



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA

**EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM DE FEZES DE
MAZAMA JUCUNDA NO ISOLAMENTO VIABILIDADE E CULTIVO CELULAR**

AREIA

2025

MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA

**EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM DE FEZES DE
MAZAMA JUCUNDA NO ISOLAMENTO VIABILIDADE E CULTIVO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. (a) Dr. (a) Luciana Diniz Rola

AREIA

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Mirta Oliveira Gomes da.

Efeitos da temperatura e tempo de estocagem de fezes
de mazama jucunda no isolamento viabilidade e cultivo
celular / Mirta Oliveira Gomes da Silva. -

Areia:UFPB/CCA, 2025.

46 f. : il.

Orientação: Luciana Diniz Rola.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Cervídeos neotropicais. 3.
Viabilidade celular. 4. Células esfoliadas. I. Rola,
Luciana Diniz. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)

MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA

EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM DE FEZES DE MAZAMA JUCUNDA NO ISOLAMENTO VIABILIDADE E CULTIVO CELULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano.

APROVADA EM 28/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. LUCIANA DINIZ ROLA
UNESP

Orientadora



Documento assinado digitalmente

LUCIANA DINIZ ROLA
Data: 28/02/2025 11:09:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. DANILA BARREIRO CAMPOS
UFPB

Examinadora



Documento assinado digitalmente

DANILA BARREIRO CAMPOS
Data: 06/03/2025 19:15:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. ELUZAI DINAI PINTO SANDOVAL

UNESP - FCAV

Examinadora



Documento assinado digitalmente

ELUZAI DINAI PINTO SANDOVAL
Data: 04/03/2025 12:13:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MIRTA OLIVEIRA GOMES DA SILVA – Nascida em João Pessoa - PB, em 19 de novembro de 1998. Graduada em Zootecnia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB - CCA), em janeiro de 2023. Participou de projetos de extensão, pesquisa e monitoria durante a graduação e pós-graduação. Tem experiência nas áreas de reprodução e citogenética de animais silvestres e exóticos com foco na conservação. É mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPB – Campus II – Areia.

A minha avó Elda Argentina (*in memorian*), DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por todas as graças que tem me concedido e por ter me sustentado, mesmo nos momentos mais difíceis sendo sempre fonte de conforto. Aos meus pais e meu irmão, por todo esforço e apoio incondicional. Por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade. Vocês são o meu tudo.

Matheus e Milena, meus companheiros de jornada. Matheus, obrigada por ser minha dupla, a quem eu sei que posso recorrer a qualquer hora pois sempre está disposto a me ajudar, acolher e me fazer dar risada mesmo nos piores momentos. Todas aquelas horas, especialmente quando eu estava sozinha, trocando memes e recebendo suas indicações de filmes macabros significaram muito pra mim, amigo. Você é um presente. Milena, não sei como expressar em palavras a gratidão que sinto por ter tido você ao meu lado, em especial na loucura que foi estarmos em uma cidade desconhecida, longe de tudo que conhecemos. Obrigada por cada palavra de afirmação, cada “eu acredito em você, amiga”, por estar sempre presente. Eu também acredito em você, Miroles, e espero que um dia você acredite também. Enfim, amo vocês, MMs.

Lígia e Fernanda: Obrigada por sempre me ouvirem (~~reclamar~~) enfrentar a maluquice que é ser adulta nesse mundo. Fernanda, não sei se você sabe, mas aquele “Respira, amiga, tá tudo bem” me salvou. Obrigada por ter atendido o telefone, ter segurado a minha mão e me salvado, além de ter vivido (mesmo longe) tantos sonhos comigo. Lígia, os áudios falando sobre tudo e nada ao mesmo tempo o dia inteiro continuarão por muitos anos, ok?

