



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**



**OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR E XENOTRANSPLANTE
DE CARTILAGEM AURICULAR PARA CONSERVAÇÃO
DE ONÇAS-PINTADAS (*Panthera onca*)**

SOFIA REGINA POLIZELLE

Campo Grande – MS

2023

SOFIA REGINA POLIZELLE

**OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR E XENOTRANSPLANTE
DE CARTILAGEM AURICULAR PARA CONSERVAÇÃO
DE ONÇAS-PINTADAS (*Panthera onca*)**

*Optimization of cell cryopreservation and xenotransplant protocols of ear
cartilage for the conservation of jaguars (*Panthera onca*)*

Sofia Regina Polizelle

Orientador: Prof. Dr. Gediendson Ribeiro de Araujo

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS

2023

Certificado de Aprovação em Comissão de Ética



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da viabilidade e do ciclo celular de fibroblastos de cartilagem de onças-pintadas (*Panthera onca*) xenotransplantadas em camundongos NSG e criopreservados em diferentes protocolos", registrada com o nº 1.278/2023, sob a responsabilidade de Gediendson Ribeiro de Araújo - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 11/05/2023.

Vigência de autorização	12/05/2023 a 31/07/2024	
Procedido	☒ Ensino	☐ Pesquisa científica
Nº de inscrição no Autopós do CONCEA	75762-4	
Atividade	☒ Ensino	
	☐ Outros fins científicos	
	☐ Educação	
Espécies/Tipos	☒ Outros fins científicos	
	☐ Educação	
Localização	Disponibilidade	
Local de realização das atividades	Instituto Biológico	

Procedido	☒ Ensino	☐ Pesquisa científica
Vigência de autorização	16/04/2023 a 31/05/2024	
Local/Instituição	Mato Grosso do Sul - UFMS	
Nº de inscrição	15	
Observações	20/05/2023	
Assinatura	Assinatura	
Assinatura	Assinatura	



1 **RESUMO**

2 POLIZELLE, S.R. Otimização dos protocolos de criopreservação celular e xenotransplante
3 de cartilagem auricular para conservação de onças-pintadas (*Panthera onca*). 2023.
4 MESTRADO. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de
5 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo
6 Grande, MS, 2023.

7
8 Com a finalidade de minimizar as perdas genéticas das populações de onças-
9 pintadas, estão sendo desenvolvidos biobancos de material genético, e, para isso,
10 torna-se necessário estabelecer e/ou aprimorar protocolos que preservem e
11 permitam a viabilidade do material após a criopreservação. Para esta espécie, a
12 criopreservação de células somáticas já apresenta bons resultados usando a curva
13 de congelamento lento com álcool isopropílico. Com isso, esse trabalho tem como
14 objetivo avaliar se o congelamento rápido consegue manter a viabilidade das
15 células em relação à forma tradicional, sendo uma alternativa para estocagem das
16 células, além de realizar o xenotransplante de tecido de animais *post-mortem*
17 avaliando se houve revitalização de um material em estágio inicial de
18 decomposição. No primeiro experimento, as células foram cultivadas até a terceira
19 passagem, avaliadas e criopreservadas no método tradicional através do
20 congelamento lento (CL) pelo uso do equipamento Mr. Frosty, e através do
21 congelamento rápido (CR) no vapor de nitrogênio, armazenadas em palhetas de
22 0,25ml. Após um período, foram descongeladas, avaliadas pelo corante azul de
23 tripano e pelo uso de sondas fluorescentes (teste de necrose e apoptose (laranja
24 de acridina + iodeto de propídio (PI) e citometria de fluxo (Hoechst33342 + PI)) e
25 colocadas em cultivo, onde, após atingirem confluência de 70-80%, foram avaliadas
26 novamente. Foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as células
27 descongeladas (congelamento lento: $86,7 \pm 3,7$ para azul de tripano (AT), $79,4 \pm 1,9$
28 para o teste de necrose e apoptose (LA); congelamento rápido: $83,8 \pm 4,5$ AT,
29 $73,0 \pm 6,7$ LA) e na confluência (congelamento lento: $99,2 \pm 0,5$ AT, $92,0 \pm 1,4$ LA,



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



30 94,91±0,61 para citometria de fluxo (CIT); congelamento rápido: 99,6±0,1 AT,
31 87,8±2,7 LA, 92,73±1,7 CIT), sendo as células cultivadas com viabilidade
32 semelhante as células a fresco ($p>0,05$) (98,24±0,3 AT, 88,7±3,9 LA, 94,24±2,16
33 CIT). As células após descongelamento apresentaram baixa viabilidade,
34 aumentando-a após confluência. Foi encontrado também uma diferença entre as
35 análises de viabilidade, onde o AT marcou mais células inviáveis (CL: 86,76±3,68;
36 CR: 83,78±4,55), enquanto os resultados do LA (CL: 92±1,38; CR: 87,80±2,69) e
37 da citometria (CL: 94,91±0,61; CR: 92,73±1,7) foram semelhantes. No segundo
38 experimento, os fragmentos de orelha de onças-pintadas atropeladas (atrop1,
39 atrop2 e atrop3) foram levadas ao laboratório, tiveram a pele removida e a
40 cartilagem foi lavada em álcool 70% por um minuto, depois em meio de cultivo com
41 5% de antibiótico-antimicótico, sendo posteriormente uma parte cultivado a fresco
42 e seis vitrificados em superfície sólida. Após reaquecimento, uma foi colocada no
43 cultivo, uma fixada em paraformaldeído para histologia, e duas xenotransplantadas
44 em cada região (intraperitoneal (XenoIP) e subcutânea (XenoSC)) em
45 camundongos imunodeficientes. Uma semana após o xenotransplante, um
46 explante de cada região foi fixado para histologia e os demais colocados em cultivo.
47 Na análise histológica, o fragmento XenoSC do atrop1 apresentou maior número
48 de fibroblastos (28,4±9,48) que o XenoIP (11,1±5,47) e descongelado (20,6±7,17);
49 para o atrop2, o XenoSC (17,2±7,96) não apresentou diferença em relação ao
50 grupo fresco (25,1±12,6), e o XenoIP apresentou menor quantidade de fibroblastos
51 que os demais (5,65±4,69); e para o atrop3, os XenoSC (7,4±4,67) e descongelado
52 (6,5±3,54) não apresentaram diferenças. De forma geral, a análise histológica
53 indicou um maior tempo de morte para o animal atrop3. Todos os animais
54 apresentaram efeito positivo para o xenotransplante, sendo o XenoSC como melhor
55 na manutenção da viabilidade celular, além da média de fibroblastos obtidos após
56 descongelamento (28,4) serem semelhantes aos encontrados na literatura (21,7 e
57 26,6) para vitrificação de tecido em superfície sólida.

58 Palavras-chave: Banco genético, célula somática, felídeo silvestre, tecido

ABSTRACT

POLIZELLE, S.R. Optimization of cell cryopreservation and xenotransplant protocols of ear cartilage for the conservation of jaguars (*Panthera onca*). 2023. MASTER'S DEGREE. Postgraduate Program in Veterinary Sciences. School of Veterinary Medicine and Zootechnics, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

In the pursuit of conserving genetic diversity among jaguar populations, the establishment of genetic material biobanks is gaining prominence. An initial crucial stride involves refining protocols to ensure the viability of genetic material subsequent to cryopreservation. Notably, the cryopreservation of somatic cells in jaguars has exhibited favorable outcomes, particularly with the utilization of the slow freezing curve involving isopropyl alcohol. This research endeavors to ascertain whether the viability of cells can be maintained using rapid freezing as compared to the conventional approach. A key objective encompasses the exploration of an alternative method for cellular storage, alongside the assessment of xenotransplantation feasibility utilizing tissue samples from deceased animals. The study further scrutinizes whether material revitalization is feasible during the initial stages of decomposition. In the primary experiment, cells were cultured until the third passage, assessed for viability, and subsequently cryopreserved using both the traditional slow freezing method (referred to as SF) employing the Mr. Frosty equipment, and the rapid freezing approach (referred to as RF) utilizing nitrogen vapor and stored in 0.25ml straws. Following a defined timeframe, the cells were thawed, viability was assessed through trypan blue dye (TB) and fluorescent probes, including necrosis and apoptosis tests (using acridine orange and propidium iodide - AO), and flow cytometry (employing Hoechst33342 and propidium iodide - CT). Post-assessment, the cells were cultured again, and upon reaching 70-80% confluence, underwent further evaluation. Statistical analysis indicated significant differences ($p < 0.05$) between thawed cells from slow freezing (TB: 86.7 ± 3.7 , AO: 79.4 ± 1.9) and fast freezing (TB: 83.8 ± 4.5 , AO: 73.0 ± 6.7), as well as at confluence for slow freezing (TB: 99.2 ± 0.5 , AO: 92.0 ± 1.4 , CT: 94.91 ± 0.61) and fast freezing (TB: 99.6 ± 0.1 , AO: 87.8 ± 2.7 , CT: 92.73 ± 1.7). Notably, cultured cells demonstrated comparable viability to fresh cells ($p > 0.05$) (TB: 98.24 ± 0.3 , AO: 88.7 ± 3.9 , CT:

94.24±2.16). Thawed cells exhibited reduced viability, which subsequently improved after reaching confluence. Discrepancies were observed in viability analyses, with the TB marker identifying more cells as non-viable (SF: 86.76±3.68, RF: 83.78±4.55), while AO (SF: 92±1.38, RF: 87.80±2.69) and cytometry results (SF: 94.91±0.61, RF: 92.73±1.7) yielded analogous outcomes. In the subsequent experiment, ear fragments from deceased jaguars were processed, with the skin removed and cartilage cleansed before initiating culture. A portion of the fragments were subjected to fresh culture, while six were vitrified on a solid surface. Post-reheating, fragments were either cultured, fixed for histological analysis, or xenotransplanted into immunodeficient mice – both intraperitoneally (XenoIP) and subcutaneously (XenoSC). Histological evaluation a week post-xenotransplantation revealed varying fibroblast counts. Notably, XenoSC fragments exhibited higher fibroblast counts for certain animals compared to XenoIP and thawed samples. A positive trend was observed for xenotransplantation across all animals, with XenoSC emerging as the most conducive for maintaining cell viability. Importantly, the average fibroblast count obtained after thawing closely aligned with literature values for tissue vitrification on solid surfaces. Overall, this research contributes valuable insights into the viability of cryopreserved jaguar somatic cells and the potential of xenotransplanting post-mortem tissue fragments. The findings underscore the significance of rapid freezing techniques and the feasibility of preserving genetic material and tissue samples to aid in jaguar population conservation efforts.

Keywords: Genetic bank, somatic cell, tissue, wild felid.

SUMÁRIO

114		
115	RESUMO	IV
116	ABSTRACT	VI
117	1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
118	2. REVISÃO DE LITERATURA	11
119	2.1. A ONÇA-PINTADA.....	11
120	2.2. BIOBANCOS E CRIOPRESERVAÇÃO PARA CÉLULAS SOMÁTICAS.....	13
121	2.3. FIBROBLASTOS.....	14
122	3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
123	4. ARTIGO I - “AVALIAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO PELO CONGELAMENTO LENTO E	
124	CONGELAMENTO RÁPIDO NA VIABILIDADE DE CÉLULAS SOMÁTICAS PROVENIENTES	
125	DE ONÇAS-PINTADAS”	26
126	4.1. INTRODUÇÃO.....	26
127	4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
128	4.2.1. ANIMAIS	27
129	4.2.2. COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	27
130	4.2.3. MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS, CULTIVO PRIMÁRIO E SUBCULTURAS	28
131	4.2.4. CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAÇÃO.....	28
132	4.2.4.1. CONGELAMENTO LENTO.....	29
133	4.2.4.2. CONGELAMENTO RÁPIDO.....	29
134	4.2.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE.....	29
135	4.2.5.1. AZUL DE TRIPANO	30
136	4.2.5.2. TESTE DE NECROSE E APOPTOSE	30
137	4.2.5.3. CITOMETRIA DE FLUXO.....	30
138	4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
139	4.4. RESULTADOS.....	31
140	4.5. DISCUSSÃO	33
141	4.6. CONCLUSÃO	37
142	4.7. REFERÊNCIAS.....	38
143	5. ARTIGO II - “XENOTRANSPLANTE COMO ALTERNATIVA PARA REVIGORAMENTO	
144	TECIDUAL PARA CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE ONÇAS-PINTADAS <i>POST</i>	
145	<i>MORTEM</i>”	44
146	5.1. INTRODUÇÃO	44
147	5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
148	5.2.1. AUTORIZAÇÕES.....	45
149	5.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46

150	5.2.3. ANIMAIS.....	47
151	5.2.4 COLETA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS	47
152	5.2.6 VITRIFICAÇÃO DOS TECIDOS.....	48
153	5.2.7 REAQUECIMENTO.....	48
154	5.2.8 IMPLANTAÇÃO DE TECIDO (EXPLANTE) EM CAMUNDONGOS NSG.....	49
155	5.2.9 CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	50
156	5.2.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE.....	50
157	- AZUL DE TRIPANO	50
158	- TESTE DE NECROSE E APOPTOSE	50
159	- CITOMETRIA DE FLUXO.....	51
160	5.2.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
161	5.3. RESULTADOS.....	51
162	5.4. DISCUSSÃO	59
163	5.5. CONCLUSÕES	63
164	5.6. REFERÊNCIAS.....	63
165	<u>6. CONSIDERAÇÕES.....</u>	<u>66</u>
166	<u>7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO</u>	<u>67</u>
167		

1. INTRODUÇÃO GERAL

A onça-pintada (*Panthera onca*), apesar de ter um papel ecológico importante por ser um animal topo de cadeia, vem enfrentando nos últimos anos no Brasil declínio populacional acelerado, causado por diversos fatores como: a fragmentação ambiental, caça e atropelamentos (MORATO et al., 2014). Este declínio é observado com maior preocupação em biomas como a Caatinga e Mata Atlântica, onde o isolamento intenso das populações impede o encontro reprodutivo dos animais e o fluxo gênico, causando assim aumento das taxas de pareamentos endogâmicos (MORATO et al., 2013). Estes pareamentos com baixa variabilidade genética, podem acelerar o processo de extinção dessa espécie nestas regiões, caso não haja intervenções (FRANKLIN; FRANKHAM, 1998).

Justamente por ser um animal de grande importância ecológica e científica, ferramentas para manutenção de sua variabilidade genética são necessárias (HAAG et al., 2010). Neste contexto, os biobancos tornam-se uma estratégia de conservação, pois a partir deles, é possível manter gametas, embriões e tecidos viáveis que poderão, futuramente, serem utilizados por outras biotecnologias reprodutivas como a fertilização in vitro (FIV) ou até mesmo a clonagem em casos extremos (MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020). E para que haja a formação de um biobanco adequado e que cumpra sua função de reserva de patrimônio genético, é muito importante estabelecer protocolos simples, eficazes e funcionais, mesmo fora de ambientes controlados como o laboratório (PEREIRA et al., 2018). Além disso, é urgente o desenvolvimento de protocolos para aproveitamento do material genético obtido de animais atropelados, pois na grande maioria das vezes o material coletado já está em péssima qualidade devido ao tempo do óbito, inviabilizando o seu uso futuro.

Embora a clonagem ainda seja vista como último recurso, também é uma alternativa para manutenção e aumento de material genético para populações altamente ameaçadas (PEREIRA et al., 2018). A realidade que vivenciamos hoje em cativeiro é a presença de machos e fêmeas de idades avançadas ou com comorbidades que influenciam a qualidade reprodutiva, mas que ainda assim podem ter seus tecidos armazenados para uso em técnicas como a clonagem por

transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (ARAUJO et al., 2018). Em animais de vida-livre também vivenciamos dificuldades para obtenção de material biológico adequado, principalmente em decorrência às dificuldades para a logística de laboratório, baixo acesso à energia elétrica, baixa qualidade de amostras devido o estresse da captura e necessidade de uma equipe treinada (ARAUJO et al., 2018). Todos esses fatores só reforçam a necessidade de criação de protocolos simples e universais, para que independente do local de trabalho do pesquisador, ele possa realizar a colheita e armazenamento de amostras viáveis.

Nesse sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas pelo grupo Reprocon para a aplicação da reprodução assistida em animais silvestres a campo, como a coleta e criopreservação de sêmen de onças-pintadas de vida livre (ARAUJO et al., 2018). Em relação a formação de biobancos de células somáticas, Praxedes et al (2019) aprimorou o protocolo de vitrificação em superfície sólida de tecido de onças-pintadas em cativeiro, mas ainda assim, é necessário adequar para as situações de campo, permitindo a viabilidade do material biológico para usos futuros.

Por este motivo o presente trabalho visa aprimorar técnicas de criopreservação de células somáticas após cultivo celular, assim como desenvolver um método que permita o aproveitamento de tecidos para cultivo celular de onças-pintadas encontradas mortas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A ONÇA-PINTADA

A onça-pintada (*Panthera onca*), é um mamífero da ordem Carnívora, pertencente à família Felidae. É considerada a maior espécie de felino do continente americano e o único representante do gênero *Panthera* (que inclui leões, leopardos e tigres). São animais que possuem comprimento variável, de 1,10 a 2,14 metros, pesando entre 35 e 148 kg, sendo a fêmea menor que o macho. Seu padrão de pelagem apresenta coloração amarelada com rosetas pretas e ventre esbranquiçado, sendo a mais comum, ou enegrecida com rosetas não tão

evidentes. Possuem hábitos solitários e sua área de vida é variável com o ambiente em que vivem, oferta alimentar e impactos humanos (ICMBio, 2010).

Sua área de distribuição vai desde o sul dos Estados Unidos ao centro-oeste da América do Sul (Colômbia e Equador), leste do Peru e Bolívia (leste dos Andes), todo o Paraguai e quase todos os biomas brasileiros com exceção do Pampa (ICMBio, 2010, 2018). Embora seja classificada como “Quase Ameaçada” (QUIGLEY et al., 2017) em relação ao risco global de extinção, a onça-pintada é considerada “Vulnerável” no Brasil. O declínio populacional que a espécie vem sofrendo é em decorrência aos fatores antrópicos, inclusos a caça de indivíduos, fragmentação do seu habitat e até mortes por colisões veiculares (MORATO et al., 2014). Estima-se que nos próximos 27 anos, a população desta espécie decline em ao menos 30% (ICMBio, 2018).

