



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS OBTIDAS A  
PARTIR DE FEZES DE CAPRINOS COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA  
ESPÉCIES SILVESTRES**

**AREIA  
2022**

**MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS OBTIDAS A  
PARTIR DE FEZES DE CAPRINOS COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA  
ESPÉCIES SILVESTRES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Colegiado do Curso de  
Zootecnia no Centro de Ciências Agrárias  
da Universidade Federal da Paraíba, como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de graduado em Zootecnia

**Orientador (a):** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Diniz Rola

**AREIA  
2022**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586i Silva, Mirta Oliveira Gomes da.

Isolamento, cultivo e criopreservação de células obtidas a partir de fezes de caprinos: um modelo experimental para espécies silvestres / Mirta Oliveira Gomes da Silva. - Areia:s.n, 2022.

44 f. : il.

Orientação: Luciana Diniz Rola.  
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Cervídeos. 3. Citogenética. 4. Viabilidade celular. 5. Germoplasma. 6. Conservação. I. Rola, Luciana Diniz. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 626(02)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ZOOTECNIA

## DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Aprovada em 14/12/2022.

**“ISOLAMENTO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS  
OBTIDAS A PARTIR DE FEZES DE CAPRINOS: UM MODELO  
EXPERIMENTAL PARA ESPÉCIES SILVESTRES.”**

Autor: MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA

Banca Examinadora:

---

Prof. Dra. Luciana Diniz Rola  
Orientador (a) – UFPB

---

Prof. Dra. Danila Barreiro Campos  
Examinador (a) – UFPB

---

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo  
Examinador (a) – UFPB

Deus, minha família e amigos, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelos livramentos e por ter me sustentado sempre, mas principalmente enquanto buscava alcançar meus sonhos.

Aos meus pais e ao meu irmão por sempre estarem ao meu lado, por me apoiarem e sempre acreditarem em mim, possibilitando de todas as formas possíveis que eu corresse atrás dos meus objetivos. Gratidão nunca será o suficiente para expressar o que sinto por vocês, amo muito vocês três.

Aos meus amigos/irmãos Matheus e Milena, por todas as vezes que me fizeram rir, que acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditava e me apoiaram durante toda a caminhada, até — e principalmente — nas horas de surto (meu e de vocês). Vocês transformaram o fardo em leveza e eu agradeço muito a vocês por isso, por todo carinho e até pelas “esculhambações”. Vocês sempre serão especiais pra mim e agradeço todas as horas que vocês seguraram minha mão. O trio de ouro, o trio dos selvagens. Amo vocês.

A formação original e inicial do MSL, Vanessa e Léo, por toda a ajuda, todas as longas horas coletando fezes dentro das baias e processando nos laboratórios alheios. À Isabela (*a.k.a* Isão/Belinha/Belão/Manu) que fez toda a diferença no final da minha graduação. As sextas nunca terão tanta graça quanto as idas ao abatedouro (ironicamente), o tempo passado no laboratório falando “aresia” e surtando por um milhão de motivos diferentes, as viagens à Puxinanã ficaram marcadas na história. Obrigada por ensinar de um jeito simples e fácil, por cada risada, por todo apoio, mesmo com muitos surtos no caminho. Que a vida melhore e o azar diminua, obrigada por tanto, cobra snake!

Aos amigos que fiz no Zoológico da Bica, a “minha turma” (Alê, Élide, Bia, Pamzinha, Gabi, Débora), vocês transformaram aquele estágio em algo inesquecível, uma experiência que vou levar pra sempre no meu coração com muito carinho, os meses de pandemia e trabalho não teriam sido os mesmos sem vocês. Amo vocês, meu povo! Aos técnicos de lá por todos os inúmeros ensinamentos (Cíntia, Ingrid, Paola, Helze, Thiago e Kléber), a chance de estagiar com vocês mudou minha perspectiva em muitos sentidos, pessoal e profissionalmente. Agradeço em especial a Bióloga Marília Maia, por ter acreditado e confiado em mim, por ter se tornado uma grande amiga e incentivadora. Te admiro demais e tenho muito orgulho de você! Obrigada por tanto, Ma, te amo!

Agradeço a Ana (Lígia), por todas as conversas aleatórias que iam desde a manhã inteira até altas horas da madrugada, por todas as vezes que ouviu meus inúmeros surtos, questionamentos e desventuras tentando ser uma adulta funcional (principalmente na

cozinha). Todos os incontáveis áudios trocados no dia-a-dia ao longo desses cinco anos significaram o mundo pra mim, nem parecia que tantos quilômetros nos separavam e ter alguém pra contar sobre as loucuras da vida foi um alívio. Que venham mais anos de amizade (mesmo que seja a distância).

Às minhas Fernandas (Nanderson e Nanda-san), Faby e Gabi por todas as conversas (até as mais aleatórias e doidas) e por terem transformado a vida em algo leve há tantos anos de caminhada juntas (mesmo que separadas). À Taylor Swift, Coldplay, Mayday Parade e Sleeping at Last (que nunca vão saber disso, mas...) por serem a trilha sonora da minha vida, por terem me feito companhia em todos os momentos e terem calado a minha mente sempre que eu precisava.

A turma 2017.1 por terem seguido na batalha da graduação junto comigo, sempre apoiando uns aos outros na medida do possível. Tinha que ser vocês ou esses 5 (longos) anos não teriam sido tão incríveis. Em especial a Lays (Laiorayne, Lauraline, Lorraine, etc.) por ter sido minha primeira e melhor amiga em Areia, minha duplinha em todos os momentos, quem sempre me incentivou e quem nunca mediu esforços pra me ajudar em qualquer situação. Obrigada Chris/Greg!

Agradeço as Rolinhas (Elias, Layla, Kin, Matheus, Milena e Lays) pela amizade durante esses anos todo e por terem topado entrar de cabeça e formar o GEAS no CCA.

Ao GEAS UFPB/CCA por ter sido uma fonte imensa de aprendizado. Aprendi a liderar, a ir atrás dos meus objetivos, perder a vergonha de falar com o público. Minha graduação não teria sido a mesma sem vocês, todos que passaram pelo grupo contribuíram de alguma forma com minha formação como profissional e pessoa.

Agradeço ao Centro de Ciências Agrárias que passou de um lugar imenso desconhecido para minha segunda casa. A todos os professores da Zootecnia por quem passei nesses anos, o conhecimento que vocês transmitiram ao longo da graduação serão guardados para sempre.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de iniciação científica que originou uma parte desse trabalho e aos professores da banca examinadora, prof<sup>a</sup>. Danila e prof. Mailson pelo tempo dedicado e pelas sugestões que agregaram muito ao trabalho.

Por último, mas jamais menos importante, imensa gratidão à minha orientadora Luciana Diniz, por ter confiado a minha primeira IC sendo assim responsável por despertar minha paixão pela ciência. Agradeço por todas as oportunidades, conversas e por me guiar durante esses 4 anos de parceria. Eu não poderia ter escolhido orientadora melhor, profa. Muito obrigada por tudo!

*In the end, we will conserve only what we love; we will love only what we understand and we will understand only what we are taught.*

— Baba Dioum

## RESUMO

Dentro da região neotropical existem 17 espécies de cervídeos, sendo que nove delas ocorrem em território nacional. Essas espécies têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia e, conseqüentemente, maior risco de extinção. O presente trabalho objetivou realizar a obtenção, isolamento, cultivo e criopreservação de células somáticas obtidas a partir de fezes de caprinos. Observou-se que a grande maioria das células analisadas se tratavam de colonócitos, tanto isolados quanto agregados, além de que quanto mais escuro foi classificado o pellet, maior foi a quantidade de células totais e viáveis obtidas, sugerindo que a presença do material fecal não afetou na qualidade das células, não ocasionando uma mortalidade delas. O tempo teve efeito significativo negativo sobre a quantidade de células totais e viáveis obtidas, ou seja, quanto mais tempo se passou do momento da defecação até a avaliação, menor a quantidade de células obtidas e de células viáveis. Além disso, foi observado que metade das células permaneceram viáveis após a criopreservação pelo método lento, utilizando o DMSO.

**Palavras-chave:** Cervídeos; citogenética; viabilidade celular; germoplasma; conservação.

## ABSTRACT

Within the Neotropical region there are 17 species of deer, nine of which occur in the national territory. These species have suffered pressures on their habitat, which causes segregation between populations, a decrease in gene exchange and genetic diversity, an increase in inbreeding and, consequently, a greater risk of extinction. The present work aimed to obtain, isolate, cultivate and cryopreservation of somatic cells obtained from feces of goats. It was observed that the vast majority of the cells analyzed were colonocytes, both isolated and aggregated, in addition to the fact that the darker the pellet was classified, the greater the amount of total and viable cells obtained, suggesting that the presence of fecal material did not affected the quality of the cells, not causing their mortality. Time had a significant negative effect on the amount of total and viable cells obtained, that is, the more time passed from the moment of defecation until the evaluation, the smaller the amount of cells obtained and viable cells. Furthermore, it was observed that half of the cells remained viable after cryopreservation by the slow method using DMSO.

**Keywords:** Cervidae; cytogenetics; cell viability; germplasm; conservation.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Média da quantidade de células viáveis obtidas a fresco e após o descongelamento ..... 37

**Tabela 2:** Médias da perda de viabilidade celular após a criopreservação com diferentes concentrações de DMSO ..... 38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espécies de cervídeos dos gênero <i>Mazama</i> (A, B, D e E) e <i>Subulo</i> (C) .....	14
<b>Figura 2:</b> Células (colonócitos) inviáveis coradas em azul (A) e viáveis (B) .....	29
<b>Figura 3:</b> Colonócitos observados no primeiro cultivo após 7 dias .....	34
<b>Figura 4:</b> Cultivo celular de colonócitos contaminado após 48h .....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1. Cervídeos neotropicais e suas questões taxonômicas .....	16
3.2. Metodologias não-invasivas para a conservação dos cervídeos neotropicais .....	18
3.3. Formação de bancos de germoplasma e criopreservação .....	19
3.4. Viabilidade celular e o ensaio de exclusão por corante azul de tripan .....	21
3.5. Histórico do cultivo celular .....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. Animais .....	23
4.2. Obtenção das amostras e viabilidade celular .....	24
4.3. Isolamento das células esfoliadas das fezes .....	25
4.4. Cultivo celular .....	25
4.5. Criopreservação celular e viabilidade pós-congelamento .....	26
4.6. Análise estatística .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
5.1. Viabilidade celular .....	27
5.2. Isolamento das células esfoliadas das fezes e cultivo celular .....	33
5.3. Criopreservação celular e viabilidade pós-congelamento .....	37
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>

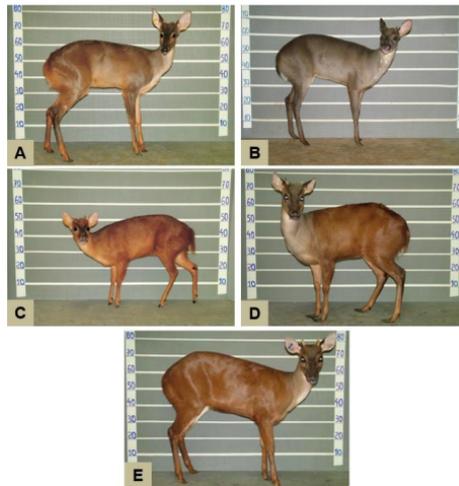
## 1. INTRODUÇÃO

Os cervídeos (família *Cervidae*) pertencem à ordem *Artiodactyla*, sendo animais ungulados de cascos pares (quatro dedos, sendo dois dedos de apoio), ruminantes da subordem *Ruminantia* e que possuem quatro compartimentos estomacais (DUARTE, 2014). Dentro da região neotropical existem 17 espécies de cervídeos, sendo que nove delas ocorrem em território nacional (*Blastocerus dichotomus*, *Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Mazama americana*, *Mazama jucunda*, *Subulo gouazoubira*, *Mazama rufa*, *Mazama nana* e *Mazama nemorivaga*) (DUARTE, 2014). Essas espécies têm sofrido pressões sobre seu habitat, o que provoca segregação entre populações, diminuição de troca gênica e de diversidade genética, aumento da endogamia e, conseqüentemente, maior risco de extinção (DUARTE, 2005).