A todos que compõem o NUPECCE pelo acolhimento, desde os tratadores até os pesquisadores, pela disposição em ajudar independente de qualquer coisa. Ao prof. José Maurício Barbanti por ter aberto as portas, sempre disposto a ajudar e disponibilizando os animais e insumos para que o experimento ocorresse. Juan, Bianca, Bruno e Janaína por toda amizade, onde cada risada, almoços no RU e idas ao Brookes foram muito importantes. Vocês tornaram esses longos meses longe de casa em algo mais leve, muito obrigada!

Ao LECAS que mesmo chegando na minha vida na reta final do mestrado, ajudaram muito ao me fazerem companhia, rir e evitar surtos maiores. Em especial ao prof. Abraão por *sempre* ter uma palavra de positividade e conforto, dando asas aos nossos planos e nos incentivando a voar cada vez mais alto. Você é uma inspiração, chefe.

A Laiorayne/Lays/Lauraline por ser a pessoa que eu sei que sempre posso contar desde o começo da graduação, para qualquer coisa: desde assuntos pessoais até acadêmicos,

não medindo esforços para auxiliar no que conseguir. Obrigada por tudo, amiga. Estou aqui para você, sempre.

À professora Luciana Diniz pelo apoio e principalmente por ser a grande responsável por despertar em mim o amor pela Ciência ao confiar a mim a minha primeira IC, por transmitir seu amor pela conservação de maneira tão única. Obrigada sempre, profa.

Ao PPGCan pela oportunidade e permitir exercer minha paixão pela pesquisa. À banca pela disponibilidade, pelo tempo dedicado e pelas sugestões de melhoria no trabalho.

“Você não pode passar um único dia sem causar um impacto no mundo ao seu redor. Sua atitude faz a diferença e você tem que decidir que tipo de diferença quer fazer.”

— Jane Goodall

RESUMO

Este estudo investigou a viabilidade, isolamento e cultivo de células esfoliadas a partir de fezes de cervídeos neotropicais, propondo um método não invasivo para análise celular e aplicações futuras na conservação animal. As amostras fecais foram coletadas e submetidas a diferentes condições de armazenamento, sendo mantidas à temperatura ambiente (27°C) e refrigerada (4°C) por períodos de 0h, 1h, 4h, 6h, 12h e 24h. O objetivo foi avaliar o impacto dessas condições no número e na viabilidade das células esfoliadas, considerando o tempo como um fator determinante para a integridade celular. Após o isolamento das células, foram realizados testes de viabilidade utilizando azul de tripan e corantes fluorescentes, como iodeto de propídeo e laranja acridina, para distinguir células viáveis, apoptóticas e necróticas. A análise estatística foi conduzida em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), avaliando os efeitos dos fatores tempo e condição sobre a variável dependente. As células isoladas através do método do gradiente de Percoll foram cultivadas em meio DMEM suplementado. O cultivo foi realizado em placas de 96 poços e mantido a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada dois dias. Os resultados revelaram que o tempo exerceu um efeito significativo na viabilidade celular, enquanto o fator condição de armazenamento apresentou efeito menor. As maiores médias de células viáveis foram observadas nos tempos iniciais de 0h e 1h, com uma redução progressiva ao longo de 24 horas, especialmente em temperatura ambiente. Em contrapartida, as amostras mantidas em condições refrigeradas apresentaram uma diminuição mais suave na viabilidade. Com relação aos cultivos, observou-se alta taxa de contaminação nas culturas, resultando na perda de cinco dos seis cultivos realizados. No entanto, em um dos cultivos, as células permaneceram viáveis por até 120 horas, demonstrando a viabilidade do método para futuras análises moleculares e de cultivo celular. Assim, o método proposto pode ser uma alternativa viável para estudos celulares em animais silvestres, evitando procedimentos invasivos e permitindo o monitoramento da saúde das populações. Conclui-se que o isolamento e cultivo de células esfoliadas de fezes de cervídeos são possíveis e eficazes, mas melhorias no protocolo são necessárias para aumentar a taxa de sucesso do isolamento celular e consequentemente dos cultivos.

Palavras-Chave: cervídeos neotropicais; viabilidade celular; células esfoliadas.