Por ser um predador topo de cadeia, é considerada espécie chave e de ótimo indicador na qualidade do ambiente (PORFIRIO, 2019). Em vista do seu declínio populacional, a busca por estratégias que possam promover a conservação das onças-pintadas engloba ações *in situ* e *ex situ* cujo objetivo central é a manutenção de populações geneticamente viáveis (PORFIRIO, 2019; PRAXEDES, 2019; PIZZUTTO et al., 2021; LUCZINSKI et al., 2023). Dentre elas, com o uso das tecnologias de reprodução assistida, é possível a recuperação e preservação de material genético, favorecendo o intercâmbio gênico entre indivíduos (PIZZUTTO et al., 2021; ARAUJO et al., 2021).

Atualmente, diversos grupos têm realizados estudos para conservação de material genético provenientes da onça-pintada. Em 2023(a), Jorge-Neto et al relatam o uso de diferentes crioprotetores e temperaturas de descongelamento para preservação de sêmen, sendo esse material altamente utilizado para procedimentos *in vivo* e *in vitro* (ARAUJO et al., 2020; Silva et al., 2020; SANTOS et al., 2022). Também são relatadas estratégias de estimulação hormonal para obtenção de oócitos através do uso da laparoscopia (JORGE-NETO et al., 2023b), e até mesmo o uso de folículos pré-antrais (CAMPOS et al., 2019). No caso dos tecidos de onças-pintadas, o primeiro relato foi em 2016 por Mestre-Citrinovitz, e, a partir de então, outros relatos foram surgindo comparando as formas de criopreservação tecidual (PRAXEDES et al., 2019) e a comparação do efeito de

diversos crioprotetores para células somáticas desses animais (ARANTES et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021).

2.2. BIOBANCOS E CRIOPRESERVAÇÃO PARA CÉLULAS SOMÁTICAS

A biologia reprodutiva é conhecida para menos de 0,3% das espécies de vertebrados do mundo. O estabelecimento desses dados faz-se necessário para colaborar com a conservação animal, otimizando e melhorando os manejos genéticos de espécies ameaçadas *in situ* e *ex situ*, além de ajudar nos avanços das tecnologias de reprodução assistida. Seguindo essa necessidade, estabelecer e colocar em prática o uso de bancos de recursos genéticos gera oportunidades para manter diversas amostras biológicas e proteger a diversidade genética existente (COMIZZOLI, 2015; COMIZZOLI & WILDT, 2017).

Bancos de germoplasma permitem o armazenamento de gametas, tecidos, sangue e células somáticas por tempo indeterminado, e, associados aos programas de manejo, permitem um intercâmbio entre esse material sem a necessidade de transportar o animal (ARAUJO et al., 2021; PIZZUTTO, COLBACHINI & JORGE-NETO, 2021). Apesar do êxito não ser total em animais de vida livre, já foi possível a conservação de tecidos, gametas e fibroblastos de onças-pintadas (MACHADO et al., 2016; ARAUJO et al., 2020; SILVA et al., 2020), incluindo de animais mortos (MACHADO et al., 2017; SANTOS et al., 2021).

Para que o desenvolvimento desses bancos seja possível, é necessário estabelecer protocolos adequados para cada espécie e/ou material utilizado, para que assim, não comprometa a viabilidade em decorrência do aumento ou diminuição de temperatura (SOBRINHO et al., 2020). Cada forma de criopreservação (lenta, rápida ou ultrarrápida) apresenta um mecanismo diferente que atua sobre a célula. Células que são congeladas de forma lenta o suficiente para perder água e desidratar, possuem os solutos concentrados em seu interior, impedindo a formação de gelo intracelular, porém, também precisam descongelar de forma lenta. No caso de células que são congeladas de forma rápida, a água intracelular não sai a tempo de estabelecer um equilíbrio, podendo levar a formação de cristais de gelo dentro da célula, gerando crioinjúrias. Para melhorar esses congelamentos, diminuindo os danos causados às células, são adicionados

agentes crioprotetores ao meio, afetando desde os transportes osmóticos até o crescimento de cristais de gelo (GAO & CRITSER, 2000).

Um dos primeiros crioprotetores a ser utilizado foi o glicerol, e, ao longo do tempo, foram surgindo outros que possuem ação extra ou intracelular, como o propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO), glucose, ribose, entre outros (FULLER, 2004). Atualmente, o DMSO vem sendo frequentemente utilizado para criopreservação de células em um âmbito geral por possuir baixo peso molecular, se ligando às moléculas de água do ambiente intracelular e, assim, reduzindo a formação de cristais de gelo (CETINKAYA et al. 2014, LEÓN-QUINTO et al. 2014). Somado ao uso deste crioprotetor, a forma tradicional para o congelamento das células foi através do congelamento lento, onde a taxa de resfriamento é de 1°C/min em tubos criogênicos armazenados em ultra freezer (-80°C) e transferidos para nitrogênio líquido (-196°C).

No caso dos tecidos, sendo fonte de células para várias aplicações (MACHADO et al., 2016), é necessário protocolos específicos e a delineação de agentes crioprotetores para cada tipo tecidual (cartilaginoso, ósseo, nervoso etc.), a fim de manter a viabilidade (BAKHACH, 2009). Em estudos anteriores, já foi apresentado o congelamento lento, na qual o tecido era armazenado em tubos criogênicos contendo solução de criopreservação (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016); e a vitrificação em superfície sólida, sendo o tecido colocado em solução de criopreservação e depois transferido para uma superfície metálica sob nitrogênio líquido (PRAXEDES et al., 2019; MARTINS et al., 2020). Praxedes et al (2019) apresentou, para a criopreservação de tecido de onças-pintadas, a vitrificação em superfície sólida como técnica mais eficiente e que, além de prático e rápido, possui baixo custo e pode ser realizada em vários ambientes. Somado a isto, Santos et al (2021), pontuaram que os locais mais adequados para conservação de tecidos somáticos são provenientes da região caudal e auricular de onças-pintadas.

2.3. FIBROBLASTOS

Constituindo uma população celular heterogênea, os fibroblastos são células somáticas de tecido conjuntivo que desempenham diversas funções no organismo (SORRELL & CAPLAN, 2009). Contribuindo não só com o espaço extracelular pela abundância de matriz extracelular (MEC), essas células também atuam em danos

teciduais, sinalizam, e servem como progenitoras para células mesenquimais especializadas (PLIKUS et al., 2021).

Como não possuem esqueleto interno, sua forma varia com o substrato em que a célula se adere. Ao começarem a se soltar do tecido, costumam apresentar formato esférico, aderindo-se posteriormente. A aderência em locais rígidos e a busca por células vizinhas levam a projeções côncavas de forma delimitada, mostrando a tensão celular sob o substrato. Já em locais não rígidos, como ágar, o formato do fibroblasto se apresentará cilíndrico, com estreitamento nos bordos (ABERCROMBIE, 1978).

Com propriedades semelhantes e respondendo, muitas vezes, às mesmas vias de transdução, cada tecido apresenta funções e linhagens específicas de fibroblastos que vão sustentar a necessidade de desenvolvimento e reparação de determinados órgãos (PLIKUS et al., 2021). Um exemplo disso é a pele, que, embora apresente uma estrutura básica que se mantém por vários locais do corpo, há variações de seus componentes e camadas (SANTOS et al., 2021).

Através dos avanços nos cultivos celulares pela descoberta de substâncias que regulam e suplementam os meios, tornou-se possível manter células somáticas cultivadas *in vitro*, e, a partir das replicações ou passagens dessas células, obtêm-se linhagens celulares mais uniformes. Apesar de favorável às condições para essa replicação *in vitro*, há um período em que a proliferação diminui e para, chamado de senescência celular (LIMA-NETO, 2017).

Sendo desencadeada por fatores intrínsecos e extrínsecos, acredita-se que estão relacionados desde alterações metabólicas, supressão tumoral, reparos teciduais, envelhecimento e distúrbios relacionados à idade. Ainda assim, sabe-se que a velocidade da senescência também depende dos fatores de crescimento presentes no meio de cultivo (VAN DEURSEN, 2014; LIMA-NETO, 2017; KUMARI & JAT, 2021).

No caso das espécies animais ameaçadas, o primeiro relato sobre colheita de tecido para cultivo de fibroblastos de onça-pintada foi realizado em 2016, por Mestre-Citrinovitz et al, realizado em território argentino. Logo após, outros estudos foram sendo realizados por Praxedes et al (2018, 2019, 2020), Arantes et al (2021), Oliveira et al (2021), Silva et al (2021) e Santos et al (2021), sendo ainda recentes para a espécie em questão. Estes estudos demonstraram que a melhor fonte para produção de fibroblastos na espécie é a cartilagem do tecido auricular, encontrando

um maior número de fibroblastos em relação as outras áreas, sendo uma região mais adequada para o cultivo de células e formação dos biobancos.

2.4. XENOTRANSPLANTE

O xenotransplante, xenoenxerto, ou transplante interespecies tem por sua definição o transplante de órgãos, tecidos ou células de uma espécie para outra. O interesse pelo seu uso aumentou na década de 70, servindo como substituto para tecidos humanos (GALVÃO & D'ALBUQUERQUE, 2020; SALLOUM et al., 2023).

Devido aos graus de diferenças interespecies, respostas envolvendo antígeno-anticorpo são comuns (GALVÃO & D'ALBUQUERQUE, 2020). A fim de minimizar as taxas de rejeição do material inserido, comumente tem sido utilizado modelos murinos geneticamente modificados para apresentarem imunossupressão, dentre eles, camundongos das linhagens Balb/c nu/nu, Scid, NOD-Scid e NSG, que levam a ausência ou deficiência da funcionalidade de linfócitos T, B ou NK (JUNG, SEOL & CHANG, 2017). Em outros casos, organismos modificados pelo uso da técnica de CRISPR/Cas9 apresentam animais, como porcos, com deleção em alguma proteína ou que não expressem algum gene. Exemplo disso são xenotransplantes entre homens e porcos, em que o homem, apresenta anticorpos contra o glicano alfaGal do porco levando a rejeição hiperaguda, e, através da modificação de um organismo, foi possível desenvolver órgãos em porcos transgênicos sem os antígenos alvos de rejeição, sendo aceitos pelo organismo do homem (FREIRE et al., 2021).

Para um material criopreservado, sabe-se que a criopreservação pode reduzir a resposta imunológica, levando a maiores possibilidades de xenotransplante (SASHA et al., 2021). Em 2012, Lu et al, demonstraram que através da congelação-descongelação de um tecido de bexiga de coelho, foi possível reduzir a imunogenicidade, enfraquecendo a rejeição imunitária do receptor para com o tecido do doador.

Apesar dos estudos envolvendo rejeições terem avançado, ainda é necessário estabelecer um sítio de enxertia adequado para cada tecido. Para tecidos ovarianos humanos congelados e descongelados, Dath et al (2010) compararam locais como a bolsa ovariana, cápsula renal, região intraperitoneal, intramuscular e subcutânea em camundongos nude, e, em curto prazo,

apresentaram resultados satisfatórios envolvendo o crescimento folicular, mas, ainda assim, é necessário o estabelecimento de mais pesquisas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M. Fibroblasts. **Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)**, v. 12, p. 1, 1978.

ARANTES, L. G., TONELLI, G. S., MARTINS, C. F., & BÃO, S. N. (2021). Cellular characterization and effects of cryoprotectant solutions on the viability of fibroblasts from three Brazilian wild cats. **Biopreservation and Biobanking**, 19(1), 11-18.

ARAUJO, G. R.; DECO-SOUZA, T.; BERGO, L. C. F.; SILVA, L. C.; MORATO, R. G.; JORGE-NETO, P. N.; SILVA, M. C. C.; MACEDO, G. G.; PAULA, T. A. R. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. **Journal of Threatened Taxa**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 15557–15564, 2020. DOI: 10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564.

ARAUJO, G. R., JORGE-NETO, P. N., CSERMAK-JR, A. C., PIZZUTTO, C. S., LUCZINSKI, T. C., & DE DECO-SOUZA, T. (2021). Avanços na andrologia de grandes felinos neotropicais. **Rev Bras Reprod Anim**, 45(4), 219-228.

ARAUJO, G. R.; PAULA, T. A. R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R. G.; BERGO, L. C. F.; SILVA, L. C.; COSTA, D. S.; BRAUD, C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 195, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.12.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>.

BAKHACH, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, 5(3), 119-126.

415 CAMPOS, L. B., PRAXEDES, E. C., SARAIVA, M. V., COMIZZOLI, P., & SILVA, A.
 416 R. (2019). Advances and challenges of using ovarian preantral follicles to develop
 417 biobanks of wild mammals. **Biopreservation and Biobanking**, 17(4), 334-341.

418 CETINKAYA, G., & ARAT, S. (2011). Cryopreservation of cartilage cell and tissue
 419 for biobanking. **Cryobiology**, 63(3), 292-297.

420 COMIZZOLI, P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility
 421 preservation for rare and endangered species. **Asian journal of andrology**, 17(4),
 422 640.

423 COMIZZOLI, P., & WILDT, D. E. (2017). Cryobanking biomaterials from wild animal
 424 species to conserve genes and biodiversity: relevance to human biobanking and
 425 biomedical research. **Biobanking of human biospecimens: Principles and**
 426 **practice**, 217-235.

427 COSTA, C. A. S.; BORGES, A. A.; NASCIMENTO, M. B.; AQUINO, L. V. C.; SILVA,
 428 A. R.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F. Effects of Vitrification Techniques on the
 429 Somatic Tissue Preservation of Agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758).
 430 **Biopreservation and Biobanking**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 165–170, 2020. DOI:
 431 10.1089/bio.2019.0109.

432 DATH, C., VAN EYCK, A. S., DOLMANS, M. M., ROMEU, L., DELLE VIGNE, L.,
 433 DONNEZ, J., & VAN LANGENDONCKT, A. (2010). Xenotransplantation of human
 434 ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. **Human**
 435 **reproduction**, 25(7), 1734-1743.

436 FRANCO, J. L. D. A., & SILVA, L. G. (2020). History, science and conservation of
 437 jaguars in Brazilian biomes. **Estudos Ibero-Americanos**, 46(1), 33911.
 438 <https://doi.org/10.15448/1980-864X.2020.1.33911>

439 FRANKLIN, I. R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain
 440 evolutionary potential? **Animal Conservation**, 1998. DOI: 10.1111/j.1469-
 441 1795.1998.tb00228.x.

442 FULLER, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in
443 the frozen state. **CryoLetters**, 25(6), 375-388.

444 FREIRE, I. F., RUSSO, B. V., VILAR, M. P. DE A., FILHO, A. S. A. B., & SILVA, S.
445 F. R. DA . (2021). O xenotransplante como possibilidade de mitigar a fila de espera
446 para transplante de órgãos sólidos: uma revisão literária. **Revista Multidisciplinar**
447 **Em Saúde**, 2(4), 204. <https://doi.org/10.51161/remms/2970>.

448 GALVÃO, F. H. F.; D'ALBUQUERQUE, L. A. C.. Xenotransplante. **Revista de**
449 **Medicina**, v. 99, n. 1, p. v-ix, 2020.

450 GAO, D., & CRITSER, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR**
451 **journal**, 41(4), 187-196.

452 HAAG T., SANTOS A.S., SANA, D.A., MORATO, R.G., CULLEN, L. Jr, et al. (2010)
453 The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss
454 of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest
455 jaguars (*Panthera onca*). **Mol Ecol** 19: 4906–4921.

456 ICMBio. (2018). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro**
457 **Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**.

458 ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Sumário**
459 **executivo do plano de ação nacional para a conservação da onça-pintada**.
460 Atibaia: Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros
461 (CENAP), 8p; 2010. Disponível em <[https://www.gov.br/icmbio/pt-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-onca-pintada/1-ciclo/pan-onca-pintada-sumario.pdf)
462 [br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-onca-pintada/1-ciclo/pan-onca-pintada-](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-onca-pintada/1-ciclo/pan-onca-pintada-sumario.pdf)
463 [sumario.pdf](https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-onca-pintada/1-ciclo/pan-onca-pintada-sumario.pdf)> Acesso em 17 de julho de 2023.

464 JOHNSON, S., NGUYEN, V., & CODER, D. (2013). Assessment of cell viability.
465 **Current protocols in cytometry**, 64(1), 9-2.

466 aJORGE-NETO, P. N., LUCZINSKI, T. C., ARAÚJO, G. R. D., REQUENA, L. A.,
467 JESUS, R. S. D., SOUZA, L. S. B., ... & PIZZUTTO, C. S. (2023). Cryopreservation
468 of jaguar (*Panthera onca*) sperm cells using different cryoprotectants and different
469 thawing temperatures. **Animal Reproduction**, 20, e20230009.

470 bJORGE-NETO, P. N., REQUENA, L. A., DE ARAÚJO, G. R., DE SOUZA TRALDI,
 471 A., LUCZINSKI, T. C., DE DECO-SOUZA, T., ... & BALDASSARRE, H. (2023).
 472 Efficient recovery of in vivo mature and immature oocytes from jaguars (*Panthera*
 473 *onca*) and pumas (*Puma concolor*) by Laparoscopic Ovum Pick-Up
 474 (LOPU). **Theriogenology Wild**, 100042.

475 JUNG, J.; SEOL, H. S.; CHANG, S. The generation and application of patient-
 476 derived xenograft model for cancer research. **Cancer research and treatment:**
 477 **official journal of Korean Cancer Association**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2018.

478 KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and
 479 senescence associated secretory phenotype. **Frontiers in cell and developmental**
 480 **biology**, v. 9, p. 645593, 2021.

481 LEÓN-QUINTO, T., SIMÓN, M. A., CADENAS, R., MARTÍNEZ, Á., & SERNA, A.
 482 (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from
 483 an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, 68(2), 227-
 484 233.

485 LU, Y., LI, B., WANG, X., ZHENG, J., PU, J., DING, Q., ... CHEN, L. (2012). The
 486 effect of programmed cryopreservation on immunogenicity of bladder mucosa in
 487 New Zealand rabbits. **Cryobiology**, 64(1), 27–32.
 488 doi:10.1016/j.cryobiol.2011.11.002

489 LUCZINSKI, T. C., JORGE-NETO, P. N., RIBEIRO, R. M., DE JESUS, R. S.,
 490 PIZZUTTO, C. S., DE DECO-SOUZA, T., ... & MORATO, R. G. (2023). One
 491 conservation concept in practice. **Theriogenology Wild**, 2, 100024.