A redução nas áreas de distribuição de espécies de cervídeos que vivem em regiões neotropicais varia entre 40 e 90% (WEBER; GONZÁLEZ, 2003) e coloca essas populações em uma situação de conservação consideravelmente pior quando comparada aos demais mamíferos no mundo. Considerando os mamíferos de forma global, há uma taxa de 25% de espécies ameaçadas e 15% classificadas como dados deficientes (SCHIPPER *et al.*, 2008). Já os dados referentes especificamente aos cervídeos neotropicais mostram que 53% das espécies se encontram sob algum grau de ameaça e 17,6% se encontram como dados deficientes, devido à escassez de estudos para afirmar sua real situação (IUCN, 2021). Com a obtenção de mais informações a respeito destas espécies e a conseqüente atualização de sua taxonomia, é esperado que o número de cervídeos neotropicais ameaçados seja maior do que o relatado atualmente (DUARTE; JORGE, 1996; GROVES; GRUBB, 1987).

As questões taxonômicas relacionadas aos cervídeos da região neotropical se dão principalmente devido a fragilidade cromossômica acentuada que é encontrada nessas espécies, o que os leva a apresentarem uma das taxas de evolução cariotípica mais elevadas entre os mamíferos (DUARTE *et al.*, 2008; VARGAS-MUNAR, 2003). Salviano *et al.* (2017) e Cursino *et al.* (2014) observaram que o cruzamento entre indivíduos *M. americana* com diferentes constituições cromossômicas resultou no nascimento de indivíduos inférteis ou sub-férteis, demonstrando haver isolamento reprodutivos entre eles. Tais fatos confirmam uma barreira reprodutiva existente e indicam a existência de várias espécies ainda não descritas (complexo críptico de espécies com homoplasia morfológica).

**Figura 1.** Espécies de cervídeos dos gênero *Mazama* (A,B,D e E) e *Subulo* (C)



Fonte: NETO, 2016.

Assim, a citogenética (ramo de estudo dos cromossomos) é uma ciência fundamental para a resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Mazama* e consequente descrição de novas espécies, considerando a dificuldade em diferenciá-las por outras metodologias. Contudo, para que seja feito uso da citogenética como ferramenta para a resolução de problemas taxonômicos, não é possível fazer uso de amostras de museu ou produtos de caça. Para tanto, se faz necessária a colheita de material de indivíduos vivos ou recém abatidos, uma vez que é imprescindível o uso de células vivas para obtenção das preparações. As células precisam ser mantidas em cultivo e são submetidas a determinados tipos de agentes químicos ou condições específicas de cultivo celular, que possibilitem a execução de diferentes técnicas (VERMA; BABU, 1995).

A obtenção de células vivas também se insere como uma ferramenta extremamente relevante na preservação da diversidade genética, que é um dos pilares para a conservação de espécies ameaçadas. Os bancos de germoplasma podem minimizar os efeitos das pressões de seleção não naturais, da deriva genética e endogamia (WILDT *et al.*, 1997). Eles são compostos tipicamente por sêmen, oócitos, embriões e fibroblastos criopreservados. Associado as biotécnicas de reprodução assistida, esses bancos auxiliam o manejo reprodutivo, promovem a manutenção da variabilidade genética mesmo após a morte dos indivíduos e também a reprodução igualitária dos animais (HOLT; PICKARD, 1999; WILDT, 1989).

Devido à facilidade na obtenção e criopreservação de tecidos e células quando comparadas a obtenção de gametas e embriões, estas fontes de material biológico são consideradas bastante promissoras. Além disso, diferentemente do que ocorre utilizando-se

células haplóides, com as células diplóides é possível que todos os alelos do indivíduo sejam retidos, maximizando a manutenção da diversidade genética.

Além das vantagens já citadas, podemos incluir outras como: possibilidade de multiplicar as células por meio de cultivo *in vitro* (diferentemente do que é possível com células haploides); torna desnecessária a contenção química/física dos animais sucessivas vezes (como é o caso para a obtenção de gametas e embriões); facilita obtenção de material de animais de vida livre, uma vez que não necessita do desenvolvimento de protocolos hormonais e métodos para a colheita dos gametas e embriões; torna possível a obtenção de materiais de animais logo após seu nascimento, nas quais ainda não há a produção de gametas, ou ainda de animais senis que dispõe de gametas com baixa qualidade; são de menor complexidade para a criopreservação e manutenção de viabilidade em relação aos gametas e embriões. Por fim, com a maior facilidade na obtenção de material de maneira menos invasiva, é possível formar bancos de germoplasma que sejam efetivamente representativos da diversidade genética das populações. Recentemente, trabalhos demonstraram a capacidade de recriar toda a gametogênese, inclusive a meiose, *in vitro* em camundongos, gerando crias saudáveis (HIKABE *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens na obtenção e uso das células viáveis para as espécies do gênero *Mazama*, métodos para sua consecução podem ser dificultados pela necessidade de captura dos animais. Além de algumas espécies serem extremamente raras, os veados deste gênero são característicos de ambientes florestais e possuem comportamento evasivo, sendo animais facilmente estressáveis, o que torna sua visualização e captura naturalmente difíceis. Devido à dificuldade em localizar os animais e a possibilidade dos indivíduos desenvolverem complicações graves decorrentes dos processos de captura (como o processo de miopatia) (CATÃO-DIAS; CAMARGO, 2010; DUARTE *et al.*, 2010) é preconizado o uso de metodologias não-invasivas para a obtenção de amostras.

A possibilidade na obtenção das células vivas a partir de uma fonte não-invasiva tornaria possível a obtenção de células de grande número de indivíduos de vida livre, o que garantiria material para estudos citogenéticos, bem como recursos genéticos representativos das populações selvagens sem que houvesse a necessidade de captura dos indivíduos. Entretanto, é necessário que seja desenvolvida uma metodologia eficiente para obtenção de células viáveis e que possa ser aplicada a campo. Apesar da importância em se trabalhar com as espécies de cervídeos, é interessante que espécies modelo sejam utilizadas nas primeiras abordagens do experimento, a exemplo das espécies domésticas (COMIZZOLI *et al.*, 2010), garantindo maior facilidade e controle na obtenção de amostras. Por isso, os caprinos se

apresentam como um modelo interessante para esta proposta, tanto por ser uma espécie taxonomicamente próxima, como pelo fato de manter a morfologia fecal bastante semelhante à dos cervídeos.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

- Realizar a obtenção, isolamento, cultivo e criopreservação de células somáticas obtidas a partir de fezes de caprinos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obter de células viáveis a partir das fezes de caprinos como um modelo de estudo em cervídeos;

- Estabelecer um método eficiente de isolamento das células obtidas a partir das fezes de caprinos utilizando o gradiente de densidade de Percoll;

- Testar o estabelecimento do cultivo celular em fezes frescas;

- Avaliar a viabilidade celular após processo de criopreservação utilizando 5% ou 10% de DMSO no meio de congelamento.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. CERVÍDEOS NEOTROPICAIS E SUAS QUESTÕES TAXONÔMICAS**

A família *Cervidae* apresenta história evolutiva com inúmeros questionamentos devido à inexistência da presença de fósseis na América Central, quando os indivíduos do gênero *Mazama* possivelmente migraram para a América do Sul (WEBB, 2000). De acordo com Webb (1991), os dois principais ramos dos cervídeos do Novo Mundo (pertencentes às tribos Rangiferina e Odocoileini) inicialmente se diversificaram há 3 milhões de anos, no final do período conhecido como Pleistoceno, se estabelecendo na América do Norte.

O Grande Intercâmbio Americano (Great American Interchange) refere-se a um significativo evento paleogeográfico no qual houve uma intensa migração da fauna pertencente à América do Norte para a América do Sul. Essa dispersão foi auxiliada pelo desenvolvimento de alguns eventos como o surgimento do istmo do Panamá, possibilitando então que mamíferos adaptados cruzassem do Norte para o Sul (DUARTE *et al.*, 2008; WEBB, 1991; WOODBURN, 2010). Dentre esses animais imigrantes, encontravam-se os

cervídeos que desenvolveram uma rápida dispersão e adaptação, ocupando variados nichos ecológicos ao longo do continente.

A região neotropical, que abrange quase toda a América Latina, é considerado um *hotspot* da biodiversidade de cervídeos, sendo o Brasil o país que detém o maior número de espécies tendo nove espécies reconhecidas (*Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Blastocerus dichotomus*, *Mazama nemorivaga*, *Subulo gouazoubira*, *M. nana*, *M. americana*, *M. rufa* e *M. jucunda*). Esses animais constituem dois grupos morfológicos diferenciados: (1) Espécies pequenas, com menos de 25kg e 60cm de altura na cernelha onde os machos não apresentam chifres ramificados cujo hábito está relacionado a vegetações densas; (2) espécies com estatura maiores, pesando acima de 25kg, nas quais os machos apresentam chifres ramificados, tendo seu hábito relacionado a ambientes abertos, com vegetação mais esparsas (DUARTE *et al.*, 2012).

Dentro da família *Cervidae* encontram-se cariótipos que variam de  $2n = 6$  (*Muntiacus muntjak*) a  $2n = 80$  (*Capreolus pygargus*) (NEITZEL, 1987). Essas variações ocorrem tanto em nível interespecífico, como também é possível observar polimorfismo cromossômico em nível intraespecífico, onde há disparidade no número de cromossomos e na presença (e quantidade) de cromossomos supranumerários. Dentro do gênero *Mazama*, ocorre uma variação cariotípica que vai desde  $2n = 32$  a  $2n = 70$ . Já na espécie *Mazama americana*, o número de cromossomos varia de  $2n = 42$  a 53, tendo sido encontradas 7 citótipos (variantes cariotípicas que se correlacionam com a localização geográfica do indivíduo) (ABRIL *et al.*, 2010). Devido a isso, diversos aspectos da taxonomia dessas espécies são discutíveis, como o número existente de subespécies ou quantas são as espécies que estão em situação crítica e por isso necessitam de mais atenção com o aumento de pesquisas relacionadas à elas.

