



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RECUPERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MAMÍFEROS
SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO DISTRITO FEDERAL. UMA
ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO ANIMAL *EX SITU*.**

LUCIANA MIRANDA MATTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**RECUPERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MAMÍFEROS
SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO DISTRITO FEDERAL. UMA
ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO ANIMAL *EX SITU*.**

ALUNA: LUCIANA MIRANDA MATTOS

ORIENTADORA: ALINE MONDINI CALIL RACANICCI

CO-ORIENTADOR: IVO PIVATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 165/2016

BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

ML937 Miranda Mattos, Luciana
RECUPERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE
MAMÍFEROS SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO
DISTRITO FEDERAL. UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO
ANIMAL EX SITU. / Luciana Miranda Mattos; orientador
ALINE MONDINI CALIL RACANICCI; co-orientador IVO
PIVATO. -- Brasília, 2016.
53 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência
Animal) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. animais silvestres. 2. mamíferos do Cerrado. 3.
espécies ameaçadas. 4. banco de germoplasma. 5.
criopreservação. I. MONDINI CALIL RACANICCI, ALINE ,
orient. II. PIVATO, IVO , co-orient. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RECUPERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE
MAMÍFEROS SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO
DISTRITO FEDERAL. UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO
ANIMAL *EX SITU*.**

LUCIANA MIRANDA MATTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**ALINE MONDINI CALIL RACANICCI, Prof^ª Dr^a (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)**

**IVO PIVATO, Prof Dr (Universidade de Brasília)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**CARLOS FREDERICO MARTINS, Pesquisador Dr (Embrapa Cerrados)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

Brasília, junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, pela vida, por iluminar sempre o meu caminho e pela oportunidade de poder a cada dia aprender mais.

À minha família, pelo apoio e orgulho demonstrado.

À minha orientadora, Dra. Aline Mondini Calil Racanicci, pela confiança e oportunidade.

Ao Dr Ivo Pivato, pelo acompanhamento, apoio e contribuições.

Ao Dr Carlos Frederico Martins, pela parceria e orientações frequentes.

Ao Colegiado dos Cursos de Pós-graduação em Ciências Animais, pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação em Ciências Animais, pelo auxílio técnico.

À EMBRAPA CERRADOS pelo apoio técnico.

ÍNDICE

Resumo:	xi
Abstract	xiii
Capítulo I.....	1
1 - Introdução	2
2 - Revisão de Literatura	4
2.1 - Degradação ambiental e a redução da população de animais silvestres	4
2.2 - Corredores ecológicos	5
2.3 - Mamíferos silvestres ameaçados no bioma Cerrado	7
2.4 - Estratégias de conservação <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	9
2.5 - Banco de germoplasma	10
2.6 - Isolamento e cultivo celular.....	12
2.6.1 - Cultivo celular.....	13
2.6.2 - Procedimento geral para cultura de células -	17
2.7 - Criopreservação celular.....	17
2.8 - Descongelamento e quantificação celular.....	20
2.9 - Transferência nuclear	21
2.10 – Considerações finais	22
3- Referências bibliográficas	24
Capítulo II.....	32
1 - Resumo	33
2 - Abstract	35
3 - Introdução	37
4. Material e Métodos.....	39
4.1 – Obtenção de Material	39
4.2 - Isolamento e cultivo de fibroblastos de mamíferos silvestres mortos.....	39
4.3 - Avaliação da morfologia e monitoramento do crescimento celular	40
4.4 - Criopreservação de fibroblastos	40
4.5 - Avaliação da variabilidade celular por criopreservação.....	40
4.6 - Avaliação ultraestrutural.....	41
4.7 - Análise estatística.....	41
5 - Resultados	42
6 - Discussão	46

7 - Conclusões -----	50
8 - Referências bibliográficas-----	51

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ACPs	Agentes criprotetores
DMEM	Dubelccos Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
iSCNT	Interspecies somatic cell nuclear transfer
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SFB	Soro fetal bovino
SV40	Genes transformantes
TN	Transferência nuclear
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Mamíferos do Cerrado brasileiro ameaçados de extinção-----	7
Tabela 2: Principais características dos três tipos de cultivos de células-----	16
Tabela 3: Avaliação morfológica dos fibroblastos de diferentes animais e monitoramento do tempo de confluência celular -----	42
Tabela 4: Viabilidade de fibroblastos de mamíferos silvestres após criopreservação em meio com DMSO 10% e DMF 5% -----	42
Tabela 5: Números de animais, espécies utilizadas e total de amostras armazenadas no banco de germoplasma -----	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia de campo claro de fibroblastos isolados com diferentes formas--- 50

Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos isolados ----- 51

RESUMO

RECUPERAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE MAMÍFEROS SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO DISTRITO FEDERAL. UMA ESTRATÉGIA PARA CONSERVAÇÃO ANIMAL *EX SITU*.

Luciana Miranda Mattos¹, Aline Mondini Calil Racanicci²
^{1,2}Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB, DF

A perda da diversidade biológica vem aumentando consideravelmente no bioma Cerrado, sendo causada pela destruição de habitats ocasionados pelo crescimento das cidades, fronteiras agrícolas, aumento da população humana, extração de madeira, abertura de estradas e distúrbios como fogo, caça, pecuária e, sobretudo, atropelamentos de animais silvestres em rodovias. Com essa intensa perda de material genético, fez-se necessário a criação de um banco de germoplasma para se evitar a extinção de espécies ameaçadas. O objetivo deste trabalho foi primeiramente avaliar a possibilidade de recuperar, isolar e caracterizar fibroblastos de três espécies diferentes (lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato), assim como testar o efeito dos crioprotetores DMSO 10% e DMF 5% associados a uma curva de resfriamento lenta e não controlada, sobre a viabilidade celular destes animais. Em seguida, utilizando o meio de criopreservação mais eficiente identificado previamente, formar um banco de germoplasma contendo fibroblastos de diferentes espécies silvestres do bioma Cerrado, aproveitando o material genético que seria perdido com a morte do animal. Os animais foram provenientes de atropelamento nas rodovias, encontrados mortos no meio ambiente ou do Hospital Veterinário do Jardim Zoológico de Brasília. Foram retirados fragmentos de pele da orelha dos animais mortos. Em seguida foram tricotomizados e fragmentados em pedaços de 2 mm². As amostras foram colocadas em placas de petri,

preenchidas com 3 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e antibiótico e, em seguida levadas à estufa de CO₂ a 38,5 °C e 5% de CO₂. Os fragmentos foram retirados após 10 dias após a troca do meio. No sétimo dia após a troca do meio, as células foram suspensas em tripsina-EDTA e transferidas para garrafas de cultivo até atingirem a confluência. Após atingirem a terceira passagem, uma parte das células foi diluída em solução de criopreservação com 10% de DMSO, e a outra parte foi diluída em solução com 5% de DMF. As células foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e armazenadas por 24 horas a -80°C e, logo após esse tempo, armazenadas em nitrogênio líquido. As células pós-congelamento foram coradas com Trypan blue 4% para análise de viabilidade. Os fibroblastos dos exemplares de lobo-guará apresentaram um atraso no crescimento celular em meio DMEM em relação a outras espécies, sendo um fator limitante para seu armazenamento futuro. Diferenças na morfologia celular foram observadas entre os fibroblastos de lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato, que apresentaram formato ramificado, fusiforme e esférico, respectivamente. A solução de crioproteção contendo 10% de DMSO foi mais eficiente que o meio com DMF 5%, para conservar a viabilidade dos fibroblastos das três espécies ($P < 0,05$). Um banco de germoplasma foi formado com 508 amostras criopreservadas com fibroblastos de 19 animais, provenientes de 11 espécies diferentes. Dentro destas espécies, quatro são classificadas em escala de risco de extinção como menos preocupantes (cachorro-do-mato, veado-catingueiro, furão e macaco-da-noite), seis espécies como vulneráveis (lobo-guará, onça-pintada-preta, onça-pintada, gato-maracajá e gato-palheiro), uma em perigo de extinção (mico-leão-preto) e uma criticamente em perigo (cairara). Este reservatório biológico se configura no primeiro banco de germoplasma contendo células somáticas de mamíferos silvestres mortos do bioma Cerrado do Brasil. Este material está alocado no Jardim Zoológico de Brasília e servirá para estudos futuros de caracterização das espécies e multiplicação de animais por meio da clonagem por transferência nuclear.

Palavras-chave: animais silvestres, mamíferos do Cerrado, espécies ameaçadas, criopreservação, banco de germoplasma.

ABSTRACT**RECOVERY AND MAMMALS OF GERMLASM CRYOPRESERVATION WILD
DEAD IN BIOMA FEDERAL DISTRICT CLOSED. A STRATEGY FOR
CONSERVATION ANIMAL *EX SITU*.**

Luciana Miranda Mattos¹, Aline Mondini Calil Racanicci²

^{1,2} School of Agronomy and Veterinary Medicine - UNB, DF

The loss of biological diversity has increased considerably in the Cerrado biome, being caused by the destruction of habitat for the growth of cities, agricultural areas, increasing human population, logging, opening roads and disturbances such as fire, hunting, livestock and especially, road kill wildlife on highways. With this intense loss of genetic material, it became necessary to create a germplasm bank to prevent the extinction of endangered species. The objective of this study was first to evaluate the possibility to recover, isolate and characterize three different species fibroblasts (maned wolf, deer brocket and dog-eating fox) and tests the effect of cryoprotectants 10% DMSO and DMF 5% associated with a slow cooling curve and not controlled on the cell viability of these animals. Then, using the most efficient means of cryopreservation identified previously, form a germplasm bank containing fibroblast different wild species of the Cerrado biome, taking advantage of the genetic material that would be lost with the death of the animal. The animals came from being run over on highways, found dead in the environment or the Veterinary Hospital Garden Brasilia Zoo. Ear skin fragments were removed from dead animals. Then they were shaved and fragmented into 2 mm² pieces. The samples were placed in petri dishes, filled with 3 mL of DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics, and then brought to the CO² incubator

at 38.5 °C and 5% CO². The fragments were removed after 10 days and the medium replaced. On the seventh day after the exchange of the medium, the cells were suspended in trypsin-EDTA and transferred for cultivation bottles until reaching confluence. After reaching the third passage, a part of the cells was diluted cryopreservation solution with 10% DMSO, and the other part was diluted in solution with 5% DMF. The cells were filled into 0.25 ml straws and stored at -80 °C for 24 hours and, after this time, stored in liquid nitrogen. The post-freezing cells were stained with Trypan blue to 4% viability analysis. Fibroblasts of the maned wolf specimens showed a delay in cell growth in DMEM in relation to other species, a limiting factor for their future storage. Differences in cell morphology were observed between the maned wolf fibroblasts, brocket deer and dog-eating fox, which had branched form, fusiform and spherical, respectively. The cryoprotection solution containing 10% DMSO was more efficient than the medium with 5% DMF, to preserve the viability of the fibroblasts of the three species (P <0.05). A germplasm bank was formed with 508 samples cryopreserved with fibroblasts of 19 animals from 11 different species. Within these species, four are classified endangered risk scale as less worrying (dog-eating fox, brocket deer, ferret and night monkey), six species as vulnerable (maned wolf, black jaguar, jaguar cat maracajá and barn cat) an endangered (black lion tamarin) and a critically endangered (cairara). This biological reservoir is configured in the first germplasm bank containing somatic cells of wild mammals killed the Cerrado biome in Brazil. This material is allocated to the Zoo of Brasilia and serves for future studies to characterize the species and multiplication of animals through cloning by nuclear transfer.

Keywords: wild animals, Cerrado mammals, endangered species, cryopreservation, germplasm bank.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O primeiro país em diversidade biológica é o Brasil, com aproximadamente 14% da biota mundial (Lewinsohn e Prado, 2002). Dentro dessa diversidade está inclusa a fauna de mamíferos, com 652 espécies registradas no território brasileiro, sendo que esse número coloca o país em primeiro lugar na diversidade de mamíferos silvestres do mundo (Reis et al., 2006). Porém, a quantidade de mamíferos silvestres vem diminuindo, principalmente pela destruição de seus habitats (93% de Mata Atlântica, 70% do Cerrado e 13% da Amazônia) degradados pela ação antrópica. Isso ocorre em função da implantação de projetos agropecuários, construção de estradas e de hidrelétricas (Wilson, 1997; Lima, 2003).

O crescimento das cidades, das fronteiras agrícolas e o aumento das populações humanas têm pressionado os recursos naturais dos biomas brasileiros no sentido de esgotamento dos mesmos. A fragmentação dos habitats é consequência inevitável desse processo e acaba por isolar as populações de animais silvestres (Bamberg et al., 1991), impedindo o fluxo gênico e, em uma perspectiva futura, inviabilizando a continuidade da espécie.

Semelhante a outros países diversos, o Brasil sofre mudanças rápidas e profundas no perfil de sua população, nos padrões de uso do ambiente e dos recursos naturais. Também enfrenta grandes dificuldades socioeconômicas. Isso dificulta a implementação de programas que visam a conservação e o uso sustentável de seus recursos naturais, incluindo a biodiversidade. A população ocupa áreas não habitadas, cujo impacto ambiental, normalmente, reflete na fragmentação dos ecossistemas e na perda da integridade biológica (Wilkie et al., 2000).