492 MACHADO, L. C., OLIVEIRA, V. C., PARAVENTI, M. D., CARDOSO, R. N.,
 493 MARTINS, D. S., & AMBRÓSIO, C. E. (2016). Manutenção da Biodiversidade
 494 Brasileira através de bancos de germoplasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,
 495 36, 62-66.

496 MACHADO, L. C., ROBALLO, K. C. S., CURY, F. S., & AMBRÓSIO, C. E. (2017).
 497 Female reproductive system morphology of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and

498 cryopreservation of genetic material for animal germplasm bank enrichment.
 499 **Anatomia, histologia, embryologia**, 46(6), 539-546.

500 MARTINS, J. C. J.; PRAXEDES, E. A.; NASCIMENTO, M. B. do; AQUINO, L. V. C.;
 501 ALVES, N. D.; OLIVEIRA, M. F. de; PEREIRA, A. F. Comparative study of
 502 cryopreservation techniques in somatic tissue of *Felis silvestris catus*. **Research,**
 503 **Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e969986686, 2020. DOI:
 504 10.33448/rsd-v9i8.6686.

505 MASTROMONACO, G. F.; SONGSASEN, N. **Reproductive technologies for the**
 506 **conservation of wildlife and endangered species**. [s.l.] : INC, 2020. v. 2 DOI:
 507 10.1016/b978-0-12-817107-3.00007-2. Disponível em:
 508 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00007-2>.

509 MESTRE-CITRINOVITZ, A. C.; SESTELO, A. J.; CEBALLOS, M. B.; BARAÑAO, J.
 510 L.; SARAGÜETA, P.. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: The
 511 *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Current**
 512 **Protocols in Molecular Biology**, [S. l.], v. 2016, n. October, p. 1–14, 2016. DOI:
 513 10.1002/cpmb.25.

514 MORAIS, G. B., VIANA, D. A., SILVA, F. M. O., XAVIER JÚNIOR, F. A. F., FARIAS,
 515 K. M., PESSOAS, D. D. O., EVANGELISTA, J. S. A. M. (2017). Polarization
 516 microscopy as a tool for quantitative evaluation of collagen using pi- crosirius red in
 517 different stages of CKD in cats. **Microscopy Research and Technique**, 80, 543–
 518 550. <https://doi.org/10.1002/jemt.22830>

519 MORATO, R. G., FERRAZ, K. M. P. M. de B., DE PAULA, R. C., & CAMPOS, C. B.
 520 de. (2014). Identification of Priority Conservation Areas and Potential Corridors for
 521 Jaguars in the Caatinga Biome, Brazil. **PLoS ONE**, 9(4), e92950.
 522 doi:10.1371/journal.pone.0092950

523 MORATO RG, BEISIEGEL BM, RAMALHO EE, CAMPOS CB, BOULHOSA RLP
 524 (2013) Avaliação de risco de extinção de onça-pintada *Panthera onca* (Linnaeus,
 525 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira** 1: 122–132.

526 NASSAR, P. M., RAMALHO, E. E., & DA SILVEIRA, R. (2013). Economic and
 527 market viability of scientific ecotourism related to the jaguar in a várzea area in
 528 central Amazonia. **Scientific Magazine UAKARI**, 9(2), 21-32.

529 OLIVEIRA, L. R. D., PRAXEDES, E. A., SILVA, M. B., RIBEIRO, L. R., SILVA, H.
 530 V., & PEREIRA, A. F. (2021). **Comparative effect of cryoprotectant**
 531 **combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar,**
 532 **Panthera onca, towards the formation of biologic banks.** Anais da Academia
 533 Brasileira de Ciências, 93.

534 PIZZUTTO, C. S., ARAÚJO, G. R., CSERMAK-JR, A. C., JORGE-NETO, P. N.,
 535 LUCZINSKI, T. C., & DE DECO-SOUZA, T. (2021). Uma visão integrada das
 536 biotecnologias reprodutivas com o conceito de One Conservation. **Rev Bras**
 537 **Reprod Anim**, 45(4), 241-245.

538 PIZZUTTO, C. S., COLBACHINI, H., & JORGE-NETO, P. N. (2021). One
 539 Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. **Animal**
 540 **Reproduction**, 18.

541 PLIKUS, M. V., WANG, X., SINHA, S., FORTE, E., THOMPSON, S. M., HERZOG,
 542 E. L., ... & HORSLEY, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in
 543 health and disease. **Cell**, 184(15), 3852-3872.

544 PRAXEDES, É. A., BORGES, A. A., SANTOS, M. V., & PEREIRA, A. F. (2018).
 545 Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo biology**, 37(4), 258-
 546 263.

547 PRAXEDES, EA.; QUEIROZ NETA, LB.; BORGES, AA.; SILVA, MB.; SANTOS,
 548 M.V.O.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V. R.; PEREIRA, A.F. Quantitative and descriptive
 549 histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step
 550 towards formation of biobanks. **Journal of Veterinary Medicine Series C:**
 551 **Anatomia Histologia Embryologia**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 121–129, 2020. DOI:
 552 10.1111/ahe.12500.

553 PRAXEDES, E. A., OLIVEIRA, L. R. M., SILVA, M. B., BORGES, A. A., SANTOS,
 554 M. V. O., SILVA, H. R., OLIVEIRA, M. F., SILVA, A. R., & PEREIRA, A. F. (2019).

555 Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin—An
 556 alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758).
 557 **Cryobiology**, 88, 15–22

558 PEREIRA, A. F., BORGES, A. A., PRAXEDES, E. A., & SILVA, A. R. (2018). Use
 559 of somatic banks for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals
 560 – A review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 42, 104–108.

561 PRENTICE, J. R., & ANZAR, M. (2011). Cryopreservation of Mammalian Oocyte for
 562 Conservation of Animal Genetics. **Veterinary Medicine International**, 2011, 1–11.
 563 <https://doi.org/10.4061/2011/146405>

564 QUEIROZ NETA, L. B., LIRA, G. P. O., BORGES, A. A., SANTOS, M. V. O., SILVA,
 565 M. B., OLIVEIRA, L. R. M., PEREIRA, A. F. (2018). Influence of storage time and
 566 nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from re-frigerated collared
 567 peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **Vitro Cellular & Developmental**
 568 **Biology-Animal**, 54, 486–495. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0270-6>

569 QUIGLEY, H., FOSTER, R. J., PETRACCA, L., PAYAN, E., SALOM, R., &
 570 HARMSSEN, B. J. (2017). **Panthera onca**. The IUCN Red List of Threatened
 571 Species, 8235, 8. [http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T20010A22247615.en)
 572 [3.RLTS.T20010A22247615.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T20010A22247615.en)

573 RODRÍGUEZ-SOTO, C.; MONROY-VILCHIS, O.; ZARCO-GONZÁLEZ, M.M.
 574 Corridors for jaguar (*Panthera onca*) in Mexico: conservation strategies. **Journal for**
 575 **Nature Conservation**, v. 21, n. 6, p. 438-443, 2013.

576 SALLOUM, A., BAZZI, N., SQUIRES, S., CHU, T., BENEDETTO, P., &
 577 BENEDETTO, A. (2023). Comparing the application of various engineered
 578 xenografts for skin defects: A systematic review. **Journal of Cosmetic**
 579 **Dermatology**, 22(3), 921-931.

580 SANTOS, M. D., AQUINO, L. V., NASCIMENTO, M. B., SILVA, M. B.,
 581 RODRIGUES, L. L., PRAXEDES, E. A., ... & PEREIRA, A. F. (2021). Evaluation of
 582 different skin regions derived from a postmortem jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus,

1758), after vitrification for development of cryobanks from captive animals. **Zoo**
Biology, 40(4), 280-287.

SANTOS, M. V. D. O., SILVA, H. V. R., BEZERRA, L. G. P., OLIVEIRA, L. R. M. D.,
 OLIVEIRA, M. F. D., ALVES, N. D., ... & PEREIRA, A. F. (2022). Heterologous in
 vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca*
 Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. **Animal**
Reproduction, 19, e20210093.

SHASHA, L.; ZHONGJIE, L.; LINGLING, F., USTICHENKO, V. D., PAKHOMOV, O.
 V., & DENG, B. (2021). Comparison between slow and rapid freezing for adrenal
 gland cryopreservation and xenotransplantation. **Cryobiology**.
 doi:10.1016/j.cryobiol.2021.07.011

SILVA, H.V.R; NUNES, T.G.P; BRITO, B.F; CAMPOS, L.B; SILVA, A.M; SILVA,
 A.R; COMIZZOLI, P.; SILVA, L.D.M.D. Influence of diferente extenders on
 morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar
 (*Panthera onca*). **Cryobiology**. 2020; 92:53-61.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.195>. PMID: 31704199

SILVA, A. M. D., PEREIRA, A. F., COMIZZOLI, P., & SILVA, A. R. (2020).
 Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity
 preservation. **Biopreservation and Biobanking**, 18(3), 235-243.

SILVA, M. B., PRAXEDES, É. A., BORGES, A. A., OLIVEIRA, L. R., NASCIMENTO,
 M. B., SILVA, H. V., ... & PEREIRA, A. F. (2021). Evaluation of the damage caused
 by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars:
 An approach to conservation through biobanks. **Zoo Biology**, 40(4), 288-296.

SOBRINHO, C.M.F., KNACKFUSS, F.B., SOUZA, P.C.S., TORRES, T.M.,
 RAMOS, A.A., DIAS, L.P.B., FERREIRA, J.B.P., & PIRES, I.M.F. (2020). Avaliação
 da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da linhagem B6D2F1,
 pertencentes ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB/Fiocruz-
 RJ. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72(3), 711–718.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-10935>

- 612 SORRELL, J. M., & CAPLAN, A. I. (2009). Fibroblasts—a diverse population at the
613 center of it all. **International review of cell and molecular biology**, 276, 161-214.
- 614 TORTATO, F.R.; IZZO, T.J. Advances and barriers to the development of jaguar-
615 tourism in the Brazilian Pantanal. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v.
616 15, n. 1, p. 61-63, 2017.
- 617 TORTATO, F. R., IZZO, T. J., HOOGESTEIJN, R., & PERES, C. A. (2017). The
618 numbers of the beast: Valuation of jaguar (*Panthera onca*) tourism and cattle
619 depredation in the Brazilian Pantanal. **Global Ecology and Conservation**, 11,
620 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2017.05.003>
- 621 VAN DEURSEN, J.M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501,
622 p. 439-446, 2014.

4. ARTIGO I - “AVALIAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO PELO CONGELAMENTO LENTO E CONGELAMENTO RÁPIDO NA VIABILIDADE DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE ONÇAS-PINTADAS”

4.1. INTRODUÇÃO

A onça-pintada, um dos maiores felídeos silvestres do mundo, vem apresentando quedas populacionais em decorrência da caça, fragmentação ambiental e mortes por colisões veiculares, levando ao isolamento das populações e redução na sua variabilidade genética (MORATO et al., 2013, 2014; PORFIRIO, 2019). Com a finalidade de minimizar essas perdas, estão sendo adotadas estratégias de reprodução assistida, como a inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões, e até o cultivo de células somáticas, somado a criação de bancos genéticos (ARAUJO et al., 2018; MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020). Através do desenvolvimento desses dos biobancos, é possível o armazenamento de diversos tecidos e células por tempo ilimitado, e, de um grande número de indivíduos e espécies diferentes.

As células somáticas como fontes genéticas para biobancos possuem a vantagem de serem facilmente coletadas e transportadas, além de poderem ser recuperadas independente da idade, sexo e procedência do animal, inclusive podendo ser recuperada post-mortem. Mas, para que isso seja possível, é necessário estabelecer protocolos que permitam a viabilidade do material após a descongelação e que também otimizam espaço para o armazenamento (URIO, 2012; PRAXEDES et al., 2018). Em onças-pintadas a criopreservação de células semelhantes a fibroblastos apresenta eficiência média de 70% usando o resfriamento com álcool isopropílico, em que as células são armazenadas em tubos criogênicos e submetidas a uma curva lenta de congelamento (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016; ARANTES et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021). No entanto, esta técnica demanda um ultra freezer para o congelamento, além de usar um recipiente de armazenamento volumoso. Com isso, esse trabalho tem como objetivo avaliar se a congelação rápida em vapor de nitrogênio líquido, em palhetas

de 0,25mL, é uma alternativa para criopreservação de células somáticas de onças-pintadas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho possui autorização do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade - ICMBio (autorização SISBIO nº 75762-1), da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMS) nº 1.278/2023 e registro SISGEN (A1CEAD0).

Todos os reagentes e meios foram obtidos através da Sigma-Aldrich e Gibco, exceto os citados no texto.

4.2.1. Animais

Para esse experimento, foram utilizadas cinco onças-pintadas (*Panthera onca*) provenientes do criadouro científico brasileiro Instituto Onça-Pintada (Mineiros, Goiás) (Tabela 1). Os animais foram sedados por combinação anestésica de cetamina (5 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands, SP, Brasil) e medetomidina (0,1 mg/kg, Precision Pharmacy, CA, EUA), via intramuscular, através da injeção de dardos anestésicos por rifle específico ou zarabatana. A anestesia foi revertida com ioimbina (0,4mg/kg, Reset®, Botupharma, SP, Brasil) após a finalização da colheita de material biológico (ARAUJO et al., 2020).

Tabela 1. Dados de sexo, bioma, idade e condição dos animais utilizados no experimento.

ANIMAL	SEXO	BIOMA	IDADE	CONDIÇÃO
Ponca1	Macho	Amazônico	Adulto	CAT
Ponca2	Fêmea	Amazônico	Adulto	CAT
Ponca3	Fêmea	Amazônico	Adulto	CAT
Ponca4	Fêmea	Cerrado	Adulto	CAT
Ponca5	Macho	Cerrado	Adulto	CAT

* CAT – sob cuidados humanos

4.2.2. Colheita e armazenamento de amostras

Um fragmento de orelha (2cm²), da região marginal cutânea, de cada animal foi colhido, utilizando material cirúrgico estéril. Para isso, foi realizada tricotomia e antisepsia com álcool 70% e clorexidina degermante. Após o procedimento, as bordas foram unidas por cola cirúrgica e utilizado fármaco tópico com ação larvicida e repelente.

As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos contendo Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5% de solução de antibiótico-antimicótico (atb) (protocolo de PRAXEDES et al., 2019, modificado de 10 para 15% de SFB, e de 2 para 5% de antibiótico-antimicótico para melhor nutrição das células e evitar possíveis contaminações), transportado até o laboratório em geladeira portátil (TED Equipamentos) a 4°C por até 24 horas.

4.2.3. Manipulação das amostras, cultivo primário e subculturas

No laboratório, os fragmentos de tecido auricular foram tricotomizados novamente para retirar as sobras de pelo. Foram lavados em álcool 70% por um minuto e mais duas vezes com meio (DMEM + 15% SFB + 5% atb). Após isso, a pele foi removida para evitar contaminações no cultivo e o tecido cartilaginoso foi lavado mais uma vez com meio (DMEM + 15% SFB + 2% atb), fatiado em fragmentos menores de 0,5x0,5cm, já que os fibroblastos se apresentam na região de pericôndrio, e levado para cultivo em placa de seis poços contendo 1ml de meio (DMEM + 15% SFB + 2% atb) a 38,5°C e 6% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 24 horas e as células tripsinizadas quando atingiram confluência de 80%, sendo utilizadas para novas subculturas em outras placas.

4.2.4. Criopreservação e descongelação

Na terceira passagem das células e confluência entre 70 a 80%, foi realizada a criopreservação seguindo duas curvas de congelamento: congelamento lento e congelamento rápido.

Para isso, após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas em PBS, adicionado tripsina para desagregação e incubadas por cinco minutos. A inativação da tripsina se deu pelo acréscimo de meio de cultivo após todas as células se soltarem do fundo da placa. A suspensão celular foi colocada em tubo falcon e centrifugada a 400 g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas. Foi realizada a concentração em câmara de Neubauer e ajustada para que cada tratamento recebesse 1x10⁶ células/ml. Todos os tratamentos receberam meio crioprotetor contendo 10% de DMSO + meio de cultivo, sendo colocado na proporção 1:1, segundo Karima (2019).

4.2.4.1. Congelamento lento

Após ajuste da concentração, 1ml da suspensão celular contendo meio de criopreservação foi colocado em tubos criogênicos. Esses tubos foram armazenados no equipamento Mr. Frosty (Thermo Scientific Nalgene, Rochester, NY, EUA) e transferido para o ultrafreezer (-80°C), com curva de congelamento de 1°C por minuto, durante 24 horas, sendo então transferidos para o botijão de nitrogênio a -196°C.

Para o descongelamento, os criotubos foram mantidos durante um minuto à temperatura ambiente e imersos em banho maria à 37°C durante quatro minutos. O conteúdo foi colocado em tubo falcon contendo meio de cultivo e levado para centrífuga para remoção do crioprotetor. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado com 1ml de meio de cultivo. Uma alíquota foi retirada para análise de viabilidade, o restante foi colocado em placa de Petri e levado para a incubadora.

4.2.4.2. Congelamento rápido

A suspensão celular na concentração pré-estabelecida e já com o crioprotetor foi homogeneizada e aspirada em palhetas de 0,25ml com auxílio de uma seringa de insulina adaptada. As células foram mantidas na parte central da palheta, entre colunas de ar. As palhetas foram seladas e transferidas para um refrigerador por 30 minutos. Após esse tempo, foram submetidas ao vapor de nitrogênio, 4cm acima do nitrogênio líquido, durante cinco minutos, sendo, posteriormente, submersas no nitrogênio. Para armazenamento, foram transferidas para botijões de nitrogênio líquido a -196°C (LIPOSKI et al., 2019).

Para a descongelação, as palhetas foram retiradas dos botijões e mergulhadas em banho maria a 36°C por 20 segundos. As extremidades foram cortadas e o meio contendo as células foi depositado em tubos de centrífugas contendo 1ml de meio de cultivo. O conteúdo foi levado à centrífuga a 400 g por cinco minutos para remoção do meio crioprotetor. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado. Uma alíquota foi retirada para análise de viabilidade e o restante colocado em placa de Petri, sendo levado para cultivo.