Apesar de serem considerados jovens em escala evolutiva, os cervídeos apresentam um alto grau de diversificação cromossômica. De acordo com Fontana e Rubini (1990), ao analisarem os dados citogenéticos de diversas espécies e subespécies de cervídeos, os *Mazama* passaram por rearranjos complexos interespecíficos, entre eles as fusões em tandem e Robertsonianas, enquanto os do gênero *Odocoileus*, por exemplo, passaram por uma diferenciação com grau menos complexo durante seu processo evolutivo.

Os estudos cariotípicos ganham tal relevância para a resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Mazama* dada a possibilidade em definir o isolamento reprodutivo e conseqüentemente a validação de uma espécie. A semelhança morfológica existente para o táxon faz dela uma ferramenta pouco confiável para a diferenciação de espécies. O mesmo ocorre com estudos genéticos moleculares, onde frequentemente os resultados obtidos não

coincidem com as variações cromossômicas encontradas. Isso faz com que não seja possível identificar unidades evolutivas a partir de marcadores mitocondriais e nucleares, como foi o caso de estudos realizados na espécie *M. americana* (ABRIL *et al.* 2010; CIFUENTES-RINCÓN, 2016; MARAN, 2016).

### **3.2. METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO DOS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS**

Para que se faça uso da citogenética como ferramenta na resolução dos problemas taxonômicos, as células precisam ser mantidas em cultivo e submetidas a determinadas condições específicas de cultivo celular, que possibilitem a execução de diferentes técnicas (VERMA; BABU, 1995). Considerando as vantagens na aquisição de células vivas para as espécies do gênero *Mazama*, métodos que garantam sua obtenção devem ser cuidadosamente elaborados.

Entre as metodologias já desenvolvidas para a obtenção de amostras de forma não-invasiva, diversos materiais puderam ser obtidos, a exemplo de amostras de saliva, urina, casca de ovos, pele (no caso de serpentes), penas, pelos e fezes (TABERLET *et al.*, 1999). Muitos trabalhos se utilizam de fezes como um fonte para obtenção de DNA, entretanto, essa é uma matriz mais promissora do que se pensava inicialmente, já que alguns estudos que investigaram a natureza dos elementos celulares nas fezes notaram que é possível isolar células viáveis dessa fonte (ALBAUGH *et al.*, 1990; IYENGAR *et al.*, 1991). A grande maioria dos estudos para obtenção de células fecais realizados até o momento tem por objetivo auxiliar no diagnóstico de doenças em humanos, fornecendo uma imagem a respeito do epitélio colônico. A coprocitobiologia, o estudo de elementos celulares das fezes, é abordagem não invasiva da fisiopatologia gastrointestinal que pode ser utilizadas como substituta para biópsias de tecidos a fim de verificar alterações na expressão gênica, metilação do DNA, danos no DNA, expressão de proteínas e acúmulo de componentes da dieta (DAVIS, 2003; KAMRA *et al.*, 2005). Entretanto, para as análises preconizadas para o diagnóstico em humanos é necessário apenas que haja a integridade celular, não havendo interesse do cultivo celular posterior. O cultivo das células esfoliadas das fezes é desafiador considerando as dificuldades que envolvem o isolamento inicial das células em número adequado, a grande chance de contaminação dos cultivos, a heterogenia da população de celular obtida (o que dificulta a definição de um meio adequado para cultivo) e a sobrevivência das células após se destacarem do seu tecido de origem.

Com relação ao isolamento inicial das células, já foi estudado que as camadas superficiais das fezes fornecem uma fonte particularmente rica de células esfoliadas. A obtenção das células a partir da superfície das fezes oferece vantagens significativas em relação ao isolamento de células das fezes homogeneizadas em termos de rendimento, pureza e facilidade de recuperação (LOKTIONOV *et al.*, 1998). Entretanto, a obtenção das células esfoliadas da superfície pode ser bastante complexo para a maioria das espécies de mamíferos. Quando uma solução aquosa é utilizada para lavagem da superfície, as fezes absorvem água e formam uma pasta ou suspensão de material fecal. Entretanto, os cervídeos possuem grandes vantagens em relação a outras espécies, pois ao contrário do que ocorre com grande parte dos mamíferos que produzem fezes moles, os cervídeos produzem fezes em cíbalas, o que garante maior firmeza e facilidade na obtenção das células preconizadas. A possibilidade na obtenção das células vivas a partir de uma fonte não-invasiva tornaria possível a obtenção de células de grande número de indivíduos de vida livre, o que garantiria material para estudos citogenéticos, bem como recursos genéticos representativos das populações selvagens sem que houvesse a necessidade de captura dos indivíduos. Entretanto, é necessário que seja desenvolvida uma metodologia eficiente para obtenção de células viáveis e que possa ser aplicada a campo. Apesar da importância em se trabalhar com as espécies de cervídeos, é interessante que espécies modelo sejam utilizadas nas primeiras abordagens do experimento, a exemplo das espécies domésticas (COMIZZOLI *et al.*, 2010), garantindo maior facilidade e controle na obtenção de amostras.

### **3.3. FORMAÇÃO DE BANCOS DE GERMOPLASMA E CRIOPRESERVAÇÃO**

Atualmente as espécies silvestres sofrem extrema pressão antrópica. Uma das maiores ameaças à vida dos animais de vida livre é a diminuição dos seus *habitats* naturais devido a agropecuária predatória e pela indústria, resultando em fragmentação das florestas e consequentemente no isolamento e perda das espécies que antes eram abundantes, resultando na ameaça de extinção de uma grande variedade de espécies (WEMMER, 1998).

Tendo em vista o panorama ameaçador atual para os animais, os bancos de germoplasma surgem como uma opção para a conservação *ex situ* (medidas que são realizadas fora do *habitat* natural das espécies) de material genético, assim como os avanços das técnicas para criopreservação e as biotecnologias reprodutivas (HIEMSTRA *et al.*, 2005). Os bancos de germoplasma podem minimizar os efeitos das pressões dessa seleção não

natural, da deriva genética e da endogamia (WILDT *et al.*, 1997). Eles podem ser compostos por sêmen, oócitos, embriões e fibroblastos, podendo ser utilizados para caracterização molecular e também para o uso de técnicas como a transferência nuclear. Associados às biotécnicas de reprodução assistida, esses bancos auxiliam o manejo reprodutivo e promovem a manutenção da variabilidade genética mesmo após a morte dos indivíduos (HOLT; PICKARD, 1999; WILDT, 1989).

De acordo com Benford (1992) para ser possível o estudo genético das populações ameaçadas ou não, os bancos necessitam criopreservar gametas, zigotos e embriões da maior quantidade de espécies possíveis. Essa proposta surge com o objetivo de simplesmente evitar que os germoplasmas das espécies se percam para sempre. Holt *et al.* (2003) afirmam que a implementação inteligente dos bancos de germoplasma nos programas de reprodução tem como uma de suas vantagens o aumento no intervalo entre gerações e também do tamanho da população reprodutivamente viável, dessa forma as amostras criopreservadas seriam geneticamente equivalentes a animais vivos.

As células quando mantidas em cultivo durante períodos prolongados são induzidas a alterações uma vez que os processos de imortalização ocorrem durante várias gerações das células, ocasionando no risco de alterações no DNA. Por esse motivo é necessário o congelamento das células para que haja a diminuição ou atraso do surgimento dessas alterações em cultivo. A criopreservação celular é amplamente empregada no cultivo celular para o armazenamento prolongado das mesmas, mantendo o estoque de células em temperaturas abaixo de -196 °C. Essa temperatura baixa acarreta no interrompimento da atividade celular, preservando o DNA e sua capacidade proliferativa, impedindo a morte (GURRUCHAGA *et al.*, 2018; LISBOA; SOBRAL, 2020).

Há dois tipos de protocolos para criopreservação cuja diferença se baseia nos mecanismos físicos de congelamento. Na criopreservação convencional o congelamento ocorre na presença de gelo enquanto na criopreservação baseadas em protocolos de vitrificação ocorre sem a formação de gelo. Os protocolos de criopreservação convencional requerem que as amostras sejam tratadas com soluções crioprotetoras em concentrações baixas, contudo, a remoção da água intracelular acontece durante o processo de resfriamento lento. Em contrapartida a criopreservação através de protocolos de vitrificação envolve a desidratação e dessecação pré-congelamento pela exposição a soluções altamente concentradas, resultando em um grau maior de remoção de água intracelular (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2007).

### 3.4. VIABILIDADE CELULAR E O ENSAIO DE EXCLUSÃO POR CORANTE AZUL DE TRIPAN

A viabilidade celular pode ser definida como sendo a quantidade de células saudáveis presentes em uma amostra, tratando-se de uma etapa fundamental para seleção de suspensões e cultivos celulares. Os métodos para determinação de viabilidade celular podem ser divididos em duas categorias: (1) aquelas que analisam populações completas; (2) e aquelas que analisam células individualmente (ANDRADE; SOBRAL, 2020; STODDART, 2011).

O ensaio de exclusão por Azul de Tripán foi performedo pela primeira vez como análise clínica para o tratamento de tripanossomíase africana por Paul Ehrlich tendo a seguinte conformação química:  $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$ . A avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de exclusão pelo corante azul de Tripán foi uma dos primeiros métodos propostos e é amplamente difundido e utilizado nos laboratórios até os dias atuais. Essa metodologia é baseada no fundamento que as células vivas apresentam membrana celular intacta, não absorvendo o corante. Já as células mortas, tem suas membranas danificadas e por isso não são mais capazes de controlar a absorção de macromoléculas, captando o corante e apresentando coloração azul, indicando sua inviabilidade. As células são então contadas em câmara hemocitométrica com auxílio de microscópio óptico e então o número total de células viáveis e inviáveis é contabilizada dentro de uma população. Quando realizada de forma subjetiva (sem o auxílio de dispositivos de contagem automáticos) esse ensaio de exclusão pode superestimar significativamente a viabilidade das células, subestimando o número de células inviáveis e, conseqüentemente, produzindo uma estimativa equivocada sobre a viabilidade geral do cultivo (ALTMAN *et al.*, 2003; STODDART, 2011).

O Azul de Tripán apresenta algumas desvantagens em seu uso como o pequeno período de tempo para contagem celular visto que (a) o corante exerce toxicidade nas células após um curto período após a exposição a coloração, (b) ligação a artefatos inespecíficos, falsos positivos, ou seja, (c) células que iniciaram o processo de apoptose, mas possuem membrana ainda íntegra, (d) ausência de padronização da concentração do corante para medição da viabilidade celular, (e) contagem demorada. Apesar de tais fatores limitantes, esse método ainda é bastante utilizado por apresentar grandes vantagens, entre elas pode-se citar a rapidez na execução do experimento, facilidade de utilização, baixo custo e análise acessível, podendo ser realizada em laboratórios ou a campo. Além disso, pode ser usado para contabilização automática através de computadores específicos, sendo um considerado um método de referência para avaliação de viabilidade celular (PICCININI *et al.*, 2017).