Para a abertura de novas áreas a serem exploradas, segundo Scoss et al., (2000), é necessária a construção de estradas (rodovias) que geram grandes impactos negativos sobre a fauna, uma vez que divide uma paisagem natural, removendo uma porção de hábitat, inibindo ou atraindo a dispersão e migração de espécies. Outros fatores associados à abertura de estradas envolvem a facilitação e propagação de distúrbios, tais como o fogo, a caça, a pecuária e a extração de madeira (Dantas e Martini, 2000). Além disso, o índice de animais silvestres atropelados nas rodovias vem chamando a atenção de vários pesquisadores no mundo e estão sendo objeto de estudo.

Segundo Scoss (2002), a questão de atropelamento de animais silvestres é agravada em rodovias com grande fluxo de veículos que cruzam áreas potencialmente ricas em diversidade faunística, como as unidades de conservação. As colisões com a fauna, geralmente envolvem vertebrados movimentando-se dentro de sua área de vida ou migrando entre áreas, atraídos por alimentos que caem de caminhões, plantas exóticas às margens das estradas e pequenos animais mortos, vítimas de atropelamento (Forman e Alexander, 1998).

O número de animais mortos em rodovias brasileiras, a cada ano, aumenta. Muitas espécies utilizam as estradas em seus deslocamentos diários, estando sujeitas a serem atropeladas por veículos motorizados (Vieira, 1996). Frente a esta situação, torna-se importante o estudo de impacto de estradas sobre a fauna de países ricos em espécies de vertebrados, como o Brasil, bem como a recomendação de estratégias para a mitigação dos eventos de atropelamentos.

No entanto, sabe-se que as mudanças estruturantes não são imediatas. Considerando que a morte de um animal representa a perda de seu patrimônio genético (germoplasma) e, conseqüentemente, a perda de genes importantes para uma população, o uso da reprodução assistida surge como uma ferramenta para uso emergencial nesta situação. Mesmo com a morte animal, ainda é possível recuperar este material genético (espermatozoides e fibroblastos) e formar um criobanco de germoplasma, o qual poderá ser utilizado para multiplicação animal por meio da inseminação artificial, fecundação *in vitro* e transferência nuclear (clonagem).

O objetivo principal desse trabalho foi verificar a possibilidade de isolar e criopreservar germoplasma (fibroblastos de pele) de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado, utilizando diferentes crioprotetores para a construção de um criobanco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Degradação ambiental e a redução da população de animais silvestres

O comportamento e a distribuição da vida selvagem têm sido afetados pelas mudanças climáticas globais ou regionais e, indiretamente, por mudanças na vegetação decorrentes do uso indevido da terra, fragmentando os habitats e elevando os obstáculos à migração de espécies. Assim, é esperado que em poucos anos muitas espécies em risco extremo sejam extintas e espécies vulneráveis se tornem mais raras e mais próximas à extinção (IPCC, 2001).

A crescente redução da biodiversidade vem aumentando de modo acelerado nos últimos 100 anos (IUCN, 2011), apesar do incremento de algumas iniciativas, como as que visam o uso sustentável da diversidade biológica e ampliação da superfície de área protegida no planeta. Todavia, as áreas de proteção raramente são capazes de proteger todos os habitats e espécies de interesse (Kati et al., 2004).

No Cerrado, a fauna dos mamíferos silvestres vem sendo alterada, principalmente pela destruição desse bioma em função da implantação de projetos agropecuários, hidrelétricas e principalmente construção de estradas (Lima 2003).

De modo geral, o bioma Cerrado ocupa cerca de 25% do território brasileiro, compreendendo diferentes paisagens e tipos de vegetação, incluindo formações florestais, savânicas e campestres (Silva et al., 2010). Além da grande diversidade ecossistêmica, o bioma abrange uma grande diversidade de animais, de modo que segundo a grande variedade de espécies de animais e plantas do Cerrado está diretamente associada à grande diversidade de ambientes (Machado et al., 2004). O Cerrado é o segundo bioma brasileiro em extensão que tem sofrido com pressões antrópicas impostas pelo avanço das fronteiras agropecuárias (Silveira, 1999). Estima-se que atualmente restam menos de 35% de Cerrado na sua forma

natural (Mantovani e Pereira, 1998), sendo que destes, apenas 1,6% estão em áreas protegidas. Este avanço vem fragmentando e isolando de forma irreversível, pequenas populações geneticamente inviáveis.

Na região do Cerrado, o problema maior tem raízes no modelo de exploração agrícola e que se constitui também em fator de risco para a segurança alimentar, à medida que a degradação ambiental se instala nesse bioma, com sérias restrições à economia e à cadeia alimentar. Há de se considerar que essa região possui solo de baixa fertilidade natural, acidez acentuada e reduzido teor de matéria orgânica (de 3 a 5%), além de submeter-se à sazonalidade do clima. Estas condições mostram a fragilidade desse bioma.

A velocidade de ocupação das áreas naturais e as ações antrópicas são tão grandes, que se torna necessária a garantia de manutenção da diversidade genética das populações através de populações e germoplasma conservados *ex situ* (Duarte, 2005).

Muitas espécies de animais silvestres, que utilizam estradas em seu deslocamento estão sujeitos ao atropelamento (Vieira, 1996) e o índice desses animais atropelados nas rodovias vem aumentando. O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é um exemplo de espécie que vem sofrendo morte abrupta por atropelamento em rodovias do Distrito Federal. Desta forma, os animais atropelados constituem grande fonte de material. Gametas e células somáticas podem ser utilizados em programas de biotecnologia da reprodução (criopreservação) para a criação de bancos de germoplasma, os quais poderão abrigar coleções-base para a conservação de ampla variabilidade genética e animal e surgem como alternativas para manutenção da biodiversidade (MMA, 2002).

Os atropelamentos ocorrem em função de dois aspectos principais: a rodovia corta o habitat de determinado táxon, interferindo na rota de deslocamento natural da espécie e a disponibilidade de alimentos ao longo das rodovias, que servem de atrativo para fauna (Forman e Alexander, 1998).

2.2 Corredores ecológicos

O cerrado é um bioma com fitofisionomias bem características que ocupa uma área de dois milhões de km². É a maior formação de vegetação aberta da América do Sul e corresponde ao segundo maior domínio morfoclimático brasileiro (com cerca de 25% da superfície do território do país). Trata-se de uma das 25 áreas do mundo consideradas como

críticas para conservação (Myers et al., 2000). Possui uma grande diversidade de flora e fauna, composta por espécies comuns aos biomas adjacentes. Este bioma vem sendo ameaçado rapidamente pela destruição do sistema, em decorrência do avanço da fronteira agrícola e dos grandes empreendimentos agroindustriais. Particularmente, a construção de estradas é um mecanismo de fragmentação de alto impacto, removendo a cobertura vegetal original, gerando efeito de borda e alterando a função e a estrutura da paisagem (Ferreira et al., 2004). Este tipo de modificação acarreta sérios impactos à fauna de vertebrados em processos de deslocamento para superar rodovias, como barreira artificial, elevando o índice de mortalidade (Dias et al., 2004).

Conforme Soulé (1991), os corredores ecológicos são estruturas lineares da paisagem que ligam pelo menos dois fragmentos que originalmente eram conectados. O aumento da conectividade, por meio dos corredores ecológicos, constitui uma estratégia para reverter o quadro de fragmentação e isolamento de populações. Vários autores recomendam a manutenção ou restauração de corredores como estratégias para a conservação da biodiversidade. Os corredores são reconhecidamente importantes para o controle de fluxos hídricos e biológicos na paisagem.

A conectividade funcional considera a medida de quanto um organismo ou espécie usa as diferentes regiões da paisagem, estando relacionada à probabilidade de um organismo cruzar a paisagem. A restauração da conectividade estrutural possibilita a conexão entre habitats fragmentados, promovendo o movimento de organismos, auxiliando na preservação da biodiversidade de ecossistemas e nas funções das comunidades. Já o aumento da conectividade funcional se refere especificamente à intensidade de movimentos inter habitat dos organismos, os quais poderão ser avaliados pelos fluxos de disseminação. Fatores como largura do corredor e características quanto à permeabilidade da matriz podem influenciar fluxos de forma diferenciada, dependendo das características das espécies. Portanto, quanto à avaliação da efetividade da implantação de corredores (conectividade funcional), somente poderá ser aferida em trabalhos de ecologia populacional e fluxo gênico entre fragmentos, dentre outros métodos específicos que possam mensurar de acordo com a sensibilidade de cada espécie alvo. Poucos trabalhos abordaram a conectividade como um parâmetro funcional da paisagem, que depende de características das espécies e/ou grupos funcionais estudados (Ribeiro, 2009). Contudo, estudos demonstram que espécies se movem com mais frequência entre os sistemas ligados por corredores do que entre fragmentos desconectados (Haddad, 1999).

2.3 Mamíferos silvestres ameaçados no bioma Cerrado

Os mamíferos correspondem ao segundo grupo mais diverso entre os vertebrados terrestres no bioma Cerrado, representando aproximadamente 15% das espécies conhecidas (Aguilar et al., 2004). Este bioma ocupa o segundo lugar em extensão e se localiza no Planalto Central do Brasil, distribuindo-se também como manchas de pequenas extensões na Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Caatinga (Ribeiro e Walter, 2008). Apresenta um mosaico de fisionomias que englobam formações campestres, savânicas e florestais (Ribeiro e Walter, 2008) que lhe confere padrões biogeográficos da flora e fauna distintos (Bridgewater et al., 2004). Entretanto, grande parte de sua área original está sofrendo um acelerado processo de desmatamento e fragmentação devido à ação antrópica (Machado et al., 2004) e estimou-se em 2002 que 38,9% dessa área já tinha sido convertida em terras agrícolas, de pastagem e reflorestamento (Sano et al., 2009). Os mamíferos de médio e grande porte são afetados pela fragmentação e alteração do habitat decorrente da ocupação humana (Trolle et al., 2007) que, juntamente com a pressão de caça, correspondem às principais ameaças a esse grupo (Costa et al., 2005).

No Cerrado do Brasil ocorrem 38 espécies de mamíferos de médio a grande porte (>1,5kg), sendo que 45% destas são pertencentes à ordem *Carnivora* (Alho, 1990). Estão agrupados em quatro famílias: *felidae*, *canidae*, *mustelidae* e *procionidae*. Os carnívoros ocupam nichos terrestres e aquáticos. Suas dietas variam de estritamente carnívora a carnívora-onívora. São geralmente solitários, embora algumas espécies possam viver em grupos familiares.

De acordo com Instituto Chico Mendes (2014), as espécies de mamíferos do Cerrado ameaçadas de extinção no Brasil estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Mamíferos do Cerrado brasileiro ameaçados de extinção.

Nome científico	Nome popular
<i>Aotus sp</i>	Macaco-da-noite
<i>Alouatta guariba clamitans</i>	Bugio-ruivo
<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo-do-pantanal
<i>Cacajao hosomi</i>	Uacari
<i>Callicebus coimbrai</i>	Guigó
<i>Callicebus melanochir</i>	Guigó
<i>Callicebus personatus</i>	Sauá-de-cara-preta

<i>Callithrix aurita</i>	Sagui-da-serra-escuro
<i>Callithrix flaviceps</i>	Sagui-da-serra-claro
<i>Caluromysiops irrupta</i>	Cuíca-de-colete
<i>Cavia intermedia</i>	Preá
<i>Cebus kaapori</i>	Caiarara
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato
<i>Cerradomys goytaca</i>	Rato-do-chão
<i>Chaetomys subspinosus</i>	Ouriço-preto
<i>Chiropotes utahicki</i>	Cuxiú
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará
<i>Coendou speratus</i>	Coandu-mirim
<i>Ctenomys bicolor</i>	Tuco-tuco
<i>Callicebus melanochir</i>	Guigó
<i>Ctenomys flamarioni</i>	Tuco-tuco
<i>Ctenomys lami</i>	Tuco-tuco
<i>Ctenomys minutus</i>	Tuco-tuco
<i>Eptesicus taddeii</i>	Morcego
<i>Euryoryzomys lamia</i>	Rato-do-mato
<i>Furipterus horrens</i>	Morcego
<i>Glyphonycteris behnii</i>	Morcego
<i>Gyldenstolpia planaltensis</i>	Rato-do-mato
<i>Juscelinomys candango</i>	Rato-candango
<i>Kerodon acrobata</i>	Mocó
<i>Kerodon rupestris</i>	Mocó
<i>Lagothrix cana cana</i>	Macaco-barrigudo
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Macaco-barrigudo
<i>Lagothrix poeppigii</i>	Macaco-barrigudo
<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Mico-leão-preto
<i>Leopardus colocolo</i>	Gato-palheiro
<i>Leopardus geoffroyi</i>	Gato-do-mato-grande
<i>Leopardus guttulus</i>	Gato-do-mato
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato-maracajá
<i>Lonchophylla dekeyseri</i>	Morceguinho-do-cerrado
<i>Lonchorhina aurita</i>	Morcego
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo
<i>Marmosops paulensis</i>	Cuíca
<i>Mazama gouazoupira</i>	Veado-catingueiro
<i>Microalodontomys transitorius</i>	Rato-do-mato
<i>Mustela putoris</i>	Furão
<i>Myrmecopjaga tridactyla</i>	Tamanduá-bandeira
<i>Natalus macrourus</i>	Morcego
<i>Oligoryzomys rupestris</i>	Rato-da-árvore
<i>Ozotoceros bezoarticus bezoarticus</i>	Veado-campeiro

<i>Ozotoceros bezoarticus leucogaster</i>	Veado-campeiro
<i>Phantera onca</i>	Onça-pintada
<i>Phyllomys brasiliensis</i>	Rato-da-árvore
<i>Phyllomys lundii</i>	Rato-da-árvore
<i>Phyllomys thomasi</i>	Rato-da-árvore
<i>Phyllomys unicolor</i>	Rato-da-árvore
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Toninha
<i>Pteronura brasiliensis</i>	Ariranha
<i>Puma concolor</i>	Onça-parda
<i>Rhipidomys cariri</i>	Rato-da-árvore
<i>Rhipidomys tribei</i>	Rato-da-árvore
<i>Saguinus bicolor</i>	Sauim-de-coleira
<i>Saguinus niger</i>	Sagui-una
<i>Saimiri vanzolinii</i>	Macaco-de-cheiro
<i>Sapajus cay</i>	Macaco-prego
<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-prego-galego
<i>Sapajus robustus</i>	Macaco-prego-de crista
<i>Sapajus xanthosternus</i>	Macaco-prego-do-peito-amarelo
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada
<i>Thalpomys cerradensis</i>	Rato-do-chão
<i>Thalpomys lasiotis</i>	Rato-do-chão
<i>Thylamys macrurus</i>	Catita
<i>Thylamys velutinus</i>	Catita
<i>Tolypeutes tricinctus</i>	Tatu-bola
<i>Trinomys moojeni</i>	Rato-do-espinho
<i>Trinomys eliasi</i>	Rato-do-espinho
<i>Trinomys mirapitanga</i>	Rato-do-espinho
<i>Trinomys yonenagae</i>	Rato-do-espinho
<i>Wilfredomys oenax</i>	Rato-do-mato
<i>Xeronycteris vieirai</i>	Morcego

Fonte: ICMBio, 2014.

