrônica de varredura, setas evidenciaram projeções citoplasmáticas mais longas, quando comparadas com os fibroblastos do *L. colocolo*, conforme demonstrado na figura 6B.

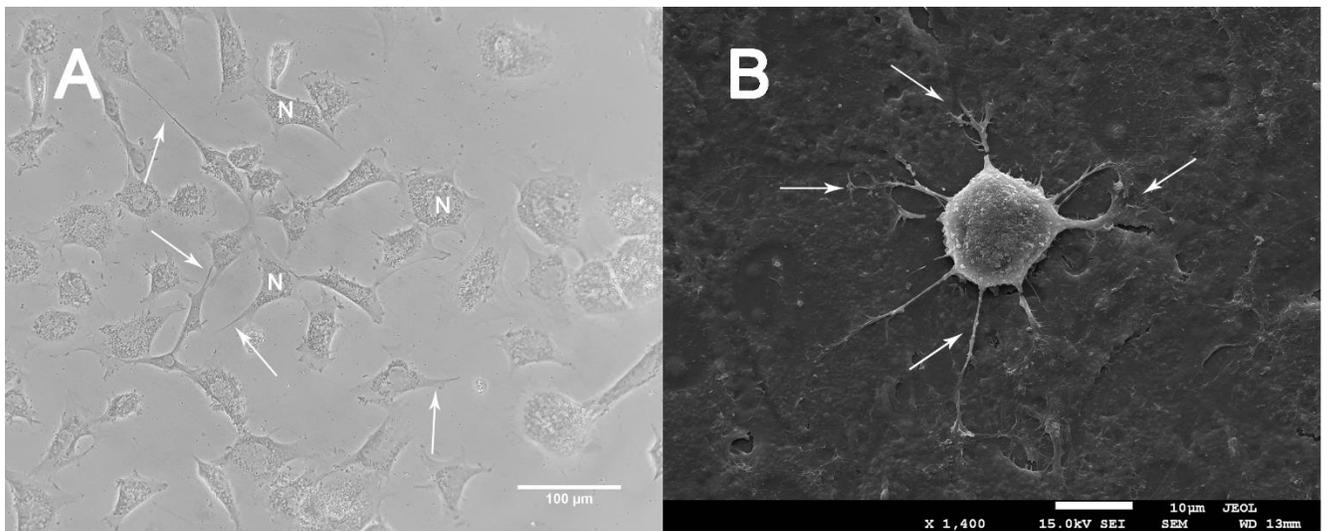


Figura 6. Fibroblasto de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato) em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Setas indicando projeções citoplasmáticas. (A) Cultivo celular em microscopia óptica (400x) com presença de Núcleo (N). (B) Microscopia eletrônica de varredura (x1,400).

A figura 7A evidencia, com um aumento de 400x, os fibroblastos de *P. onca*, com aparência mais alongada e com longas projeções. São perceptíveis também na mesma figura, seus núcleos mais afilados. Na microscopia de varredura é indicado pelas setas da figura 7B, as longas projeções citoplasmáticas, em conformidade ao visto na figura 7A.

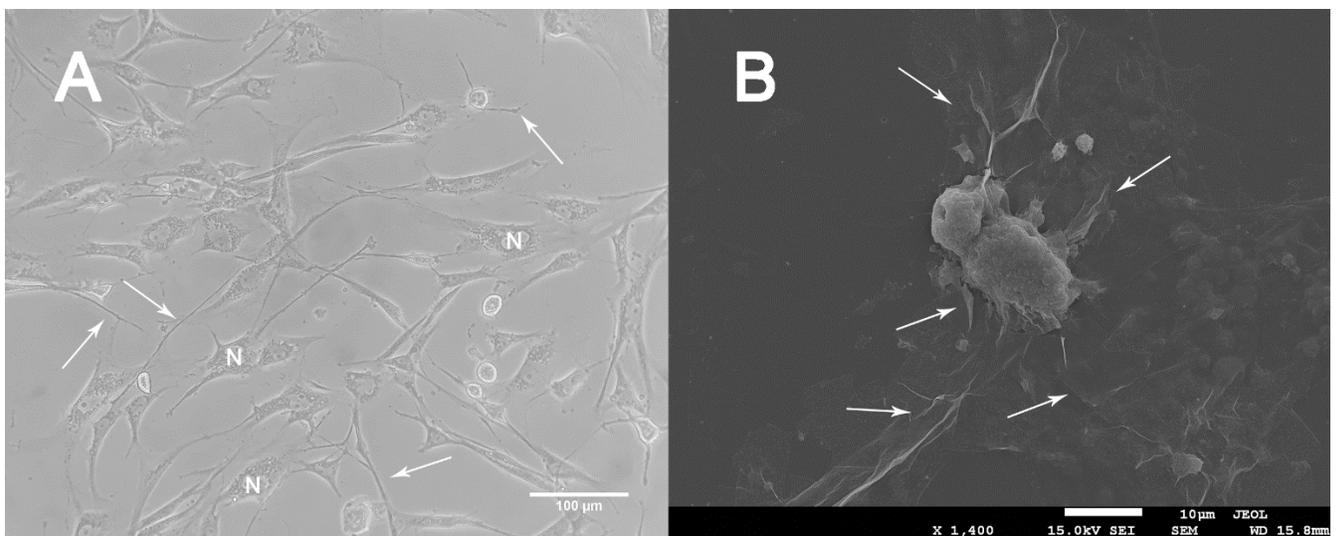


Figura 7. Fibroblasto de *Panthera onca* (onça preta) em microscopia óptica e eletrônica de varredura. Setas indicando projeções citoplasmáticas. (A) Cultivo celular em microscopia óptica (400x) com presença de Núcleo (N). (B) Microscopia eletrônica de varredura (x1,400).

A microscopia eletrônica de transmissão de *L. colocolo* demonstrou, conforme indicado por setas na figura 8A, muitas projeções citoplasmáticas, com membranas íntegras. Presença de diversas vesículas digestivas e vacúolos, indicados na figura 8B, com um aumento maior. Na mesma figura o núcleo apresenta-se evidente e com notável cromatina e próximo a eles, há uma quantidade significativa de retículo endoplasmático rugoso. Foi registrada mitocôndria, próxima ao núcleo, conforme demonstrado pela figura 8C.