### 3.5. HISTÓRICO DO CULTIVO CELULAR

O cultivo celular de mamíferos constitui-se como sendo uma importante ferramenta para os estudos biológicos nas últimas décadas. As células são as unidades básicas do sistema de um ser vivo, sendo necessário compreender como ocorrem seus fenômenos fisiológicos. Para isso, o cultivo celular permite o estudo e a observação do comportamento celular em ambiente fora do organismo por meio do isolamento do tecido (vegetal ou animal), mantendo-as viáveis e se proliferando em sistema *in vitro* constituído de fatores fundamentais para a sobrevivência delas como temperatura, pH e osmolaridade (BARBOSA *et al.*, 2015; SILVA; GOUVEIA; DONATO, 2020).

Historicamente, a técnica do cultivo celular teve seu início nos primeiros anos do século XX, tendo sido desenvolvida com o objetivo primário já de observar o comportamento das células em meio controlado, fora do organismo animal e permitir sua manutenção *in vitro*. Inicialmente, os cultivos provinham de tecidos fragmentados em frascos e devido a isso a técnica foi chamada de cultivo de tecidos por mais de 50 anos, sendo usado para denominar qualquer cultivo, fosse de células, tecidos ou órgãos. Em 1907, o cientista Ross Harrison tinha o objetivo de provar que as fibras nervosas eram compostas por células nervosas. Para tanto, fazendo uso de embriões de anfíbios, o cientista dissecou o tubo medular e mimetizou as condições do organismo originário, mantendo o ambiente asséptico e conseguindo garantir a sobrevivência das células por até uma semana, provando sua hipótese e sendo considerado um marco como pioneiro de estudos na área. Alexis Carrel em 1912, impulsionado pelos resultados obtidos por Harrison, observou em cultivos de cardiomiócitos de aves que o contato entre as células proporcionava maior taxa de proliferação e conseqüentemente uma relação direta com a manutenção da viabilidade celular. Além disso, o pesquisador francês descobriu que era necessário que fosse realizada a troca dos nutrientes contidos nos frascos, renovando-os constantemente e permitindo então que as células pudessem ser cultivadas por longos períodos, dando origem e desenvolvendo a primeira linhagem celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; MIGITA, 2012).

Em 1947, Holtfreter realizou experimentos com cultivo em três dimensões, mostrando que havia afinidade entre os tecidos de um mesmo organismo, evidenciando a importância da adesão celular. Já entre as décadas de 1950 e 1970, Moscona (1961) demonstrou em suas pesquisas a importância das interações célula-célula, analisando como as células embrionárias se organizavam para originar tecidos e órgãos. Foi observado também que

células de origens (órgãos) diferentes não se misturavam, enquanto as células que derivavam do mesmo tecido permaneciam unidas (AMARAL; MACHADO-SANTINELLI, 2011; BARBOSA *et al.*, 2015).

Os pesquisadores Hayflick e Moorhead (1961) visando prevenir contaminação dos cultivos de fibroblastos, foram os pioneiros na utilização de antibióticos nos meios de cultivo, permitindo que a técnica se tornasse mais amplamente utilizada, sendo algo empregado até os dias atuais nos laboratórios de biotecnologia. Além da assepsia do meio, é necessário que haja o fornecimento de nutrientes, íons, vitaminas e outros itens para que o cultivo se desenvolva. Em 1955 ocorreu a primeira investigação sistemática para que fosse descoberto os requerimentos nutricionais essenciais para o desenvolvimento das células em ambiente *in vitro*. Assim, Harry Eagle desenvolveu um meio mínimo essencial para o cultivo que era constituído por aminoácidos, vitaminas, carboidratos, sais e soro animal, chamado de EMEM (BARBOSA *et al.*, 2015; BRETAS, 2011; KRETZMER, 2002).

Todas essas descobertas foram fundamentais para que fosse possível a obtenção de diversas linhagens celulares com o avançar das décadas, possibilitando o cultivo celular em larga escala. Nos anos 80 houve o isolamento e cultivo das primeiras células-tronco pluripotentes advindas de embrião de camundongos e dez anos mais tarde, humanas, provenientes da fase de blastocisto (BARBOSA *et al.*, 2015).

Atualmente o cultivo de células pode ser utilizado em diversas linhas de pesquisa, como terapias gênicas, desenvolvimento de enxertos transplantáveis e aplicações biotecnológicas no desenvolvimento de fármacos e vacinas, além de sua utilização cada vez mais frequente e empregado na conservação de espécies silvestres (SILVA; GOUVEIA; DONATO, 2020).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

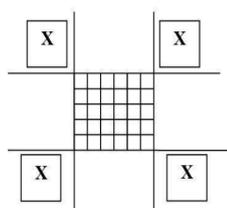
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, PB, Brasil (protocolo nº 4194010520). Foram utilizados 8 animais pertencentes a caprinocultura, setor do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba localizado no município de Areia, Paraíba. O rebanho é composto por animais da raça Alpina e Saanen, criados sobre piso ripado. Os animais possuem manejo diário

padronizado, havendo saída dos animais ao pasto pela manhã após a ordenha e a tarde são confinados e suplementados com ração balanceada sendo a água oferecida *ad libitum*.

#### 4.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E VIABILIDADE CELULAR

Um observador foi alocado em conjunto com os caprinos, aguardando até que os animais defecassem. A amostra fresca foi coletada diretamente em uma placa de petri de vidro e encaminhada ao laboratório, onde teve seu peso anotado. Na primeira coleta com cada um dos indivíduos, as fezes foram imediatamente lavadas com 50 mL de solução de Tampão Fosfato Salino (PBS), sendo esse líquido disperso sobre as fezes por meio do uso de uma seringa de 60 mL e agulha 22G (0,7 x 30mm) com pressão de cerca de 1,7 mL/segundo. Para maior recuperação celular foi realizada uma segunda lavagem. Os lavados obtidos foram recolhidos da placa de petri com o auxílio de uma seringa e foram filtrados em filtro Falcon, sendo transferidos para dois tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 274G por 5 minutos. Após o processo de centrifugação houve a formação do pellet, que foi avaliado em relação a sua coloração, utilizando uma escala subjetiva variando de 1 a 5, onde 1 representa um pellet de coloração clara e aparentemente sem material fecal e 5 representa um pellet de coloração amarronzada intensa, semelhante à das fezes. O número 0 foi adicionado às amostras onde não foi possível observar a formação de pellet, possivelmente devido à baixa quantidade de células e material fecal presente.

O sobrenadante foi descartado e os dois pellets pertencentes à mesma amostra de fezes foram ressuspensos conjuntamente em 1 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Após a homogeneização da amostra, 50  $\mu$ L da solução homogeneizada foram adicionados a 50  $\mu$ L de Azul de Tripán (1:1) para avaliar a viabilidade celular. 10  $\mu$ L da solução com corante foram depositadas em câmara hemocitométrica de Neubauer para contagem do número total de células viáveis e inviáveis, sendo que aquelas coradas em azul indicam células inviáveis. Foram contabilizadas as células presentes nos quadrantes indicados com o X:



A contagem foi realizada em duplicata para cada amostra e a média dessas contagens foi utilizada na fórmula a seguir:

$$N = (Nq/4) \times 1000 \times 2$$

Sendo N = Número de células obtidas; Nq = Número contado nos quatro quadrantes; 1000 corresponde ao volume (1mL); 2 corresponde ao fator de diluição (50µL de azul de tripan e 50µL de células). Para as demais coletas fecais, as amostras foram encaminhadas ao laboratório, pesadas e submetidas a manutenção em temperatura ambiente ou armazenadas em refrigeração. No caso da manutenção das fezes em temperatura ambiente, foi avaliado se as células conseguem manter sua viabilidade por várias horas. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e em refrigeração por períodos de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas e, por fim, 24 horas. Posteriormente, foram submetidas a lavagem, centrifugação e avaliação da viabilidade celular seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para as amostras de fezes frescas.

#### **4.3. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES**

Os gradientes de densidade foram previamente preparados a partir da adição de 9 partes de Percoll (v/v) em 1 parte (v/v) de NaCl 1,5M (concentração final de 0,15 M), resultando em uma solução ajustada para cerca de 340 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. A solução de Percoll foi submetida a centrifugação em 10.000 g por 10 minutos em ângulo fixo, formando o gradiente de densidade contínuo, e as células foram depositadas no topo do gradiente pré-formado, sendo centrifugadas a 800 g por 30 minutos. Uma vez que houve a formação das bandas isopicnicamente, pode-se recuperar as células esfoliadas presentes nas camadas que correspondem a aproximadamente a densidades entre 1000 e 1076 assim como descrito por Albaugh e colaboradores (1992), com o auxílio de uma pipeta. As partículas de Percoll foram removidas através da diluição da amostra colhida em meio de cultivo DMEM e nova centrifugação a 200 g por 5 minutos para obtenção do pellet celular. Após o isolamento celular, 50 µL da solução contendo as células foram adicionados a 50 µL de Azul de Tripan (1:1) e foi feita novamente a avaliação de viabilidade celular.

#### **4.4. CULTIVO CELULAR**

Os colonócitos recuperados após a etapa anterior foram cultivados em meio DMEM suplementado com 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 2,5µg/ml de gentamicina, 2,5µg/ml de anfotericina b, 10µg/ml de insulina, 0,15mM de aminoácidos

não-essenciais, 4mM de L-glutamina, 2,7mg/ml de glicose e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo os frascos levados para estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C e mantidos por 48 horas sem qualquer movimento. Após esse período, a troca de meio foi realizada duas vezes por semana e o cultivo foi monitorado diariamente para avaliar o crescimento celular.

#### **4.5. CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR E VIABILIDADE PÓS-CONGELAMENTO**

O meio de congelamento foi testado com relação à concentração de 5% e 10% de DMSO, sendo ainda composto por 50% de SFB e 45% de DMEM. Após a avaliação de viabilidade descrita acima, cada amostra foi inserida em criotubo contendo 0,5 mL, e foram criopreservadas pelo método de resfriamento lento (4 horas a 4°C em geladeira; 30 minutos em vapor de nitrogênio em isopor e posteriormente imersas em nitrogênio líquido onde foram transferidas para o botijão). Para o descongelamento das amostras, os criotubos foram mantidos em banho-maria a temperatura de 37°C por cerca de 3 minutos. As células foram centrifugadas a 250G por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo DMEM contendo 10% de SFB por duas vezes. Após a retirada do sobrenadante, as células foram novamente ressuspensas em 10mL de meio de cultivo contendo 10% de SFB. Seguidamente houve a retirada do sobrenadante novamente e nova ressuspensão em 0,5 mL de cultivo celular DMEM + 10% SFB. 50 µL desta solução foi adicionados a 50 µL de Azul de Tripán (1:1) para avaliar a viabilidade celular, assim como descrito anteriormente. A perda de viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$PVC = CVf - CVd$$

Onde CVf representa a porcentagem de células viáveis obtidas das fezes frescas e CVd representa a porcentagem de células viáveis obtidas nas células após a descongelação.

#### **4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

##### **4.6.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E VIABILIDADE CELULAR**

Os dados foram apresentados como média com desvio padrão para o número de células totais e para o número de células viáveis por mL, onde adotou-se o teste de Tukey

para comparação das médias. Foi utilizado o teste F de Fisher para definir a significância dos efeitos onde foi considerado o nível de significância a 1% para as lavagens em relação ao número total e viabilidade das células obtidas. Para a constatação da normalidade dos dados fez-se uso do teste de Cramer-von Mises utilizando os resíduos estudentizados. Devido à grande variação dos dados em relação ao número de células obtidas, fez-se necessária a transformação do número de células obtidas para LOG na base 10.