2.4 Estratégias de conservação animal *in situ* e *ex situ*

Uma das reações para o problema da redução da biodiversidade tem sido a emergência da conservação biológica, que focaliza sua sustentação através de uma síntese de ideias, informações e pesquisas (Wildt, 1997).

Virtualmente, todos os biólogos de conservação concordam que a preservação do hábitat é o melhor caminho para se conservar a biodiversidade. O povoamento animal de grandes áreas de terras livres da interferência humana, pode proteger muitas espécies, mas esta abordagem tem sido caracterizada como “estranha”, dada a realidade mundial atual e do futuro.

Diante disso, surge a necessidade de iniciativas para o uso sustentável da diversidade biológica. Além disso, são utilizados métodos e técnicas de manutenção dos animais vivos fora de seu ambiente (*ex situ, in vivo*), ou ainda a criopreservação de seu germoplasma (*ex situ, in vitro*) (Hiemstra et al., 2005), merecendo destaque a criação de bancos de germoplasma, os quais abrigam coleções-base para a conservação de ampla variabilidade genética vegetal e animal (MMA, 2002).

A conservação *in situ*, mecanismo mais utilizado na conservação de espécies animais, é a manutenção de pequenas populações vivas de animais em seu ambiente original, adaptado ou semelhante (Andrabi e Maxwell, 2007).

A conservação *ex situ* é dividida em *ex situ in vivo*, métodos e técnicas de manter o animal vivo fora da sua região de produção ou ambiente e *ex situ in vitro*, método de criopreservação em bancos de germoplasma de gametas, embriões, células somáticas, tecidos ou DNA. Essa técnica é utilizada para a preservação de raças raras, raças comerciais ou animais em vias de extinção. A criopreservação de germoplasma é uma estratégia muito eficiente para conservar a diversidade alélica existente para o uso futuro (Hiemstra et al., 2005; Andrabi e Maxwell, 2007).

Programas de conservação *in situ* e *ex situ* para raças e espécies em risco de extinção podem ser beneficiados por técnicas de biotecnologias da reprodução, incluindo inseminação artificial com sêmen congelado, superovulação e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões, clonagem, micromanipulação de gametas/embriões, sexagem de sêmen/embriões e banco de germoplasma (Andrabi e Maxwell, 2007).

2.5 Bancos de germoplasma

Os bancos de recursos genéticos ou também chamados de bancos de germoplasma podem ser definidos como repositórios de materiais coletados, processados e armazenados. Podem incluir gametas, embriões, células somáticas e DNA, (Holt e Pickard,

1999) e assim, facilitar a criação de um *pool* genético de espécies ameaçadas de extinção (TAO, 2009). Os primeiros bancos de germoplasma eram constituídos apenas de sêmen, ovócitos e embriões (Holt e Pickart, 1999, Leon-Quinto et al., 2009).

Apresentam como principal objetivo, o resgate de populações que se extinguíram, ou que tenham importantes características biológicas a serem preservadas (Hiemstra, 2005), ou ainda espécies localmente adaptadas ou em risco de extinção (Ramos et al., 2011). A formação de bancos de recursos genéticos surge como estratégia, pois tais bancos são repositores de germoplasma para programas de conservação definidos (Wildt, 1997), os quais são ligados diretamente com as biotecnologias. O material biológico pode ser utilizado para diversos fins, como a clonagem e a transgênese (Leon-Quinto et al., 2009). Atualmente, a formação de bancos de células, as quais são usadas associadas à técnica de clonagem, podem ser uma alternativa para a preservação, uma vez que a obtenção de fibroblastos é simples e necessita apenas de um pequeno fragmento de material (Leon-Quinto et al., 2009, 2011). Além disso, o cultivo de células fibroblásticas é considerado o mais apropriado para o uso na transferência nuclear de células somáticas (TNCS), além de ser um excelente recurso para a pesquisa (Wu, et al., 2008, Leon-Quinto et al., 2011).

No Brasil, os bancos de germoplasma são coordenados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por meio de um sistema conhecido como Plataforma Nacional de Recursos Genéticos e distribuídos em várias instituições, como universidades federais e estaduais, institutos estaduais de pesquisa e desenvolvimento e empresas estaduais (Ferreira et al., 2005). Entretanto, tais bancos são voltados, principalmente, para a conservação de material genético de animais domésticos com potencial produtivo dentro da pecuária (MAPA, 2012).

No Estado do Rio Grande do Norte, na cidade de Mossoró, foi criado em 2007 o Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – LCGA, no campus da Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA. O laboratório tem realizado várias pesquisas voltadas para a coleta e criopreservação de gametas de diversas espécies silvestres, como quatis (*Nasua nasua*), catetos (*Tayassu tajacu*), cutias (*Dasyprocta aguti*), tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) e preás silvestres da Caatinga (*Galea spixi spixi*). Na Universidade Federal do Pará, o Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia – BIOMEDAM, em parceria com o Centro Nacional de Primatas, situados em Belém do Pará, têm contribuído para a adequação de biotécnicas reprodutivas voltadas para a preservação de primatas neotropicais, como o macaco-prego (*Cebus apella*).

Hoje, no Brasil, não há um cadastro público de todas as instituições que atualmente trabalham com pesquisas voltadas para o desenvolvimento de técnicas de conservação de germoplasma em animais silvestres. Sendo assim, há uma dificuldade na citação de todos os órgãos, bem como, permanece restrito o acesso àqueles trabalhos publicados em veículos de baixa divulgação.

2.6 Isolamento e cultivo celular

Diversas técnicas foram criadas para a desagregação do tecido isolado para a cultura primária. Estas técnicas podem ser divididas em: (a) mecânica, que envolve dissecação com ou sem maceração, e (b) enzimática. Explantes primários (mecânica) são mais adequados para quantidades muito pequenas de tecidos e funciona bem com os tecidos moles e alguns tecidos mais firmes, quando o tamanho do rendimento viável não é importante (Freshney, 1994); na desagregação enzimática há um melhor rendimento quando se tem tecido disponível.

Para manter as células em cultura, é necessário utilizar técnicas básicas que evitem a morte celular dentro da garrafa de cultivo. As células normalmente possuem inibição por contato e, quando em uma garrafa de cultivo, a quantidade de células excederem um número tal que impossibilite o crescimento normal da monocamada, as células se inibirão e haverá morte. Assim, é extremamente importante que se retire quantidades de células periodicamente da garrafa de modo a manter a população sempre com um número ideal (Freshney, 2000).

O processo de renovação de células de uma garrafa para outra é chamado passagem. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada. Muitas linhagens contínuas são capazes de manter as características iniciais do tecido original com algumas passagens, enquanto as células transformadas não mantêm as características originais e são capazes de permanecer em cultura por um grande número passagens, chegando até virtualmente ao infinito número de passagens (Freshney, 1994).

2.6.1 Cultivo celular

Cultura de tecidos é a denominação genérica usada para se referir à cultura de órgãos e de cultura de células. A cultura de órgãos refere-se a culturas tridimensionais de tecido não desestruturado que conserva algumas ou todas as características histológicas do tecido *in vivo*. Cultura celular refere-se a uma cultura derivada a partir de células retiradas de um tecido original (cultura primária), ou a partir de uma linha celular ou estirpe celular, por ação enzimática, mecânica, química ou desagregação (Quiagen, 2000).

O termo “cultura de células” poderia então abranger quaisquer organismos. No entanto, na prática ele é utilizado principalmente para cultura de células eucarióticas de organismos multicelulares, especialmente animais. A sua origem está intimamente relacionada com a origem das culturas de tecidos e órgãos (Freshney, 2000).

A cultura de células é o processo através do qual as células são cultivadas sob condições controladas, geralmente a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Essa técnica tornou-se um procedimento laboratorial rotineiro na década de 50, de modo que atualmente é possível isolar e cultivar células de diferentes tecidos e formas (Freshney, 2000).

O desenvolvimento da cultura de tecido iniciou no final do século XIX, quando Roux demonstrou que células embrionárias de galinhas (*Gallus gallus*) podiam ser mantidas vivas em solução salina, fora do organismo animal. Desde então, vários pesquisadores contribuíram para o conhecimento e manutenção *in vitro* das células. Porém, foi apenas na metade do século XX, devido à adoção do uso de antibióticos nos meios de cultura que a cultura de tecido pode ser ampla e continuamente utilizada, e se tornou uma técnica comum de laboratório. A substituição dos modelos animais ou ovos embrionados de galinha pela cultura de células a partir da década de 50 permitiu à virologia um grande avanço nos estudos de vírus animais, pois proporcionou um sistema mais fácil, rápido e barato para realização de ensaios. Hoje, mesmo com técnicas moleculares avançadas, ainda utilizamos o cultivo celular no estudo de vírus. Os ensaios mais comuns são os de titulação de vírus, multiplicação e isolamento.

O cultivo de células, tanto animais como células vegetais, além de ter sido utilizado para o estudo dos vírus, tem sido utilizado para estudos fisiológicos e bioquímicos de células normais e tumorais, estudos dos efeitos de compostos químicos ou drogas variadas sobre tipos específicos de células (epiteliais, sanguíneas, etc.), estudos para a geração de tecidos artificiais (como pele artificial, por exemplo), síntese de produtos biológicos a partir

de culturas celulares em larga escala, produção de proteínas recombinantes glicosiladas, (Freshney, 2000) e para o cultivo de células ou tecidos de animais silvestres que correm risco de extinção visando a clonagem.

O cultivo de células deve ser realizado em condições assépticas. A taxa de multiplicação de células animais é relativamente baixa, comparada com células bacterianas. Enquanto bactérias podem se duplicar a cada 30 minutos, as células animais requerem de 18 a 24 horas. Isto torna as culturas de células animais mais vulneráveis à contaminação, uma vez que um pequeno número de bactérias introduzido na garrafa de cultura pode crescer rapidamente em uma população de células normais. Para evitar a introdução de micro-organismos na cultura, vários cuidados básicos de manipulação e prevenção devem ser tomados (Freshney, 2000).

Outro grande desafio de se cultivar células *in vitro* é reproduzir as condições nutricionais encontradas *in vivo*. Desta forma, várias formulações de meios de cultura vêm sendo desenvolvidas a fim de simular as condições encontradas no tecido original. Os meios para cultura de célula precisam garantir o fornecimento de aminoácidos, vitaminas, proteínas e sais orgânicos e outros componentes essenciais para a sobrevivência de cada tipo celular. Além disso, o meio de cultura deve garantir condições físico-químicas, como pH e osmolaridade adequadas. Os meios de cultura devem apresentar um sistema de tamponamento para garantir a manutenção do pH na faixa apropriada para o tipo de linhagem celular (Quiagen, 2000).

Podemos dividir os cultivos celulares em três tipos: cultivo primário, cultivo secundário (finito) e linhagem contínua (imortal). Na Tabela 2 são apresentadas as principais características de cada tipo.

No cultivo primário, as células são diploides e são produzidas a partir de células que foram isoladas diretamente de órgãos ou tecidos por processos de desagregação mecânica ou enzimática. São caracterizadas por um período de vida médio limitado. Em função de sua origem, as células geralmente são muito sensíveis às infecções pelos vírus da espécie do tecido. Elas são obtidas pela dispersão com tripsina e são capazes de multiplicar por 3 a 20 passagens *in vitro*. As culturas primárias são, portanto, formadas a partir células que sobrevivem aos processos de desagregação, aderem-se ao substrato da garrafa de cultura (ou mantêm-se em suspensão) e proliferam. As células primárias possuem morfologia idêntica ao do tecido das quais se originam. A cultura primária permite um número limitado de divisões (ou passagens) celulares, após as quais entram em estado de senescência e morrem. Muitos cientistas preferem utilizar culturas primárias em seus experimentos, uma vez que

estas células mantêm as características fisiológicas do tecido de origem, podendo ser consideradas, portanto, como representativas das condições naturais de um organismo (Quiagen, 2000).