4.2.5. Análise da viabilidade

Para análise da viabilidade celular, foram utilizados o corante azul de tripano e as sondas fluorescentes laranja de acridina, iodeto de Propídio (PI) e Hoechst

33342. A análise foi realizada antes da criopreservação das células, após descongelação e após confluência.

4.2.5.1. Azul de tripano

Em um tubo de fundo cônico, foram colocados 20µl da suspensão celular e 20µl de azul de tripano a 0,4%. As células foram contadas em câmara de Neubauer e consideradas viáveis quando não apresentavam a coloração azul. A porcentagem da viabilidade foi calculada dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas, segundo Strober (1997).

4.2.5.2. Teste de Necrose e Apoptose

Em um tubo de fundo cônico escuro, foram colocados 20µl da suspensão celular, 20µl do corante laranja de Acridina (100 µg/ml) e 4µl de Iodeto de Propídio - PI (2 mg/ml). Logo após, uma alíquota desse conteúdo foi colocada sobre uma lâmina e coberta por uma lamínula, sendo analisada em microscópio invertido de fluorescência (Nikon). Um total de 100 células foi contabilizado, sendo separados em apoptóticas (alguma marcação em laranja), necróticas (núcleo marcado em vermelho) e viáveis (núcleo verde uniforme).

4.2.5.3. Citometria de fluxo

A análise de viabilidade com Hoechst 33342 foi realizada em citômetro de fluxo (CytoFLEX, Beckman Coulter). Para isso, 40µl da suspensão celular foi incubada por 15 minutos com 20µl de Hoechst 33342 (40 µg/ml) e 4 µl de PI (2 mg/ml). A porcentagem viável foi considerada através do (PI -).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável de viabilidade foi testada quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, tendo sido transformada para ARSN x/100 para ser submetida à análise de variância considerando os efeitos de tratamento, momento (fresco, descongelado e confluência) e a interação tratamento*momento na primeira parte, já para a segunda análise, foi considerado o tratamento (congelamento lento e rápido) e corante (azul de tripano, laranja de acridina e citometria) e a interação tratamento*corante. As médias foram comparadas pelo teste de t quando pertinente, e as médias foram ajustadas da interação pelo teste de Tukey considerando como diferenças significativas valores $p < 0,05$, sendo utilizado o software SAS. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão.

4.4. RESULTADOS

De acordo com os resultados encontrados, apesar de haver uma queda na integridade de membrana das células somáticas logo após o descongelamento, não há diferença ($p>0,05$) de integridade de membrana após passagem das células descongeladas em cultivo celular (análise após a confluência) em relação ao cultivo a fresco (Tabela 2). Mas, ao se comparar o momento (descongelação e confluência), diferenças são observadas para a integridade de membrana por azul de tripano. Comportamento semelhante foi observado na análise por coloração com laranja de acridina (Tabela 2).

Tabela 2. Integridade de membrana de células somáticas provenientes de onças-pintadas submetidos ao congelamento lento e ao congelamento rápido.

	FRESCO	Congelamento Lento		Congelamento Rápido	
		DESC	CONF	DESC	CONF
AT	98,24±0,3 ^a	86,7±3,7 ^b	99,2±0,5 ^a	83,8±4,5 ^b	99,6±0,1 ^a
LA	88,7±3,9 ^{a,b}	79,4±1,9 ^{b,c,d}	92,0±1,4 ^a	73,0±6,7 ^d	87,8±2,7 ^{a,c}
CIT	94,24±2,16 ^a	-	94,91±0,61 ^a	-	92,73±1,70 ^a

*Letras diferentes na mesma LINHA (a, b, c) indicam diferença ($p<0.05$)

*AT - azul de tripano, LA - laranja de acridina com Iodeto de Propídio em fluorescência (células coradas de verde), CIT - iodeto de propídio com Hoechst 33342 em citometria (apresentado dados para IP-), DESC - análise após o descongelamento, CONF - análise após a confluência

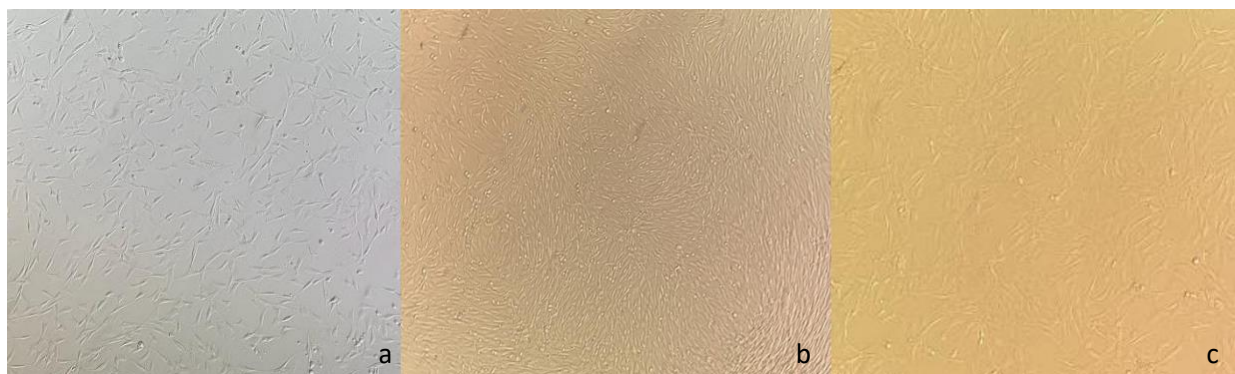


Figura 1. Células somáticas de onças-pintadas na confluência, sendo (a) fresco, (b) congelamento lento e (c) congelamento rápido. Magnitude: 100x. Fonte: Reprogen.

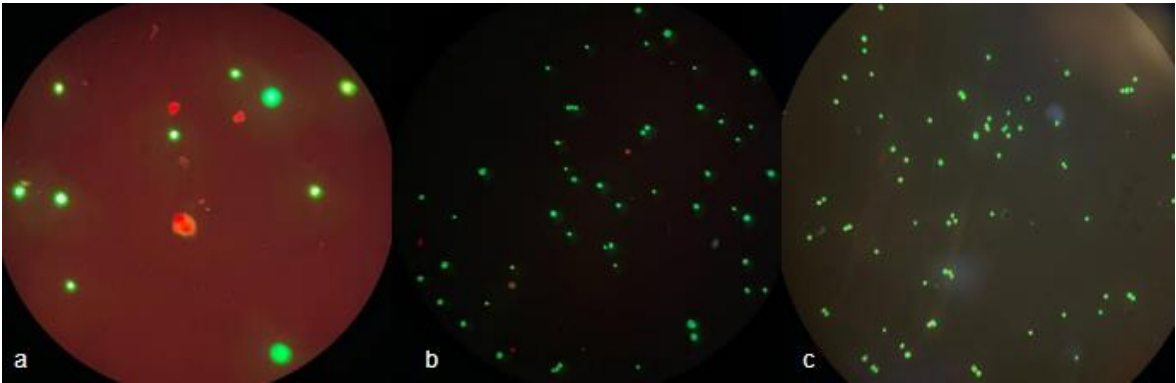
792

793 Ao comparar os diferentes métodos de análise celular observamos que a
794 coloração por azul de tripano detectou mais lesão de membrana ($p<0,05$) nas
795 células descongeladas em relação ao uso de sondas fluorescentes em citometria
796 de fluxo (Tabela 3). Por outro lado, os métodos de análise por sondas fluorescentes
797 (LA (Figura 2) e CIT (Figura 3)) apresentaram resultados semelhantes ($p>0,05$) nos
798 três tratamentos (Tabela 3).

799 **Tabela 3.** Análises de viabilidade celular e integridade de membrana com diferentes métodos de
800 coloração em células somáticas de onças-pintadas analisadas no momento da confluência.

Tratamento	Método de avaliação de viabilidade		
	LA	AT	CIT
Fresco	$88,72 \pm 3,87$ <i>b</i>	$98,24 \pm 0,35$ <i>a</i>	$94,24 \pm 2,16$ <i>a,b</i>
Congelamento lento	$92,00 \pm 1,38$ <i>a,b</i>	$86,76 \pm 3,68$ <i>b</i>	$94,91 \pm 0,61$ <i>a</i>
Congelamento rápido	$87,80 \pm 2,69$ <i>a,b</i>	$83,78 \pm 4,55$ <i>b</i>	$92,73 \pm 1,70$ <i>a</i>

801 *Letras diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferença ($p<0,05$)
802 *AT - azul de tripano, LA - laranja de acridina, CT - Iodeto de Propídio com Hoechst 33342 em
803 citometria (apresentado dados para IP-)
804



805 **Figura 2.** Células somáticas de onças-pintadas avaliadas pelo teste de apoptose e necrose
806 utilizando Laranja de Acridina com Iodeto de Propídio, sendo **(a)** fresco (magnitude de 200x), **(b)**
807 congelamento lento (magnitude 100x) e **(c)** congelamento rápido (magnitude 100x). Fonte:
808 Reprogen.
809

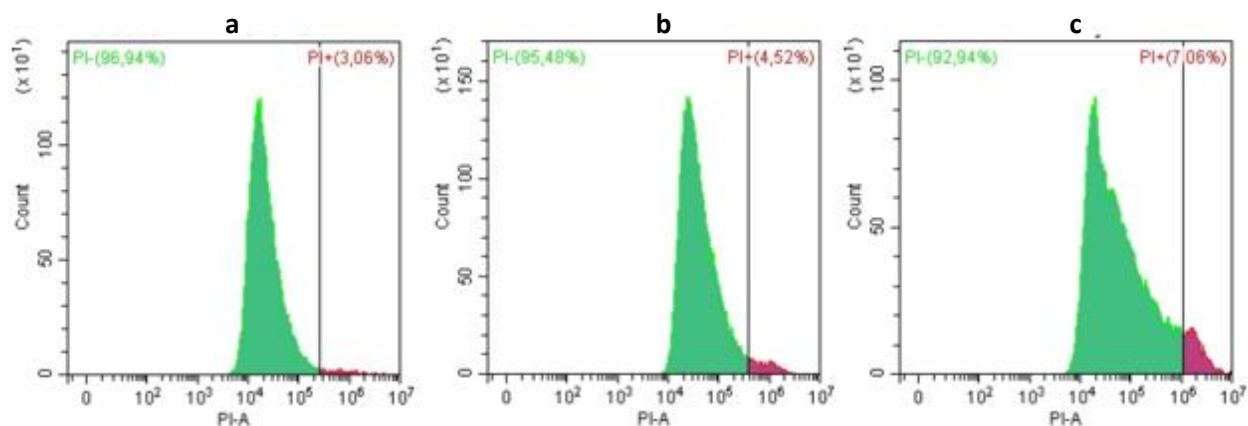


Figura 3. Células somáticas de onças-pintadas avaliadas pela citometria de fluxo com Hoechst33342 e Iodeto de Propídio, sendo **(a)** fresco, **(b)** congelamento lento e **(c)** congelamento rápido. Fonte: Reprogen.

4.5. DISCUSSÃO

Esse trabalho procurou identificar a melhor forma para criopreservar células oriundas de cartilagem auricular de onças-pintadas, buscando um método prático e eficaz. Tanto o método de congelamento lento (utilizando o equipamento Mr. Frosty, -1°C por minuto até -80°C) quanto o método de congelamento rápido (em Vapor de nitrogênio, -31°C/min), foram capazes de manter a integridade de membrana e viabilidade celular após o cultivo das células descongeladas. Apesar do congelamento lento ser o método tradicionalmente utilizado, com eficiência média de 70 a 80% de viabilidade pelo método com azul de tripano para onças-pintadas (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021), o processamento requer o acesso a um ultrafreezer para realizar o congelamento, além de demandar mais espaço para estocagem visto que armazena as células em tubos criogênicos. Mesmo assim, no presente trabalho a média de viabilidade pelos métodos laranja de acridina, azul de tripano e citometria, no congelamento rápido, foram de $87,80 \pm 2,69$, $83,78 \pm 4,55$ e $92,73 \pm 1,70$, sendo superior ao descrito na literatura (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016; ARANTES et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021).

Além disso, o congelamento em vapor de nitrogênio líquido apresenta como principal vantagem a possibilidade de estocagem em palhetas de 0,5 ou 0,25ml, otimizando o espaço em botijões de nitrogênio líquido, assim como já descrito para bovinos (CETINKAYA & ARAT, 2011; PACHECO et al., 2022).

Durante o resfriamento e congelamento, há modificações na estrutura da membrana plasmática, assim como a formação de cristais de gelo (e alteração da osmolaridade extra e intracelular) que afetam a viabilidade celular após o descongelamento (GAO & CRITSER, 2000). Basicamente taxas de congelamento mais lentas promovem desidratação da célula aumentando a concentração de solutos no meio intracelular (efeito soluto), minimizando a formação de cristais de gelo em seu interior. Por outro lado, quando sob taxas de congelamento mais rápidas há formação de cristais de gelo dentro das células, que podem danificar sua estrutura (ELLIOTT, WANG & FULLER, 2017). Para minimizar esses efeitos, células congeladas lentamente precisam ser reaquecidas lentamente, assim como células congeladas de forma rápida, precisam ser descongeladas de forma rápida, recuperando, assim, sua hidratação (GAO & CRITSER, 2000). Taxas de congelamento lentas, usando congeladores automáticos ou o equipamento Mr. Frosty, tem sido usada para criopreservação de células somáticas em felinos (SONG et al., 2007; GUAN et al., 2010), inclusive em onças-pintadas (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016). No presente trabalho o uso do equipamento Mr. Frosty, foi comparado com o vapor de nitrogênio utilizando palhetas, comparando assim diferentes taxas de congelamento, potencialmente com diferentes mecanismos de crioinjúria. No entanto, ambos foram capazes de manter de forma semelhante a integridade e viabilidade das células após o descongelamento ($86,7 \pm 3,7$ com azul de tripano e $79,4 \pm 1,9$ com laranja de acridina para o congelamento lento; $83,8 \pm 4,5$ e $73,0 \pm 6,7$ para o congelamento rápido).

Outro fator que está relacionado aos mecanismos de crioinjúria é o efeito do recipiente de armazenamento. Recipientes com maior diâmetro, como os criotubos, apresentam maior variação de taxas de congelamento na periferia x centro em relação àqueles com menor diâmetro (como a palheta), em que a taxa de congelamento é mais uniforme ao longo do recipiente (ARAÚJO et al., 2016; HUNT, 2019; MENEGHEL, KILBRIDE & MORRIS, 2020). Por outro lado, as palhetas finas (0,25ml) estão mais sensíveis às mudanças de temperatura durante a manipulação, necessitando mais cautela a ser manuseada. Desta forma, a vantagem de otimização de uso do espaço em relação às palhetas, deve ser contraposta com sua maior sensibilidade à manipulação. Apesar disso, Urio (2012) comparou a criopreservação de células em palhetas de 0,5 e 0,25 ml, não encontrando

diferenças estatísticas entre elas. Liposki et al (2018) realizou a criopreservação de células fetais bovinas em palhetas de 0,25ml, obtendo 89,8% de viabilidade pelo teste de azul de tripano, enquanto Forell et al (2008) e Rochetti et al (2010) apresentam eficácia para o uso de palhetas de 0,5 ml para criopreservação de células somáticas usadas para clonagem, sendo, também, uma alternativa de recipiente de envase, podendo estocar o dobro do volume comparado as palhetas de 0,25 ml.

Para proteger as células das crioinjúrias causadas pelos congelamentos, são utilizadas substâncias que possuem ação intra ou extracelular, alterando mecanismos da membrana ou de outros compostos presentes nas células. Esses compostos devem ser de baixa toxicidade, biologicamente aceitáveis e capazes de proteger a célula, para tentar reduzir a morte celular por apoptose durante os processos de congelamento e descongelamento (JANG et al., 2017). Crioprotetores extracelulares, como a sacarose e a trealose, são encontrados a base de açúcares, lipoproteínas ou alguns aminoácidos, e possuem alto peso molecular (GONZALES, 2004; JANZ et al., 2012; MATTOS, 2016). Dentre os crioprotetores intracelulares, os mais utilizados são o DMSO, etilenoglicol e glicerol (SRETER, FOXALL & VARGA, 2022). O DMSO, é um crioprotetor de baixo peso molecular, que se liga às moléculas de água do ambiente intracelular e assim reduz a formação de cristais de gelo (CETINKAYA et al. 2014, LEÓN-QUINTO et al. 2014). Este crioprotetor tem ação também ao estabilizar as proteínas da célula, equilibrando as concentrações intra e extracelulares dos eletrólitos (LIU et al. 2010). Crioprotetores intracelulares podem ser associados a outros de ação extracelular (como a sacarose) para reduzir os potenciais danos causados pelo estresse osmótico (SCHNEIDER & MAZUR 1984). Em onças-pintadas a presença da sacarose não promoveu efeito protetor adicional na conservação de células com morfologia semelhante a fibroblastos, submetidos a uma curva lenta de congelamento (OLIVEIRA et al., 2021). Desta forma, optou-se pelo uso do DMSO 10% isoladamente no meio de congelamento no presente estudo, sendo igualmente eficaz na proteção celular em ambas as metodologias de congelamento propostas.

Tanto na análise pela laranja de acridina quanto pelo azul de tripano, usadas para comparar a integridade de membrana entre os momentos, observou-se melhora na viabilidade celular após o cultivo (descongelação x confluência). Este

comportamento também foi observado outro estudo com onças-pintadas, em que a viabilidade celular foi retomada após cultivo das células criopreservadas, restaurando níveis semelhantes aos obtidos a fresco ($97.8\% \pm 1.1$ versus $95.7\% \pm 1.3$ a fresco e pós cultivo, respectivamente $p < 0.05$) (OLIVEIRA et al. 2021). Isto pode ser explicado pelo fato de que durante as lavagens dos cultivos para troca do meio de cultura, as células mortas em suspensão são descartadas, e assim progressivamente removidas permanecendo aquelas saudáveis, capazes de se aderir ao substrato.

Silva et al (2021) avaliam o efeito da criopreservação de células somáticas de onça-pintada após confluência, enquanto outros trabalhos avaliam logo após o descongelamento (MAGALHAES et al., 2017; BORGES et al., 2020; JENUIT et al., 2021; PRAXEDES et al., 2021). No presente estudo, a viabilidade celular somente alterou imediatamente após o descongelamento, se recuperando a níveis semelhantes ao processamento a fresco após o cultivo. Desta forma, o efeito de tratamentos de criopreservação deve ser avaliado prioritariamente imediatamente após o descongelamento, visto que os efeitos das crioinjúrias não são mais detectáveis após cultivo celular.