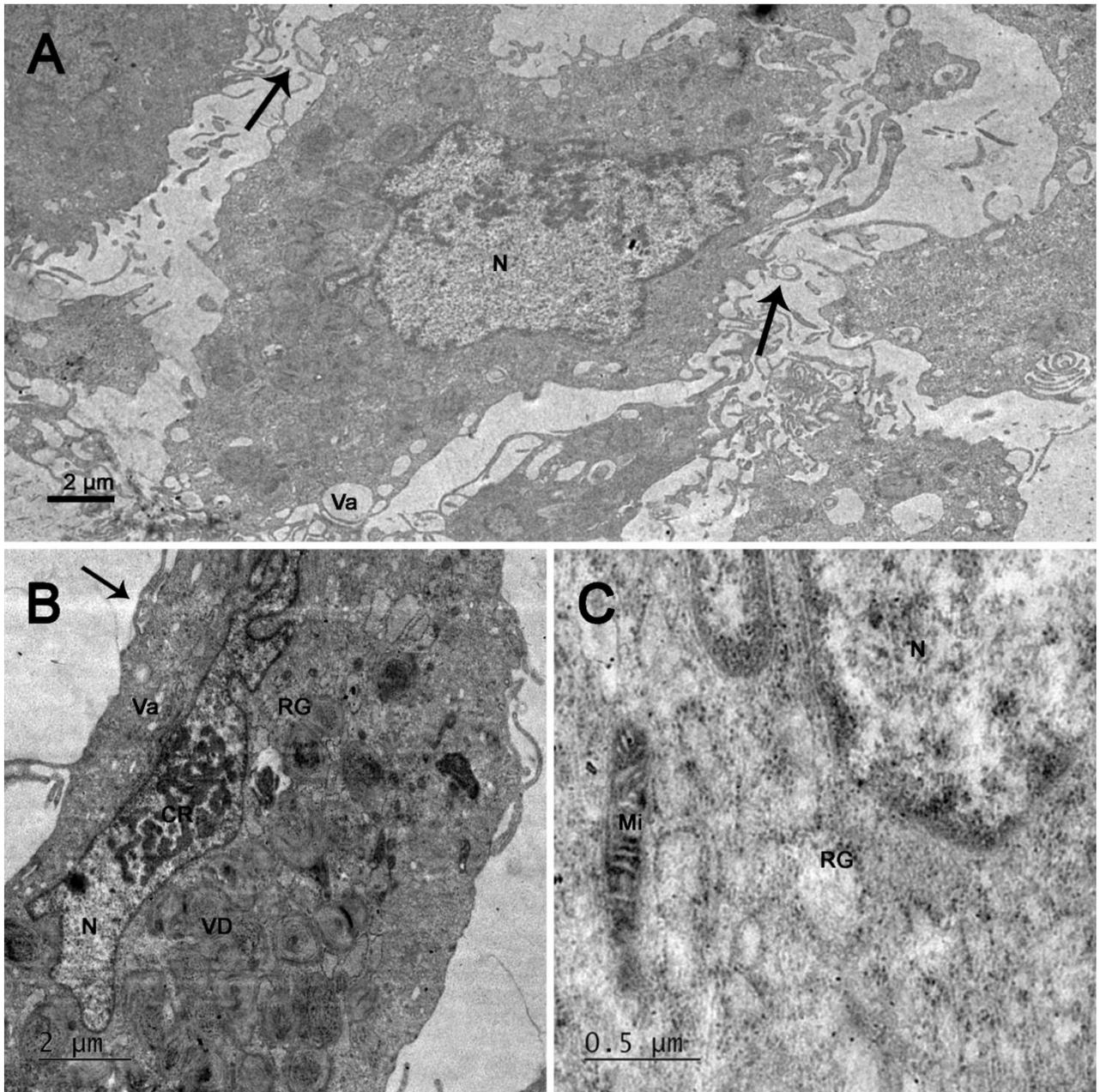


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de *Leopardus colocolo* (gato palheiro). Setas indicando projeção citoplasmática. (A) Imagem panorâmica de um fibroblasto, com diversas projeções citoplasmáticas. (B) Vesículas digestivas sugerindo intensa atividade celular. (C) Presença de mitocôndria. Núcleo (N), Cromatina (CR), Vacúolo (Va), Vesícula Digestiva (VD), Retículo Endoplasmático Rugoso (RG), Mitocôndria (Mi).

Ao realizar a microscopia eletrônica de transmissão para o *L. tigrinus* foram percebidas diversas vesículas, como vacúolos, indicado na figura 9 (A, B e C). Projeções citoplasmáticas indicadas pelas setas são demonstradas na figura 9B além de grânulos de secreção o que sugere

que o fibroblasto observado está envolvido em atividade de síntese. Na figura 9C é possível melhor identificação de vacúolos digestivos, devido ao maior aumento em relação à mesma figura no quadrante A.

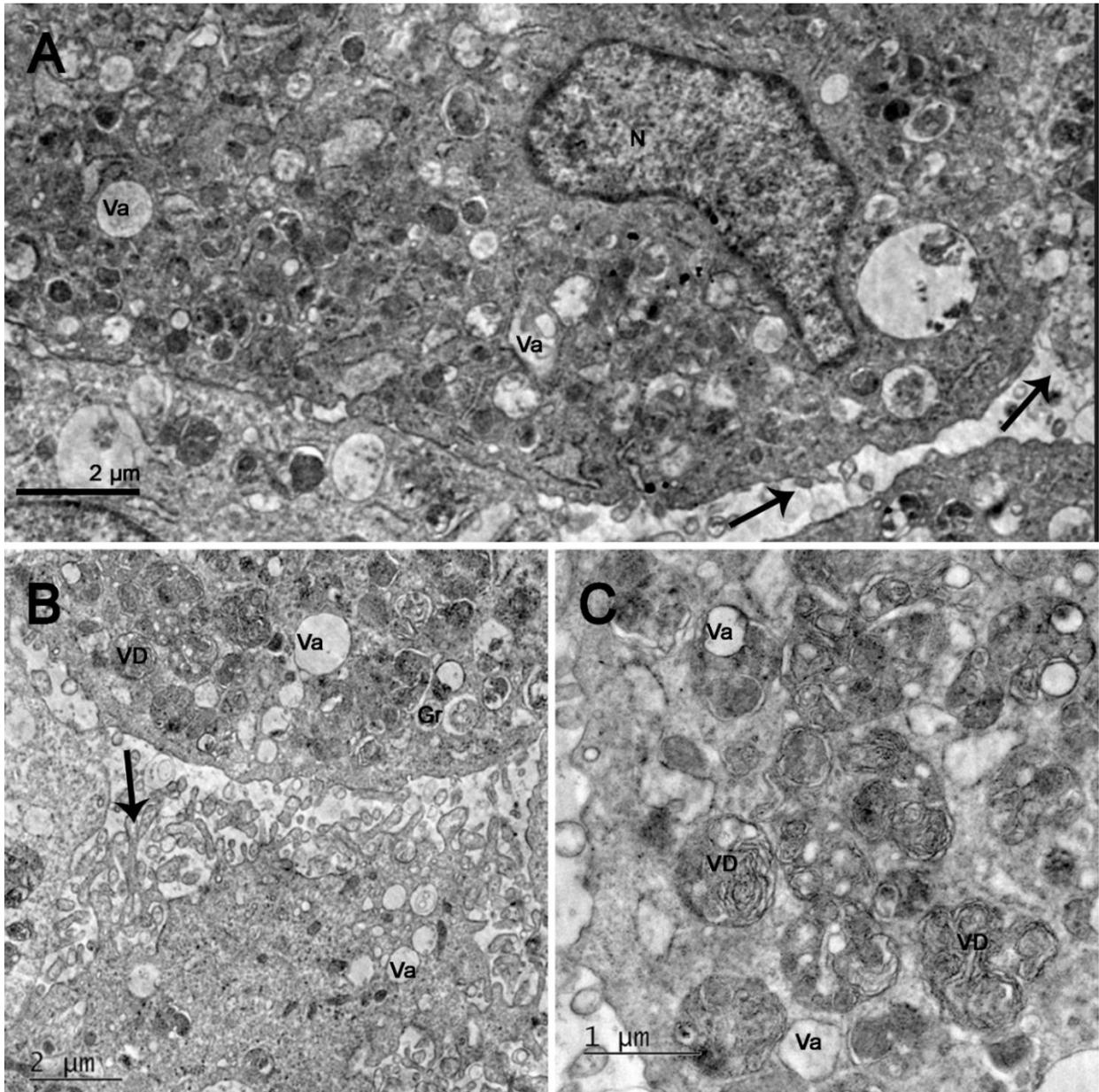


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de *Leopardus tigrinus* (gato-domato). (A, B) Setas indicando projeção citoplasmática. (C) Presença de diversas vesículas digestivas, sugerindo intensa atividade celular. Núcleo (N), Vacúolo (Va), Vesícula Digestiva (VD), Grânulo de secreção (Gr).

Por fim, para *P. onca*, a microscopia eletrônica ilustrou projeções citoplasmáticas longas, indicadas por setas, conforme se nota na figura 10A. A presença de elevada quantidade de

retículo endoplasmático rugoso pode ser notado nos quadrantes A e B da figura 10. Na figura C, o núcleo é notado, bem como a cromatina e vacúolos digestivos próximos a eles.