Uma vez que essas células entram em senescência após certo número de duplicações, o ciclo celular é cessado e as células permanecem paradas na fase G1, não passando para fase S. Mesmo tendo condições adequadas para o crescimento, permanecem metabolicamente ativas, podendo resistir à morte por apoptose (Campisi e Fagagna, 2007). A senescência é um processo natural de envelhecimento celular onde ocorre à perda da capacidade proliferativa, devido ao encurtamento dos telômeros (Freshney, 2000).

Na maioria dos casos, células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias; elas podem ser repetidamente subcultivadas desta forma por semanas ou meses. Tais células apresentam frequentemente muitas propriedades diferenciadas apropriadas à sua origem: fibroblastos continuam a secretar colágeno; células derivadas de músculo esquelético embrionário fusionam-se para formar fibras musculares gigantes, que se contraem espontaneamente na placa de cultura; células nervosas lançam axônios que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com outra célula nervosa; e células epiteliais formam extensivas lâminas com muitas das propriedades de um epitélio intacto. Como tais fenômenos ocorrem em cultura, eles são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos intactos (Quiagen, 2000). Muitas pesquisas são desenvolvidas com células imortalizadas, que se distinguem das primárias pela sua capacidade de se proliferar indefinidamente, o que é geralmente alcançado pela transdução de genes ou vírus que levam a desregulação do ciclo celular.

No cultivo secundário, também chamado de finito, as células são ainda diploides, porém sofreram algumas modificações no seu genoma que permitem a sua passagem de 60 a 80 subcultivos *in vitro*. As culturas finitas são formadas após a primeira passagem de uma cultura primária. Estas culturas irão proliferar por um número finito de divisões celulares, após as quais irão morrer. O potencial proliferativo de algumas culturas finitas pode ser prolongado através da introdução de genes virais transformantes (tais como os genes transformantes SV40) (Quiagen, 2000).

Culturas finitas de células irão fatalmente morrer ou eventualmente adquirir uma mutação estável capaz de produzir uma cultura contínua. Esta mutação sofrida pelas células é conhecida como transformação ou imortalização e está frequentemente associada com tumorigenicidade. As células de linhagens contínuas são células heteroplóides, com

números bastantes irregulares de cromossomos, com permissividade variável para as várias espécies de vírus, porém, capazes de serem propagadas *in vitro* por números indefinidos de passagens (Quiagen, 2000).

Células primárias de roedores em cultura formam facilmente linhagens de células contínuas espontaneamente ou após o tratamento com algum agente mutagênico. Células de culturas primárias humanas, ao contrário, raramente tornam-se imortais desta forma e necessitam de modificações genéticas adicionais para formar uma linhagem contínua. Células derivadas de tumores humanos, contudo, frequentemente suportam uma grande quantidade de passagens, sendo consideradas contínuas. Linhagens de células contínuas são relativamente fáceis de trabalhar, comparado com linhagens células primárias. Contudo, deve-se lembrar que as primeiras podem sofrer alterações genéticas (mesmo que não existam alterações morfológicas visíveis) após várias passagens e que, portanto, podem não representar a situação fisiológica real do organismo *in vivo* (Quiagen, 1999).

Tabela 2 - Principais características dos três tipos de cultivos de células.

	Cultivo primário	Cultivo secundário	Linhagem contínua
Nº subcultivos	3 a 20	40 a 80	Infinito
Nº cromossomos	2n	2n	Maior que 2n
Morfologia	Semelhante ao tecido original	Semelhante ao tecido original	Diferente do tecido original
Índice metabólico	Baixo	Médio	Alto
Nº nucléolos	1	1	4 a 6
Produção de vacinas	Sim	Sim	Depende da origem
Exemplos	Cultivo primário de embrião de galinha; cultivo primário de células amnióticas humanas.	Células originárias de prepúcio humano (FS4); células de pulmão de embrião humano (WI38)	Linhagem de células HeLa, originária de um tumor de cérvix uterino, cujo nome tem as iniciais da paciente de onde foi retirado (Henrietta Lacks)

Fonte: The Quiagen Transfection Resource Book, Second Edition, 1999.

2.6.2 Procedimento geral para cultura de células

Embora cada tecido exija um conjunto de procedimentos para as condições de cultura de células, alguns requisitos são comuns para a maioria deles: (1) o excesso de gordura e tecido necrosado deve ser removido durante a dissecação; (2) os tecidos devem ser picados o mais fino possível; (3) as enzimas utilizadas para a desagregação celular devem ser removidas; (4) a concentração de células na cultura primária deve ser muito maior do que o normalmente utilizado para a subcultura, porque a proporção de células do tecido que sobrevive em cultura primária pode ser muito baixo; (5) ao meio utilizado deve ser rico, como F12 Ham, adicionado de soro fetal bovino, pois o resultado de sobrevivência celular é maior; (6) tecido embrionário desagrega mais facilmente do que o tecido adulto; a cultura se prolifera mais rapidamente e os rendimentos são mais viáveis; (7) as enzimas utilizadas com mais frequência para a desagregação de tecido são tripsina, colagenase, elastase, pronase, dispase, DNase, e hialuronidase, puras ou em diferentes combinações, como por exemplo, a elastase e a DNase para isolamento de células alveolares (Dobbs e Gonzalez, 2002), colagenase com protease (Booth e O'Shea, 2002), e colagenase com hialuronidase. Tripsina e pronase permitem uma desagregação mais completa, mas pode danificar as células. A colagenase e protease, por outro lado, dão uma desagregação incompleta, mas é menos prejudicial às células. A hialuronidase pode ser usada em conjunto com colagenase para digerir a matriz intracelular, e DNase é usada para dispersar o DNA liberado a partir de células lisadas. O DNA tende a prejudicar a proteólise e promover reagregação, Porém, a tripsina bruta é, de longe, a enzima mais comum usado na desagregação de tecido, uma vez que é tolerada muito bem por muitas células e os seus resíduos são neutralizados pelo soro fetal presente no meio de cultura ou por um inibidor de tripsina (Freshney, 2000).

2.7 Criopreservação celular

Quando as células são submetidas ao cultivo contínuo em laboratório, os riscos de contaminações e de mutações genéticas aumentam, além de implicar também em despesas econômicas e desprendimento de tempo (Graham, 1996). O resfriamento das células a temperaturas pouco superiores a 0 °C reduz o seu metabolismo, mas não o interrompe

completamente, de forma que as células continuam sofrendo o processo de deterioração progressiva, apenas em menor velocidade. Por isso, é necessário o uso de técnicas que permitam estabilizar, manter as características e a viabilidade destas células em temperaturas criogênicas (Graham, 1996).

Nos últimos anos, a criopreservação tem conquistado grande destaque, tanto na medicina reprodutiva humana quanto na reprodução animal, seja através da criopreservação de embriões, células germinativas masculinas (Caleghiani et al., 2008), femininas ou através da criopreservação de tecido gonadal, como ovário (Rodrigues, 2004). Todavia, o sucesso dessa técnica depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas (volume da solução de criopreservação e taxas de resfriamento), quanto questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação. Além disso, para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas, é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura (Vatja, 2007). Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores (ACPs) são fundamentais para o sucesso da criopreservação.

A criopreservação representa uma valiosa ferramenta para a preservação de gametas femininos, tanto de animais quanto de humanos, oferecendo suporte para diversas biotecnias reprodutivas, permitindo salvaguardar o material genético e facilitando a sua difusão. No entanto, o sucesso do procedimento depende da utilização adequada de um agente crioprotetor. A relevância da criopreservação para a reprodução assistida estimula novos estudos a fim de compreender, determinar e aperfeiçoar os protocolos para cada espécie e estrutura, incluindo também a busca por novos agentes crioprotetores que sejam eficientes e não prejudiciais às estruturas a serem criopreservadas (Vatja, 2007).

A criopreservação tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados utilizando crioprotetores, por períodos indeterminados, permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor a -150 °C (Karth, 1985). A técnica pode ser feita de forma rápida (vitricificação) ou lenta. O procedimento mais utilizado no congelamento celular é o lento. Nesse processo, há diminuição da temperatura vagarosamente, acarretando a solidificação da água que se encontra no meio de cultura. Isso aumenta a concentração de soluto fora da célula e faz com que a água saia através do processo de osmose. A saída da água da célula faz com que ela murche. Assim, à medida que a água sai, ela se congela no exterior, deixando a célula desidratada. Nesse processo, a água do meio externo é congelada formando cristais que

podem se reorganizar no exterior da célula. A formação de cristais e reorganização dentro da célula leva ao rompimento da membrana celular, matando as células. Isso é impedido com o processo lento de congelamento (Quiagen, 2000).

Os crioprotetores maximizam a viabilidade celular e minimizam os efeitos prejudiciais causados pelo processo de congelamento e descongelamento das células. A forma como o crioprotetor age é muito complexa, pois o seu efeito protetor geralmente está ligado à sua habilidade de se unir às moléculas de água ou diretamente na célula alvo para evitar a formação de gelo intracelular (Córdova-Caballero et al., 2002). São substâncias que evitam a formação de gelo intracelular, reduzem o estresse osmótico através da reposição de água necessária para a manutenção do volume celular, interagem com íons e macromoléculas, reduzem o ponto de congelamento da água e servem como tampão, ajustando as alterações de pH.

Segundo Pegg (2006), a utilização de crioprotetores e protocolos com controle de temperatura visa diminuir as perdas celulares inerentes ao processo de congelamento. As células geralmente resistem à redução da temperatura, porém não suportam a formação de cristais de gelo. O gelo se forma em diversos momentos do processo de resfriamento. Durante um congelamento lento, o gelo é formado primeiramente no espaço extracelular e depois no interior da célula. Logo, a água tende a sair do compartimento celular, provocando um grande desequilíbrio osmótico, o que leva à desidratação da célula. O aumento na concentração de soluto tanto dentro quanto fora da célula interfere na sobrevivência celular, pois pode gerar lise. Em um congelamento rápido, os efeitos na concentração do soluto são minimizados, já que a formação de gelo ocorre homogeneamente, apesar de haver uma maior concentração de cristais de gelo intracelulares. E, geralmente, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas por causa da perda da integridade da membrana, ou seja, ocorre uma lesão mecânica (Baudot et al., 2002). A curva de resfriamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Geralmente, uma taxa de resfriamento de 1 °C por minuto é a mais indicada. A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduz a probabilidade de formar grandes cristais de gelo dentro das células, o que ocasionaria danos às estruturas internas e à membrana plasmática. Entretanto, a desidratação severa promove a desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, levando a um colapso de membrana (Dalimata; Graham, 1997).

Os crioprotetores são divididos em duas classes principais: os extracelulares que não conseguem penetrar na membrana celular e agem reduzindo os efeitos hiperosmóticos presentes no processo de congelamento (Davis et al., 1990), e os intracelulares, que penetram na célula e previnem a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular.

Os crioprotetores extracelulares são moléculas de alto peso molecular e, portanto, não conseguem atravessar a membrana plasmática (Vatja; Nagy, 2006). Atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, o que faz com que ocorra a passagem de água do interior da célula para o meio externo, impedindo assim a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação (Amann; Pickett 1987). Essas substâncias exigem protocolos de congelamento e de aquecimento rápidos e podem ser encontradas na gema de ovo, no leite, em alguns açúcares e na albumina sérica bovina (Moussa *et al.*, 2002). São exemplos de crioprotetores extracelulares a lactose, a glicose, a sacarose, a trealose e a polivinilpirrolidona (PVP), a rafinose, o manitol e o sorbitol (Niemann, 1991).

Os crioprotetores intracelulares mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO). O efeito protetor do glicerol se relaciona com a sua capacidade de ligação com a água e à sua baixa dissociação com sais, diminuindo a osmolaridade do meio de congelamento. O DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar. Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante um congelamento, a molécula impede fases de transmissão dos lipídeos de membrana, que chegam a promover a fusão de várias membranas (Davis et al., 1990).

2.8 Descongelamento e quantificação celular

O descongelamento geralmente ocorre de forma rápida. Simplesmente retira-se o recipiente do tanque de nitrogênio líquido e coloca-se em água a 37 °C imediatamente.

Quando se trabalha com experimentos que necessitam do uso de células em cultura é necessária à avaliação constante das células. Uma das formas de se avaliar o crescimento celular é utilizando-se métodos de quantificação celular. Quantificar uma cultura significa dizer quantas células se encontram em determinada garrafa de cultivo. A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular, as condições de crescimento e o

início de experimentos nos quais o número de células utilizado deve ser preciso. Existem duas maneiras de se quantificar células em cultura: na forma direta, conta-se diretamente o número de células presente na garrafa de cultivo; na forma indireta, ocorre a quantificação de determinadas estruturas celulares, como proteínas, ou pela medição do metabolismo celular. Como forma de quantificação direta, o método mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer. No método indireto existem muitas técnicas baseadas no metabolismo celular ou até mesmo na dosagem de macromoléculas presentes na célula, como as proteínas ou o DNA (Quiagen, 2000).

Para a contagem em câmara de Neubauer, as células devem estar totalmente individualizadas. Para a análise de viabilidade celular, utiliza-se o corante Trypan blue, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul (Quiagen, 2000).

2.9 Transferência Nuclear (TN)

Atualmente, a TN é uma técnica utilizada em diferentes espécies animais para estudos de reprogramação celular e epigenética. A técnica atende aos programas de melhoramento genético com a rápida multiplicação de animais com características genéticas desejáveis, proporcionando uma diminuição no intervalo de gerações e também possibilitando a conservação e regeneração de recursos genéticos em vias de extinção (Perecin, 2007).

A principal contribuição da transferência nuclear à vida selvagem pode envolver uma situação na qual uma espécie é reduzida a números criticamente baixos, onde a população seja incapaz de se recuperar de forma natural ou por outras estratégias de reprodução assistida (Perecin, 2007).