ABSTRACT

This study investigated the viability, isolation, and cultivation of exfoliated cells from the feces of Neotropical deer, proposing a non-invasive method for cellular analysis and future applications in animal conservation. Fecal samples were collected and subjected to different storage conditions, being kept at room temperature (27°C) and refrigerated (4°C) for periods of 0h, 1h, 4h, 6h, 12h, and 24h. The objective was to assess the impact of these conditions on the number and viability of exfoliated cells, considering time as a determining factor for cell integrity. After cell isolation, viability tests were performed using trypan blue and fluorescent dyes such as propidium iodide and acridine orange to distinguish viable, apoptotic, and necrotic cells. Statistical analysis was conducted using a Completely Randomized Design (CRD), evaluating the effects of time and storage condition factors on the dependent variable. Cells isolated using the Percoll gradient method were cultured in a supplemented DMEM medium. The cultivation was carried out in 96-well plates and maintained at 37°C and 5% CO₂, with media changes every two days. The results revealed that time had a significant effect on cell viability, while the storage condition factor had a smaller effect. The highest means of viable cells were observed at the initial times of 0h and 1h, with a progressive reduction over 24 hours, especially at room temperature. In contrast, samples stored under refrigerated conditions showed a milder decrease in viability. Regarding cell cultures, a high contamination rate was observed, resulting in the loss of five out of six cultures. However, in one culture, cells remained viable for up to 120 hours, demonstrating the feasibility of the method for future molecular and cell culture analyses. Thus, the proposed method could be a viable alternative for cellular studies in wild animals, avoiding invasive procedures and enabling population health monitoring. It is concluded that the isolation and cultivation of exfoliated cells from deer feces are possible and effective, but protocol improvements are necessary to increase the success rate of cell isolation and, consequently, cultures.

Keywords: neotropical deers; cell viability; exfoliated cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig 1. Exemplares das espécies de cervídeos florestais com ocorrência no Brasil.....	18
Figura 2. Área de distribuição do <i>M. jucunda</i>	20
Figura 3. Indivíduo de <i>Mazama jucunda</i> utilizado no experimento.....	24
Figura 5. Lavagem das fezes com PBS.....	26
Figura 6. Colonócitos esfoliados inviáveis (a esquerda) e viáveis (a direita) corados com azul de tripan obtidos por meio das fezes.....	29
Figura 7. Camada de muco recobrimdo as fezes de <i>M. jucunda</i>	35
Figura 8. Lâmina de muco contendo colonócitos aderidos.....	36
Figura 9. Gradiente Percoll com pellet ressuspenso após centrifugação.....	37
Figura 10. Colonócitos viáveis vistos em microscópio de fluorescência (Aumento de 60x).....	38
Figura 11. Conjunto de colonócitos apoptóticos (seta) e viáveis (cabeça de seta) em microscópio de fluorescência.....	39
Fig 12. Colonócitos observados no primeiro após 48 horas. Visto em microscópio invertido sob lente de aumento de 40x.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio padrão para quantidade de células totais obtidas em relação a condição e tempo (valores transformados para Log na base 10).....	32
Tabela 2. Médias e desvio padrão para condição e tempo para obtenção de células viáveis....	32
Tabela 3. Dados da média da quantidade de células totais obtidas por diferentes tempos.....	34
Tabela 4. Dados da média da quantidade de células viáveis obtidas em diferentes tempos.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. EVOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS...	16
3.2. MAZAMA JUCUNDA: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E GENÉTICAS.....	18
3.3. METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO DOS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS.....	20
3.4. VIABILIDADE CELULAR E O ENSAIO DE EXCLUSÃO POR CORANTE AZUL DE TRIPAN.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. ANIMAIS E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	22
4.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	24
4.3. USO DE MUCOLÍTICO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES.....	26
4.4. CULTIVO CELULAR.....	27
4.5. NÍVEL DE APOPTOSE.....	27
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	28
5.2. USO DE MUCOLÍTICO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES.....	34
5.3. CULTIVO CELULAR.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Os cervídeos são mamíferos da família Cervidae, inseridos na ordem dos Artiodactyla. Esses animais são chamados de ungulados por apresentarem cascos pares com quatro dedos, sendo dois deles de apoio, e pertencem a subordem Ruminantia, que é caracterizada por possuir quatro compartimentos estomacais (Duarte, 2014). Ao todo, na região neotropical é possível encontrar 17 espécies de cervídeos, tendo a ocorrência de nove delas em território brasileiro: *Blastocerus dichotomus*, *Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Mazama americana*, *Mazama juncunda*, *Subulo gouazoubira*, *Mazama rufa*, *Mazama nana* e *Passalites nemorivagus* (Duarte, 2014). Essas espécies têm sofrido com pressões antrópicas sob seu habitat, o que resulta em uma grande segregação populacional, reduzindo a troca gênica e, por consequência, a diversidade genética, levando a um aumento da endogamia e, consequentemente, maior vulnerabilidade à extinção (Duarte, 2005).