A viabilidade celular, caracterizada por alterações na morfologia, no estado fisiológico ou até mesmo na permeabilidade da membrana, pode ser confirmada através da marcação ou absorção de corantes e sondas fluorescentes (JOHNSON, NGUYEN & CODER, 2013). Um dos métodos mais utilizados em biologia celular é a avaliação com a coloração pelo azul de tripano, que atravessa a membrana celular lesionada, sem que a célula consiga excluí-lo, sendo assim possível diferenciar células com membrana íntegra de lesionada (STROBER, 1997). Fatores como a atividade enzimática não afetam sua avaliação por depender apenas da membrana celular lesada. Apesar disso, o azul de tripano pode gerar artefatos que acabam confundindo o analisador (MASCOTTI, MCCULLOUGH & BURGER, 2000). Outro método utilizado envolve o uso de sondas fluorescentes, por microscopia ou citometria de fluxo, como o iodeto de propídio (IP). Sendo semelhante ao azul de tripano, o IP cora células com a membrana lesionada, porém, seu uso acaba tornando-se mais caro (LEBEAU et al., 2019). Já o laranja de acridina, uma sonda fluorescente, emite fluorescência verde ao se ligar aos ácidos nucleicos de células viáveis, emitindo coloração verde. Quando associada

ao iodeto de propídio, emite fluorescência alaranjada ou vermelha dependendo do tipo de lesão celular. Também é um método funcional e rápido de executar, tornando-se superior quando relacionado ao azul de tripiano por permitir outras diferenciações celulares - viáveis, em apoptose inicial ou tardia e necróticas (MASCOTTI, MCCULLOUGH & BURGER, 2000).

No presente trabalho, não foram encontradas diferenças na viabilidade celular a fresco entre as técnicas de coloração por laranja de acridina - LA e IP+H342 em citometria - CIT ($p>0,05$), apenas entre essa e o azul de tripiano ($p<0,05$). Para as células descongeladas, a técnica do AT apresentou um menor percentual de células viáveis do que em relação à CIT. Tal fato pode ser considerado pela quantidade de células que são analisadas pela técnica de AT, assim como pela presença de debris do corante gerando artefatos que geram falsos positivos, superestimando as populações inviáveis. Kummrow et al (2013) comentam das dificuldades em detectar células não coradas, superestimando as populações celulares durante o processamento por AT, e indicam que para minimizar essas discrepâncias e aproximar os resultados, torna-se necessário contabilizar muitas células (mais de 2500 para 2% de incerteza estatística). Se formos comparar com a citometria de fluxo, sua especificidade é maior por ser um equipamento que está processando o material, tirando o viés do analisador, além de contabilizar um grande número de células.

Kummrow et al (2013) também comparam o uso da citometria com análises feitas no microscópio de fluorescência, ressaltando a possibilidade de análises múltiplas e quantitativas com alta velocidade em relação à microscopia, porém que a microscopia é melhor empregada para análise individual das células. No presente trabalho, tanto a análise feita na citometria quanto na microscopia de fluorescência, apresentaram resultados semelhantes por se tratar de um mecanismo parecido para análise, diferindo apenas na quantidade de células analisadas, podendo assim a escolha do método ficar a cargo do equipamento disponível.

4.6. CONCLUSÃO

Em conclusão, ambos os métodos para criopreservação de células somáticas de onças-pintadas são eficazes, mas, levando em conta os armazenamentos em botijões de nitrogênio, a criopreservação em palhetas plásticas torna-se melhor opção quando comparada ao uso de tubos criogênicos.

Para avaliarmos o verdadeiro efeito do crioprotetor, é necessário a avaliação logo após o descongelamento, visto que durante o cultivo, as células mortas são retiradas conforme a troca do meio. Apesar das diferenças entre corantes e formas de análises, a citometria de fluxo é um método mais rápido para avaliação, porém apresenta alto custo quando comparado ao azul de tripano, que, atualmente, é o método mais empregado.

4.7. REFERÊNCIAS

- ARANTES, L. G., TONELLI, G. S., MARTINS, C. F., & BÃO, S. N. (2021). Cellular characterization and effects of cryoprotectant solutions on the viability of fibroblasts from three Brazilian wild cats. **Biopreservation and Biobanking**, 19(1), 11-18. doi:10.1089/bio.2020.0059
- ARAUJO, G.R; PAULA, T. A. R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R. G.; BERGO, L. C. F.; SILVA, L. C.; COSTA, D. S.; BRAUD, C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 195, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.12.019
- ARAUJO, F. H., MORAIS, C. A. R. S., LOPES, D., AZEVEDO, H. C., & MARIA, A. N. (2016). **Taxa de Diluição e Tipo de Recipiente de Envase na Criopreservação do Sêmen de Tambaqui**. III Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.132-138
- ARAUJO, G. R., DECO-SOUZA, T., BERGO, L. C. F., SILVA, L. C., MORATO, R. G., JORGE-NETO, P. N., ... & PAULA, T. A. R. (2020). Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. **Journal of Threatened Taxa**, 12(5), 15557-15564.
- BORGES, A. A., LIRA, G. P. D. O., NASCIMENTO, L. E., SANTOS, M. V. D. O., DE OLIVEIRA, M. F., SILVA, A. R., & PEREIRA, A. F. (2020). Isolation, characterization, and cryopreservation of collared peccary skin-derived fibroblast cell lines. **PeerJ**, 8, e9136.
- CETINKAYA, G., & ARAT, S. (2011). Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, 63(3), 292-297.

997 ELLIOTT, G. D., WANG, S., & FULLER, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of
 998 the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery
 999 from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, 76, 74-91.

1000 FORELL, F., FELTRIN, C.; SANTOS, L.C.; 1, COSTA, U.B., VIEIRA, A.D.;
 1001 HÖLKER, M.; RODRIGUES, J.L. Otimização do sistema de produção de clones por
 1002 transferência nuclear da célula. **Acta Scientiae Veterinarie** 36:221-228, 2008.

1003 GAO, D., & CRITSER, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR**
 1004 **journal**, 41(4), 187-196.

1005 GONZALES, R. A. F. (2004). **Efeito da Criopreservação usando diferentes**
 1006 **técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a**
 1007 **integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 92 f. Tese (Doutorado)
 1008 - Curso de Pós Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina
 1009 Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga

1010 GUAN WJ, LIU CQ, LI CY, LIU D, ZHANG WX & MA YH. 2010. Establishment and
 1011 cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal Tiger (*Panthera tigris*
 1012 *tigris*). **CryoLetters** 31: 130-138.

1013 HUNT, C. J. (2019). Technical considerations in the freezing, low-temperature
 1014 storage and thawing of stem cells for cellular therapies. **Transfusion Medicine and**
 1015 **Hemotherapy**, 46(3), 134-150.

1016 JANG, T. H., PARK, S. C., YANG, J. H., KIM, J. Y., SEOK, J. H., PARK, U. S., ... &
 1017 HAN, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative medicine**
 1018 **research**, 6(1), 12-18.

1019 JANZ, F. L.; JANZ, F. D. L., DEBES, A. D. A., CAVAGLIERI, R. D. C., DUARTE, S.
 1020 A., ROMÃO, C. M., MORÓN, A. F., ... & BYDLOWSKI, S. P. (2012). Evaluation of
 1021 Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem
 1022 Cells Cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012 p.
 1023 1-10.

1024 JENUIT, M., ZAINUDDIN, Z. Z., PAYNE, J., & HAMID, A. (2021). Establishment and
 1025 cryopreservation of fibroblast cell line from a Sumatran rhinoceros (*dicerorhinus*
 1026 *sumatrensis*). **Journal of Sustainability Science and Management**, 16(4), 85-98.

1027 KARIMA, H. N., SUSILAWATI, T., DJATI, M. S., CIPTADI, G., & PUTRI, A. R.
 1028 (2019). Effect of DMSO concentration on the quality of goat fetus fibroblast cell
 1029 cultured in vitro. In **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**
 1030 (Vol. 546, No. 6, p. 062011). IOP Publishing.

1031 KUMMROW, A., FRANKOWSKI, M., BOCK, N., WERNER, C., DZIEKAN, T., &
 1032 NEUKAMMER, J. (2013). Quantitative assessment of cell viability based on flow
 1033 cytometry and microscopy. **Cytometry Part A**, 83(2), 197-204.

1034 LEBEAU, P. F., CHEN, J., BYUN, J. H., PLATKO, K., & AUSTIN, R. C. (2019). The
 1035 trypan blue cellular debris assay: a novel low-cost method for the rapid quantification
 1036 of cell death. **MethodsX**, 6, 1174-1180.

1037 LEÓN-QUINTO, T., SIMÓN, M. A., CADENAS, R., MARTÍNEZ, Á., & SERNA, A.
 1038 (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from
 1039 an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, 68(2), 227-
 1040 233.

1041 LIPOSKI, D. DE M., OHLWEILER, L. U., MEZZALIRA, J. C., BROGNI, C. F., SILVA,
 1042 L. G., & MEZZALIRA, A. (2018). Células fetais bovinas de cultivo primário
 1043 submetidas a diferentes pressões negativas antes do congelamento em palhetas.
 1044 **Ciência Animal Brasileira**, 19(0). doi:10.1590/1809-6891v19e-44099

1045 LIU Y, XU X, MA X, MARTIN-RENDON E, WATT S & CUI Z. 2010. Cryopreservation
 1046 of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced
 1047 dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. **Biotech Program** 26: 1635-
 1048 1643.

1049 MASCOTTI, K., MCCULLOUGH, J., & BURGER, S. R. (2000). HPC viability
 1050 measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide.
 1051 **Transfusion**, 40(6), 693-696.

1052 MAGALHAES, L. C., BHAT, M. H., FREITAS, J. L., MELO, L. M., TEIXEIRA, D. I.,
 1053 PINTO, L. C., ... & FREITAS, V. J. (2017). The effects of cryopreservation on

different passages of fibroblast cell culture in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **Biopreservation and Biobanking**, 15(5), 463-468.

MASTROMONACO, G. F.; SONGSASEN, N. Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species. [s.l.] : **INC**, 2020. v. 2 DOI: 10.1016/b978-0-12-817107-3.00007-2.

MATTOS, L. M. (2016). **Recuperação e criopreservação de germoplasma de mamíferos silvestres mortos no bioma cerrado do Distrito Federal: Uma estratégia para conservação animal ex situ**. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MENEGHEL, J., KILBRIDE, P., & MORRIS, G. J. (2020). Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies—A review. **Frontiers in medicine**, 7, 592242.

MESTRE-CITRINOVITZ, A. C., SESTELO, A. J., CEBALLOS, M. B., BARAÑAO, J. L., & SARAGÜETA, P. (2016). Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Current Protocols in Molecular Biology**, 116(1), 28-7.

MORATO R.G., BEISIEGEL B.M., RAMALHO E.E., CAMPOS C.B., BOULHOSA R.L.P. (2013) Avaliação de risco de extinção de onça-pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira** 1: 122–132.

MORATO, R. G., FERRAZ, K. M. P. M. de B., DE PAULA, R. C., & CAMPOS, C. B. de. (2014). Identification of Priority Conservation Areas and Potential Corridors for Jaguars in the Caatinga Biome, Brazil. **PLoS ONE**, 9(4), e92950. doi:10.1371/journal.pone.0092950

OLIVEIRA, L. R. D.; PRAXEDES, E. A.; SILVA, M. B.; RIBEIRO, L. R.; SILVA, H. V.; & PEREIRA, A. F. (2021). **Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 93. doi.org/10.1590/0001-3765202120190314

PACHECO, W. B. M., SOUSA, A. P. M., CORDEIRO, M. L. L., SANTANA, M. V., COSTA JÚNIOR, S. H., SOUZA, J. A. T., ... & BARROS, F. N. (2022). Viability of fibroblasts from "Curraleiro Pé Duro" cattle after different cryopreservation

1085 protocols. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 74, 754-758.
 1086 <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12587>

1087 PORFIRIO, G. (2019). Etnozoologia e conservação da onça-pintada
 1088 (*Panthera onca*) no Brasil. **Interações** (Campo Grande), 559–574.
 1089 <https://doi.org/10.20435/inter.v0i0.1717>

1090 PRAXEDES, É.A.; QUEIROZ-NETA, L.B., SILVA, H.V.R., RIBEIRO, L.R.,
 1091 BORGES, A.A., SILVA, M.B., SANTOS, M.V.O., SILVA, A.R. & PEREIRA, A.F.
 1092 2017. Isolation and in vitro culture of somatic cells derived from Jaguar (*Panthera*
 1093 *onca*) ear tissue. **Anim Reprod** 14: 873.

1094 PRAXEDES, É. A., BORGES, A. A., SANTOS, M. V., & PEREIRA, A. F. (2018).
 1095 Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoo biology**, 37(4), 258-
 1096 263 <https://doi.org/10.1002/zoo.21416>

1097 PRAXEDES, É. A., SILVA, M. B., DE OLIVEIRA, L. R. M., DA SILVA VIANA, J. V.,
 1098 SILVA, A. R., DE OLIVEIRA, M. F., & PEREIRA, A. F. (2021). Establishment,
 1099 characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti
 1100 (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)—A study in a wild rodent. **Cryobiology**, 98,
 1101 63-72.

1102 PRENTICE, J. R., & ANZAR, M. (2011). Cryopreservation of Mammalian Oocyte for
 1103 Conservation of Animal Genetics. **Veterinary Medicine International**, 2011, 1–11.
 1104 <https://doi.org/10.4061/2011/146405>

1105 ROCHETTI, R. C., DE BEM, T. H. C., BRESSAN, F. F., SANGALLI, J. R.,
 1106 PERECIN, F., & MEIRELLES, F. V. (2010). Cryopreservation of cells in straws for
 1107 bovine nuclear transfer purposes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38(2):819.
 1108 ISSN: 1679-9216

1109 SCHNEIDER U & MAZUR P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant
 1110 permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos.
 1111 **Theriogenology** 21: 68-79. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90307-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90307-8)

1112 SILVA, M.B., PRAXEDES, É.A., BORGES, A.A., OLIVEIRA, L.R., NASCIMENTO,
 1113 M.B., SILVA, H.V., SILVA, A.R. AND PEREIRA, A.F., 2021. Evaluation of the

1114 damage caused by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts
 1115 derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. **Zoo Biology**,
 1116 40(4), pp.288-296. <https://doi.org/10.1002/zoo.21606>

1117 SONG J, HUA S, SONG K & ZHANG Y. 2007. Culture, characteristics and
 1118 chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. **In Vitro**
 1119 **Cell Dev Biol Anim** 43: 203-209. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9043-3>

1120 SRETER, J. A., FOXALL, T. L., & VARGA, K. (2022). Intracellular and extracellular
 1121 antifreeze protein significantly improves mammalian cell cryopreservation.
 1122 **Biomolecules**, 12(5), 669. <https://doi.org/10.3390/biom12050669>

1123 STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in**
 1124 **immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 1997.
 1125 <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

1126 URIO, M. **Viabilidade de fibroblastos bovinos submetidos a diferentes**
 1127 **estratégias de criopreservação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)
 1128 - Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa
 1129 Catarina, SC: 54-54.

5. ARTIGO II - “XENOTRANSPLANTE COMO ALTERNATIVA PARA REVIGORAMENTO TECIDUAL PARA CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE ONÇAS-PINTADAS *POST MORTEM*”

5.1. INTRODUÇÃO

A perda da diversidade biológica é um dos mais graves problemas ambientais globais causados pela ação humana. Esse alarmante declínio populacional indica que uma sexta extinção em massa já está em andamento (CEBALLOS et al. 2017). Entre as ações antrópicas, as estradas são classificadas pela Lista Vermelha da IUCN como uma das principais causas da redução de populações de espécies selvagens (PINTO et al., 2022). Anualmente, bilhões de animais selvagens são mortos por colisões veiculares no mundo (ASCENSÃO & DESBIEZ, 2022). Os mamíferos de médio e grande porte são os mais suscetíveis aos efeitos negativos de mortalidade nas estradas (FAHRIG, et al, 2009), com estimativas de mais de 2 milhões de mamíferos mortos anualmente nas estradas brasileiras (GONZÁLEZ-SUÁREZ et al.,2018). Dentre esses, os carnívoros são os mais vulneráveis aos atropelamentos devido a sua maior massa corporal, alta capacidade de dispersão e baixa densidade (COSTA et al., 2022).

A onça-pintada é o maior carnívoro das américas e apesar de ter um papel ecológico muito importante, vem enfrentando nos últimos anos um declínio populacional acelerado (JEŃDRZEJEWSKI et al., 2018). Apenas no primeiro semestre de 2023, pelo menos seis onças-pintadas morreram por colisão veicular, sendo quatro na mesma região que corta o Pantanal Sul (Miranda – MS) e dois na estrada que passa pelo Parque Estadual Morro do Diabo (Teodoro Sampaio – SP), cuja população estimada está abaixo de 20 indivíduos e que pertencente ao bioma Mata Atlântica (SRBEK-ARAUJO & CHIARELLO, 2016). A população de onças-pintadas da Mata Atlântica está extremamente ameaçada de extinção, com estimativa inferior a 300 indivíduos espalhados em pequenas populações (PAVIOLO et al., 2016).

Justamente por ser um animal de grande importância ecológica e científica, ferramentas para a conservação e manutenção de sua variabilidade genética são

necessárias, principalmente para animais que vierem a óbito (HAAG et al., 2010). Neste contexto, os biobancos tornam-se uma importante estratégia de conservação, pois a partir deles, é possível manter gametas, embriões e tecidos somáticos viáveis que poderão, futuramente, serem utilizados para programas de reprodução assistida e até mesmo clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (PEREIRA et al., 2018; MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para viabilizar a conservação de células somáticas de onças-pintadas (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016), que vão desde a escolha do tecido coletado (SANTOS et al., 2021), preparação do tecido e avaliação dos danos gerados pelas condições de cultivo *in vitro* (SILVA et al., 2021) e os efeitos dos crioprotetores na viabilidade das células com morfologia semelhante a fibroblastos (ARANTES et al., 2021). No entanto, para que haja a formação de um biobanco adequado e que realmente cumpra sua função de criopreservação do patrimônio genético é muito importante o desenvolvimento de protocolos para aproveitamento e vitalização de material genético de animais atropelados, pois na grande maioria das vezes o material se encontra em péssima qualidade biológica devido ao tempo do óbito, inviabilizando o seu uso futuro.