Várias espécies ameaçadas de extinção também foram produzidas por meio de técnicas de transferência nuclear, inclusive pela técnica de TN interespecíes. Lanza et al., (2000) realizaram TN usando fibroblastos da pele de gaur fundidos com ovócitos bovinos enucleados. Outras espécies ameaçadas foram produzidas com sucesso, como o muflão (Loi et al., 2001) e o gato selvagem africano, por exemplo. No gato selvagem africano, foram utilizados ovócitos de gato doméstico (Gomez et al., 2004; Gómez et al., 2008).

Posteriormente, dois lobos cinzentos foram clonados por TN, utilizando células de lobo e ovócito cão doméstico (Kim et al., 2007). Além disso, a cabra de montanha bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) já extinta, foi produzida por união de fibroblastos da cabra com ovócitos enucleados da cabra doméstica. Uma cabra clonada de bucardo foi obtida, mas morreu poucos minutos após o nascimento devido a defeitos físicos nos pulmões (Folch et al., 2009).

A TN permite ainda o estudo de interações núcleo-citoplasmáticas, como a incompatibilidade de componentes nucleares e mitocondriais de diferentes espécies e subespécies pode prejudicar o desenvolvimento normal dos embriões reconstruídos, o que afetaria a eficiência da clonagem. Hwang I et al., descreveu a clonagem bem sucedida de lobo cinzento (*Canis lupus*) transferindo células somáticas isoladas de lobos mortos para ovócitos enucleados de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*); coiotes (*Canis latrans*) foram clonados através da iSCNT, utilizando oócitos de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), conforme descreveu OH. H.J. e colaboradores.

Portanto, o sucesso da produção de embriões clonados, indica que a técnica de TN pode ser adotada para aumentar o tamanho da população de mamíferos em perigo de extinção ou mesmo para recuperar espécies extintas.

2.10 Considerações finais

Ao longo desse estudo, foi possível compreender o problema da perda da biodiversidade animal devido à fragmentação de ecossistemas, crescimento das cidades, aumento das fronteiras agrícolas e, sobretudo, atropelamentos de animais silvestres em rodovias. A recuperação de fibroblastos de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado torna-se uma ferramenta valiosa para garantir a preservação ou recuperação de espécies extintas ou vulneráveis. Foram testadas duas soluções crioprotetoras e, o uso da solução crioprotetora com 10% de DMSO fica recomendado para o congelamento de fibroblastos de animais silvestres. Esse estudo possibilitou a formação do primeiro criobanco de fibroblastos de animais silvestres do Brasil. Este material será importante para aplicação científica e conservação animal por meio das biotécnicas reprodutivas no futuro. No entanto, este trabalho alerta que muitos animais continuam morrendo no bioma, devido o crescimento das cidades e ações humanas diversas. Ações imediatas devem ser tomadas para que estas espécies

continuem a viver em seus habitats. A biotecnologia reprodutiva surge como uma ação emergencial para conservação de espécies silvestres, embora não possa reparar o dano provocado em larga escala durante anos de ações humanas irresponsáveis.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.M.S., MACHADO, R.B.; MARINHO-FILHO, J.. A Diversidade Biológica do Cerrado. In Cerrado: ecologia e caracterização (L.M.S. Aguiar e A.J.A. Camargo, Ed.). Embrapa Cerrados, Planaltina, p.17-40. 2004

AKAGI, S.; GESHI, M., NAGAI, T. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Animal Science Journal* , v.84, p. 191–199, 2013.

ALHO, C.J.R., LACHER, T.E., CAMPOS, Z.M.S. e GONÇALVES, H.. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul: levantamento preliminar de espécies. *Rev. Bras. Biol.* 48(2):213-225. 1988.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 145-173, 1987.

ANDRABI SMH, MAXWELL WMC. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.

BAGUISE, A., BEHBOODI, E., MECAN, D.T., POLLOCK, J.S., DESTREMPES, M.M., CAMMUSO, C., WILLIAMS, J.L., NIMS, S.D., PORTER, C.A., MIDURA, P., PALACIOS, M.J., AYRES, S.L., DENNISTON, R.S., HAYES, M.L., ZIOMEK, C.A., MEADE, H.M., GODKE, R.A., GAVIN, W.G., OVERSTROM, E.W., ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, v.17, p.456-461, 1999.

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PATZL, M. et al. Pregnancy by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J. Zoa Wildl. Med.*, v.22, p.73-77, 1991.

BAUDOT, A. Thermal study of simple aminoalcohol solution. *Cryobiology*, v. 44, p. 150-160, 2002.

BERG, D.K., LI, C., ASHER, G., WELLS, D.N., OBACK, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biology of Reproduction*, v.77, p.384-394, 2007.

BOOTH, CATHERINE, O'SHEA JA. ISOLATION and Culture of Intestinal Epithelial Cells. Second edition John Wiley and Sons, Inc; 2002.

BRASIL, MMA. A Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB, Cópia do Decreto Legislativo nº 2, de 5 de junho de 1992. MMA. Brasília, p.30, 2002.

BRIDGEWATER, S., RATTER, J.R. & RIBEIRO, J.F. Biogeographic patterns, β -diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. *Biodivers. Conserv.* 13:2295-2318, 2004.

CALEGHIANI E.C.C., ARRUDA R.P., ANDRADE A.F.C., NASCIMENTO J., RAPHAEL C.F.; RODRIGUES P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has no sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science.* 104: 119-131. 2008.

CAMPBELL, K.H.S., FISHER, P., CHEN, W.C., CHOI, I., KELLY, R.D.W., LEE, J.H., XHU, J. Somatic Cell Nuclear Transfer: Past, Present And Future Perspectives. *Theriogenology*, v.68, p.214-231, 2007.

CAMPISI J, D'ADDA DI FAGAGNA F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:729–740. 2007.

CIBELLI, J.B., STICE, S.L., GOLUEKE, P.J., KANE, J.J., JERRY, J., BLACKWELL, C., PONDE DE LEON, A., ROBL, J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.

CÓRDOVA-CABALLERO, M. S. et al. Transplantes de células progenitoras hematopoyéticas. *Gaceta Médica de México*, v. 138, n. 1, 2002.

COSTA, P. M., MARTINS, C.F. Avaliação do potencial de criopreservação de espermatozoides imaturos do epidídimo de animais mortos. In: Simpósio de recursos genéticos para América Latina e Caribe. 5, 2005.

COSTA, P. M., MARTINS, C.F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ. Ci. Saúde, UniCeub, Brasília*, v. 6, n. 1, p. 39-55, jan./jun. 2008.

CUNHA, NINA ROSA DA SILVEIRA; LIMA, JOÃO EUSTÁQUIO DE; GOMES, MARÍLIA FERNANDES DE MACIEL AND BRAGA, MARCELO JOSÉ. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. *Rev. Econ. Sociol. Rural* [online]. vol.46, n.2, pp. 291-323. 2008.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, p. 831-841, 1997.

DANTAS, G. P. M.; MARINI, M. A. Características das unidades de conservação no Estado de Minas Gerais In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. 2, 2000. Campo Grande Anais... Campo Grande. *Rede Nacional de Pró-conservação*. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza.p 663-672, 2000.

DANTAS, T. C.; SILVA, M. A.; CASTELO, T. S.; RICARTE, A. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA A. R. Comparação de diferentes crioprotetores na congelação de espermatozoides epididimários de cutias (*Dasyprocta agouti*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19, 2011, Anais... Belo Horizonte: CBRA, (CD-ROM). ISSN: 1984-8471. 2011.

DAVIS, J. M., ROWLEY SD, BRAINE HG, PIANTADOSI S, SANTOS GW Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood Journal*, Baltimore, v. 75, n. 3, p. 781-786, 1990.

DIAS, L.B.; BOCCHIGLIERI, A.; VILARINS, L. B. Vertebrados de uma área de cerrado no Distrito Federal: Importância de sua conservação. Congresso Brasileiro de Zoologia, Brasília, Brasil, p.446. 2004.

DOBBS, L. G., AND R. F. GONZALEZ. Isolation and culture of pulmonary alveolar epithelial Type II cells. In R. I. and M. G. F. Freshney, editors. *Culture of Epithelial Cells*, 2nd ed. Wiley-Liss, New York. 2002.

DOUROJEANNI, M.J., PÁDUA, M.T.J. Biodiversidade: a hora decisiva. Ed. UFPR, Curitiba, 308p. 2001.

DUARTE, J.M.B. Introdução Geral. In: Duarte, J.M.B.O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de PortoPrimavera: Resultado de dois anos de pesquisa. CD ROM. Jaboticabal, FUNEP. 2005.

FERREIRA AA, GUIMARÃES ZFS, PRADO TR, GARCIA HL, OLIVEIRA IG, SILVA WJ E ALMEIDA EF Levantamento de animais silvestres atropelados na Br 153 /GO 060 nas imediações do Parque Altamiro de Moura Pacheco. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Zoologia. Brasília, pp 434. 2004.

FERREIRA, M. A. J. F.; WETZEL, M. M. V. S.; VALOIS, A. C. C. El estado del arte de los recursos genéticos en las Américas: conservación, caracterización y utilización. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología e Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología para los Trópicos Suramericanos (procitropicos). 2005.

FISCHER, W. A. Efeitos da Br-262 na mortalidade de vertebrados silvestres: síntese naturalística para a conservação da região do Pantanal, MS. Campo Grande: UFMS, 1997. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Ecologia) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1997.

FOLCH, J.; COCERO, M. J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J. L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ROCHE, A.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; MARTÍ, J. I.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J. F.; SÁNCHEZ BONASTRE, A.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v. 71, n. 6, p. 1026-1034, Apr. 2009.

FORMAN, T.T.R.; ALEXANDER, L.E.. Roads and their major ecological effects. 1998.

FORSBERG, E.J., STRELCHENKO, N.S., AUGENSTEIN, M.L., BETTHAUSER, J.M., LANGE, G.I., MALLON, K.S., BISHOP, M.M. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biology of Reproduction*, v.67, p.327-333, 2001.

FRESHNEY R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley, Toronto, 2000.
FRESHNEY, R. IAN. Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique; 3rd edition; WILEY-LISS Pub. New York. 1994.

FUNDAÇÃO JARDIM ZOOLOGICO DE BRASÍLIA. Disponível em: <http://www.zoo.df.gov.br/>. Acesso em 07 de Março de 2016.

GALLI, C.; DUCHY, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.

GÓMEZ MC, POPE CE, GIRALDO A, LYONS L, HARRIS RF, COLE A, GODKE A, DRESSER BL. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.

GÓMEZ, M.C. POPE C.E. GIRALDO A. LYONS L.A. HARRIS R.F. KING A.L. COLE A. GODKE R.A. DRESSER B.L. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells.*; 6:247–258. 2004.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, p. 131-147, 1996.

HADDAD, N. M. Corridor and distance effects on interpatch movements: a landscape experiment with butterflies. *Ecological Applications, Tempe*, v. 9, 612– 622. 1999.

HAWANG I, JEONG YW, KIM JJ, LEE HJ, KANG M, PARK KB, PARK JH, KIM YW, KIM WT, SHIN T, HYUN SH, JEUNG EB, HWANG WS. Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 25(8):1142. 2013.

HIEMSTRA SJ, VAN DER LENDE T, WOELDERS H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy -5-7 March, 2005.

HIEMSTRA SJ, VAN DER LINDE T, WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: The role of biotechnology, 2005, Turin, Italy. Rome: FAO. p.25-35. , 2005

HOUGHTON, J.T., Y. DING, D.J. GRIGGS, M. NOGUER, P.J. VAN DER LINDEN, X. DAI, K. MASKELL, AND C.A. JOHNSON. IPCC: 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, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 881pp. 2001.

HOLT, W.; PICKARD, A. R. Role os reproduction technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction.* Institute of Zoology, Regent's Park:London NW1 4RY, UK 143-150, 1999.

INSTITUTO CHICO MENDES (ICMBIO). Lista oficial de animais ameaçados de extinção. [S.l.: s.n.], 2003. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

IUCN - Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

KARTHA K.K. Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton: CRC press, 276p. 1985.

KATI, V.; DEVILLERS, P.; DUFRENE, M.; LEGAKIS, A.; VOKOU, D.; LEBRUN, P. Hotspots, complementarity or representativeness? Designing optimal small-scale reserves for biodiversity conservation. *Biological Conservation*, v.120, p.471-480, 2004.

LANZA, R. P., B. L. DRAPER, AND P. DAMIANE. Cloning Noah's ark. *Sci. Am.* 283:84-89. 2000.

LEON-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; SANCHEZ, A.; MARTIN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. *Cryobiology* 62:145–151, 2011.

LEON-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; ARTINEZHERNANDEZ, J.M.; VARGAS, A.; MARTIN, F.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal Reproduction Science* 112:347–361, 2009.

LEWINSOHN, T.; PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira. Síntese do atual estado do LIMA, D.C. Corredores Ecológicos Rodoviários no Distrito Federal. 2003. 99p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília. 2003.

LOI, P., PTAK, G., FULKA, J., JR., et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964. 2001.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.

MACHADO, R.B., M.B. RAMOS NETO, P. PEREIRA, E. CALDAS, D. GONÇALVES, N. SANTOS, K. TABOR e M. STEININGER. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservação Internacional do Brasil, Brasília. 2004.

MANTOVANI, J. E. E A. PEREIRA. Estimativa da integridade da cobertura vegetal de cerrado através de dados TM/Landsat. VIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Santos, São Paulo. 1998.

MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*, v. 8, p. 489-500, 1971.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

MYERS, N.; MITTERMAYER, R. A.; MITTERMAYER, C. G.; FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858, 2000.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, v. 35, p. 109-124, 1991.

OH HJ, KIM MK, JANG G, KIM HJ, HONG SG, PARK JE, PARK K, PARK C, SOHN SH, KIM DY, SHIN NS, LEE BC. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology*. 1;70(4):638-47. 2008.

PEGG, D. E. The preservation of tissues for transplantation. *Cell Tissue Bank*, v. 7, p. 349-358, 2006.

- PERECIN, FELIPE. Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas / Felipe Percin. – Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.
- PRATHER, R.S., BARNES, F.L., SIMS, M.M., ROBL, J.M., EYSTONE, W.H., FIST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction*, v.37, p.859-866, 1987.
- RAMOS, A. F.; ALBUQUERQUE, M. S.M.; MARIANTE, A. S. Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: desafios e perspectivas da conservação de caprinos no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.104-107, 2011.
- REIS N. R. PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, J. P. Mamíferos do Brasil: UEL, 437p. 2006.
- RIBEIRO, J.F. e WALTER, B.M.T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, S.P. Almeida e J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212. 2008.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. *Essex*, v. 142, n.6, p. 1141–1153. 2009.
- RODRIGUES, A.P.R., AMORIM C.A., COSTA S.H.F., MATOS M.H.T., SANTOS R.R., LUCCI C.M., BÁO S.N., OHASHI O.M. e FIGUEIREDO J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue Using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*. 84: 211-227, 2004.
- RODRIGUES, F. H. G.; HASS, A.; REZENDE, L. M.; PEREIRA, C. S.; FIGUEIREDO, C. F.; LEITE, B. F.; FRANCA, F. G. F. Impacto de rodovias sobre a fauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. In: III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 2002, Fortaleza. Anais do III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. p. 585-593. 2002.
- SANO, E.E., ROSA, R., BRITO, J.L.S.; FERREIRA, L.G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-009-0988-4. 2009.
- SANSINEMA, M.J., TAYLOR, S.A., TAYLOR, P.J., DENNISTON, R.S., GODKE, R.A. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.191-198, 2003.
- SCOSS, L. M.; DE MARCO, P. JR. Avaliação metodológica do uso de pegadas de mamíferos em estudos de biodiversidade. In: VI Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas – FOREST, Anais. Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p.457-459. 2000.

SHIN, D., LU, F., WEI, Y., CUI, K., YANG, S., WEI, J., MSEVOY, T.G. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology of Reproduction*, v.77, p.285-291, 2007.

SILVA MP, REZENDE LC, ALCÂNTARA D, MIGLINO MA. Análise comparativa da morfologia uterina do bicho preguiça, tamanduá e tatu (*Xenarthras*). *Enciclopédia Biosfera*, v.6, n.10, p.1-7, 2010.

SILVEIRA, L. Ecologia e Conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas. Goiás: UFG. 177 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás. 1999.

SILVEIRA, L., E A. T. A. No Prelo. Jácomo. Jaguar conservation and threats in the Cerrado of central Brazil. (Proceedings of the Jaguar Workshop, Mexico, março de 1999).

SOULÉ, M. E.; GILPIN, M. E. The theory of wildlife corridor capability. In: SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J. (Eds.). *Nature Conservation 2: the role of corridors. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons*. p. 3-8. , 1991.

TAO, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; FANG, J.; HAN , W.; ZHANG,Z.; LIU,Y.; DING, J.; ZHANG, X. Fibroblast cell line establishment, cryopreservation and interspecies embryos reconstruction in red panda (*Ailurus fulgens*). *Zygote* 17:117–124, 2009.

THE QUIAGEN Transfection Resource Book, Second Edition, 1999.

THE QUIAGEN Transfection Resource Book. QUIAGEN GMBH. , 2000.

THE QUIAGEN Transfection Resource Book. QUIAGEN GMBH. , 2002.

TROLLE, M., BISSARO, M.C.; PRADO, H.C. Mammal survey at a ranch of the Brazilian Cerrado. *Biodivers. Conserv.* 16(4):1205-1211. 2007.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproduction Biomedical Online*, v. 12, p. 779-796, 2006.

VATJA G., KUWAYAMA M. e VANDERZWALMEN P. Disadvantages and benefits of vitrification. In: *Vitrification in assisted reproduction A user's manual and troubleshooting guide*. London: *Informa UK*, pp.33-44. 2007.

VIEIRA, E. M. 1996. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciência e cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 48(4):270-272.

WILDT DE, RALL WF, CRITSER JK, MONFORT SL, Seal US. Genome resource bank BioScience. v.47, p.689-698, 1997.

WILKIE, D., SHAW, E., ROTBERG, F., MORELLI, G., AND AUZEL,. Roads, development, and conservation in the Congo Basin. *Conservation Biology* 14(6): 1614-1622. 2000.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J., CAMPBELL, K.H. Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells. *Nature*, v.385, p.810–813, 1997.

WILSON, E. O. A situação atual da diversidade biológica. In: WILSON, E. O. Biodiversidade. Rio de Janeiro, RJ: Nova Fronteira, 1997. p. 03-24.

WU, H.; GUAN, W.; LI, H.; MA, Y. Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. *Cell Biology International* 32:1478-1485, 2008.

CAPÍTULO II

1 RESUMO

CULTIVO, CARACTERÍSTICAS E CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTO DE MAMÍFEROS SILVESTRES MORTOS NO BIOMA CERRADO DO BRASIL PARA FORMAÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA.

O objetivo deste trabalho foi primeiramente avaliar a possibilidade de recuperar, isolar e caracterizar fibroblastos de três espécies diferentes (lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato), assim como testar o efeito dos crioprotetores DMSO 10% e DMF 5% associados a uma curva de resfriamento lenta e não controlada, sobre a viabilidade celular destes animais. Em seguida, utilizando o meio de criopreservação mais eficiente identificado previamente, formar um banco de germoplasma contendo fibroblastos de diferentes espécies silvestres do bioma Cerrado, aproveitando o material genético que seria perdido com a morte do animal. Os animais foram provenientes de atropelamento nas rodovias, encontrados mortos no meio ambiente ou do Hospital Veterinário do Jardim Zoológico de Brasília. Foram retirados fragmentos de pele da orelha dos animais mortos. Em seguida, foram tricotomizados e fragmentos em pedaços de 2 mm². As amostras foram colocadas em placas de petri, preenchidas com 3 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e antibiótico e, em seguida levadas à estufa de CO₂ a 38,5 °C e 5% de CO₂. Os fragmentos foram retirados após 10 dias de e o meio trocado. No sétimo dia após a troca do meio, as células foram ressuspensas em tripsina-EDTA e transferidas para garrafas de cultivo até atingirem a confluência. Após atingirem a terceira passagem, uma parte das células foi diluída em solução contendo 10% de DMSO e o outro grupo, contendo 5% de DMF contendo. As células foram envazadas em palhetas de 0,25 mL e armazenadas por 24 horas a -80 °C e, logo após esse tempo, armazenadas em nitrogênio líquido. As células pós-congelamento foram coradas com Trypan blue 4%. Os fibroblastos dos exemplares de lobo-guará apresentaram um atraso no

crescimento celular em meio DMEM em relação a outras espécies, sendo um fator limitante para seu armazenamento futuro. Diferenças na morfologia celular foram observadas entre os fibroblastos de lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato, que apresentaram formato ramificado, fusiforme e esférico, respectivamente. A solução de crioproteção contendo 10% de DMSO foi mais eficiente que o meio com DMF 5%, para conservar a viabilidades dos fibroblastos das três espécies ($P < 0,05$). Um banco de germoplasma foi formado com 508 amostras criopreservadas com fibroblastos de 19 animais, provenientes de 11 espécies diferentes. Dentro destas espécies, quatro são classificadas em escala de risco de extinção como menos preocupantes (cachorro-do-mato, veado-catingueiro, furão e macaco-da-noite), seis espécies como vulneráveis (lobo-guará, onça-pintada-preta, onça-pintada, gato-maracajá e gato-palheiro), uma em perigo de extinção (mico-leão-preto) e uma criticamente em perigo (cairara). Este reservatório biológico se configura no primeiro banco de germoplasma contendo células somáticas de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil. Este material servirá para estudos futuros de caracterização das espécies e multiplicação de animais por meio da clonagem por transferência nuclear.

Palavras-chave: animais silvestres, mamíferos do Cerrado, espécies ameaçadas, criopreservação, banco de germoplasma.

2 ABSTRACT

CULTURE, CHARACTERISTICS AND CRYOPRESERVATION OF BRAZILIAN WILD MAMMALS FIBROBLASTS FROM BRAZILIAN CERRADO BIOME FOR FORMATION OF GERMOPLASM BANK.

The objective of this study was first to evaluate the possibility to recover, isolate and characterize three different species fibroblasts (maned wolf, deer brocket and dog-eating fox) and test the effect of cryoprotectants 10% DMSO and DMF 5% associated with a slow cooling curve and not controlled on the cell viability of these animals. Then, using the most efficient means of cryopreservation identified previously, form a germplasm bank containing fibroblast different wild species of the Cerrado biome, taking advantage of the genetic material that would be lost with the death of the animal. The animals came from being run over on highways, found dead in the environment or the Veterinary Hospital Garden Brasilia Zoo. Ear skin fragments were removed from dead animals. Then they were shaved and fragmented into 2 mm² pieces. The samples were placed in petri dishes, filled with 3 mL of DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics, and then brought to the CO² incubator at 38.5 °C and 5% CO². The fragments were removed after 10 days and the medium replaced. On the seventh day after the exchange of the medium, the cells were resuspended in trypsin-EDTA and transferred for cultivation bottles until reaching confluence. After reaching the third pass, a group of cells were diluted in solution containing 10% DMSO and the other group containing 5% of DMF containing. Cells were filled into 0.25 ml straws and stored at -80 °C for 24 hours and after this time, stored in liquid nitrogen. The post-freezing cells were stained with Trypan Blue 4%. Fibroblasts of the maned wolf specimens showed a delay in cell growth in DMEM in relation to other species, a limiting factor for their future storage. Differences in cell morphology were observed between the maned wolf fibroblasts, brocket

deer and dog-eating fox, which had branched form, fusiform and spherical, respectively. The cryoprotection solution containing 10% DMSO was more efficient than the medium with 5% DMF, to preserve the viability of the fibroblasts of the three species ($P < 0.05$). A germplasm bank was formed with 508 samples cryopreserved with fibroblasts of 19 animals from 11 different species. Within these species, four are classified endangered risk scale as less worrying (thous, brocket deer, ferret and night monkey), six species as vulnerable (maned wolf, black jaguar, jaguar, Margay and cat hayloft) an endangered species (black lion tamarin) and a critically endangered (cairara). This biological reservoir is configured in the first germplasm bank containing somatic cells of wild mammals of the Cerrado biome in Brazil. This material will be used for future studies of characterization of the species and multiplication animals by nuclear transfer cloning.

Keywords: wild animals, Cerrado mammals, endangered species, cryopreservation, germplasm bank.

3 INTRODUÇÃO

A expansão das cidades, das fronteiras agrícolas e o crescimento das populações humanas têm pressionado os recursos naturais do bioma Cerrado no sentido de esgotamento dos mesmos. A fragmentação de habitats é consequência inevitável desse processo e acaba por isolar as populações de animais silvestres (Bamberg et al., 1991), impedindo o fluxo gênico e, em uma perspectiva futura, inviabilizando a continuidade da espécie.

Alguns outros fatores associados à abertura de estradas envolvem a facilitação e propagação de distúrbios, tais como o fogo, a caça, a pecuária e a extração de madeira (Dantas e Martini, 2000). Além disso, o índice de animais silvestres atropelados nas rodovias vem chamando a atenção de vários pesquisadores no mundo e estão sendo objeto de estudo (Van der Zande et al., 1980, Philcox et al., 1999).

A diversidade biológica é a chave para sustentar a vida tal como a conhecemos, e não há dúvida de que a destruição do habitat é o principal fator responsável pela redução da biodiversidade ou o número total de espécies que existem no planeta (Loskutoff, 1998). O material genético de um animal pode ser perdido por morte do animal, redução da sua herança genética (conjunto de genes) e, possivelmente, ter uma perda de genes importantes para a espécie. Neste caso, os esforços podem ser feitos através da utilização de técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total de material genético de importância (Martins et al., 2007).

Bancos de recursos genéticos são repositórios de germoplasmas (gametas, embriões, produtos derivados do sangue, tecidos e DNA) para programas de conservação definidos, que estão diretamente ligados à biotecnologia para a implementação do objetivo final, que é a reprodução animal. Uma possibilidade para preservar o germoplasma de animais silvestres é o isolamento, o cultivo e a criopreservação de células e gametas, tais como as testiculares, foliculares e fibroblastos, e podem ser utilizadas para a caracterização molecular

e para técnica de transferência nuclear (clonagem), na multiplicação do número de animais que estão extintos ou ameaçadas de extinção (Martins et al., 2007).

De forma emergencial, a biotecnologia pode contribuir com criopreservação de células e gametas provenientes de animais mortos e evitar a perda de material genético importante de espécies ameaçadas. O material armazenado poderá ser utilizado para multiplicação de animais estratégicos para o bioma por meio das técnicas de inseminação artificial, fecundação *in vitro* e clonagem.