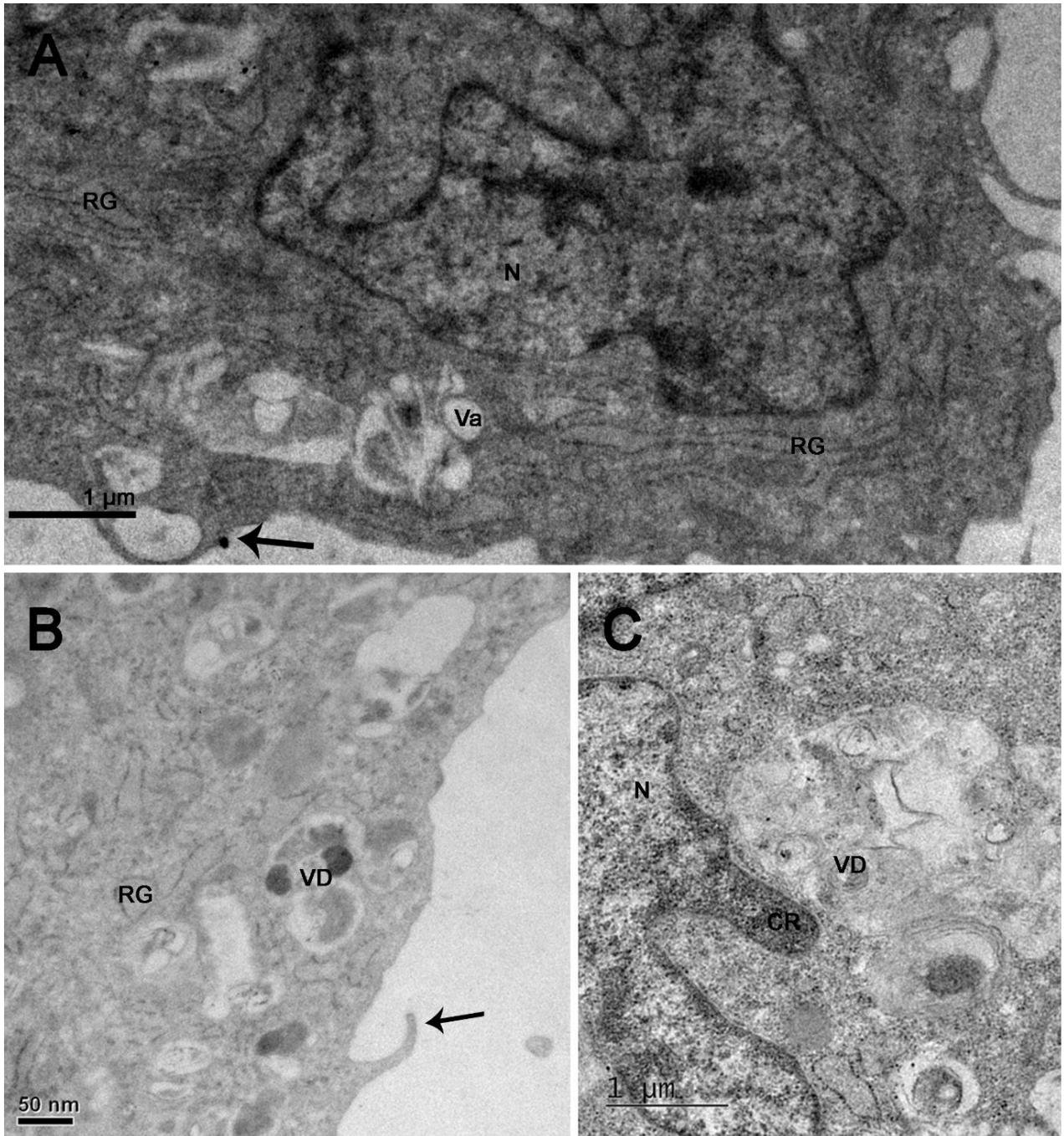


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos de *Panthera onca* (onça preta). (A, B) Setas demonstrando as projeções citoplasmáticas. (C) Presença de vesícula digestiva, sugerindo intensa atividade celular. Núcleo (N), Cromatina (Cr), Vacúolo (Va), Vesícula Digestiva (VD), Retículo Endoplasmático Rugoso (RG).

5.2. Curva de Crescimento

A análise da curva de crescimento dos fibroblastos das três espécies de felinos estudadas, *L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca* está representada na Figura 11.

Percebe-se que ao longo dos 8 dias, as células das três espécies tiveram crescimento diferenciado e até o final do 8º dia de acompanhamento, nenhuma das culturas havia atingido confluência total na placa de cultivo.

Os fibroblastos de *L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca* apresentaram um padrão de crescimento semelhante até 100 h de cultivo. A partir deste período, os fibroblastos das três espécies de felinos silvestres aumentaram o crescimento celular, porém as 120 h, 140h e 160 h, os fibroblastos de *L. colocolo*, cresceram de forma exponencial, se diferenciando das outras espécies.

Desta forma, ao final do 8º dia de acompanhamento, o cultivo do *L. colocolo* foi o que atingiu uma quantidade de células maior quando comparado às outras duas espécies (*L. tigrinus* e *P. onca*), sendo que este quantitativo representou uma quantidade aproximada de 42×10^4 células/mL, enquanto que nas outras duas espécies, a quantidade máxima de células ficou aproximadamente entre 8 e 9×10^4 células/mL.

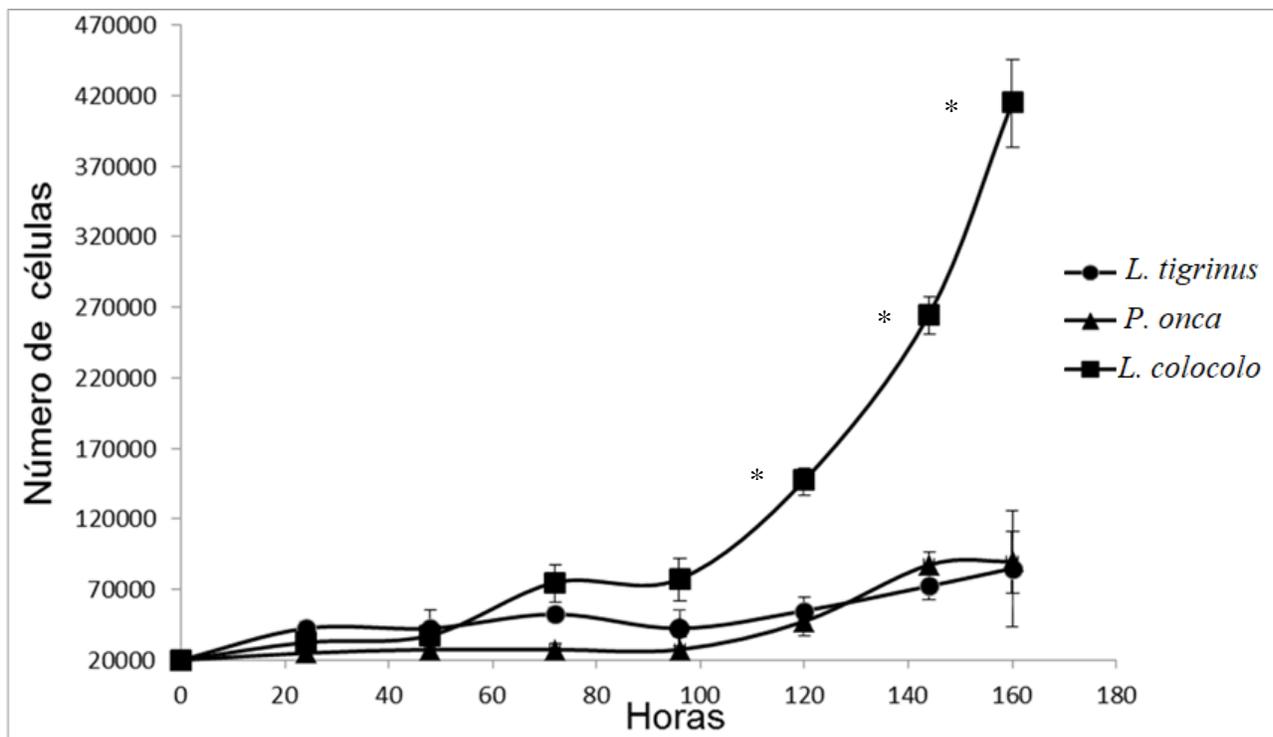


Figura 11. Curva de crescimento de 8 gerações de fibroblastos de *L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca*. *Diferenças significativas entre animais para o período de crescimento celular ($P < 0,5$).

5.3. Viabilidade Celular

Os resultados obtidos por citometria de fluxo, que analisou a quantidade de células viáveis, em apoptose (inicial ou final) e necrose, após a criopreservação, estão apresentados nas figuras 12 a 15.

A figuras 12 a 14 ilustram a reação dos fibroblastos à Anexina V, que traduz início de apoptose e ao iodeto propídeo, detectando apoptose ou necrose celular.

A figura 12 representa os gráficos de pontos traduzindo a análise de citometria de fluxo para as células de *L. colocolo*. No quadrante A, as células criopreservadas com DMSO a 2,5% demonstram-se com grande quantidade de células necróticas, quase nenhuma célula apoptótica e a grande maioria das células viáveis. No quadrante B, ilustrando análise das células criopreservadas em DMSO 5% não foi notada nenhuma célula em estágio de apoptose, quase

nenhuma célula em necrose, com quase todas as representações no quadrante das células viáveis. O quadrante C representa as células criopreservadas em DMSO 10%, com poucas células ditas necróticas, mas a maioria das células encontram-se viáveis após a criopreservação. Para o CryoSOfree™, representado no quadrante D, presença de um grande quantitativo de células encontradas em necrose, algumas em algum estágio de apoptose, porém o maior percentual de células encontrou-se viáveis.

A figura 13 representa os gráficos de pontos dos fibroblastos criopreservados da espécie *L. tigrinus*. No quadrante A, tratamento em DMSO 2,5%, não foi percebida nenhuma célula em estágio de apoptose, poucas células em estado de necrose, porém, a maioria das células viáveis. No quadrante B, representando o tratamento DMSO 5%, com nenhum fibroblasto reagindo com anexina V e pouquíssimas células reagindo com o iodeto de propídeo. Em C, é notado uma quantidade de células consideradas necróticas, mas a grande maioria das células foram sinalizadas como viáveis. Por fim, em D, o CryoSOfree™, é perceptível uma quantidade de células em algum estágio de apoptose, outras em necrose, por reagirem com iodeto de propídeo e a maioria das células viáveis.

A figura 14 ilustra o resultado da citometria de fluxo para os fibroblastos criopreservados de *P. Onca*. Em A, células criopreservadas em DMSO 2,5%, representando o gráfico que apresentou maior quantidade de pontos reagindo com iodeto de propídeo e houve também presença de células reagindo com anexina V. Em B, C e D os resultados foram semelhantes, representando respectivamente células criopreservadas em DMSO 5%, 10% e CryoSOfree™, com a grande quantidade de células sendo indicadas como estágio final de apoptose, muitas em apoptose, porém ainda a maioria das células viáveis.