Dessa forma, o presente projeto pretende avaliar a revitalização do tecido e a qualidade das células somáticas cultivados de onças-pintadas mortas por colisão veicular, após serem transplantados em camundongos imunodeficientes.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Autorizações

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA UFMS, Processo: nº 1278/2023), obteve autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO, Processo: nº 75762-1) para a coleta de material biológico das onças-pintadas de vida livre e registro no SISGEN (A1CEAD0).

5.2.2. Delineamento experimental

Todos os reagentes e meios foram obtidos através da Sigma-Aldrich e Gibco, exceto os citados no texto.

Cada fragmento de tecido cartilaginoso auricular de onça-pintada (n=3), medindo 3cm², foi considerado como uma unidade experimental, sendo dividido em quatro grupos experimentais (controle a fresco, controle descongelado, Xenotransplante intraperitoneal e Xenotransplante subcutâneo). Para cada grupo foram utilizados quatro fragmentos, dois para análise histológica e dois para cultivo de células somáticas, totalizando 16 fragmentos seccionados de cada biópsia.

Doze fragmentos foram vitrificados e após o reaquecimento, quatro foram utilizados para o controle descongelado, quatro foram implantados em cada camundongo, sendo dois fragmentos na região subcutânea e dois na região intraperitoneal. Ou seja, para cada tecido de onça-pintada foram utilizados dois camundongos NSG (totalizando 6 camundongos).

Sendo assim tivemos:

- Grupo controle 1 - GC1: análises a fresco (cultivo de células somáticas e histologia).
- Grupo controle 2 - GC2: quatro fragmentos foram analisados após reaquecidos, dois foram cultivados para avaliação da qualidade das células somáticas e dois analisados histologicamente.
- Xenotransplante Intraperitoneal - XenolP: quatro fragmentos foram reaquecidos e transplantados no peritônio de camundongo por sete dias. Posteriormente, uma parte foi cultivada para avaliação da qualidade das células somáticas e a outra analisada histologicamente.
- Xenotransplante subcutâneo - XenoSC: quatro fragmentos foram reaquecidos e transplantados no subcutâneo de camundongo (o mesmo animal do grupo XenolP) por sete dias. Posteriormente, uma parte foi cultivada para avaliação da qualidade das células somáticas e a outra analisada histologicamente.

5.2.3. Animais

Foram utilizados tecidos da cartilagem auricular de três onças-pintadas mortas por colisão veicular, encontradas na BR 262 que corta o Pantanal do Mato Grosso do Sul (Pantanal Sul, MS), entre as cidades de Mirada e Corumbá. Os fragmentos foram coletados e encaminhados pela Polícia Ambiental do MS ao Laboratório de Edição e Conservação Genética da UFMS (Reprogen/UFMS). Informações sobre idade, peso, sexo, localidade aproximada e data da coleta estão na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de sexo, peso, idade, localidade e recebimento do material biológico de cada onça-pintada utilizada do experimento.

Animal	Sexo	Peso (KG)	Estimativa da idade	Localidade aproximada	Data da coleta de material
Atrop 1	Macho	108 kg	Adulto	19°38'40.9"S 57°02'07.2"W	28/01/2023
Atrop 2	Macho	103 kg	Adulto	19°39'25.2"S 57°01'20.2"W	22/03/2023
Atrop 3	Fêmea	65 kg	Adulto	19°49'11.9"S 56°54'20.9"W	29/04/2023

Para a realização dos xenotransplantes foram utilizados 6 camundongos imunodeficientes da linhagem NSG, produzidos no Biotério Central da UFMS e mantidos em mini-isoladores com temperatura e umidade controladas. A ração e água eram fornecidas diariamente e a troca da cama de maravalha era realizada semanalmente.

5.2.4 Coleta e processamento dos tecidos

Os fragmentos de orelhas (n=3, com 3cm²) de onças-pintadas foram encaminhados ao Reprogen/UFMS, acondicionados em frascos com soro fisiológico. No laboratório esse material passou por antissepsia com álcool 70% por 1 minuto e em seguida o material foi enviado para a capela de fluxo laminar, onde foi lavado com PBS por 1 minuto e em seguida eram transferidos para tubo falcon de 50 ml contendo Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM),

suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5% de solução de antibiótico-antimicótico até o momento da dissecação, seguindo o protocolo de Mestre-Citrinovitz et al. (2016). Após a dissecação as cartilagens eram fragmentadas em pedaços de 9 mm² e utilizadas nos grupos experimentais.

5.2.5 Análise histológica

Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% e incorporados em parafina, em seguida foram fatiados em frações de 5 µm, conforme preconizado por Queiroz Neta et al. (2018). As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise dos aspectos morfológicos. Usando um microscópio de luz com fluorescência (Nikon Eclipsi Ni, Japão) acoplado de câmera fotográfica, foram registradas em cada tratamento, um total de 20 fotomicrografias em campos aleatórios e magnitude de 40x para quantificação de fibroblastos dérmicos, condrócitos e lacunas.

Como não foi possível determinar a deterioração dos tecidos no momento da chegada ao laboratório, as análises estatísticas da avaliação histológica foram realizadas por indivíduo.

5.2.6 Vitrificação dos tecidos

Os fragmentos foram vitrificados pelo método de superfície sólida, de acordo com o protocolo adaptado de Praxedes et al. (2019). Os fragmentos foram transferidos para placas de 24 poços contendo 2 ml do meio crioprotetor (DMEM suplementado com 10% DMSO, 10% de soro fetal bovino (FBS) e 2% de antibiótico-antimicótico) e mantidos a 25°C por 4 minutos, em seguida, foram alçados em uma superfície metálica em cima do nitrogênio, sendo, posteriormente, armazenados direto no nitrogênio líquido a -196°C.

5.2.7 Reaquecimento

Após uma semana os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e mantidos por um minuto a 25 °C ao ar e depois foram imersos em banho-maria a 37°C. Para remoção do meio crioprotetor, os fragmentos foram lavados três vezes por 5 minutos em soluções de DMEM + FBS 10% suplementadas com sucrose em concentrações decrescentes (na ordem 0,5M; 0,25M e sem sucrose) (PRAXEDES

et al., 2019). Dois fragmentos foram implantados no subcutâneo e dois fragmentos foram implantados na região intraperitoneal de camundongos NSG. Em todos os grupos experimentais, cada fragmento foi dividido ao meio, sendo uma parte para cultivo e a outra para análise histológica.

5.2.8. Implantação de tecido (explante) em Camundongos NSG

Os camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal contendo associação de Cetamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg). Como protocolo analgésico, foi utilizado Meloxicam (2mg/kg) e Cloridrato de Tramadol (20mg/kg), por via subcutânea, trinta minutos antecedendo a cirurgia. Após analgesia e conferência do plano anestésico, o animal foi colocado em decúbito dorsal para realização da antisepsia na região abdominal com clorexidina degermante e em seguida foi realizada a tricotomia. A pele foi incisada e divulsionada, sendo feita a incisão da musculatura e peritônio posteriormente.

Com o auxílio de uma pinça oftalmológica, a musculatura foi manipulada de forma que o peritônio fosse facilmente visualizado. Com os fragmentos da cartilagem de orelha já descongelados e mantidos em placa de petri estéril, dois deles foram colocados na região intraperitoneal e os outros dois na região subcutânea de cada camundongo. Com um fio de sutura agulhado, cada explante foi transfixado e inserido na região intraperitoneal do camundongo, através de pontos simples. Logo após, um pouco de solução fisiológica foi utilizado para evitar possíveis aderências no local, retornando, também, a musculatura para sua posição anatômica, e realizado a síntese com fio de sutura catgut nº4-0, utilizando a técnica de Reverdin, abrangendo o peritônio, as fáscias e os músculos da região.

Os explantes da região subcutânea foram inseridos sem a necessidade de fixação do tecido com fio de sutura. Após o procedimento, também foi realizada a sutura da pele por meio de pontos simples, com fio de náilon nº4-0. Ao final do procedimento cirúrgico, o animal foi colocado em decúbito ventral onde permanecia em observação em uma placa aquecedora a 37°C até sua recuperação anestésica. Durante dois dias receberam analgesia com Meloxicam (2mg/kg), e Cloridrato de Tramadol (20mg/kg), SID.

Passados uma semana os camundongos foram eutanasiados com sobredosagem de anestesia inalatória. Os animais foram expostos ao isoflurano em oxigênio (indução 5%, 2 L/min) em uma câmara de indução até a verificação do óbito dos mesmos, observado a partir da ausência dos reflexos pedal e caudal e dos sinais vitais: movimentos respiratórios e batimentos cardíacos (STOKES et al., 2009).

Um explante do subcutâneo e um da região intraperitoneal foram fixados para estudo histológico. Os outros explantes foram fragmentados em tamanhos menores e cultivados para a obtenção de células somáticas.

5.2.9. Cultivo de células somáticas

Todos os explantes foram cultivados até a terceira passagem em meio DMEM contendo 15% FBS e 2% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B, em incubadora de cultivo celular a 38,5°C e CO₂ a 5%. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas e as passagens ocorriam quando os fibroblastos alcançavam 80-90% de confluência. As células foram avaliadas pelas características durante a cultura primárias e subculturas quanto a: morfologia, viabilidade e apoptose. Após a terceira passagem de cada placa atingir 100% de confluência, foram realizadas as avaliações de viabilidade dos fibroblastos.

5.2.10. Avaliação da viabilidade

Para análise da viabilidade celular, foram utilizados o corante azul de tripano e as sondas fluorescentes laranja de acridina, iodeto de Propídio (PI) e Hoechst33342. A análise foi realizada antes da criopreservação das células, após descongelamento e após confluência.

Azul de tripano

Em um tubo cônico, foram colocados 20µL da suspensão celular e 20µL de azul de tripano a 0,4%. As células foram contadas na câmara de Neubauer e consideradas viáveis quando não apresentavam a coloração azul. A porcentagem da viabilidade foi calculada dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas, segundo Strober (1997).

1330 Teste de Necrose e Apoptose

1331 Em um tubo cônico escuro, foram colocados 20µL da suspensão celular,
1332 20µL do corante laranja de acridina (100 µg/mL) e 4µL de Iodeto de Propídio
1333 (2mg/mL). Logo após, uma alíquota desse conteúdo era colocada sobre uma
1334 lâmina e coberta por uma lamínula, sendo analisada em microscópio invertido de
1335 fluorescência (Nikon). Um total de 100 células foi contabilizado, sendo separados
1336 em laranjas (apoptóticas), vermelhas (necróticas) e verdes (viáveis).

1337 Citometria de fluxo

1338 A análise de viabilidade com Hoechst33342 foi realizada em citômetro de
1339 fluxo (CytoFLEX, Beckman Coulter). Para isso, 40µL da suspensão celular foi
1340 incubada por 15 minutos com 20µL de Hoechst33342 (40µg/mL) e 4µL de PI
1341 (2mg/ml). A porcentagem viável foi considerada através do (PI -).

1342 5.2.11 Análises estatísticas

1343 Na avaliação dos dados da histologia foi realizado o teste de interação entre
1344 os animais e os parâmetros avaliados, observando-se o efeito dos animais,
1345 possivelmente por causa do tempo de coleta entre eles. Dessa forma, optou-se por
1346 analisar os dados dos animais individualmente. Nos dados paramétricos foi
1347 realizado um teste de médias student T entre os grupos. Significância foi
1348 considerada se $p < 0,05$. Nos dados não paramétricos foram realizados o Kruskal
1349 Wally's test entre os parâmetros avaliados. Os dados de viabilidade das células
1350 somáticas foram não paramétricos, sendo realizada a comparação também entre
1351 os animais individualmente, utilizado o Kruskal Walli's test. Todas as análises
1352 estatísticas foram realizadas no programa estatístico R.

1353 **5.3. RESULTADOS**

1354 Foram encaminhados ao Reprogen/UFMS fragmentos de orelhas de três
1355 onças-pintadas (Atrop1, Atrop2 e Atrop3) que vieram a óbito devido colisão veicular
1356 (Figura 4). Todos esses animais foram encontrados no período da manhã e os
1357 fragmentos coletados deram entrada no laboratório às 22:00.



Figura 4. Onças-pintadas mortas por colisão veicular na BR 206, que corta o Pantanal Sul, entre as cidades de Miranda e Corumbá. **(A)** Animal macho de 108 kg, **(B)** Animal macho de 103 kg e **(C)** Animal fêmea de 65 kg.

Segundo relatos da Polícia Ambiental do MS que recolheu os animais, devido ao rigor cadavérico e estágio de decomposição, todas as colisões possivelmente ocorreram a partir do período crepuscular noturno do dia anterior. Dessa forma, foi contabilizado aproximadamente em 24 horas o tempo entre a colisão veicular e o recebimento no laboratório dos fragmentos de orelha de cada indivíduo.

As análises histológicas foram realizadas nos Atrop1 e Atrop3, nos tecidos descongelados e nos XenoIP e XenoSC. Apenas no Atrop2 foi incluída a análise histológica do tecido a fresco. Foram realizadas análises histopatológicas e a quantificação celular por histologia clássica nos fragmentos de cartilagem auricular, sendo contabilizados a quantidade de fibroblastos presentes no pericôndrio, lacunas preenchidas e vazias na região de côndrio e os condrócitos.

Quanto à análise histológica (Figura 5) do animal Atrop1, fragmentos criopreservados seguidos de xenotransplante por via subcutânea (XenoSC) apresentaram um maior número de fibroblastos quando comparados aos fragmentos criopreservados descongelados e xenotransplantados por via intraperitoneal (XenoIP) ($p < 0,05$). No entanto, houve diferença significativa da quantidade de fibroblastos do XenoIP em relação ao tecido descongelado (Tabela 5).

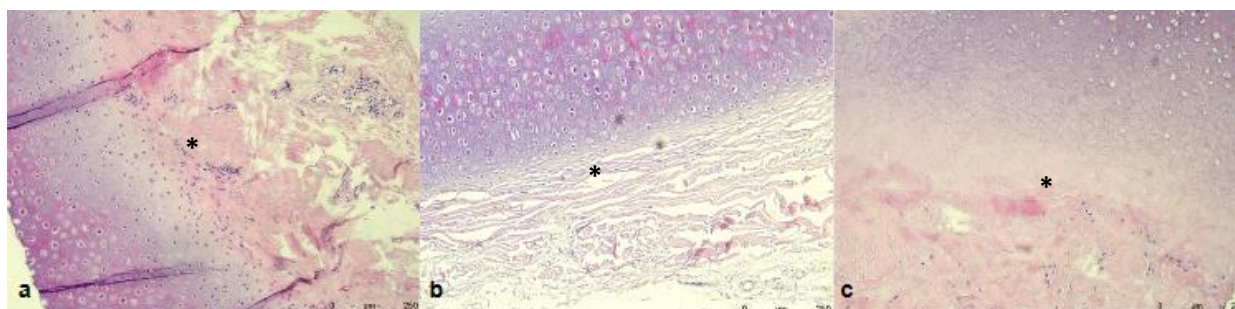


Figura 5. Imagens histológicas de tecido somático de onça-pintada submetido à criopreservação e xenotransplante. **(A)** Fragmento descongelado, **(b)** Fragmento criopreservado e xenotransplantado por via intraperitoneal, **(c)** Fragmento criopreservado e xenotransplantado por via subcutânea; **(*)** fibroblastos. Magnitude: 20×. Barras: 250 µm.

Além disso, foi observado no animal Atrop1 um aumento ($p < 0,05$) de condrócitos normais dos tecidos XenolP e XenoSC em relação ao tecido descongelado. O XenoSC foi capaz de apresentar menos condrócitos degenerados em relação ao tecido descongelado. Por sua vez, o XenolP apresentou maior quantidade de lacunas preenchidas. Adicionalmente, o maior percentual de lacunas preenchidas, ou seja, contendo condrócitos foi observado no grupo xenotransplantado por via intraperitoneal ($p < 0,05$). Finalmente, um maior número de lacunas vazias, ou seja, sem condrócitos, foi observado em todos os grupos xenotransplantados, sendo mais evidente no xenotransplante intraperitoneal ($p < 0,05$).

Tabela 5. Quantificação do número de células presentes na derme e cartilagem de tecidos somáticos da região auricular de onça-pintada após descongelamento e xenotransplante por via intraperitoneal (XenolP) e subcutânea (XenoSC).

Animais	Grupos	Fibroblastos	Condrócitos		Lacunas	
			Normais	Degenerados	Preenchidas	Vazias
Atrop 1	Descongelado	$20,6 \pm 7,17^b$	$7,5 \pm 3,31^b$	$20,1 \pm 4,25^a$	$39,3 \pm 4,27^b$	$6,5 \pm 2,12^c$
Atrop 1	XenolP	$11,1 \pm 5,47^c$	$15,8 \pm 5,53^a$	$16 \pm 7,02^{a,c}$	$46,7 \pm 6,99^a$	$25,6 \pm 5,17^a$
Atrop 1	XenoSC	$28,4 \pm 9,48^a$	$15 \pm 5,07^a$	$11,3 \pm 5,86^{b,c}$	$39,3 \pm 5,89^b$	$13,6 \pm 7,11^b$

^{a,b,c}: Letras diferentes na mesma COLUNA (a, b, c) indicam diferença ($p < 0,05$).

A avaliação histológica no Atrop2 possibilitou compreender melhor o efeito dos tecidos criopreservados e xenotransplantados em relação ao tecido a fresco. Na análise histopatológica, o tecido a fresco (Figura 6a) apresentou aspecto normal, com condrócitos viáveis. Tecido conjuntivo frouxo ativo e organizado, preenchendo quase que sua totalidade a região de pericôndrio e presença de raras células inflamatórias.

1405 O tecido descongelado do Atrop2 (Figura 6b) apresentou pericôndrio com
1406 fibras colágenas desorganizadas, com grandes espaçamentos entre elas.
1407 Acentuada visualização de fibrócitos e fibroblastos degenerados difusos. Foram
1408 observadas moderadas lacunas vazias ou com presença de condrócitos
1409 degenerados. Visualizaram-se também discretos a moderados grumos
1410 eosinofílicos na matriz celular, indicando degeneração.