Neste sentido, este trabalho primeiramente objetivou avaliar a possibilidade de recuperar, isolar e caracterizar fibroblastos de três espécies diferentes (lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato), bem como testar o efeito dos crioprotetores DMSO 10% e DMF 5% sobre a viabilidade celular. Em seguida, utilizando o meio de criopreservação mais eficiente identificado previamente, formar um banco de germoplasma contendo fibroblastos de diferentes espécies silvestres do bioma Cerrado, aproveitando o material genético que seria perdido com a morte do animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Material

Fibroblastos de três espécies de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil foram utilizados para testar a eficiência de criopreservação dos meios DMSO 10% e DMF 5%, diluídos em meio DMEM. Os animais mortos encontrados nas rodovias do Distrito Federal, bem como encontrados no bioma Cerrado e provenientes do Hospital Veterinário do Jardim Zoológico de Brasília, foram usados nesse estudo. Muitas vezes a população encontra animais traumatizados por acidentes nas rodovias ou por fogo e encaminham para o Jardim Zoológico de Brasília. Grande parte desses animais tratados no Hospital Veterinário sobrevive e são soltos no ambiente, mas aqueles que morreram neste período forneceram material para este trabalho. Este banco de células está disponível para estudos de caracterização destes animais, bem como para serem utilizados em estudos de clonagem por transferência nuclear.

4.2 Isolamento e cultivo de fibroblastos de mamíferos silvestres mortos

Para realizar o isolamento de fibroblastos proveniente de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil, realizou-se a retirada de fragmentos de pele de orelhas e depois, o material foi transportado a 15°C até o laboratório. No laboratório os fragmentos de pele de orelhas sofreram tricotomia, lavagem com álcool 70% e em seguida retirados fragmentos de 3 x 3 cm com auxílio de bisturi, pinça dente de rato e tesoura. Em placa de petri, as amostras foram lavadas com Dubelccos Modified Eagle Medium, (DMEM, Invitrogen Life Science, USA), adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,2% de antibióticos

(penicilina/estreptomicina). Nove fragmentos menores (1-2 mm) foram retirados da biópsia e depositados em placa de petri de 30 mm até começarem a secar. Posteriormente, a placa foi preenchida com 3 mL de DMEM e levada para cultivo em estufa com 5% de CO₂ à temperatura de 38,5 °C. Após 10 dias, os fragmentos foram retirados e o meio DMEM trocado totalmente. No sétimo dia após a troca do meio, as células foram resuspensas em tripsina-EDTA e transferidas para garrafas de cultivo com 3 mL de DMEM, onde foram cultivadas até alcançar a confluência celular.

4.3 Avaliação da morfologia e monitoramento do crescimento celular

Na segunda semana de cultivo, a morfologia dos fibroblastos das três espécies foi avaliada em microscópio invertido de luz clara (Nikon). A partir deste momento, diariamente o crescimento celular foi avaliado para identificar o momento que os fibroblastos atingiram a confluência. Semanalmente o meio de cultivo era renovado.

4.4 Criopreservação de fibroblastos

Os fibroblastos isolados dessas espécies foram criopreservados em duas soluções crioprotetoras: 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em meio DMEM versus 5% de Dimetilformamida (DMF) em DMEM. As células foram envazadas em palhetas de 0,25 mL e depois congeladas em redução progressiva de temperatura, sendo armazenadas em freezer -80 °C por 24 horas e depois armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) após 24 horas.

4.5 Avaliação da viabilidade celular pós-criopreservação

A viabilidade celular pós-descongelamento foi avaliada utilizando-se o corante Trypan blue 4%. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36 °C durante 30 segundos, misturadas na proporção 1:1 (v/v) corante e amostra de células e incubadas a 36 °C

durante 10 minutos. A integridade e viabilidade celular foram avaliadas em câmara de Neubauer, para guiar a contagem, sob microscópio de campo claro. Foram contadas 300 células em duas repetições. Células com a presença do corante Trypan blue foram consideradas mortas.

4.6 Avaliação ultraestrutural

Na avaliação de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as células foram fixadas em temperatura ambiente com fixador Karnovsky (2% glutaraldeído + 2% paraformaldeído + 3% sacarose + 5mM de CaCl_2 em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2). Em seguida, foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com tampão cacodilato de sódio a 0,1M. A seguir, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8%, 5 mM de CaCl_2 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 acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Foi realizada a secagem ao ponto crítico e em seguida a metalização com ouro e avaliados em microscópio eletrônico de varredura Jeol 700A.

4.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 2 tratamentos (DMSO 10% e DMF 5%), quatro repetições para o experimento de criopreservação e monitoramento do tempo de confluência celular. Para as variáveis em formato de porcentagens, foi realizada a transformação dos dados aplicados arco seno raiz ($x/100$). A verificação estatística da significância dos tratamentos foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo software estatístico SAS versão 9.1.2.

5 RESULTADOS

O tempo para atingir confluência celular foi diferente entre as espécies. Os fibroblastos provenientes de lobo-guará apresentaram crescimento retardado (40 dias) para entrar em confluência em comparação com os fibroblastos de veado-catingueiro e cachorro-do-mato (18 dias), conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação morfológica dos fibroblastos das diferentes animais e monitoramento do tempo de confluência celular.

	lobo-guará	veado-catingueiro	cachorro-do-mato
Tempo de confluência (dias)	40	18	18
Morfologia celular	Ramificada	Fusifforme	Esférico

O crioprotetor DMSO 10% foi mais eficiente em preservar a viabilidade dos fibroblastos que o DMF 5% (Tabela 4).

Tabela 4 - Viabilidade de fibroblastos de mamíferos silvestres após criopreservação em meio com DMSO 10% e DMF 5%.

Tratamentos	lobo-guará	veado-catingueiro	cachorro-do-mato
DMSO 10%	86,75 ± 3,8% ^{aA}	64,16 ± 4,53% ^{aB}	79,58 ± 1,32% ^{aA}
DMF 5%	55,91 ± 6,11% ^{bA}	25,33 ± 4,8% ^{bB}	40,83 ± 14,27% ^{bA}

Letras diferentes^{a-b} nas colunas e nas linhas^{A-B} indicam diferença significativa (P<0,05).

Foram observadas, também, diferenças morfológicas dos fibroblastos entre as espécies. O lobo-guará apresentou formato ramificado (Figura 1A), o veado-catingueiro apresentou formato fusiforme (figura 1B) e o cachorro-do-mato apresentou formato esférico (figura 1C).

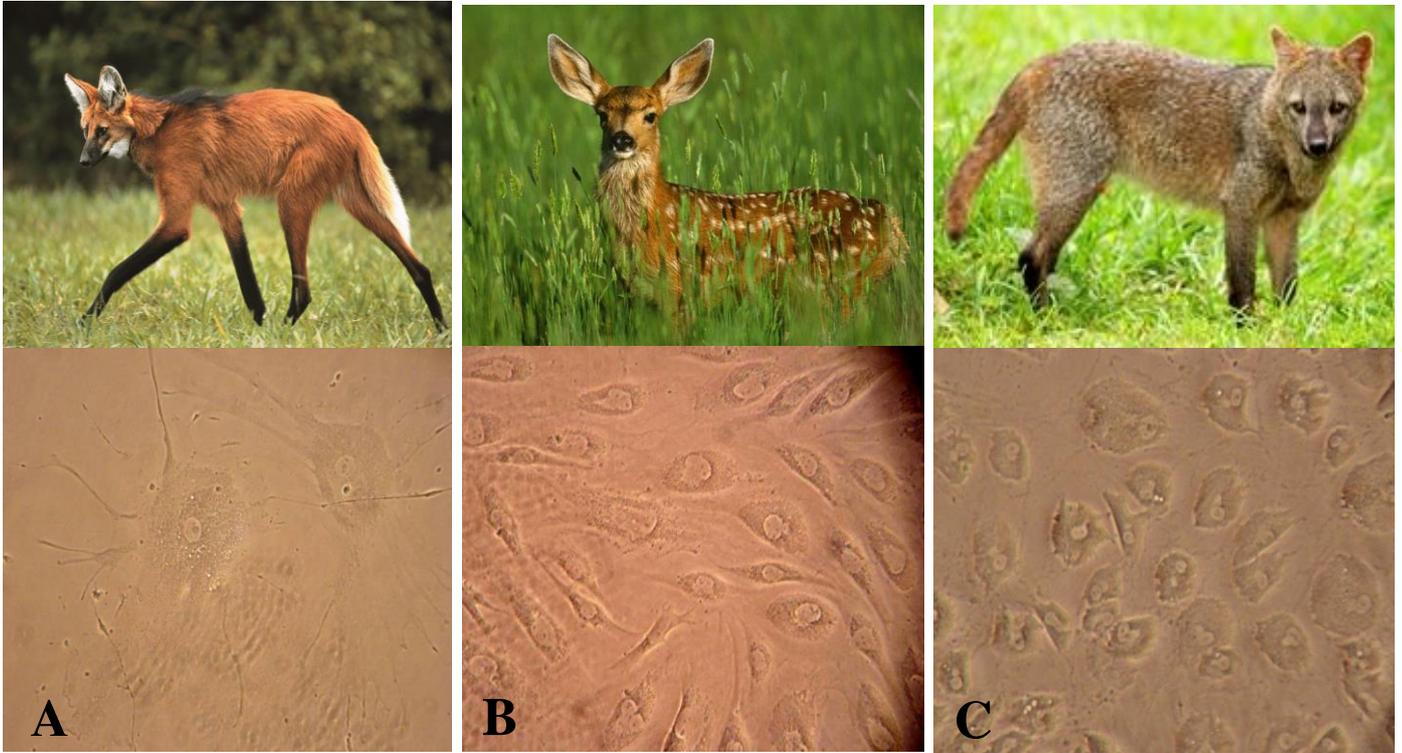


Figura 1 Microscopia de campo claro de fibroblastos isolados com diferentes formatos: A. Ramificado (lobo-guará); B. Fusiforme (veado-catingueiro); C. Esférico (cachorro-do-mato).

Na microscopia eletrônica de transmissão, foi possível visualizar células íntegras de veado-catingueiro (Figura 2A) e células lesadas (Figura 2B), células íntegras de cachorro-do-mato (Figura 2C) e célula lesadas (Figura 2D), células de veado-catingueiro com lesões dentro da célula (Figura 2E) e células íntegras (Figura 2F).

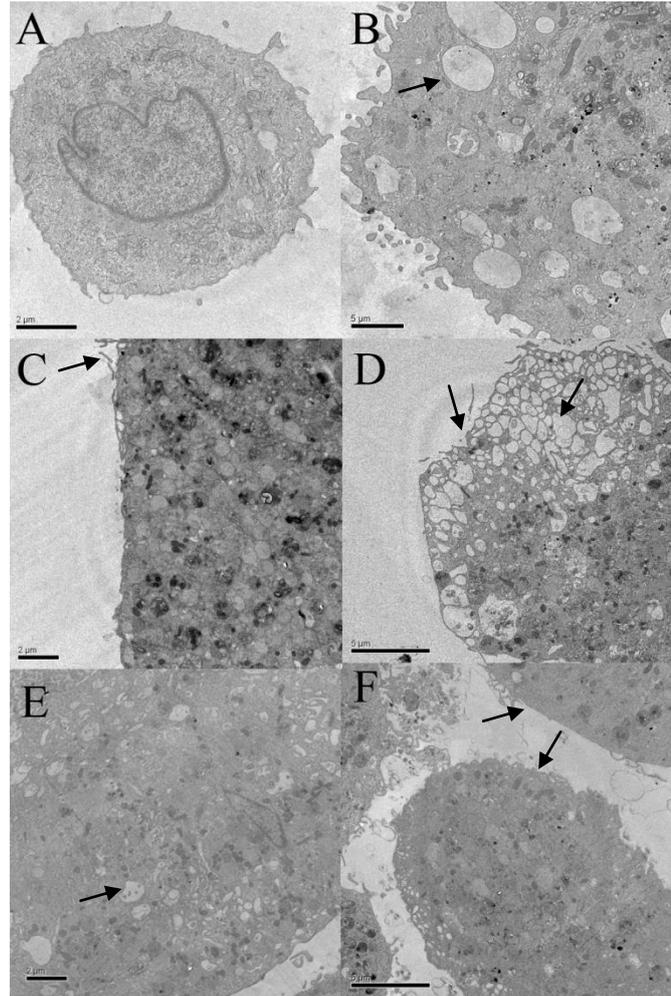


Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos isolados apresentado diferentes formatos e estados de criopreservação: (A), imagem panorâmica de fibroblasto de veado-catingueiro; (B) seta demonstrando formação de vacúolos em fibroblastos de veado-catingueiro pós-criopreservação; (C-D) setas demonstrando membrana plasmática lesada e formação lipídica em fibroblastos de cachorro-do-mato; (E) seta indicando fibroblastos de lobo-guará com pequenos vacúolos; (F) setas indicando membranas plasmáticas íntegras e lesadas de lobo-guará.

Baseado nos resultados do experimento de criopreservação foi escolhido o meio DMSO 10% como meio padrão para ser utilizado em animais silvestres. Foram recebidos no laboratório um total de 31 animais. Foi possível coletar, isolar e criopreservar fibroblastos da orelha de 19 animais de 11 espécies diferentes. O maior número de animais foi proveniente do Jardim Zoológico de Brasília (51,69%). O restante foi obtido em missões nas rodovias do Distrito Federal (25,80%), e no cerrado (22,51%).