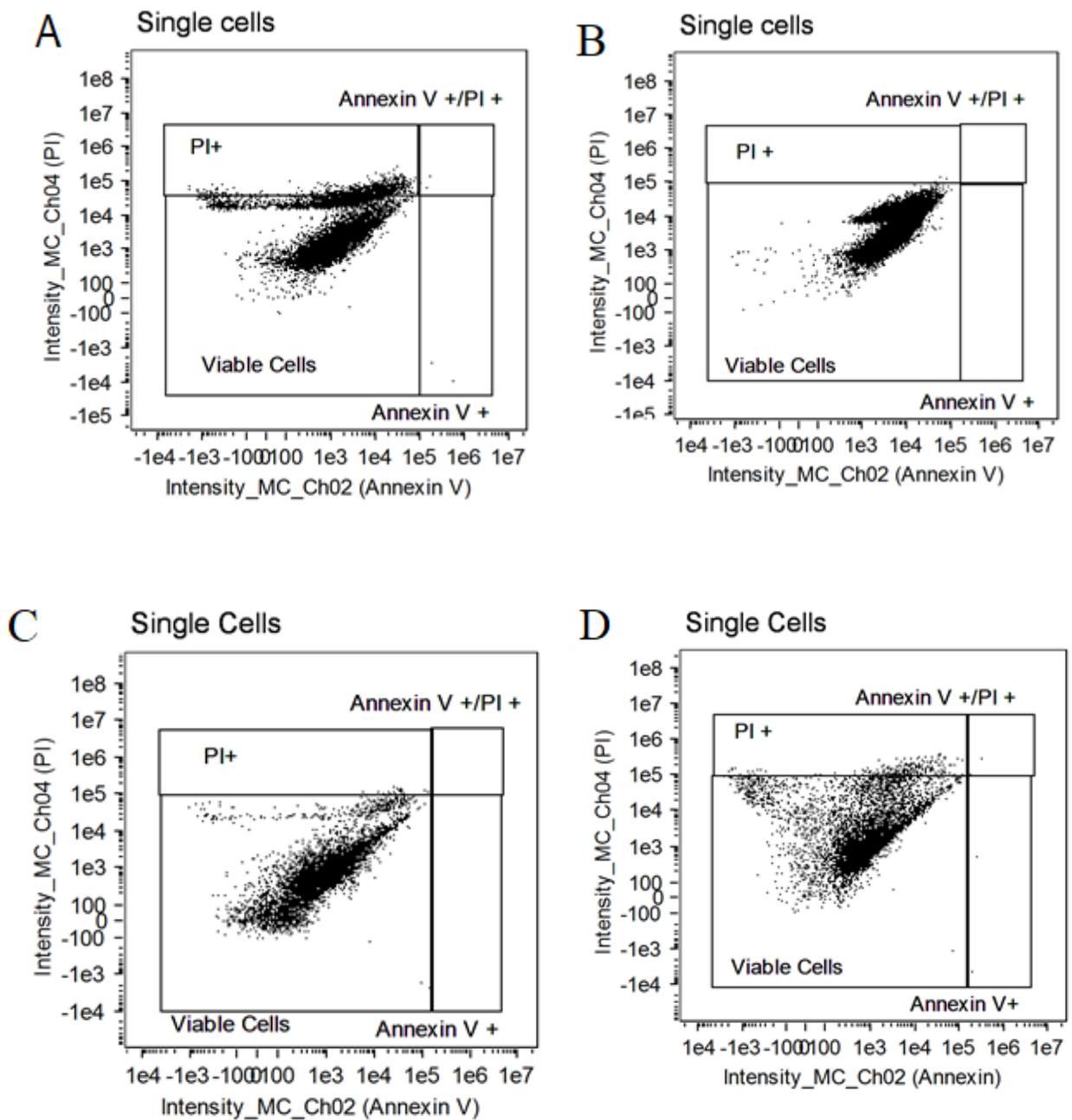


Figura 12. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de *L. colocolo* mostrando populações de fibroblastos corados com annexin V, iodeto de propídeo e não corados (viáveis). (A) 2,5% DMSO. (B) 5% DMSO. (C) 10% DMSO. (D) CryoSofree™.

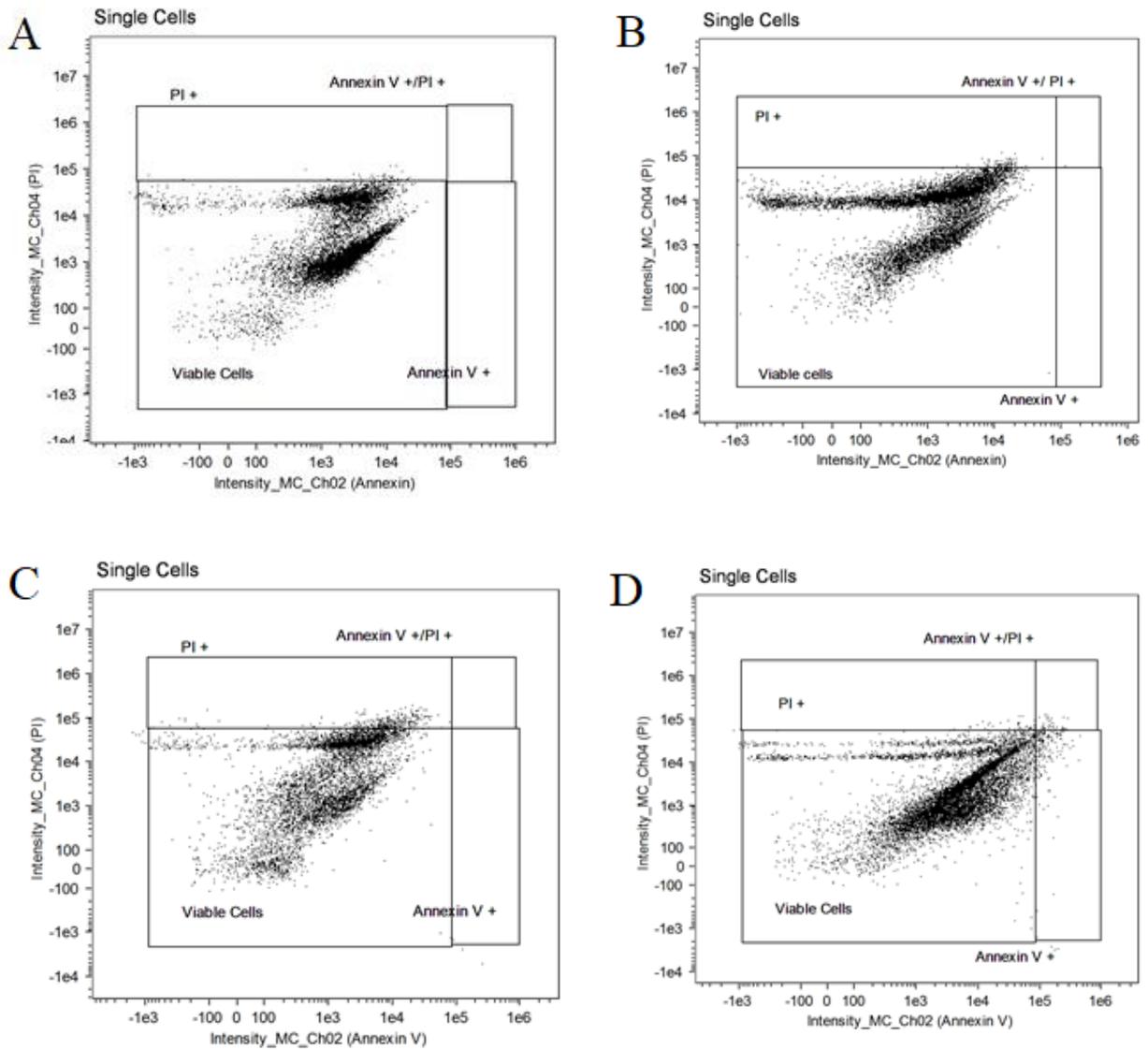


Figura 13. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de *L. tigrinus* mostrando populações de fibroblastos corados com annexin V, iodeto de propídeo e não corados (viáveis). (A) 2,5% DMSO. (B) 5% DMSO. (C) 10% DMSO. (D) CryoSOfree™.