#### **4.6.2. CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR E VIABILIDADE PÓS-CONGELAMENTO**

Os dados foram apresentados como média com desvio padrão para quantidade de células obtidas a fresco e após a criopreservação com 5% e 10% de DMSO onde foi adotado o teste de Tukey para comparação dessas médias para análise de variância. A normalidade dos resíduos padronizados será conduzida por meio do procedimento UNIVARIATE do SAS.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. VIABILIDADE CELULAR**

Foi possível a realização de coletas de todos os animais, totalizando 56 amostras obtidas e havendo a presença de células viáveis em todas elas. Observou-se que a grande maioria das células analisadas se tratavam de colonócitos (células epiteliais do cólon), tanto isolados quanto agregados, conforme o encontrado também por Roediger e Truelove (1979). Neste trabalho foi possível observar uma grande quantidade de agregados celulares que se encontravam em sua maioria inviáveis, apesar de também haver células viáveis dessa forma, porém em menor quantidade.

As fezes são constituídas por um conjunto complexo de resíduos alimentares não digeridos da dieta, secreções endógenas e produtos do trato gastrointestinal, como a presença já comprovada de células esfoliadas (BANDALETOVA *et al.*, 2002; IYENGAR *et al.*, 1991). O conceito altamente equivocado de que as fezes se limitam a serem um produto descartado do organismo por anos limitou pesquisas voltadas à viabilidade celular. Entretanto, Nair *et al.*, (2003) e Albaugh *et al.*, (1992) observaram que células viáveis poderiam ser encontradas e recuperadas intactas em fezes humanas, abrindo caminho para estudos não invasivos das células fecais como indicadores cancerígenos ou de saúde. No âmbito da conservação das espécies selvagens, a obtenção de células viáveis também se insere como uma ferramenta

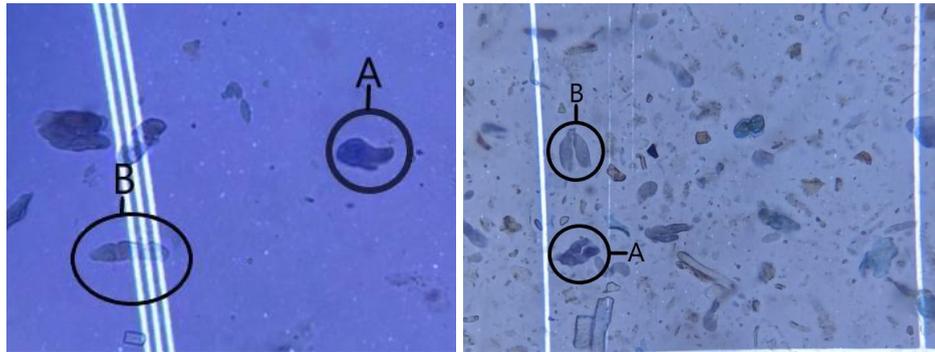
extremamente relevante na preservação da diversidade genética. Nesse caso as fezes se enquadram como uma metodologia não invasiva para obtenção de amostras bastante adequada, apesar das dificuldades para isolamento celular e cultivo posterior.

Ensaio de viabilidade celular podem ser baseados em algumas das propriedades de células viáveis tais quais atividade metabólica, integridade de membrana ou fluxo citoplasmático. Um dos métodos mais comuns, e antigos, para realização do teste de viabilidade celular é através do corante azul tripano. Nessa técnica é possível observar as células inviáveis pois elas têm a membrana plasmática comprometida e por isso não controlam a passagem de macromoléculas, absorvendo o corante e adquirindo uma coloração azul, enquanto as células viáveis têm a membrana íntegra e não absorvem o corante como o observado na figura 2 (CASTRO *et al.*, 2006; LOUIS; SIGEL, 2011; STODDART, 2011).

A apoptose ocorre quando há o desencadeamento de uma sequência programada de eventos responsáveis pela remoção de células defeituosas ou indesejadas durante seu desenvolvimento normal ou no final de sua vida útil, podendo ocorrer também quando a célula foi danificada de forma irreparável como quando há infecção virais ou bacterianas, presentes em grandes quantidades em lavados fecais como foi o obtido neste trabalho (STODDART, 2011).

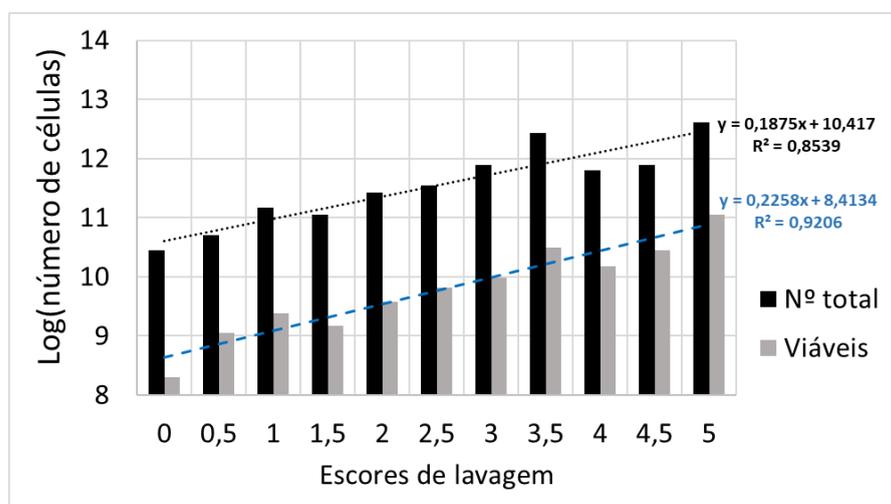
As células que estão presentes nas fezes são aquelas que acabam sendo esfoliadas pelo bolo fecal, se desprendendo de sua superfície originária, o que posteriormente pode interferir na integridade das mesmas. O desprendimento de colonócitos, que são células dependentes de ancoragem na sua matriz de suporte, ocasiona a ativação do processo de *anoikis*, mecanismo de autofagia responsável por regular a viabilidade e funcionalidade das células dentro do seu tecido de origem (FRISCH; SCREATON, 2001; MEMON *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Bayoussef *et al.*, (2011) utilizando-se da linhagem celular C2C12 (mioblastos) cultivados *in vitro* observaram que os agregados celulares obtidos mantiveram sua viabilidade, permitindo sua capacidade de diferenciação e proliferação. Yamada *et al.*, (1999) e Han *et al.*, (2006) confirmaram que células agregadas conseguem manter sua viabilidade por um tempo maior do que as células únicas, reconhecendo a importância das interações célula-célula para o cultivo *in vitro*, podendo ser esse o motivo da alta mortalidade celular observada nas amostras analisadas.

**Figura 2.** Células (colonócitos) inviáveis coradas em azul (A) e viáveis (B). Visto em microscópio óptico sob lente de aumento de 40x.



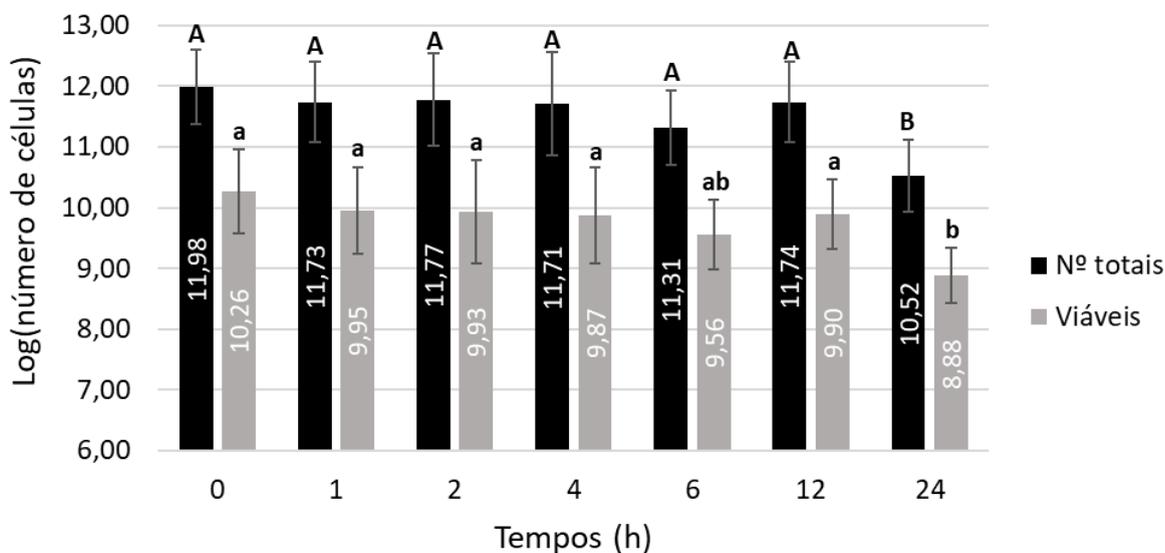
Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Com relação aos pellets que foram classificados após a centrifugação dos lavados das fezes, era inicialmente preconizado que a menor quantidade de material fecal seria benéfica, pois possivelmente facilitaria o futuro cultivo das células *in vitro*. Assim, inicialmente era desejável que fossem obtidos pellets de coloração mais clara. No entanto, no Gráfico 1 é possível observar que quanto mais escuro foi classificado o pellet, maior foi a quantidade de células totais e viáveis obtidas, sugerindo que a presença do material fecal não afetou na qualidade das células, não ocasionando uma mortalidade expressiva delas. Assim, apesar de apresentarem maior quantidade de material fecal e possivelmente de microrganismos, colorações mais escuras são desejáveis visando a coleta de um número de células para que se obtenha quantidade suficiente para estabelecer o cultivo celular. Portanto, faz-se necessário uma metodologia eficiente para que posteriormente essas células possam ser isoladas com segurança dos demais componentes fecais.



**Gráfico 1.** Média de escores das lavagens em relação a quantidade de células totais e viáveis

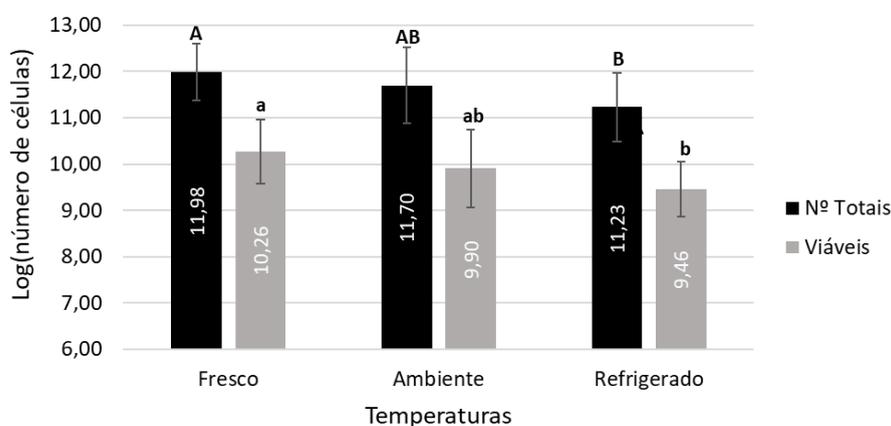
No Gráfico 2 é possível observar que o tempo teve efeito significativo sobre a quantidade de células totais e viáveis obtidas, ou seja, quanto mais tempo se passou do momento da defecação até a avaliação, menor a quantidade de células obtidas e de células viáveis. Além disso, constatou-se que não há diferença significativa na quantidade total e viável de células obtidas entre 0 horas até às 12 horas, independente da temperatura em que as amostras foram armazenadas (ambiente ou refrigerada). Contudo, com 24 horas há um decréscimo significativo na quantidade de células totais e viáveis obtidas.