1411 No tecido do Atrop2 xenotransplantado no subcutâneo (Figura 6c) foi
1412 possível observar alta proliferação de tecido conjuntivo frouxo ativo circundando a
1413 matriz cartilaginosa elástica de forma organizada. A região de cartilagem
1414 apresentava abundantes lacunas preenchidas com condrócitos viáveis e
1415 abundantes condroblastos. Discreta a moderada neovascularização em região
1416 subcutânea, próxima a pericondral. Matriz extracelular apresentava-se bem
1417 distribuída e homogênea.

1418 No tecido do Atrop2 xenotransplantado intraperitoneal (Figura 6d) foi
1419 observado processo degenerativo, apresentando matriz extracelular eosinofílica e
1420 de aspecto granular; espessamento das paredes das lacunas; acentuadas lacunas
1421 preenchidas com condrócitos degenerados difuso e moderados condrócitos
1422 necróticos multifocal. Pericôndrio discretamente espessado, com moderados
1423 fibrócitos e fibroblastos normais e raros fibroblastos proliferativos.

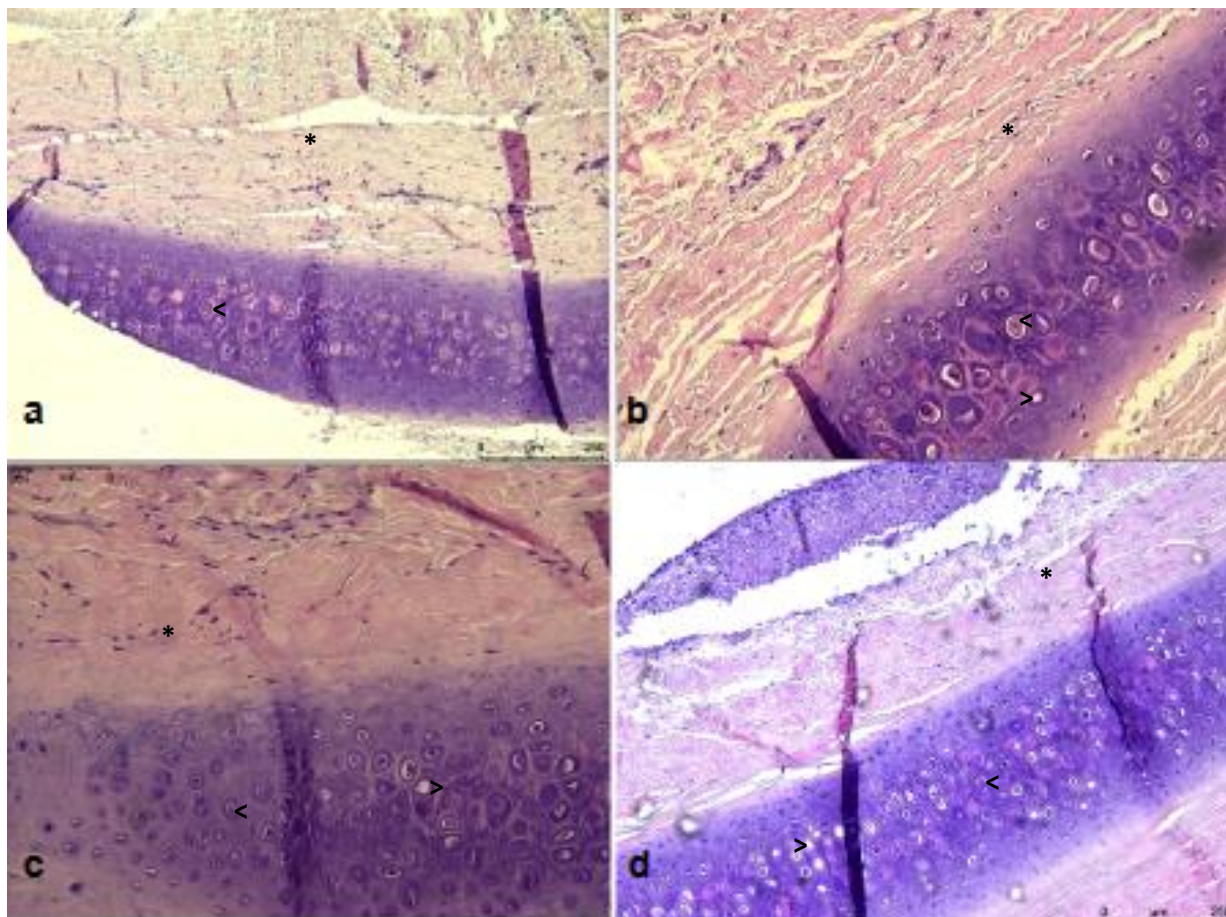


Figura 6. Imagens histológicas de tecido somático de onça-pintada submetido à criopreservação e xenotransplante. **(a)** Fragmento fresco, **(b)** Fragmento descongelado, **(c)** fragmento criopreservado e xenotransplantado por via subcutânea, **(d)** Fragmento criopreservado e xenotransplantado por via intraperitoneal; (*) fibroblastos, (>) lacunas vazias, (<) lacunas preenchidas. Magnitude: 10x (a,d) e 20x (b,c). Barras: 250µm.

Em relação a quantificação celular (Tabela 6), dos tratamentos após o descongelamento apenas o XenoSC não apresentou diferença ($p>0,05$) nas análises realizadas em relação ao grupo Fresco. Foi observado também que o XenoIP obteve a menor quantidade de fibroblastos em relação aos demais ($p<0,05$). No entanto, a quantidade de Condrócitos normais do XenoIP foi semelhante aos tratamentos a Fresco e XenoSC e superior ao Descongelado. Assim como, a quantidade de Lacunas preenchidas do XenoSC foi superior aos demais tratamentos.

Tabela 6. Quantificação do número de células presentes na derme e cartilagem de tecidos somáticos da região auricular de onça-pintada (Atrop2) a fresco e após descongelamento e xenotransplante por via intraperitoneal (XenoIP) e subcutânea (XenoSC).

Animais	Grupos	Fibroblastos	Condrócitos		Lacunas	
			Normais	Degenerados	Preenchidas	Vazias
Atrop 2	Fresco	25,1 ± 12,6 ^a	17,1 ± 4,65 ^{a, b}	26,3 ± 9,75 ^{b, c}	43,8 ± 8,93 ^a	0,8 ± 0,91 ^b
Atrop 2	Descongelado	14,6 ± 6,79 ^b	11,9 ± 3,48 ^b	38,5 ± 6,49 ^b	50,8 ± 9,53 ^a	2,2 ± 1,14 ^b
Atrop 2	Xeno. IP	5,65 ± 4,69 ^c	22,3 ± 8,12 ^a	53,7 ± 14,5 ^a	76 ± 16,5 ^b	7 ± 6,88 ^a
Atrop 2	Xeno. SC	17,2 ± 7,98 ^{a, b}	20,8 ± 12,9 ^{a, b}	19,6 ± 9,82 ^c	40,4 ± 15,1 ^a	4,2 ± 4,36 ^{a, b}

^{a, b, c}: : Letras diferentes na mesma COLUNA (a, b, c) indicam diferença (p<0.05).

Na análise histopatológica do Atrop3 (Figura 7a) foi observado no tecido descongelado a presença de pericôndrio com distribuição irregular, com fibras colágenas do tecido conjuntivo em degeneração e aumento do espaço entre elas. Moderados fibroblastos ativos difusos com raros fibroblastos proliferativos multifocal. Tecido cartilaginoso em processo de degeneração, apresentando as seguintes características: lacunas quase em sua totalidade preenchidas com condrocitos em diferentes estágios degenerativos, por vezes era observado núcleos tumefeitos, basofílicos com evidência de nucléolo e/ou cromatina em grumos, com discretas lacunas não preenchidas.

Nos tecidos do XenoIP (Figura 7b) foram observados que estavam encapsulados por fibroblastos, células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) e debris celulares, sendo uma das extremidades da cápsula mais aderente e com presença de revascularizações. O pericôndrio apresentava fibras colágenas com distribuição regular, densa e citoplasma discretamente degenerados. Também foi observado no pericôndrio moderados a acentuados fibrocitos difusos. Tecido cartilaginoso com moderada perda de matriz celular, algumas lacunas com bordos irregulares e espessados. Discretas lacunas vazias multifocal.

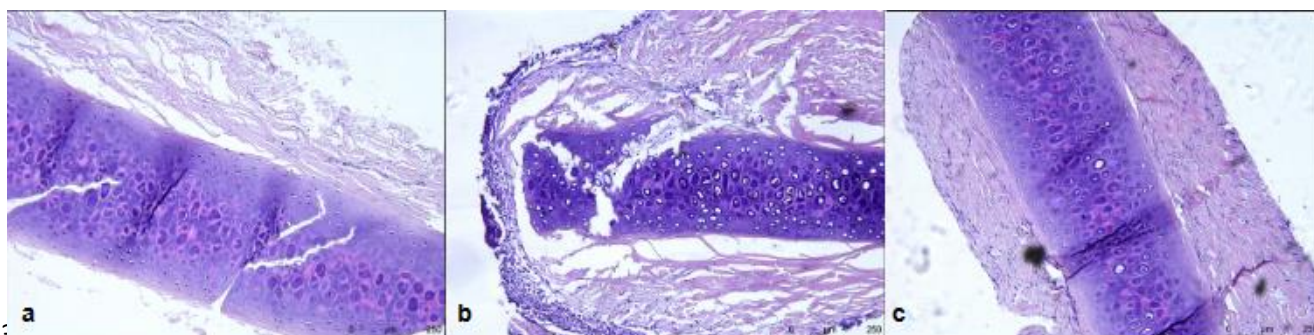


Figura 7. Imagens histológicas de tecido somático de onça-pintada submetido à criopreservação e xenotransplante. **(a)** Fragmento descongelado, **(b)** Fragmento criopreservado e xenotransplantado por via intraperitoneal, **(c)** Fragmento criopreservado e xenotransplantado por via subcutânea. Magnitude: 10×. Barras: 250 µm.

Na quantificação das células presentes, foi observado diferença ($p < 0,05$) dos fibroblastos do XenoIP em relação ao XenoSC e o Descongelado, sendo que esses dois não tiveram diferença entre si (Tabela 7). Dessa mesma forma, o XenoIP obteve menor quantidade de condrócitos normais e maior quantidade de Lacunas vazias em relação ao descongelado, que por sua vez foi semelhante ao XenoSC nessas duas análises.

Tabela 7. Quantificação do número de células presentes na derme e cartilagem de tecidos somáticos da região auricular de onça-pintada (Atrop3) após descongelamento e xenotransplante por via intraperitoneal (XenoIP) e subcutânea (XenoSC).

Animais	Grupos	Fibroblastos	Condrócitos		Lacunas	
			Normais	Degenerados	Preenchidas	Vazias
Atrop 3	Descongelado	$6,5 \pm 3,54^a$	$24,6 \pm 3,50^a$	$43,5 \pm 7,14$	$68,1 \pm 10,4$	$2,1 \pm 3,00^b$
Atrop 3	Xeno. IP	$1,75 \pm 1,86^b$	$15,2 \pm 9,42^{b,c}$	$47,4 \pm 16,1$	$62,6 \pm 17,2$	$13,6 \pm 9,49^{a,c}$
Atrop 3	Xeno. SC	$7,4 \pm 4,67^a$	$21,0 \pm 8,08^{a,c}$	$39,8 \pm 9,84$	$60,8 \pm 12,0$	$8,65 \pm 5,71^{b,c}$

^{a,b,c}: Letras diferentes na mesma COLUNA (a, b, c) indicam diferença ($p < 0,05$).

Após o cultivo dos tecidos a fresco, as células levaram 14 e sete dias para se soltar, nos animais Atrop2 e Atrop3, respectivamente. Por outro lado, nos tecidos descongelados, levaram mais de 60 dias para se soltar no Atrop2 e 39 dias no Atrop3; e 13 e cinco dias nos tratamentos de xenotransplante (Atrop2 e Atrop3, respectivamente). Desta forma, não foi possível incluir o tratamento Descongelado na análise da viabilidade das células somáticas entre os tratamentos de cada animal, pois os explantes não tinham liberado os fibroblastos, sendo que todos os tratamentos do XenoIP e XenoSC já estavam na terceira passagem (Figura 8).

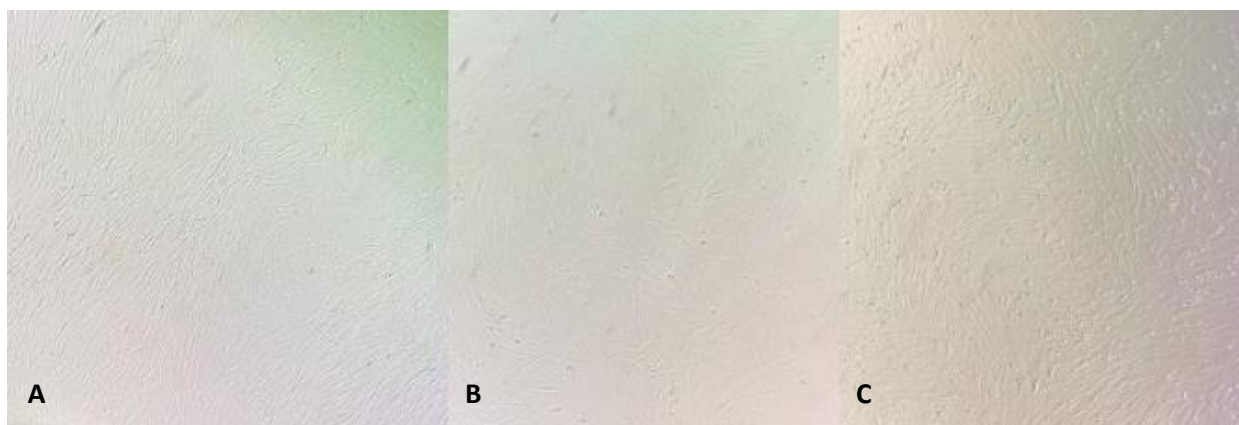


Figura 8. Cultivo de células somáticas após xenotransplante. **(a)** células do tecido cultivado a fresco, **(b)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via subcutânea e cultivado, **(c)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via intraperitoneal e cultivado. Magnitude: 10x. Fonte: Reprogen.

Os dados de viabilidade com o Azul de Tripano (Vbat), Citometria de Fluxo (Figura 9) (Vbcit) e Laranja de acridina (Vblacr) (Figura 10) dos tratamentos XenolP e XenoSC de todos os animais, não diferiram estatisticamente entre eles e principalmente não tiveram diferença em relação ao tratamento Fresco (Tabela 8).

Tabela 8. Análise da viabilidade de fibroblastos de onças-pintadas pelos testes de Azul de tripan (Vbat), Citometria de fluxo (Vbcito) e Laranja de acridina (Vblacr) entre os tratamentos fresco, xenotranplante intraperitonial (Xeno.P) e xenotransplante subcutâneo (XenoSC). Dados em mediana.

Animal	Grupos	VIABILIDADE		
		Vbat (%)	Vbcito (%)	Vblacr (%)
Atrop 1	Fresco	90,78	97,92	74
	Xeno. IP	92	87,95	88,995
	Xeno. SC	94,815	94,57	91
Atrop2	Fresco	97,58	84,22	64
	Xeno. IP	97,56	86,535	70,5
	Xeno. SC	99,675	96,365	87
Atrop3	Fresco	96,42	87,67	77
	Xeno. IP	85,005	95,96	74
	Xeno. SC	83,33	90,695	70

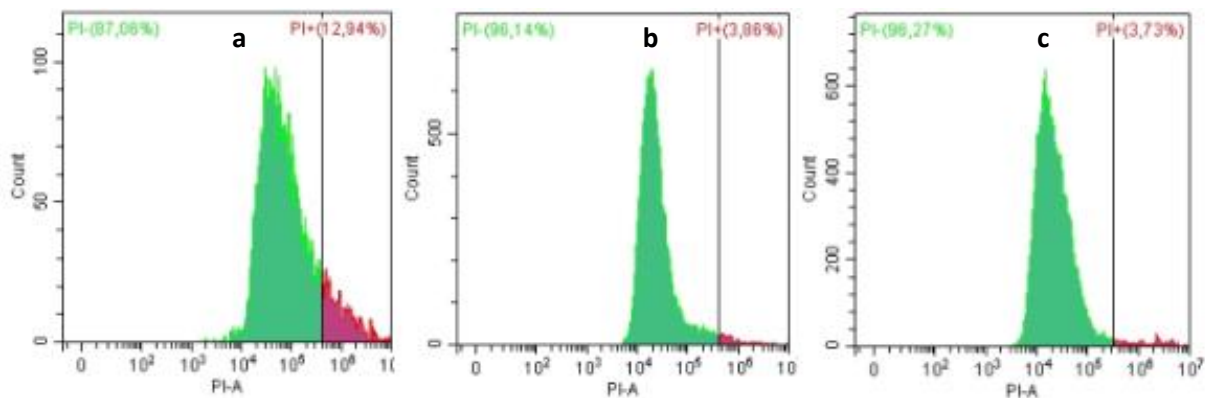


Figura 9. Análise pela citometria de fluxo com as sondas fluorescentes Hoechst33342 + iodeto de propídio. **(a)** células do tecido cultivado a fresco, **(b)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via subcutânea e cultivado, **(c)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via intraperitoneal e cultivado.

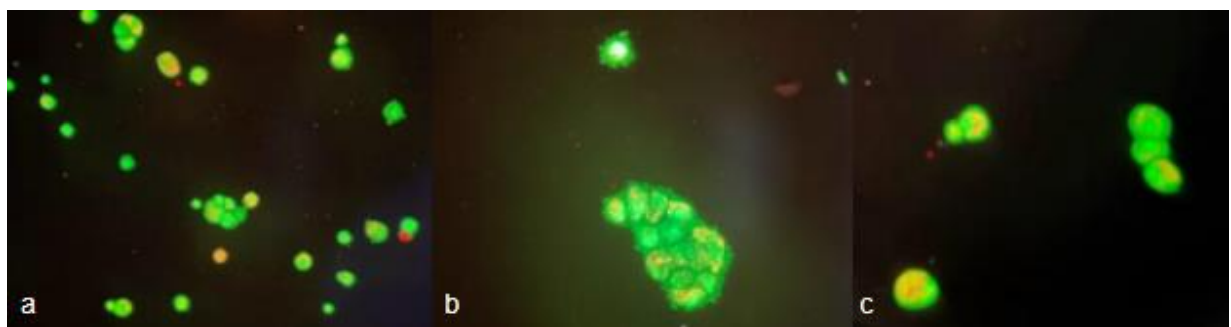


Figura 10. Teste de necrose e apoptose através das sondas fluorescentes laranja de acridina + iodeto de propídio. **(a)** células do tecido cultivado a fresco, **(b)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via subcutânea e cultivado, **(c)** células do tecido criopreservado, xenotransplantado por via intraperitoneal e cultivado. Magnitude: 200x. Fonte: Reprogen.