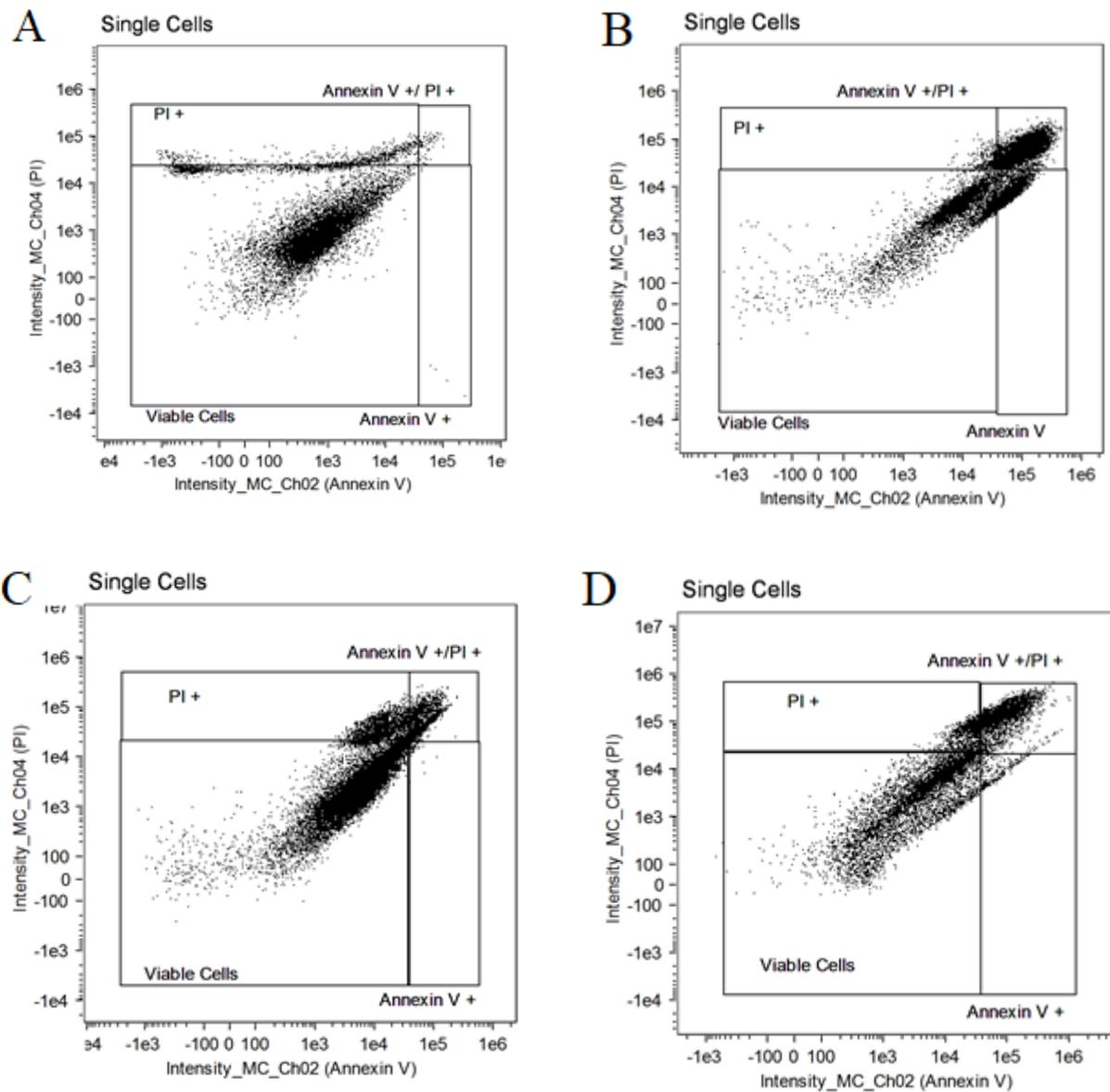


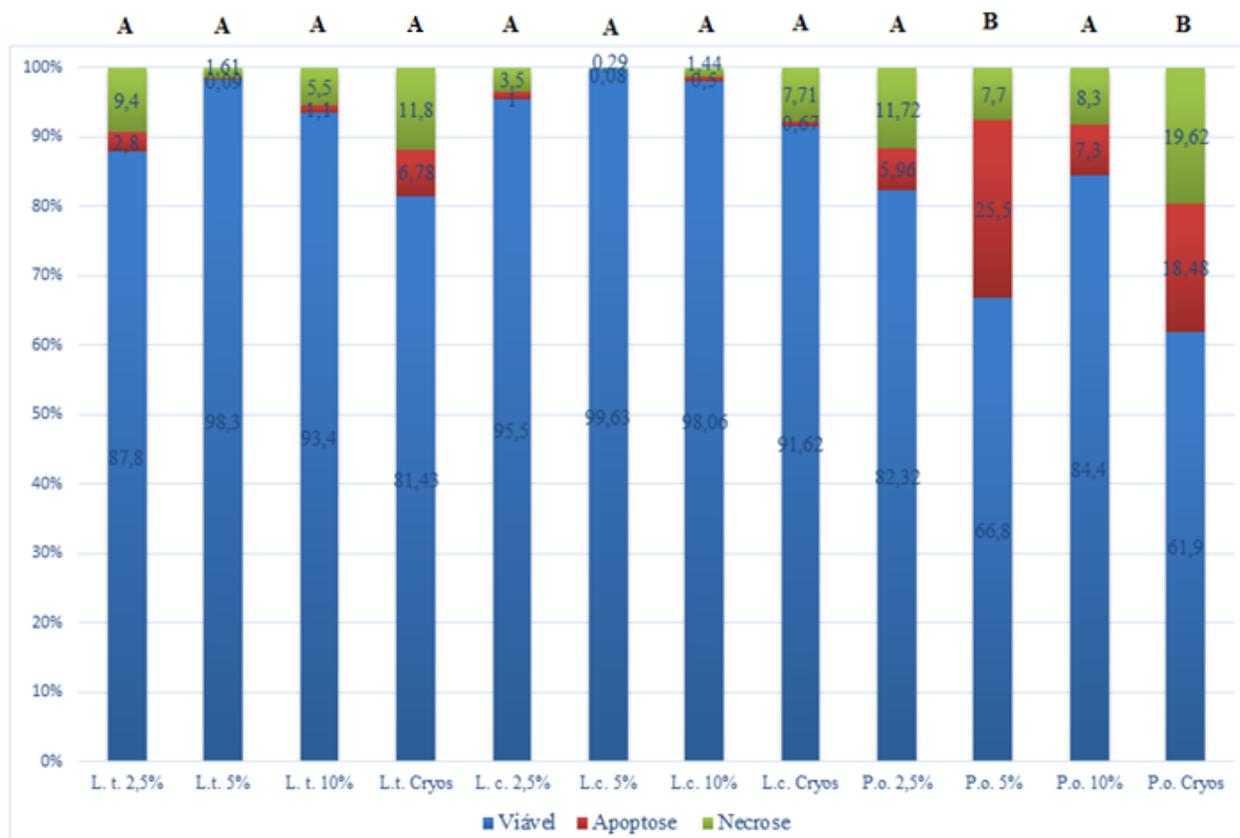
Figura 14. Gráficos de pontos de citometria de fluxo de *P. onca* mostrando populações de fibroblastos corados com annexin V, iodeto de propídeo e não corados (viáveis). (A) 2,5% DMSO. (B) 5% DMSO. (C) 10% DMSO. (D) CryoSOfree™.

Tabela 1. Viabilidade de fibroblastos das espécies *L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca* criopreservados em diferentes concentrações de DMSO e em meio CryoSOfree™.

Animais	DMSO 2,5%	DMSO 5%	DMSO 10%	CryoSOfree™
<i>L. colocolo</i>	95.50±3.95	99.63±0.63 ^A	98.06±3.09	91.33±4.84 ^A
<i>L. tigrinus</i>	87.86±18.95	98.26±0.90 ^A	93.40±1.83	81.43±14.40 ^A
<i>P. onca</i>	82.23±21.06 ^a	52.60±14.20 ^{bB}	84.45±1.75 ^a	61.90±6.70 ^{bB}

Letras diferentes nas linhas^{a,b} indicam diferença estatística (P<0,05).

Letras diferentes nas colunas^{AB} indicam diferença estatística (P<0,05).



L. t. = *Leopardus tigrinus*; *L. c.* = *Leopardus colocolo*; *P. o.* = *Panthera onca*.

Figura 15. Percentagem de fibroblastos viáveis, em apoptose e em necrose após a criopreservação com diferentes soluções crioprotetoras. Diferenças significativas (p < 0,05) são indicadas por letras maiúsculas diferentes (entre diferentes tratamentos na mesma espécie).

A Tabela 1 e a Figura 15 são complementares e expõem os resultados da viabilidade celular por espécie e soluções de criopreservação utilizadas.

Para *L. colocolo* não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) de eficiência, entre os 4 tipos de metodologias escolhidas. Em percentagem, todas as concentrações apresentam mais de 90% de células viáveis, sendo a concentração DMSO 5% protegeu 99,63% dos fibroblastos. Para as concentrações de DMSO 10%, DMSO 2,5% e CryoSOfree™ as percentagens foram respectivamente 98,06%, 95,50% e 91,33%.

Para os fibroblastos de *L. tigrinus* também não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) de eficiência, entre os 4 tipos de metodologias escolhidas. Em termos de percentagem, o crioprotetor DMSO 5% representou 98,3% de células viáveis, seguido de DMSO 10%, DMSO 2,5% e CryoSOfree™ com respectivamente 93,4%, 87,8% e 81,43% das células viáveis.

A espécie *P. onca* foi a espécie que apresentou as maiores porcentagens de células apoptóticas e necróticas, representando uma menor eficiência dos crioprotetores em relação às suas células. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações DMSO 2,5% e DMSO 10%, em relação à DMSO 5% e o CryoSOfree™. Os resultados que representaram maior eficiência de crioproteção foram as soluções de DMSO 2,5% e DMSO 10%, iguais estatisticamente ($p < 0,05$), tendo como percentagem 82,23% e 84,45% de células viáveis respectivamente. Em contraposição, as soluções menos eficientes foram DMSO 5% e CryoSOfree™, que entre eles o quantitativo de células viáveis foi estatisticamente semelhante ($p < 0,05$), dentro de uma percentagem de 52,60% para a primeira solução e 61,90% para a segunda.

Quando comparado a concentração do crioprotetor dentre as espécies, as concentrações de DMSO 2,5% e DMSO 10% não apresentaram diferenças estatísticas significativas, porém, a concentração de DMSO 5% e o CryoSOfree™ foram estatisticamente diferentes. Para as espécies de *L. colocolo* e *L. tigrinus* a concentração de 5% de crioprotetor foi estatisticamente semelhante ($p < 0,05$) em relação à sua eficiência, sendo superior à eficiência para crioprotetor os fibroblastos de *P. onca*. A mesma diferença estatística foi encontrada quando analisado o crioprotetor CryoSOfree™.