**Gráfico 2.** Médias da quantidade de células totais e viáveis (números convertidos para LOG10) obtidas em relação ao tempo

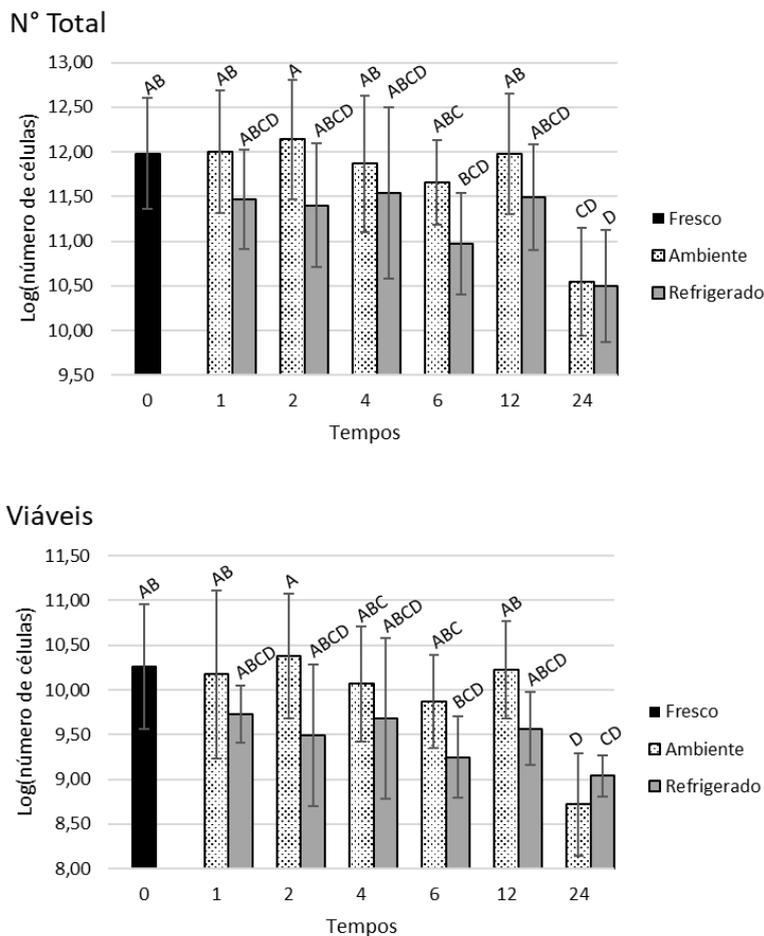
No Gráfico 3 observa-se que o número de células totais e viáveis obtidas nas amostras a fresco não difere estatisticamente das amostras mantidas em temperatura ambiente, porém difere das amostras refrigeradas. Todavia, as amostras em temperatura ambiente não diferem estatisticamente nem das frescas e nem das refrigeradas. É possível observar também que há maior quantidade de células totais e viáveis nas amostras frescas e uma menor quantidade nas amostras refrigeradas. Wang *et al.*, (2017) mostraram que células M2 (células de melanomas) de mamíferos armazenadas em temperaturas entre 1°C e 5°C, considerada um tratamento de grau de hipotermia severo, por 24 horas sofreram decréscimo significativo na sua viabilidade, quando comparado com células M2 armazenadas entre 16°C e 22°C, indicando que essas células são mais sensíveis a temperaturas mais baixas, assim podendo-se inferir que os

colonócitos se comportam da mesma maneira e, por isso, observou-se uma menor quantidade de células viáveis nas amostras refrigeradas.



**Gráfico 3.** Médias da quantidade células totais e viáveis obtidas em relação a temperatura.

No Gráfico 4 é possível observar e comparar as médias da quantidade de células em todos os tempos (tratamentos) em temperatura ambiente, tanto totais quanto viáveis. Constatou-se que até 12 horas em temperatura ambiente é possível obter com um número de células que não difere significativamente dos demais horários. Já com 24 horas após as coletas o número de células viáveis e totais foi menor quando comparado com os outros horários. Wang *et al.* (2017) observaram que as células M2, HEK 293T (células embrionárias do rim humano) e SaO2 (linhagem celular derivada de osteosarcoma) alcançaram até 80% de viabilidade, indicando que células de mamíferos conseguem se manter viáveis ao serem mantidas em temperatura ambiente para serem transportadas suspensas em meio de cultura. Além disso, também observou-se que células HEK 293T incubadas a 37°C por 3 dias conseguem manter sua viabilidade alta, desde que estejam em uma concentração celular adequada. Células MCF-7 ressuspensas em mistura de meio de cultivo DMEM (34%) com Matrigel (66%) e armazenadas em temperatura ambiente mantiveram sua viabilidade por uma semana, obtendo taxas de crescimento semelhantes a células quando mantidas criopreservadas. Demonstrando então que meio de crescimento celular suplementado com Matrigel fornece um ambiente adequado para que elas se mantenham viáveis em temperatura ambiente (WANG *et al.*, 2015).



**Gráfico 4.** Dados da quantidade de células totais e viáveis relacionando tempos e tratamentos.

Ainda no gráfico 4 é possível observar a queda contínua e acentuada da quantidade de células totais e viáveis com o passar do tempo. Observa-se também que apesar da quantidade de células totais ser maior em temperatura ambiente, há também uma queda mais acentuada, tendo uma redução na quantidade de células obtidas e também viáveis. Para as células viáveis notou-se uma inversão, onde houve maior quantidade de células vivas nas amostras refrigeradas com 24 horas quando comparado com as amostras de 24 horas em temperatura ambiente. A resposta das células a refrigeração varia de acordo com as propriedades e a integridade da membrana plasmática, tendo linhagens celulares que conseguem sobreviver a altos níveis de refrigeração (MAZUR, 2006).

Apesar da criopreservação ser uma das principais ferramentas para o armazenamento de células, a preservação celular em condições hipotérmicas através da refrigeração revela-se como uma saída de custo reduzido. Manter as células em baixas temperaturas ocasiona o retardamento das atividades metabólicas, desacelerando os processos dependentes de energia e prolongando o avanço do ciclo celular. Contudo a exposição prolongada a hipotermia faz

com que ocorra a ativação da hidrólise da membrana fosfolipídica desencadeando o processo que leva ao dano e conseqüentemente a morte celular, explicando então o decréscimo na quantidade de células viáveis obtidas com o decorrer do tempo observada no presente trabalho (ROBINSON *et al.*, 2013; ROOBOL *et al.*, 2009; HOCKACHKA, 1986). Assim, as células presentes nas amostras mantidas em temperatura ambiente mantém seu metabolismo ativo e contínuo, de forma que sua viabilidade possa ser mantida por um tempo menor em relação às células que são mantidas sob refrigeração.

## **5.2. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES E CULTIVO CELULAR**

Foram coletadas as fezes de quatro caprinos em placas de Petri no momento da defecação, evitando-se possíveis contaminantes ambientais, sendo as amostras coletadas imediatamente encaminhadas ao laboratório onde foi realizada a metodologia previamente descrita de lavagens e isolamento das células através do gradiente de Percoll.

No primeiro cultivo realizado, foram adicionadas células em diferentes volumes. No segundo dia de cultivo, foi observado quantidade significativa de células, sem indícios de contaminação. Nos poços com maior volume de células foi possível observar uma quantidade significativamente maior de células, entretanto apresentava uma quantidade material fecal. Conseqüentemente nos poços em que foi depositado um menor volume celular, observou-se células mais espaçadas e uma menor quantidade de material fecal. Quanto foi atingido o quinto dia, foi possível observar contaminação significativa a olho nu em alguns poços, e, sendo assim, realizou-se o descarte dos mesmos, mantendo-se o cultivo dos demais poços que não demonstraram contaminação. Quando esse cultivo atingiu o sétimo dia (Figura 3), os poços restantes apresentavam alta taxa de mortalidade celular e no oitavo dia restaram apenas restos celulares. Logo, toda a placa de cultivo foi descartada.

Ao promover o segundo e terceiro cultivos, foi possível observar bastante contaminação já no seu terceiro dia, sendo as placas descartadas por completo. O quarto e último cultivo, não apresentava sinais de contaminação nas primeiras setenta e duas horas. Contudo, as células estavam em quantidades pequenas e bem espaçadas. O cultivo foi descartado no sétimo dia quando já não era mais visualizada a presença de células.

**Figura 3.** Colonócitos observados no primeiro cultivo após 7 dias. Visto em microscópio óptico sob lente de aumento de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal (2022)

As células são cultivadas em meios ricos em nutrientes e por isso há um alto risco da propagação de microrganismos indesejados (contaminantes). Por esse motivo, o cultivo celular exige diversos cuidados para que os riscos de contaminações sejam reduzidos, sendo as técnicas assépticas de extrema importância para sua manutenção prolongada. As fezes são formadas por uma mistura de resíduos alimentares não digeridos, microflora e componentes celulares, sendo então, por si só, amostras com alto risco de contaminação. Por isso, se faz necessário que haja a utilização de um método eficiente para separação do material fecal dos colonócitos que serão usados no cultivo celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; IYENGAR *et al.*, 1991).

O Percoll consiste em partículas de sílica coloidal firmemente revestidas com uma camada de polivinilpirrolidona (PVP) e quando centrifugado em alta velocidade, forma gradientes com diferentes densidades, sendo o colóide não tóxico para células e organelas celulares. Esse meio tem sido utilizado para a separação de uma grande variedade de tipos celulares, como células germinativas (espermatozóides), linfócitos, células mononucleares, hepatócitos, entre outros. Sendo essa razão de ter sido escolhido para separação entre colonócitos e material fecal dos lavados de fezes (LESSLEY; GARNER, 1983; PERTOFT *et al.*, 1979; PINO; CARDONA, 2011; TIMONEN; SAKSELA, 1980).

Em estudo realizado por Kreamer e colaboradores (1986) para preparação de isolados de hepatócitos, observou-se que o processo de purificação celular utilizando Percoll resultou na obtenção de uma taxa maior de viabilidade, menor quantidade de detritos, maior porcentagem de células individuais e menor contaminação durante a suspensão final. Além

disso, as preparações que passaram por esse processo de purificação quando colocadas em cultivo suplementado com insulina e examinadas 24 horas depois, apresentavam células com maior ligação com o substrato.