O banco de germoplasma formado possui 508 palhetas criopreservadas com fibroblastos das seguintes espécies: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), lobo-guará

(*Chrysoncyon brachyuru*), veado-catingueiro (*Mazama gouazoupira*), furão (*Mustela putorius furo*), macaco-da-noite (*Aotus sps*), mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), onça-pintada-preta (*Panthera onca*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), onça-parda (*Puma concolor*), cairara (*Cebus kaapori*), gato-palheiro (*Leopardus pajeros*) e onça-pintada (*Panthera onca*), conforme Tabela 5. O banco de germoplasma está localizado no Jardim Zoológico de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Tabela 5 - Números de animais, espécies utilizadas e total de amostras armazenadas no banco de germoplasma.

Nome popular	Nome científico	Código	Número de Amostras	Grau de vulnerabilidade*
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	CM1	20 palhetas	LC
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	CM2	21 palhetas	LC
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	CM3	20 palhetas	LC
Lobo-guará	<i>Chrysoncyon brachyuru</i>	LG1	3 palhetas	VU
Lobo-guará	<i>Chrysoncyon brachyuru</i>	LG2	2 palhetas	VU
Veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoupira</i>	VC1	20 palhetas	LC
Veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoupira</i>	VC2	154 palhetas	LC
Veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoupira</i>	VC3	64 palhetas	LC
Furão	<i>Mustela putorius</i>	FU1	34 palhetas	LC
Furão	<i>Mustela putorius</i>	FU2	38 palhetas	LC
Macaco-da-noite	<i>Aotus sp</i>	MN	16 palhetas	LC
Mico-leão-preto	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	MLP	2 palhetas	EM
Cairara	<i>Cebus kaapori</i>	CA	16 palhetas	CR
Onça-pintada	<i>Panthera onca</i>	OP1	15 palhetas	VU
Onça-pintada-preta	<i>Panthera onca</i>	OP	35 palhetas	VU
Onça-parda	<i>Puma concolor</i>	OPA	1 palheta	VU
Gato-palheiro	<i>Leopardus pajeros</i>	GP	30 palhetas	VU
Gato-maracajá	<i>Leopardus wiedii</i>	GM1	12 palhetas	VU
Gato-maracajá	<i>Leopardus wiedii</i>	GM2	5 palhetas	VU
Total de Amostras			508 palhetas	

*LC (menos preocupante), VU (vulnerável), EM (em perigo) e CR (criticamente em perigo).
Fonte: ICMBIO, 2014.

6 DISCUSSÃO

A biodiversidade presente no Brasil é uma das mais importantes no mundo e sua riqueza, tanto de animais quanto de plantas, é de grande interesse em diversos setores, entre os quais se destaca a comunidade científica, pois há interesse na preservação das espécies presentes (Costa e Martins, 2008).

Inicialmente, o trabalho buscou aproveitar o material genético que seria perdido com a morte animal, por meio de isolamento de fibroblastos de pele. Verificou-se que em alguns animais, mesmo após dois dias da morte no meio ambiente, foi possível realizar o isolamento celular. Além disso, observou-se que os fibroblastos dos exemplares de lobo-guará apresentaram um atraso no crescimento celular em meio DMEM em relação a outras espécies. Em tamanduá-mirim nem mesmo crescimento celular foi conseguido em meio DMEM. Devido ao diferente comportamento de crescimento celular das diferentes espécies em meio DMEM, sugere-se que outros meios sejam testados ou se realize ajustes na concentração de glicose, SFB ou uso de fatores de crescimento do meio de cultivo para cada espécie animal, para promover um crescimento mais acelerado para o uso adequado destas células na técnica de clonagem.

Diferenças na morfologia celular foram observadas entre os fibroblastos de lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato, que apresentaram formato ramificado, fusiforme e esférico, respectivamente. Isto demonstra que são necessários estudos aprofundados em cada espécie de mamífero silvestres, pois, além de apresentarem diferenças em nível fisiológico, possivelmente apresentem outras diferenças nas características celulares. As baixas taxas de sucesso das biotecnologias reprodutivas em animais não domésticos nem sempre está relacionado com a ineficiência na criopreservação de gametas e células ou por falhas na técnica e sim o maior fator limitante acaba sendo a insuficiência de informações e de conhecimento da biologia reprodutiva dessas espécies (Leibo e Songsasen, 2002).

Para os fibroblastos provenientes de lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato, a criopreservação pela redução da temperatura em curva não controlada foi mais efetiva quando combinado com as soluções contendo 10% de DMSO. Esta solução de crioproteção foi mais eficiente em preservar a viabilidade celular e mostrou menos variação que a solução com DMF 5%. Desta forma, este estudo mostrou que o DMSO é também o crioprotetor de escolha para se criopreservar fibroblastos de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil e a curva de refrigeração com redução progressiva na temperatura é útil para estes tipos celulares. Estas informações confirmam os achados de Cunha et al., (2014), que demonstraram que o uso da redução progressiva da temperatura e do crioprotetor DMSO é um método eficiente e prático para se criopreservar fibroblastos e células amnióticas bovinas. Segundo Hayes et al., (2005), o crioprotetor e a curva de congelamento são os fatores que tem mais influência na sobrevivência celular após o descongelamento. No entanto, também é necessário considerar as características celulares de cada espécie para a criopreservação. Neste estudo, os fibroblastos de veado-catingueiro foram mais sensíveis à criopreservação que as outras espécies, independente da molécula crioprotetora. Por isso, o uso de meios crioprotetores adaptados para células das diferentes espécies devem ser estudados.

Atualmente, a importância do uso de estratégias alternativas para conservação da biodiversidade é enfatizada e o estabelecimento de bancos de germoplasma é uma alternativa para conservação das espécies em extinção (Machado et al., 2016). Segundo Martins et al., (2007), bancos de recursos genéticos são repositores de germoplasma (gametas, embriões, sangue, tecidos e DNA) para definir os programas de conservação, que são diretamente ligados com a biotecnologia para implementação do último objetivo, que é a reprodução animal.

Neste trabalho, após a definição do melhor meio crioprotetor para os fibroblastos dos animais silvestres, foi formado um criobanco de células somáticas de animais mortos. Este repositório de material genético constitui o primeiro banco de germoplasma contendo fibroblastos de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil. Ele foi formado com o objetivo de recuperar material genético de mamíferos silvestres, o qual seria perdido com a morte do animal no ambiente. Em um período de um ano de trabalho, o Laboratório de Reprodução da Embrapa Cerrados recebeu material biológico de 31 animais silvestres mortos, sendo que fibroblastos foram isolados de 19 animais de 11 espécies diferentes.

O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente do Brasil, classifica detalhadamente o grau de vulnerabilidade de extinção dos animais nos diferentes biomas do País. No banco de

germoplasma deste trabalho, encontram-se células de animais classificados como menos preocupantes (cachorro-do-mato, veado-catingueiro, furão e macaco-da-noite), vulneráveis (lobo-guará, onça-pintada-preta, onça-pintada, gato-maracajá e gato-palheiro), em perigo (mico-leão-preto) e criticamente em perigo (cairara). Este material estocado pode contribuir com os estudos de conservação e incentivar novas estratégias de políticas governamentais para diminuição destas perdas irreversíveis. Segundo Mathews et al., (1988), a derivação de culturas primárias de células e, eventualmente, de linhas de células de espécies ameaçadas, podem fornecer aos pesquisadores novas ferramentas para determinar sexo, cariótipo, a obtenção de informações bioquímica e genéticas, o acesso a polimorfismos mitocondriais, cromossômicas de DNA, obtenção de RNAs e proteínas livres provenientes de várias espécies. Isto propicia uma melhor compreensão dos sistemas de acasalamento, da identificação e tamanhos populacionais eficazes de animais selvagens.

Outra possibilidade de uso imediato das células deste banco para reprodução dos animais é utiliza-las na técnica de transferência nuclear de células somáticas. No entanto, segundo Loi et al., (2001) muitos são os problemas relacionados com a clonagem de espécies ameaçadas de extinção: alguns são de caráter geral da eficiência da técnica, e outros são estritamente ligados à limitada, se não impossível, forma de acesso a animais raros mantidos em reprodução em cativeiro e, pior ainda, *in situ* em seus nichos naturais. Entre os fatores gerais, o principal é representado pelo limitado conhecimento da fisiologia reprodutiva de extinção espécies. Tecnologias reprodutivas são, de fato, transferidas para animais selvagens que são geneticamente próximas de animais domésticos onde tais procedimentos foram originalmente dominados, como relatados entre mouflon e ovelhas.

A clonagem interspécie é uma possibilidade para superar a deficiência na obtenção de ovócitos em quantidade das espécies silvestres. A clonagem interespécie foi já estabelecida em algumas espécies ameaçadas de extinção: mouflon (*Ovis orientalis musimon*) e argali (*Ovis ammon*). Os embriões clonados foram derivados após a transferência de células somáticas em ovócitos ovinos enucleados (*Ovis aries*) (Loi et al., 2001) e embriões de gaur clonados (*Bos frontalis gaurus*) produzidos após a transferência de células em ovócitos de vaca doméstica enucleados (*Bos taurus*) (Lanza et al., 2000).

A clonagem interespécie de carnívoros selvagens foi feita em gato selvagem africano (Gómez et al., 2004) e gato black footed (*Felis nigripes*) (Gómez et al., 2006) usando citoplasma receptor de gato doméstico. OH. H.J. et al., (2008) descreveu a clonagem bem sucedida em coiotes (*Canis latrans*), através da iSCNT, utilizando oócitos de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*). Hwang I e colaboradores (2013) conseguiram clonar lobo cinzento

(*Canis lupus*) transferindo células somáticas isoladas de lobos mortos para oócitos enucleados de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*).

7 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou ser possível recuperar fibroblastos de mamíferos silvestres do bioma Cerrado, sendo recomendado o uso da solução crioprotetora com 10% de DMSO. Isso possibilitou a formação do primeiro criobanco de fibroblastos de animais silvestres do Brasil. Este material será importante para aplicação científica e conservação animal por meio das biotécnicas reprodutivas no futuro. No entanto, este trabalho alerta que muitos animais continuam morrendo no bioma, devido o crescimento das cidades e ações humanas diversas. Ações imediatas devem ser tomadas para que estas espécies continuem a viver em seus habitats. A biotecnologia reprodutiva surge como uma ação emergencial para conservação de espécies silvestres, embora não possa reparar o dano provocado em larga escala durante anos de ações humanas irresponsáveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMBERG, E.; MOSTL, E.; PATZL, M. et al. Pregnancy by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J. Zoa Wildl. Med.*, v.22, p.73-77, 1991.

COSTA, P. M., MARTINS, C.F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. *Univ. Ci. Saúde, UniCeub, Brasília*, v. 6, n. 1, p. 39-55, jan./jun. 2008.

DA CUNHA, ER, MARTINS, C.F.; , SILVA, CG, BESSLER, HC; BAÓ, S.N.; 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*, vol 49, Issue 5, pages 806–812, October 2014.

DANTAS, G. P. M.; MARINI, M A. Características das unidades de conservação no Estado de Minas Gerais In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação. 2, 2000. Campo Grande Anais... Campo Grande. *Rede Nacional de Pró-conservação*. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza.p 663-672, 2000.

GÓMEZ, M. C., C. E. POPE, AND B. L. DRESSER. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology*. 66:72–81. 2006.

GÓMEZ, M.C. POPE C.E. GIRALDO A. LYONS L.A. HARRIS R.F. KING A.L. COLE A. GODKE R.A. DRESSER B.L. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells.*; 6:247–258. 2004.

HAYES O, RODRÍGUEZ LL, GONZALEZ A, FALCON V, AGUILAR A, CASTRO FO. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and in vitro development into blastocysts of bovine cell lines used in somatic cell cloning. *Zygote*. 4, 277–282, 2005.

HAWANG I, JEONG YW, KIM JJ, LEE HJ, KANG M, PARK KB, PARK JH, KIM YW, KIM WT, SHIN T, HYUN SH, JEUNG EB, HWANG WS. Successful cloning of coyotes

through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 25(8):1142. 2013.

LEIBO SP, SONGSASEN N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology.* 57:303–326. 2002.

LANZA, R. P., B. L. DRAPER, AND P. DAMIANE. Cloning Noah's ark. *Sci. Am.* 283:84-89. 2000.

LOI, P., PTAK, G., FULKA, J., JR., et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964. 2001.

LOSKUTOFF N.M. 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,1998.

MARTINS, C.F.; BAÓ, S.N.; DODE, M.N.; CORREA, G.A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology.* v.67-8, p.1307-1315, 2007.

MATHEWS, E. A.; KELLER S.; WEINER D. B. A method to collect and process skin biopsies for cell culture from free-ranging gray whales. *Mar. Mamm. Sci* 41: 1–12; 1988.

MACHADO, L.C., OLIVEIRA V.C., PARAVENTI M.D., CARDOSO R.N.R., MARTINS D.S. e AMBRÓSIO C.E. Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 36(1):62-66. 2016.

OH HJ, KIM MK, JANG G, KIM HJ, HONG SG, PARK JE, PARK K, PARK C, SOHN SH, KIM DY, SHIN NS, LEE BC. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology.* 1;70(4):638-47. 2008 Sep.

PHILCOX, C.K.; GROGAN, A.L.; MACDONALD, D.W. Patterns of otter *Lutra lutra* road mortality in Britain. *Biol. Conservation,* v.36, p.748-762, 1999.

VAN DER ZANDE, A.N; TER KEURS, W.J.; METIKOSH, S. The impact of roads on the densities of four birds species in an open field habitat - evidence of a long distance effect. *Biol.Conservation,* v.18, p.299-321, 1980.