Em relação à *P. onca*, o CryoSOfree™ apresentou-se como menos eficiente, tendo 18,48% da amostra indicada como apoptóticas e 19,62% da amostra necrosada.

6. Discussão

Este trabalho configura-se no primeiro estudo de caracterização e criopreservação com diferentes tratamentos de crioprotetores para fibroblastos das espécies *Leopardus colocolo* (gato palheiro), *Leopardus tigrinus* (gato do mato) e *Panthera onca* (onça preta), felinos silvestres típicos do bioma Cerrado do Brasil.

O estabelecimento e criopreservação de fibroblastos provenientes de animais silvestres, especialmente aqueles ameaçados de extinção, é uma abordagem importante para a preservação animal. A formação de um banco de germoplasma com fibroblastos das espécies deste trabalho, garante o estoque deste material de interesse para estudos de multiplicação via transferência nuclear (TN). Para tanto, é necessário que as células armazenadas tenham a melhor viabilidade possível, para permanecerem em cultivo *in vitro*, durante todo período necessário para o procedimento de clonagem.

Neste estudo, por meio de microscopia de campo claro das células em aderência dos diferentes felinos silvestres, observou-se que estas apresentaram uma morfologia típica de fibroblastos, com projeções características conforme observadas. A mesma morfologia foi descrita em fibroblastos de *Phantera tigris altaica* (tigre siberiano), segundo SONG *et al.*, 2007 e também para outras espécies filogeneticamente distantes, como é o caso do veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), demonstrado por MAGALHÃES *et al*, 2017, do lobo-guará e do cachorro-do-mato, descritos por MATTOS, 2016. A morfologia típica de fibroblasto abrange células mais alongadas e com projeções citoplasmáticas, conforme descrito também por NISHIDA, YASUMOTO & OTORI (1988).

Houve diferenças morfológicas percebidas entre as três espécies de felinos. Fibroblastos de *L. colocolo* apresentam-se com projeções citoplasmáticas, mais fusiformes. As células de *L. tigrinus* apresentaram-se mais esféricas, com curtas projeções citoplasmáticas, enquanto *P. onca* possui fibroblastos mais alongados quando comparados às outras duas espécies, tanto seus núcleos quanto suas projeções são mais afilados. As três espécies apresentaram seus núcleos claramente visíveis em microscopia eletrônica.

Quando os fibroblastos foram analisados pela microscopia de varredura (MEV), foi evidenciado a célula de *L. colocolo* e *L. tigrinus* como uma morfologia mais esférica, quando

comparado ao fibroblasto de *P. onca*. As projeções citoplasmáticas do *L. colocolo* foram menos evidentes, enquanto que as de *L. tigrinus* e *P. onca* mais evidentes, sendo as projeções de *P. onca* as de maior comprimento. As imagens obtidas com MEV corroboraram com as diferenças morfológicas encontradas nas imagens de microscopia de campo claro. Possivelmente, estas diferenças encontradas na morfologia, especialmente nos prolongamentos de aderência celular, sejam devido a momentos diferentes de atividades de cada célula.

Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível observar diferentes organelas bem definidas e em quantidade variável que pode definir especificidades no que se refere a atividades celulares. Mas, de uma forma geral, infere-se que os fibroblastos de todas espécies estavam em atividade fisiológica de crescimento celular, especialmente pela presença de vacúolos, grânulos de secreção e vacúolos digestivos, sugerindo intensa atividade celular.

WANG *et al.* (2016), trabalhando com fibroblastos de tigre e MATTOS (2016) com de veado-catingueiro, lobo-guará e cachorro-do-mato, encontraram em seus estudos de MET, utilizando o mesmo protocolo, fibroblastos com quantidade significativa de vesículas, indicando intensa atividade de digestão celular, porém foi relatado por ambos o fato dos fibroblastos possuírem a membrana plasmática lesada, muito provavelmente advindo de processos apoptóticos gerados pelo processo de congelamento destas células. Este fato não evidenciado nas microscopias de transmissão deste estudo.

A espécie *L. tigrinus* apresentou fibroblastos com a maior quantidade de vesículas. Já os fibroblastos de *P. onca* apresentaram projeções mais longas, corroborando com o evidenciado nos outros dois tipos de microscopia (óptica e MEV), além de possuir elevada quantidade de retículo endoplasmático rugoso. As projeções citoplasmáticas de *P. onca* sugerem um recente processo de englobar porções líquidas do meio extracelular, conforme observado e descrito por JUNQUEIRA & CARNEIRO (2013).

Em relação às células, vale ressaltar que as idades dos animais, que tiveram seus materiais congelados, não foram levadas em conta para este estudo, podendo apresentar-se ou não como um fator de alteração no ritmo de crescimento celular. Até o momento da publicação deste

estudo, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho relacionando a idade dos animais dessas espécies com o crescimento celular em cultura.

Estudos foram realizados por SIENDGEE *et al.* (2018) afirmando que a taxa de crescimento e de viabilidade celular pré e pós crio-preservação são próximas (97,3% e 95,5%, respectivamente), não afetando assim as amostras que já tenham sido congeladas, para posterior realização de curva de crescimento e um possível re-cultivo, como foi o caso dos materiais do presente estudo, uma vez que ao se ter o crescimento celular estabelecido e o repique da cultura, não há resquícios de crioprotetor nas células, não gerando portanto prejuízo para as análises neste quesito.

As três espécies dobraram o número de células após as 20 horas de cultivo, de forma mais rápida do que outros animais como o tigre siberiano, que dobrou a população celular na 32ª hora, conforme descrito por WANG *et al.* (2016) e para GUAN *et al.* (2010), também com células de tigre, só dobrou o número de células no 4º dia de acompanhamento (96 horas). Já fibroblastos de elefante, apresentaram uma curva de crescimento sigmoideal, tendo o número de células dobradas após 25 horas de cultivo (SIENGDEE *et al.* 2018).

Percebeu-se que para *L. colocolo*, *L. tigrinus* e *P. onca* foi mantido um quantitativo de células semelhantes até aproximadamente 100 horas de acompanhamento, enquanto que a curva de crescimento de *L. Tigrinus* encontrou-se, por todo o período de observação, com o quantitativo de células sempre abaixo, não excedendo 8×10^4 células/mL. Mesmo utilizando a mesma metodologia, para as três espécies do presente estudo a curva chegou, após o 8º dia de acompanhamento com um quantitativo máximo de células para *L. colocolo* sendo 42×10^4 células/mL e para *L. tigrinus* e *P. onca* variando entre 8 e 9×10^4 células/mL. O quantitativo baixo de células chamou a atenção devido à quantidade de horas em que se contabilizou estes crescimentos. Para o mesmo período de acompanhamento, em se tratando de outras espécies como leão, leopardo e tigre do estudo de YELISETTU *et al.* (2016), a cultura chegou a ter mais de 80×10^4 células/mL, e para estudos com cachorro-do-mato (MACHADO, 2016) e tigre siberiano (WANG *et al.* , 2016) que chegaram a ter 60×10^4 células/mL.

Diversos fatores podem estar associados com o quantitativo total de células, para o último dia de acompanhamento das culturas, como por exemplo as passagens em que se

encontravam as culturas, a forma como as células foram congeladas, idade do animal, etc. Há também a possibilidade desta interferência ter acontecido devido a uma má distribuição celular na placa de cultivo no período inicial da cultura. Estudos complementares associados podem auxiliar na obtenção de novas informações para explicar os resultados encontrados neste atual estudo.

Também é possível destacar que as células de *L. colocolo* continuaram apresentando potencial de crescimento ao final do oitavo dia de cultivo, fato não observado para as células das duas outras espécies. Estes achados são relevantes, pois podem direcionar o período máximo de cultivo dos fibroblastos de cada espécie, permitindo se adequar a área de cultivo ao tempo de crescimento para que as células possam atingir a confluência celular, fase fundamental para se iniciar o período de clonagem, bem como a estocagem dos materiais em criobancos.

Neste estudo foram identificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na viabilidade dos fibroblastos de *P. onca* criopreservados em DMSO e em meio CryoSOfree™. Para a espécie *L. colocolo* e *L. tigrinus*, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os 4 tratamentos de criopreservação avaliados, apesar do meio CryoSOfree™ ter apresentado uma porcentagem maior de células inviáveis. Para fibroblastos de *Elephas maximus* (elefante asiático), a taxa de sucesso de crioproteção utilizando o DMSO na concentração de 10% foi de 95,5% (SIENGDEE *et al*, 2018) e para fibroblastos de *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro) de 90% até a quarta passagem, porém com redução significativa a partir da décima passagem criopreservada (MAGALHÃES *et al*, 2017).

Para a espécie *L. tigrinus*, a solução crioprotetora com 2,5% de DMSO não foi menos eficiente do que o meio CryoSOfree™, assim como concentrações maiores (5% e 10%) de DMSO, apresentando juntas 1,19% de células apoptóticas e 7,11% de células necróticas. Em pesquisas com células tronco mesenquimais de ratos e camundongos, o CryoSOfree™ mostrou-se mais eficiente que o meio com DMSO 10%, mantendo viáveis 95% da amostra descongelada. Além disso, ele foi menos tóxico que o DMSO após 6 h descongelamento. (MATSUMURA & HYON, 2010).