Esse método já foi testado no isolamento de células fecais esfoliadas em humanos, utilizando diferentes gradientes de densidade a partir de uma solução de Percoll a 1.08 g/ml. No entanto, as fezes de humanos não resistem a lavagem superficial, se tornam uma pasta ou suspensão fecal. A quantidade de células recuperadas pelos autores foi relatada como satisfatória, sendo a maioria delas recuperada nas frações de densidade menores que 1.076, totalizando cerca de 3 a  $4 \times 10^6$  células/g de amostra fresca de fezes. As células recuperadas apresentaram cerca de 80% de viabilidade atestada pelo uso do corante Azul de Tripán, porém, não foram utilizadas para cultivo (ALBAUGH *et al.*, 1992).

De acordo com Brandslund *et al.* (1982) o procedimento de separação de monócitos utilizando Percoll é extremamente confiável, apresentando apenas 3 a 4% de falhas. Tais falhas podem ser resultantes da formação de agregados de outras células que contaminam os monócitos, resultando em uma má separação das células que são de interesse. Outro fator que pode influenciar nas taxas de falhas, de acordo com o autor, é a contaminação da suspensão em que as células estão inseridas ou do próprio Percoll por bactérias ou fungos.

A contaminação do cultivo celular pode acontecer por diversos fatores, sendo eles biológicos (fungos, vírus e bactérias), químicos (endotoxinas de bactérias gram-negativas, detergentes residuais, metais pesados, fixadores e radicais livres) ou contaminação cruzada decorrente de diferentes fontes (BAUST *et al.*, 2017; MAHMOOD; ALI, 2017; ROUTRAY *et al.*, 2016; ).

A contaminação biológica ocorre com maior frequência, sendo o problema mais comum nos laboratórios. Ela está diretamente relacionada a técnicas assépticas impróprias, esterilização inadequada ou reagentes impuros (meio de cultura, soluções, etc.). A contaminação bacteriana em cultivos celulares pode ser visualizada com facilidade de forma macro e microscópica onde se observa turvamento do meio de cultura, mudança de pH (através da acidificação do meio) e os microrganismos passam a competir pelos nutrientes disponíveis, levando a morte das células (LOPES; GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

A contaminação fúngica aparece macroscopicamente como pequenas colônias isoladas, apresentando coloração variando entre branco, cinza e esverdeado, flutuando no meio de cultivo. Quando há contaminação significativa, o meio apresenta característica turva ou enevoadada, causando aumento do pH, o que resulta na mudança na coloração indo de vermelho de fenol ao rosa. Microscopicamente é possível visualizar micelas filamentosas

finas, como hifas, ou aglomerados de esporos, sendo facilmente identificáveis. Os fungos estão presentes no ambiente, podendo se infiltrar nas culturas através do ar, principalmente quando ocorrem mudanças climáticas, há a presença de ar condicionado ou superaquecimento (LOPES *et al.*, 2020; HANDLING-SOLUTIONS, 2020; LANGDON, 2004).

Apesar do Percoll ter se mostrado eficiente na separação e purificação de diversas linhagens celulares, é necessária ampliação dos estudos relacionados aos colonócitos esfoliados isolados a partir de fezes visto que houve contaminação significativa no presente trabalho (Figura 4) sendo possível observar contaminação fúngica de forma macro e microscópica. Células primárias, aquelas isoladas diretamente a partir de tecido animal, apresentam maiores riscos de contaminação visto que a contaminação pode advir do processo de dissecação dos microrganismos presentes no próprio tecido originário, assim como as fezes. O risco de contaminação por microrganismos está ligada a fonte da linhagem celular, sendo fundamental o fornecimento de processos para prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos não desejáveis, através da inserção de protocolos com antibióticos e antifúngicos potentes (STACEY, 2011).

**Figura 4.** Cultivo celular de colonócitos contaminado após 48h.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2022)

### 5.3. CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR E VIABILIDADE PÓS-CONGELAMENTO

Foi possível a realização da coleta de todos os animais, totalizando 12 amostras obtidas (quatro animais em triplicata). Por se tratarem de dois tratamentos (5% e 10% de DMSO), totalizaram-se 24 amostras, onde foi possível observar a presença de células viáveis tanto a fresco quanto após o descongelamento.

A sobrevivência celular durante os processos de congelamento e descongelamento depende de variados mecanismos responsáveis pelo dano celular. Cada linhagem celular apresenta sua própria taxa ótima para resfriamento que depende tanto da permeabilidade da membrana celular quanto da composição da solução usada para criopreservação. Atualmente a taxa de sobrevivência de células e tecidos de mamíferos são alcançadas principalmente devido ao desenvolvimento de soluções de agentes crioprotetores (CPAs), sendo necessário definir qual substância é adequada para a criopreservação de colonócitos. As substâncias crioprotetoras, como o nome sugere, garantem proteção durante o processo de congelamento, sendo os principais agentes penetrantes utilizados o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (HUBEL, 1997), tendo sido esse último escolhido para o início dos testes com colonócitos obtidos a partir de lavados de fezes.

Liseth e colaboradores (2005) observaram que concentrações menores que 5% de DMSO (2% e 4%) resultaram em menores taxas de sobrevivência de células progenitoras do sangue periférico (PBPC) criopreservadas. Em estudo realizado por Ock e Rho (2011) observou-se que a sobrevivência e o número de colônias celulares mesenquimais foram inversamente proporcionais à concentração de DMSO utilizado para criopreservação, onde a concentração de 5% mostrou melhores taxas de sobrevivência, contudo, sem diferir significativamente da concentração de 10%, assim como visto na tabela 1.

**Tabela 1.** Média da quantidade de células viáveis obtidas a fresco e após o descongelamento

Variável	CVf	Cvd 5%	Cvd 10%
Quant. de células	52,91 ± 17,86 <sup>A</sup>	25,83 ± 6,87 <sup>B</sup>	25 ± 6,38 <sup>B</sup>

Médias com letras diferentes diferem significativamente

Fato semelhante foi observado por Picoli *et al.*, (2015) ao estudar o efeito da toxicidade do DMSO em células Madin-Darby de rins bovinos (MDBK). Os autores observaram que concentrações baixas (0,5%, 1% e 2,5%) de DMSO não foram eficazes na proteção contra crio-injúrias, preconizando o uso de concentrações acima de 5%. Por esses motivos, foi utilizada a quantidade mínima de 5% para a criopreservação de colonócitos. O autor ressalta, contudo, que a retirada do composto deve se dar logo após o congelamento para evitar a toxicidade exercida sobre tais células.

No presente trabalho observou-se que não houve diferença significativa na média de células viáveis após a criopreservação com 5% e 10% de DMSO. Em células hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical, Donaldson *et al.*, (1996) observaram que ocorre uma boa recuperação de células com DMSO em concentrações de 5% e 10% quando há uma taxa de resfriamento controlada, corroborando com a tabela 2, onde é possível observar que houve perda de apenas 27% das células viáveis criopreservadas.

**Tabela 2.** Médias da perda de viabilidade celular após a criopreservação com diferentes concentrações de DMSO

Variável	Cvd 5%	Cvd 10%
Perda da viabilidade	27,08 ± 14,03 <sup>A</sup>	27,91 ± 12,72 <sup>A</sup>

Médias com letras diferentes diferem significativamente

Uma vez que os tratamentos não diferiram estatisticamente, podemos inferir que ambas foram igualmente adequadas na manutenção da viabilidade celular, como visto no gráfico 2 abaixo. Estudos futuros podem demonstrar que outras concentrações se adequem ainda melhor a essa linhagem.

Em relação ao método utilizado no resfriamento celular, este depende de diversos fatores, entre eles a linhagem celular que será submetida a criopreservação. Os tipos celulares que apresentam membrana com permeabilidade alta tendem a sobreviverem quando ocorre o resfriamento rápido, enquanto as células com membranas de baixa permeabilidade precisam ser resfriadas lentamente. Durante o congelamento e o aquecimento, as células são submetidas a diversas forças (térmicas e químicas, em especial). Quando o processo de congelamento se inicia, as células se encontram hidratadas e equilibradas em relação ao meio que as cerca, fato que muda conforme esse processo avança, fazendo-as desidratar e formar

gelo intracelular. O método do resfriamento lento e aquecimento rápido elimina a formação de cristais de gelo intracelulares, deixando então de ser um fator que proporciona o dano celular (HUBEL, 1997; LI *et al.*, 2018). Esse fato foi observado por Mandal *et al.*, (2015) que creditaram o sucesso na recuperação de hepatócitos criopreservados a lenta diluição do DMSO durante o processo de resfriamento, evitando o choque osmótico e o descongelamento rápido das células a 37 °C, o que assegurou que houvesse dano limitado às células pois evitou a nova formação de cristais de gelo no meio intracelular. No caso das células fecais, o resfriamento lento foi a única técnica utilizada, e futuramente seria interessante testar diferentes curvas de refrigeração a fim de otimizar a técnica e estabelecer um protocolo mais eficiente.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises realizadas pode-se afirmar que há presença de células viáveis tanto em fezes mantidas em temperatura ambiente ou refrigerado até 24h após a sua excreção. Foi possível demonstrar que o tempo e a temperatura influenciam na quantidade de células totais e viáveis. Em relação às amostras mantidas em temperatura ambiente, é possível afirmar que não há diferença significativa na quantidade de células obtidas nas análises realizadas até 12 horas após as coletas. Já nas amostras analisadas 24 horas após as coletas, foi observada a diminuição na quantidade de células obtidas, bem como do número de células viáveis. Conclui-se também que apesar da quantidade de células totais ser maior em temperatura ambiente, há uma curva de queda maior na sua sobrevivência com o passar do tempo em relação às amostras que foram mantidas sob refrigeração.

Em relação a criopreservação celular pode-se concluir que concentrações entre 5% e 10% de DMSO são eficazes para a criopreservação de colonócitos, podendo manter cerca de metade da população viável inicial ainda com vitalidade após a criopreservação. A criopreservação lenta utilizando geladeira e o isopor contendo nitrogênio líquido é o método mais fácil e barato para realizar a curva de congelamento celular, e também se mostrou como uma técnica viável. Entretanto, faz-se necessário estudos mais amplos e aprofundados para determinação do grau de toxicidade do DMSO nas células obtidas em lavados de fezes caprinas, bem como de diferentes curvas de refrigeração.

Pode-se também inferir que o estabelecimento de cultivos celulares a partir de lavagens de fezes de caprinos é uma técnica viável e que pode ser adaptada para animais selvagens. Contudo, para isso, as técnicas precisam passar por um processo de refinamento,

já que, apesar de ter sido viável, se mostrou pouco eficiente. Sendo assim, é necessário a realização de estudos mais aprofundados para uma boa determinação de protocolo de cultivo celular obtido a partir de fezes de caprinos como modelo experimental para espécies selvagens.

## REFERÊNCIAS

ABRIL, V.V. *et al.* Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 128, n. 1-3, p. 177-187, 2010.

ALBAUGH, G. P. *et al.* Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. **International Journal Of Cancer**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 347-350, 1992.

ALTMAN, S.A. *et al.* Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. **Biotechnology progress**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 671-674, 1993.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. Cultivo celular. *In*: MOLINARO, E.M. *et al.* **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v. 2, cap. 5, p. 215-253.

AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTINELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados à formação do lúmen. **Naturalia**, [s. l.], v. 34, p. 1-20, 2011.

ANDRADE, C.C.N; SOBRAL, M.V. Contaminantes da cultura celular. *In*: GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M.V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020. cap. 9, p. 94-104.

BANDALETOVA, T. *et al.* Isolation of exfoliated colonocytes from human stool as a new technique for colonic cytology. **APMIS**, [S.l.], v. 3, n. 110, p. 239-246, 2002.

BARBOSA, B.S. *et al.* Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

BAUST, J. M. *et al.* Best practices in cell culture: an overview. **Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 8, p. 669-672, 2017.

BAYOUSSEF, Z. *et al.* Aggregation promotes cell viability, proliferation, and differentiation in a in vitro model of injection cell therapy. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [S.l.], v. 10, n. 6, p. 61-73, 2011.

BRANDSLUND, I. *et al.* Separation of human peripheral blood monocytes on continuous density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (PERCOLL). **Journal of immunological methods**, [s. l.], n. 2, ed. 48, p. 199-211, 1982.

BRETAS, R.M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**. Orientador: Marcos da Silva Freire e Luciane Pinto Gaspar. 2011. 170 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 2011.

CASTRO, L. A. *et al.* Measurement of cell viability in In Vitro culture. *In:* LOYOLA-VARGAS, V.M.; VAZQUEZ-FLOTA, F. (ed.). **Methods in molecular biology: plant cell culture protocols**. 2. ed. S.I.: Humana Press, 2006. Cap. 6. p. 71-76.

CIFUENTES-RINCÓN, A. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de Mazama americana (Artiodactyla: Cervidae) a partir de um topótipo atual**. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2016.

COMIZZOLI, P. *et al.* Protecting and Extending Fertility for Females of Wild and Endangered Mammals. *In:* WOODRUF, T. *et al.* (ed.) **Oncofertility. Cancer Treatment and Research**, v. 156. Boston: Springer. p. 87-100, 2010.

CURSINO, M. *et al.* The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **Bmc Evolutionary Biology**, London, v. 14, p.12, 2014.

DAVIS, J.M. *et al.* Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 781-786, 1990.

DONALDSON, C. *et al.* Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. **Bone Marrow Transplantation**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 725-731, 1996.

DUARTE, J. M. B.; JORGE W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus Mazama) from Brazil. **Cytogenetics and Cell Genetics**. Basel: Karger, v. 74, n. 3, p. 228- 228, 1996.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus Mazama) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 45, p. 281-287, 1996.

DUARTE, J. M. B. Coleta, conservação e multiplicação de recursos genéticos em animais silvestres: o exemplo dos cervídeos. **Agrociência**, Jaboticabal, v. 9, n. 1-2, p. 541-544, 2005.

DUARTE, J.M.B. *et al.* The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 17-22, 2008.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. (ed.) Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, p.394, 2010.

DUARTE, J. M. B. Artiodactyla—Cervidae (Veados e Cervos). *In:* CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (org.). **Tratado de Animais Selvagens**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap. 51. p. 1204-1226.

- FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, [s.l.], v. 34, p. 157-174, 1990.
- FRISCH, S.M.; R.A. SCREATON. Anoikis mechanisms. **Current Opinion In Cell Biology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 555-562, 2001.
- GROVES, C.P.; GRUBB, P. Relationships of living deer. *In*: WEMMER, C.M. (ed.) **Biology and management of the cervidae**. Smithsonian Institution Press, Washington, p. 21-59. 1987.
- GURRUCHAGA, H. *et al.* Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, 2018.
- HAN, Y. *et al.* Cultivation of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells Grown as Suspended Aggregates in Stirred Vessels. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 430-435, 2006.
- HANDLING SOLUTIONS. **Contamination in Cell Culture**, 2020. Disponível em: <<https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/contamination/scientific-background/fungal-contamination/>>. Acesso em: 30 nov. de 2022.
- HIEMSTRA S.J. *et al.* The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. *In*: Ruane J. & Sonnino A. (Eds), **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Vol.1. FAO, Rome, 2005.
- HOLT, W. V; PICKARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 143–150, 1999.
- HUBEL, A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. **Transfusion Medicine Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 224-233, 1997.
- IUCN 2021. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2021-1. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 30 nov. de 2022.
- IYENGAR, V. *et al.* Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 5, n. 13, p. 2856-2859, 1991.
- KAMRA, D.N. *et al.* Rumen microbial ecosystem. **Current science**, [s. l.], v. 89, ed. 1, p. 124-135, 2005.
- KREAMER, B.L. *et al.* Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. **In vitro cellular developmental biology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 201-211, 1986.
- KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 59, n. 2-3, p. 135-142, 2002.
- LANGDON, S. P. Cell line contamination. *In*: LANGDON, S.P. **Cancer cell culture: Methods and protocols**. New Jersey: Human press, 2004. cap. 30, p. 309-317.

- LESSLEY, B.A.; GARNER, D.L. Isolation of Motile Spermatozoa by Density Gradient Centrifugation in Percoll. **Gamete Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 49-61, 1983.
- LISBOA, T.M.H.; SOBRAL, M.V. Criopreservação. *In*: GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M.V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020. cap. 6, p. 73-80.
- LISETH, K. *et al.* The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 328-333, 2005.
- LOKTIONOV, A. *et al.* Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, [s.l.], v. 4, n.2, 1998.
- LOPES, A.L.O. *et al.* Contaminantes da cultura celular. *In*: GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M.V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020. cap. 9, p. 94-104.
- MAHMOOD, A.; ALI, S. Microbial and Viral Contamination of Animal and Stem Cell Cultures: Common Contaminants, Detection and Elimination. **Journal of Stem Cell Research & Therapeutics**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 1-8, 2017.
- MANDAL, A. *et al.* Long-term culture and cryopreservation does not affect the stability and functionality of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 243-251, 2015.
- MARAN, M.L.H. **Filogenia molecular de Mazama americana (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) como auxílio na resolução das incertezas taxonômicas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2016.
- MAZUR, P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. **Annals Of New York Academy Of Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 125, p. 658-676, 2006
- MEMON, Imran A. *et al.* Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. **The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery**, [S.l.], v. 130, n. 5, p. 1333-1341, 2005.
- MIGITA, N.A. **Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. Orientador: Deilson Elgui de Oliveira. 2012. 39 p. Monografia (Bacharel em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, [S. l.], 2012.
- MOSCONA, A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: a quantifiable approach to cell interactions in vitro. **Experimental cell research**, v. 22, p. 455-475, 1961.

- NAIR, P. *et al.* Crococitobiology: on the nature of cellular elements from stools in the pathophysiology of colonic disease. **Journal Clinical Gastroenterology**, [S.l.], v. 36, p. 84-93, 2003.
- NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. *In*: OBE, G.; BASLER, A. (eds.). **Cytogenetics, basic and applied aspects**, Berlin: Springer Verlag, 1987, p. 90-112.
- NETO, F. G. **Ecologia do veado-catingueiro (Mazama gouazoubira, Fischer, 1814) no Pantanal**. Orientador: Fernando de Camargo Passos. 2016. 85 p. Dissertação (Mestre em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, [S. l.], 2016.
- OCK, S.; RHO, G. Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Cryopreservation of Porcine Mesenchymal Stem Cells (pMSCs). **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 20, p. 1231-1239, 2011.
- PERTOFT, H. *et al.* Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 271-282, 1978.
- PICCININI, F. *et al.* Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. **Biological Procedures Online**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2017.
- PICOLI, T. *et al.* Toxicidade e eficiência do Dimetilsulfóxido (DMSO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (MDBK). **Science and animal health**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 159-168, 2015.
- PINO, P.A.; CARDONA, A.E. Isolation of Brain and Spinal Cord Mononuclear Cells Using Percoll Gradients. **Journal of visualized experiments**, [s. l.], v. 48, p. 1-3, 2011.
- ROBINSON, N. J. *et al.* Low temperature cell pausing: an alternative short-term preservation method for use in cell therapies including stem cell applications. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 2, n. 36, p. 201-209, 2013.
- ROOBOL, A. *et al.* Biochemical insights into the mechanisms central to the response of mammalian cells to cold stress and subsequent rewarming. **The Febs Journal**, [S.l.], v. 276, n. 1, p. 286-302, 2009.
- ROUTRAY, I. *et al.* Cell line cross-contamination and accidental co-culture. **Journal of Stem Cell Research & Therapeutics**, [s. l.], v. 1, n. 5, 2017.
- SCHIPPER, J. *et al.* The Status of the World's Land and Marine Mammals: diversity, threat, and knowledge. **Science**, [S.L.], v. 322, n. 5899, p. 225-230, 2008.
- SALVIANO, M. B. *et al.* Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction**, Jaboticabal, v. 96, n. 6, p. 1279-1287, 2017.
- STACEY, G.N. Cell Culture Contamination. *In*: CREE, I.A. (ed.). **Cancer cell culture: Methods and protocols**. 2. ed. UK: Human press, 2011. cap. 7, p. 79-92.

- STODDART, M. J. Cell Viability Assays: Introduction. *Mammalian Cell Viability*, p.1–6, 2011.
- TABERLET, P. *et al.* Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in ecology and evolution**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 323-327, 1999.
- TIMONEN, T.; SAKSELA, E. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 36, n. 3-4, p. 285-291, 1980.
- VARGAS-MUNAR, D. S. F. **Relação entre Fragilidade Cromossômica e Trocas entre Cromátides Irmãs com a Variabilidade Cariotípica de Cervídeos Brasileiros**. Master's thesis, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.
- VERMA, R. S., BABU, A. (ed.) **Human chromosomes: principles and techniques**. New York: McGraw Hill, 2. Ed. 419 p., 1995.
- WANG, J. *et al.* Transporting Cells in Semi-Solid Gel Condition and at Ambient Temperature. **Plos One**, [S.l.], v. 10, n. 6, p. 1-9, 2015.
- WANG, J. *et al.* The analysis of viability for mammalian cells treated at different temperatures and its application in cell shipment.. **Plos One**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1-16, 2017.
- WEBB, S.D. Ecogeography and the Great American Interchange. **Paleobiology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 266-280, 1991.
- WEBB, D, S. Evolutionary History of new world cervidae. *In*: VRBA, E. S; SCHALLER, G. B. **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 38-64.
- WEBER, M.; GONZALEZ, S.. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Écoscience**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 443-454, 2003.
- WEMMER, C. Deer status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Deer Specialist Group. p.106, 1998.
- WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 8, n. S1, p. 17–20, 1989.
- WILDT, D. E. Genome resource banking: impact on biotic conservation and society. In *Reproductive tissue banking*, pp. 399-439. **Academic Press**, 1997.
- WOODBURNE, M.O. The Great American Biotic Interchange: Dispersals, Tectonics, Climate, Sea Level and Holding Pens. **Journal of mammalian evolution**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 245-264, 2010.
- YAMADA, K. *et al.* Enhanced Cell Aggregation and Liver Functions Using Polymers Modified with a Cell-Specific Ligand in Primary Hepatocyte Cultures. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s. l.], v. 88, n. 5, p. 557-563, 1999.