5.4. DISCUSSÃO

O presente trabalho relata o primeiro sucesso na produção de células somáticas de onças-pintadas de vida livre mortas por colisão veicular, criando um protocolo que possibilitará a revitalização do material biológico de animais atropelados, minimizando o impacto das perdas de animais nas rodovias.

Um grande problema da utilização de material biológico para biobanco de animais atropelados é o tempo entre o óbito, a coleta e o cultivo do tecido. A maioria das colisões de veículos com animais selvagens são relatadas no período noturno entre o anoitecer e a meia noite, como também no amanhecer até as 9:00 da manhã (ABRA et al., 2019). Segundo Abra et al. (2021) o momento da colisão veicular está principalmente relacionado ao período de atividade da espécie e ao volume de

tráfego. No Pantanal, foi relatado picos de maior atividade de onças-pintadas antes do amanhecer (entre 03:30 e 6:00h) e depois do crepúsculo (das 18:30 às 21:00h) (QUIGLEY & CRAWSHAW, 1992). Dessa forma, a estimativa do tempo do óbito dos animais do presente estudo até o recebimento dos tecidos no laboratório, foi de aproximadamente 24 horas. Infelizmente no presente trabalho não é possível determinar o tempo de óbito dos animais, mas segundo relatos dos agentes da Polícia Ambiental do Mato Grosso do Sul (PMA-MS) que removeram os animais, já haviam se passado um longo período pois todos os animais apresentavam início de decomposição.

Outro ponto importante foi a escolha do tecido a ser coletado dos animais atropelados. Como o animal após óbito não possui mais circulação sanguínea ativa e os tecidos mais vascularizados sofrem mais com a hipóxia, o tecido cartilaginoso da orelha torna-se uma importante opção por ter o metabolismo mais baixo e maior resistência a isquemia (SAUERESSIG et al., 2003). Além disso, Santos et al (2021) avaliaram a qualidade de tecidos de orelha, cauda e região femoral de onça-pintada após a vitrificação em superfície sólida (SSV) e observaram que o tecido da orelha pode ser utilizado em biobanco.

No presente trabalho, foi observado pela avaliação histológica que o protocolo de vitrificação SSV foi capaz de preservar os fibroblastos presentes no pericôndrio e os condrócitos normais em todos os animais. Esse é um achado muito importante, pois muitas das vezes é impossível realizar o cultivo a fresco do tecido do animal atropelado, e a criopreservação acaba sendo a única opção, além disso é uma técnica prática e de baixo custo. Segundo Praxedes et al. (2019), a técnica de vitrificação em superfície sólida é a mais indicada para criopreservação de amostras de pele de onça-pintada.

Como o tempo do óbito interfere diretamente na viabilidade do tecido, podendo inviabilizar o seu uso em biobanco, o presente trabalho avaliou a utilização de xenotransplantes na revitalização dos tecidos descongelados. A utilização de xenotransplantes está muito relacionada a transplantes de tecidos ovarianos e testiculares, obtendo resultados satisfatórios (PARIS et al., 2004). Os principais sítios de transplante em camundongos imunodeficientes têm sido a cápsula renal e a bolsa ovariana (DATH et al., 2010). No presente trabalho, devido ao tamanho

dos fragmentos (9 mm²), foram utilizados o subcutâneo e a musculatura abdominal para a colocação dos explantes. Além disso, por se tratar de animais imunodeficientes, é necessário estabelecer um cuidado maior com o tecido durante seu processamento, a fim de minimizar contaminações por presença bacteriana e/ou fúngica, e que poderia acarretar até a perda do animal que recebeu o enxerto do tecido.

No animal Atrop1, o grupo XenoSC obteve maior quantidade de fibroblastos e condrócitos normais e menor quantidade de condrócitos degenerados em comparação ao grupo Descongelado ($p<0,05$). Já o grupo XenoSC do animal Atrop3 obteve a quantidade de fibroblastos, condrócitos normais, condrócitos degenerados, lacunas preenchidas e lacunas vazias semelhantes às do grupo Descongelado. O animal Atrop2 foi o único que foi possível comparar o grupo Fresco com os grupos Descongelado, XenoIP e XenoSC. Nas análises foi observado que o XenoSC foi o único tratamento semelhante ao grupo Fresco em relação a quantidade de fibroblastos, condrócitos normais, condrócitos degenerados, lacunas preenchidas e lacunas vazias. Já no grupo Descongelado a quantidade de fibroblastos foi menor ($p<0,05$) em relação ao grupo Fresco. Em todos os animais, o grupo XenoIP difere significativamente em relação ao XenoSC na quantidade de fibroblastos, mostrando que o XenoSC é o melhor local para o transplante do explante, o que pode ser explicado pelo maior contato do fragmento com o local de enxertia (subcutâneo e musculatura), além de que a cartilagem se encontra, também, entre dois tecidos.

Os resultados da avaliação histopatológica e da quantificação celular do presente trabalho, mostra que o grupo XenoSC de todos os animais, apresentou um efeito positivo do xenotransplante no subcutâneo na manutenção da viabilidade celular e quantidade de fibroblastos, possibilitando a utilização dessas células em pesquisas de reprogramação nuclear, visando à conservação das espécies. Além disso, esses dados da histopatologia e quantificação das células indicam que o animal Atrop3 possivelmente teve o maior tempo *post-mortem*.

Os dados de quantidade de fibroblastos do XenoSC do animal Atrop2 (28,4) foram semelhantes à média de 21,7 fibroblastos observados por Praxedes et al. (2019) e a média de 26,6 observada por Santos et al. (2021.), que também

realizaram a VSS para tecido da cartilagem de orelha de onças-pintadas. Os resultados da análise histológica do presente trabalho foram animadores, pois mostraram que é possível utilizar material biológico para Biobanco de animais mortos que já estavam em estágio de decomposição. Existe alguns trabalhos comparando a viabilidade de tecidos de animais mantidos em refrigeração a 4°C em diferentes horas e a qualidade dos fibroblastos (CAPUTCU et al., 2012), bem como avaliando a viabilidade de tecido descongelado de onça-pintada morta em cativeiro, após sete dias refrigerado a 4°C (SANTOS et al., 2021). No entanto, o presente trabalho é o primeiro a avaliar a revitalização de tecidos de onças-pintadas em estágio de decomposição.

Apesar da avaliação histológica já demonstrar com sucesso a revitalização dos tecidos do presente trabalho, era importante também avaliar a capacidade de cultivar as células somáticas e determinar sua viabilidade em cada tratamento. Na avaliação da viabilidade das células provenientes dos explantes dos animais atropelados, não foi possível incluir o grupo Descongelado, pois não tinham liberado as células somáticas no período em que foram realizadas as avaliações, sendo que os grupos XenoIP e XenoSC de todos os animais já estavam na terceira passagem. Essa observação já é um indicativo da qualidade superior dos grupos Fresco e Xenotransplantes em relação ao Descongelado.

Em relação ao cultivo in vitro das células somáticas, optou-se por utilizar um meio de cultivo com maior quantidade de soro fetal bovino (15%), sendo 5% a mais de soro em relação ao protocolo de Silva et al. (2021) em onças-pintadas, a fim de melhorar o cultivo das células. Em nenhum animal foi observada diferença significativa entre os grupos Fresco e os XenoIP e XenoSC ($p < 0,05$). Além disso, foi observado em todos os animais que os dados de viabilidade com azul de tripano e de citometria de fluxo do grupo Fresco (Atrop1 – Vbat: 90,78/ Vbcito: 97,92; Atrop2- Vbat: 97,58/ Vbcito: 84,22; Atrop3 – Vbat: 96,42/ Vbcito: 87,67) foram aproximadamente semelhantes ao encontrado por Silva et al. (2021) a fresco ($92.5\% \pm 6.2$). No entanto, os dados de todas as análises de viabilidade do presente trabalho nas células somáticas para XenoIP e XenoSC de todos os animais, foram numericamente superiores ao encontrado por Silva et al. (2021) no descongelado (Azul de tripano: $73.2\% \pm 9.8$ e viáveis no Laranja de acridina: 59.3 ± 2.9). Dessa forma, os presentes dados de viabilidade para células somáticas de todos os

animais e dos tratamentos, demonstram que é possível obter células com qualidade de animais mortos em estágio de decomposição semelhantes aos de animais vivos. Além disso, o xenotransplante de tecidos de onças-pintadas no subcutâneo e na região intraperitoneal de camundongos NSG possibilitou a obtenção dessas células com a mesma qualidade de tecido cultivado de animais vivos.

Esses dados comprovam que é possível aproveitar o tecido para cultivo celular e formação de biobanco de animais mortos encontrados em rodovias, bem como a utilização de xenotransplante como mais uma ferramenta para o aproveitamento de tecidos com viabilidade celular desconhecida.

5.5. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados encontrados, podemos concluir que o xenotransplante de cartilagem auricular de onças-pintadas em camundongos imunodeficientes se mostrou viável para revitalização de tecidos provenientes de animais mortos por colisão veicular, assim como também foi possível a obtenção de células somáticas de onças-pintadas *post-mortem* em estágio inicial de decomposição. O xenotransplante dos tecidos vitrificados é capaz de melhorar sua qualidade, resultando em maior eficiência do cultivo e retomando a qualidade das células a níveis semelhantes ao tecido a fresco.

5.6. REFERÊNCIAS

- ABRA, F.D., GRANZIERA, B.M., HUIJSER, M.P., DE BARROS, K.M.P.M., HADDAD, C.M., PAOLINO, R.M., 2019. Pay or prevent? Human safety, costs to society and legal perspectives on animal-vehicle collisions in São Paulo state, Brazil. **PloS One** 14 (4), e0215152
- ABRA, F. D., HUIJSER, M. P., MAGIOLI, M., BOVO, A. A. A., & FERRAZ, K. M. P. M. DE B. (2021). **An estimate of wild mammal roadkill in São Paulo state, Brazil.** Heliyon, 7(1), e06015. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06015
- ARANTES, L. G., TONELLI, G. S. S. S., MARTINS, C. F., & BÁO, S. N. (2021). Cellular Characterization and Effects of Cryoprotectant Solutions on the Viability of Fibroblasts from Three Brazilian Wild Cats. **Biopreservation and Biobanking.** doi:10.1089/bio.2020.0059

1652 ASCENSÃO, F., & DESBIEZ, A. L. (2022). Assessing the impact of roadkill on the
 1653 persistence of wildlife populations: A case study on the giant
 1654 anteater. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 20(3), 272-278.

1655 BEISIEGEL, B. M., SANA, D. & MORAES, E. JR The jaguar in the Atlantic Forest.
 1656 **Cat News** 7, 14–18 (2012).

1657 CEBALLOS, G., EHRLICH, P. R., & DIRZO, R. (2017). Biological annihilation via
 1658 the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and
 1659 declines. **Proceedings of the national academy of sciences**, 114(30), E6089-
 1660 E6096.

1661 COSTA, I. M. D. C., FERREIRA, M. S., MOURÃO, C. L. B., & BUENO, C. (2022).
 1662 Spatial patterns of carnivore roadkill in a high-traffic-volume highway in the
 1663 endangered Brazilian Atlantic Forest. **Mammalian Biology**, 102(2), 477-487.

1664 DATH, C., VAN EYCK, A. S., DOLMANS, M. M., ROMEU, L., DELLE VIGNE, L.,
 1665 DONNEZ, J., & VAN LANGENDONCKT, A. (2010). Xenotransplantation of human
 1666 ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. **Human**
 1667 **reproduction**, 25(7), 1734-1743.

1668 FAHRIG, L., & RYTWINSKI, T. (2009). Effects of roads on animal abundance: an
 1669 empirical review and synthesis. **Ecology and society**, 14(1).

1670 GONZÁLEZ-SUÁREZ, M., ZANCHETTA FERREIRA, F., & GRILO, C. (2018).
 1671 Spatial and species-level predictions of road mortality risk using trait data. **Global**
 1672 **Ecology and Biogeography**, 27(9), 1093-1105.

1673 HAAG T, SANTOS AS, SANA DA, MORATO RG, CULLEN L Jr, et al. (2010) The
 1674 effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of
 1675 diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest
 1676 jaguars (*Panthera onca*). **Mol Ecol** 19: 4906–4921.

1677 JĘDRZEJEWSKI, W., ROBINSON, H. S., ABARCA, M., ZELLER, K. A.,
 1678 VELASQUEZ, G., PAEMELAERE, E. A., ... & QUIGLEY, H. (2018). Estimating large
 1679 carnivore populations at global scale based on spatial predictions of density and
 1680 distribution—Application to the jaguar (*Panthera onca*). **PloS one**, 13(3), e0194719.

MASTROMONACO, G. F.; SONGSASEN, N. **Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species**. [s.l.] : INC, 2020. v. 2 DOI: 10.1016/b978-0-12-817107-3.00007-2.

MESTRE-CITRINOVITZ, A.C., SESTELO, A., CEBALLOS, M.B., BARANAO, J.L., AND SARAGUETA, P. 2016. Isolation of primary fibroblast culture from "wildlife: the Panthera onca case to preserve a south American endangered species. **Curr. Protoc. Mol. Biol.** 116:28.7.1-28.7.14. doi: 10.1002/cpmb.25

MORATO RG, STABACH JA, FLEMING CH, CALABRESE JM, DE PAULA RC, FERRAZ KMPM, ET AL. Space Use and Movement of a Neotropical Top Predator: The Endangered Jaguar. **PLoS ONE** 11(12): e0168176. doi:10.1371/journal.pone.0168176. 2016.

PARIS, M. C., SNOW, M., COX, S. L., & SHAW, J. M. (2004). Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. **Theriogenology**, 61(2-3), 277-291.

PAVIOLO, A., DE ANGELO, C., FERRAZ, K. et al. A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. **Sci Rep** 6, 37147 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37147>

PINTO, F. A. S., CIRINO, D. W., CERQUEIRA, R. C., ROSA, C., & FREITAS, S. R. (2022). How many mammals are killed on brazilian roads? Assessing impacts and conservation implications. **Diversity**, 14(10), 835.

PRAXEDES, É.A; DE OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A; SANTOS, M.V.O.; SILVA, H.V.R.; DE OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F.. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). **Cryobiology**, [S. l.], v. 88, n. January, p. 15–22, 2019. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.04.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.04.007>.

PEREIRA, A. F., BORGES, A. A., PRAXEDES, E. A., & SILVA, A. R. (2018). Use of somatic banks for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals – A review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 42, 104–108.

QUIGLEY, H.B. & CRAWSHAW, P.G., A conservation plan for the jaguar *Panthera onca* in the Pantanal region of Brazil, **Biological Conservation**, Volume 61, Issue

3, 1992, Pages 149-157, ISSN 0006-3207, [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(92\)91111-5](https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91111-5).

ROY, U., & KSAIBATI, K. (2021). Investigating trends and characteristics of animal-vehicle crashes in Wyoming. **Journal of Sustainable Development of Transport and Logistics**, 6(2), 25- 42. doi:10.14254/jsdtl.2021.6-2.2.

SANTOS, M. D. C. B., AQUINO, L. V. C., NASCIMENTO, M. B., SILVA, M. B., RODRIGUES, L. L. V., PRAXEDES, É. A., ... PEREIRA, A. F. (2021). Evaluation of different skin regions derived from a postmortem jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), after vitrification for development of cryobanks from captive animals. **Zoo Biology**, 40(4), 280–287. doi:10.1002/zoo.21605

SAUERESSIG, M. G., MORESCHI, A. H., BARBOSA, G. V., EDELWEISS, M. I., DE SOUZA, F. H., SAVEGNAGO, F. L., & DE MACEDO NETO, A. V. (2003). **Rejection and Indirect Revascularization of Glycerin-Preserved Tracheal Implant**. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 11(3), 237–244. doi:10.1177/021849230301100313

SILVA, M. B., PRAXEDES, É. A., BORGES, A. A., OLIVEIRA, L. R. M., NASCIMENTO, M. B., SILVA, H. V. R., ... PEREIRA, A. F. (2021). Evaluation of the damage caused by in vitro culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. **Zoo Biology**, 40(4), 288–296. doi:10.1002/zoo.21606

SRBEK-ARAUJO, A. C. & CHIARELLO, A. G. Population status of the jaguar *Panthera onca* in one of its last strongholds in the Atlantic Forest. **Oryx**, doi: 10.1017/S0030605315001222 (2016).

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 1997.

6. CONSIDERAÇÕES

Ao abordarmos os problemas encontrados a respeito da onça-pintada, sendo eles a diminuição da população e uma queda na variabilidade genética,

somada ao uso das biotecnologias de reprodução assistida para minimizar essa questão, entramos na formação dos biobancos, que permite o armazenamento de material genético por tempo indeterminado e permite ainda a translocação do mesmo sem a necessidade de transportar o animal. Apesar do uso do congelamento lento através do equipamento Mr. Frosty ser o mais tradicional, a necessidade de um ultrafreezer e a quantidade de material estocada a longo prazo acaba inviabilizando a formação dos biobancos. Através da criopreservação rápida no vapor de nitrogênio utilizando palhetas plásticas, há a otimização de espaço ao armazenar grandes quantidades de material genético. Para o caso do xenotransplante de tecido de animais mortos através das colisões veiculares, é uma alternativa para revitalização do material em decomposição e do material criopreservado. Para as três onças-pintadas atropeladas, foi possível obter células somáticas com qualidade e, assim, preservar a genética desses animais.

7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

O presente trabalho relata o primeiro sucesso na produção de células somáticas de onças-pintadas de vida livre mortas por colisão veicular, criando um protocolo que possibilitará a conservação de material biológico de animais atropelados, revitalizando o tecido que seria perdido, minimizando o impacto das perdas genéticas de animais nas rodovias.