Contrariamente, para *P. onca*, a solução de crioproteção com 2,5% de DMSO foi uma das mais eficientes em proteger os fibroblastos do congelamento, juntamente com a solução com

10% de DMSO, apresentando apenas 17,68% de células danificadas. De uma forma geral, os fibroblastos desta espécie se apresentaram mais sensíveis a criopreservação, fato que pode estar associado ao padrão de multiplicação celular, o qual foi menos exponencial quando comparado com as outras espécies durante a análise da curva de crescimento antes da criopreservação.

A solução de criopreservação contendo 5% de DMSO demonstrou ser bastante eficiente em proteger os fibroblastos das espécies *L. colocolo* e *L. tigrinus*. Neste tratamento, cerca de 98,3% das células de *L. tigrinus* e 99,63% de *L. colocolo* sobreviveram ao processo de criopreservação em curva de resfriamento não controlada. No gráfico de pontos, a citometria de fluxo não detectou nenhuma célula apoptótica da espécie *L. tigrinus* quando foi utilizado o meio com 5% de DMSO. Este mesmo padrão de proteção não foi observado para os fibroblastos da espécie *P. onca*, uma vez que foram detectadas 25,5% de células em apoptose e 7,7% de células necróticas.

O DMSO tem sido utilizado por várias décadas como o mais eficiente agente crioprotetor para muitos tipos de células e tecidos, apesar de sua toxicidade e efeitos na diferenciação celular (MATSUMURA & HYON, 2010). A concentração de DMSO a 10% nas soluções de crioproteção tem sido a mais utilizada nos trabalhos de conservação de fibroblastos (MACHADO, 2016; MESTRE-CITRINOVITZ *et al*, 2016; MAGALHÃES *et al*, 2017; SIENGDEE *et al*, 2018). Neste estudo, com a intenção de amenizar o efeito tóxico associado ao DMSO, verificou-se que a redução em 50% deste agente crioprotetor foi eficiente em proteger fibroblastos das espécies *L. colocolo* e *L. tigrinus*. Já a redução de 75% da concentração clássica no meio de congelamento só foi eficiente para a espécie *Panthera onca*. Estas concentrações menores de DMSO no meio crioprotetor surgem como novas opções para o congelamento de fibroblastos de animais silvestres. No que diz respeito as concentrações de DMSO 2,5% e 5%, não há na literatura dados relacionados à criopreservação de fibroblastos de nenhuma espécie de animal silvestre utilizando-as.

O meio CryoSOfree™ se mostrou eficiente para a criopreservação de fibroblastos para a espécie *L. colocolo*, com taxa de apoptose de apenas 8,38%. O gráfico de pontos (Figura 12), ilustra esta situação, com quantidade pequena de células percebidas reagindo a Anexina V para detectar apoptose dos fibroblastos. Já para os fibroblastos das espécies *L. tigrinus* e *P. onca*, o meio Cryofree™ não foi amplamente efetivo em proteger as células, apresentando percentagem

de apoptose celular de 18,58% e 38,10%, respectivamente, apesar de apresentar-se como um crioprotetor de eficácia para células criopreservadas de rato (MATSUMURA, BAE & HYON, 2010).

O conhecimento sobre a eficiência de criopreservação dos fibroblastos é uma etapa prévia e fundamental para a técnica de clonagem estratégica de espécies silvestres. Os achados deste estudo indicaram que há diferenças na eficiência dos crioprotetores de acordo com a concentração de DMSO e também em relação ao CrySOfree™. Além disso, observou-se que há espécies com células mais sensíveis a estes crioprotetores, bem como suas concentrações.

Desta forma, estes achados podem direcionar as ações de criopreservação celular para formação de criobancos de fibroblastos destes três felinos silvestres brasileiros e também auxiliar o uso destas células na técnica de clonagem.

7. Considerações Finais

Neste estudo foi possível observar as características morfológicas e celulares peculiares dos fibroblastos das espécies gato palheiro (*L. colocolo*), gato do mato (*L. tigrinus*) e onça preta (*P. onca*) em aderência e suspensão, sendo as primeiras observações para estas espécies.

Além disso, observou-se diferenças na eficiência das soluções crioprotetoras utilizadas, bem como diferenças na sensibilidade das espécies a uma mesma solução de crioproteção, demonstrando que o melhor protocolo para criopreservação dos fibroblastos de *L. colocolo* e *L. tigrinus* é utilizar o crioprotetor DMSO a uma concentração de 5%, pois representa a menor concentração com eficiência em proteger os fibroblastos destas espécies contra os danos causados pelo processo de congelamento celular.

Para a criopreservação de fibroblastos da espécie de *P. onca*, as soluções de crioproteção com DMSO nas concentrações de 2,5% e 10% foram as mais eficientes, com destaque para a menor concentração.

O crioprotetor CrySOfree™ foi eficiente apenas para criopreservar os fibroblastos de *L. colocolo*, podendo ser indicado para esta espécie.

Como perspectiva, espera-se que os resultados deste trabalho sirva de modelo para criopreservação de fibroblastos de felinos silvestres e formação de bancos de germoplasma.

Sugere-se estudos complementares, testando outros indivíduos de *P. Onca*, para ver se estes achados se repetem ou se os resultados obtidos neste estudo apresentaram um evento pontual para o indivíduo testado.

Este estudo forneceu uma abordagem útil para conservar material genético das diferentes espécies, e o passo seguinte a este projeto são estudos relacionados a multiplicação destes animais por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), podendo ser estudada a realização desta clonagem de forma interespecíficas ou intraespecíficas.

9. Referências

- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. (2007). **A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species**. *Animal Reproduction Science*, Sydney, v. 1, n. 99, p.223-243.
- ARAÚJO, G. R. de. (2016). **Coleta Farmacológica e Criopreservação de Sêmen de Grandes Felinos, Mantidos em Cativeiro e Capturados em Vida Livre Com o Uso de Amadilhas de Laço**. 2016. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BALCI, D.; CAN, A. (2013). **The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking**. *Current Stem Cell Research & Therapy*. v.8, p.60-72.
- BLUME, G. R.; OLIVEIRA, C. T. S. A. M.; SCHWARZ, D. G. G.; SIQUEIRA, L. G.; BONORINO, R.; DUARTE, G.; FERRÃO, F. R.; REIS, F.; BRAVO, R. P. B. & MARTINS, C. F.. (2012). **Potencial de recuperação de fibroblastos de mamíferos silvestres mortos para formação de um banco de germoplasma: resultados preliminares**. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, v.1, p.1.

- BRASIL. (2017). Ministério do meio ambiente. Disponível em MMA: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/planos-de-acao-nacional>>. Acesso em Dezembro de 2017.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R. & RODRIGUES A. P. R. (2011). **Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos**. Acta Scientiae Veterinariae, v. 39, n.2, p.18
- COSTA, P. de M.; MARTINS, C. F. (2008). Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Univ. Ci. Saúde**, Brasília, v. 6, n. 1, p.39-55.
- CUNHA, E.; MARTINS, C. F.; SILVA, C. G.; BESSLER, H. C. & BÁO, S. N. (2014). **Effects of prolonged in vitro culture and cryopreservation on viability, DNA fragmentation, chromosome stability and ultrastructure of bovine cells from amniotic fluid and umbilical cord**. Reproduction in Domestic Animals. v. 49, n.5, p. 1-7.
- DAY, J. G.; STACEY, G. N. (2007). **Cryopreservation and Freeze- Drying Protocols**. 2 ed.. Herts, UK: Humana Press, 348p.
- ERDMANN, R. H. (2005). **Exame reprodutivo, contenção farmacologica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (leopardus tigrinus schreber, 1775)**. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- GONZALES, R. A. F. (2004). **Efeito da Criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- GUAN, W.; LIU C. Q.; LI, C.Y.; LIU, D.; ZHANG, W. X. & MA, Y. H. (2010). **Establishment and cryopreservation of a fibroblast cell line derived from bengal tiger (Panthera tigris tigris)**. Cryoletters, 31(2), 130-138.

- HARDING, K.; BENSON, E.E.; MULLER, J.; TIMMERMANN, H.; LORENZ, M.; FRIEDI, T.; DAY, J. G.. (2006). **Cryopreservation of storage recalcitrante algae through fundamental studies of termal behaviour and oxidative stress**. *Cryobiology*, v.53, p. 399-400.
- HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; VAN DER LINDEN, P. J.; DAI, X.; MASKELL, K. & JONSON, C. A.. (2001). **Climate Change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental PAnel on Climate Change**. Cambridge University Press, UK. 944p.
- ICMBIO (Org.). **Fauna Brasileira**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- ICMBIO. **Mamíferos - Leopardus tigrinus (Schreber, 1775): Gato-do-mato**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6117-especie-6117>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- IUCN (Org.). **The IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/about/introduction>>. Acesso em: 10 nov. 2017
- IUCN. (1996). **Status survey and conservation action plan wild cats**. Internacional Union for Nature Conservation, Gland, Suíça.
- JANZ, F. L.; Janz, F. D. L., Debes, A. D. A., Cavaglieri, R. D. C., Duarte, S. A., Romão, C. M., Morón, A. F., ... & Bydlowski, S. P. (2012). Evaluation of Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem Cells Cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012 p. 1-10.
- JOHNSON, L.; RALF, R.; WALTER, R. (2004). **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed.. Porto Alegre: Artmed.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (2013). Tecidos Conjuntivos. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 5. p. 88-118.
- LEON-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; CADENAS, R.; JONES, J.; HERNANDEZ-MARTINEZ, F. J.; MORENO, J. M.; VARGAS, A. MARTINEZ, F. & SORIA, B.. (2009).

Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species.

Animal reproduction science, v. 112, n. 3-4, p. 347-361.

LOSKUTOFF N. M (1998). **Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife**, p.275-286. In: Lauria A., Gandolfi L. and Gianaroli L. (Eds), *Gametes: development and function*. Serono Symposia, Rome.

LUCHERINI, M.; EIZIRIK, E., DE OLIVEIRA, T., PEREIRA, J. & WILLIAMS, R.S.R.. (2016). **Leopardus colocolo**. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T15309A97204446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T15309A97204446.en>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

MACHADO, L. C.; OLIVEIRA, V. C.; PARAVENTI, M. D.; CARDOSO, R. N. R.; MARTINS, D. S. & AMBRÓSIO, C. E.. (2016). Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 1, n. 36, p.61-66.

MACHADO, L. C. (2016). **Biologia da reprodução do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e criopreservação do material genético para enriquecimento de banco de germoplasma animal**. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Biociência Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

MAGALHÃES, L. C., BHAT, M. H., FREITAS, J. L., MELO, L. M., TEIXEIRA, D. I., PINTO, L. C.; CÂMARA, L. M. C.; DUARTE, J. M. B. & FREITAS, V. J. (2017). **The Effects of Cryopreservation on Different Passages of Fibroblast Cell Culture in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*)**. BIOPRESERVATION AND BIOBANKING, v. 15, n. 5.

MARTINEZ, A.; SILVÉRIO, K. & JÚNIOR, C. (2002). **Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos - estudo in vitro**. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 16, n. 3, p. 234-238.

MARTINS, C. F.; CUMPA, H. C. B.; CUNHA, E. R.; SILVA, C. G.; BORGES, L. A. & FILHO, J. B. G.. (2013). **Isolamento, Cultivo e Criopreservação de Células Somáticas de Mamíferos Silvestres para Formação de um Banco de Germoplasma**. Planaltina, DF: EMBRAPA. v.49, n. 5, p. 806–812.

- MARTINS, C.; DODE, M.; BAO, S. & RUMPF, R. (2007a). **Criopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production.** *Animal Reproduction Science*, 101, 326-331.
- MARTINS, C.; DODE, M.; BAO, S. & RUMPF, R. (2007b). **The use of the acridine Orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA.** 6, 94-104.
- MARTINS, C.; DODE, M.; BAO, S. & RUMPF, R. (2007c). **Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos.** Embrapa Cerrados, Planaltina, DF
- MATTOS, L. M. (2016). **Recuperação e criopreservação de germoplasma de mamíferos silvestres mortos no bioma cerrado do Distrito Federal: Uma estratégia para conservação animal ex situ.** 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- MATSUMURA, K., & HYON, S. H. (2009). Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. **Biomaterials**, 30(27), 4842-4849.
- MATSUMURA, K., BAE, J. Y., & HYON, S. H. (2010). Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. **Cell transplantation**, 19(6-7), 691-699.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **Banco de DNA e Tecidos de Recursos Genéticos Animais.** Disponível em: <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-animal/projetos-componentes-1/pc2a-conservacao-ex-situ-de-recursos-geneticos-animais/planos-de-acao/pa3-banco-de-dna-e-tecidos-de-recursos-geneticos-animais>>. Acesso em: 18 nov. 2017.
- MESTRE-CITRINOVITZ, A.C.; SESTELO, A. J.; CEBALLOS, M. B.; BARAÑAO, J. L., & SARAGÜETA, P. (2016). Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a south American endangered species. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 116:28.7.1-28.7.14.

- MORATO, R. G.; BEISIEGEL, B. M.; RAMALHO, C. E.; CAMPOS, C. B. & BOULHOSA, R. L. P. **Mamíferos - Panthera onca (Linnaeus, 1758): Onça-pintada**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6132-especie-6132>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- NISHIDA, T.; YASUMOTO, K.; OTORI, T. (1988). The Network Structure of Corneal Fibroblasts in the Rat as Revealed by Scanning Electron Microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Tokyo, v. 29, n. 12, p.12-15.
- NOWELL, K.; JACKSON, P. (Comp.) (1996). **Wild Cats: Status Survey and Conservation Action Plan**. Gland, Suíça: Iucn, 1996. 383 p. (IUCN/ SSC Cat Specialist Group).
- OLIVEIRA, V.; CÂMARA, E. & OLIVEIRA, L. (2009). **Composição e caracterização da mastofauna de médio e grande porte do parque nacional da serra do cipó**. *Mastozoologia Neotropical*, 2, 355-364.
- OLIVEIRA, T. G.; TORATO, M. A.; ALMEIDA, L. B.; CAMPOS, C. B. & BEISEGEL, B. M. (Org.). **Mamíferos - Leopardus tigrinus (Schreber, 1775): Gato-do-mato**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6117-especie-6117>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- PAULA, R. (2013). **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. Acesso em Setembro de 2015, disponível em ICMBio: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-onca-pintada/livro-onca-pintada.pdf>
- PAZ, R. C. R. da; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H. (2007). **Frozen Jaguar (Panthera onca) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes**. *Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science*, São Paulo, v. 44, n. 5, p.337-344
- PAYAN, E.; de OLIVEIRA, T. (2016). **Leopardus tigrinus. The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T54012637A50653881. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T54012637A50653881.en>>. Acesso em> 15 ago. 2017.

- PERES, M. B.; VERCILLO, U. E.; DIAS, B. F. de S. (2011). **Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer?**. Biodiversidade Brasileira, Brasília, v. 1, n. 1, p.45-48.
- QUEIROLO, D.; ALMEIDA, L. B.; BEISIEGEL, B. M. & OLIVEIRA, T. G.. **Mamíferos - Leopardus colocolo (Molina, 1782): Gato-palheiro**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies/6114-especie-6114>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- QUIGLEY, H.; FOSTER, R., PETRACCA, L., PAYAN, E., SALOM, R. & HARMSSEN, B.. (2017). **Panthera onca. The IUCN Red List of Threatened Species 2017**: e.T15953A50658693. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en>>. Acesso em 10 ago.2017.
- REIS, N. R.; PARACCHINI, A. L. FREGONEZI, M. N. & ROSSANEIS, B. K. (Org.) (2010). **Mamíferos do Brasil: Guia de identificação**. Rio de Janeiro: Thechnical Books. 551 p.
- SANTOS, J. (2002). **Análise da paisagem de um corredor ecológico na Serra da Mantiqueira**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos.
- SANTOS, M.; BORGES, A. A.; SANTOS, M. V. O.; QUEIROZ, L. B. N.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. & PEREIRA, A. F..(2015). **Cultivo in vitro de células derivadas de pele em mamíferos silvestres- estado da arte**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 39, n. 4, p 382-386.
- SIENGDEE, P.; KLINHOM, S.; THITARAM, C. & NGANVONGPANIT, K. (2018), Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*). PeerJ, v. 6, p. 1-16.
- SIGRIST, T. (2012). **Mamíferos do Brasil: Uma visão artística**. São Paulo: Avisbrasilis.
- SILVA, A.; SOUZA, A. L.P.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SOUZA, P. C. & CASTELO, T. S.. (2012). **Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres na Brasil**. Ciência Animal: Edição especial, 2, 219-234.

- SONG, J.; HUA, S.; SONG, K. & ZHANG, Y.. (2007). **Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43, 203-209.
- SOUZA, W. (2007). **Microscopia óptica: Fundamentos e Aplicações Às Ciências Biomédicas.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia.
- SRIRAMA, G.; BIGLIARDI, P. L.; BIGLIARDI-QI, M. (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. **European Journal Of Cell Biology.** European, p. 483-512.
- TAVARES, A. A. S.; TAVARES, J. M. R. S. (2009). **Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante.** Lisboa: Universidade do Porto.
- VILLAMIL, P. R. (2009). **Vitrificação de blastocistos *Mus domesticus domesticus* expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 69p.
- WANG, H.; LIU, Z.; ZHANG, W.; YUAN, Z.; YUAN, H.; LIU, X.; YANG, C. & GUAN, W.. (2016). Cadmium-induced apoptosis of Siberian tiger fibroblasts via disrupted intracellular homeostasis. **Biological Research**, China, v. 42, n. 49, p.2-14.
- WILSON, E. O. (1997). **Biodiversidade.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 657p.
- YELISETTI, U. M., KOMJETI, S., KATARI, V. C., SISINTHY, S., & BRAHMASANI, S. R. (2016). Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, n 6, p. 632-645.