De acordo com Weber e González (2003), a área de distribuição das espécies de cervídeos em regiões neotropicais teve redução que variou entre 40 e 90%, colocando essas populações em situação de conservação significativamente mais crítica quando comparada com os demais mamíferos do mundo. Em escala global, cerca de 26% das espécies de mamíferos estão ameaçadas, enquanto outros 15% classificam-se como “dados deficientes”, demonstrando a necessidade de estudos para determinar sua real situação (IUCN, 2025). Com o avançar das pesquisas e atualizações na taxonomia das espécies, é provável que o número de cervídeos neotropicais ameaçados de extinção seja maior do que está atualmente relatado na literatura (Duarte; Jorge, 1996; Groves; Grubb, 1987).

As espécies de cervídeos presentes na região neotropical apresentam importantes questões taxonômicas principalmente devido a sua acentuada fragilidade cromossômica, o que resulta em uma das taxas de evolução cariotípica mais elevada quando se trata de mamíferos (Duarte *et al.*, 2008; Vargas-Munar, 2003). Em estudos realizados Salviano *et al.*, (2017) e Cursino *et al.*, (2014), o cruzamento entre indivíduos classificados como *M. americana* que apresentavam constituições cromossômicas distintas, resultou no nascimento de descendentes inférteis ou subférteis. Assim, ainda que sem diferenças relacionadas a sua morfologia ou análises relacionadas à genética molecular, foi evidenciado que há isolamento reprodutivo entre essas linhagens que contêm diferentes números de cromossomos entre si, confirmando a existência de espécies que formam um complexo críptico.

Entre as ferramentas que apresentam papel fundamental na resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Mazama* e outros cervídeos neotropicais, está a citogenética, ramo da ciência responsável pelo estudo dos cromossomos. Entretanto, a citogenética necessita que as células estejam vivas para que sejam realizadas as preparações cromossômicas, e, portanto, as amostras devem ser provenientes de indivíduos vivos ou abatidos recentemente. As células que serão usadas nos preparos devem ser mantidas em cultivo sob condições controladas e estéreis, para que assim sejam aplicadas as técnicas citogenéticas adequadas (Verma; Babu, 1995).

As células vivas também se inserem como uma ferramenta essencial para conservação da diversidade genética (um dos pilares fundamentais para a conservação de espécies silvestres ameaçadas) através dos bancos de germoplasma, desempenhando um papel importante na diminuição dos efeitos de pressões seletivas não naturais (causadas pelo homem), deriva genética e endogamia (Wildt *et al.*, 1997). Esses bancos genéticos são usados tipicamente para o armazenamento de sêmen, oócitos, embriões e fibroblastos criopreservado, e quando associados às biotécnicas reprodutivas, garantem a manutenção da variabilidade genética mesmo após a morte dos indivíduos e promovem reprodução igualitária entre os animais através do manejo reprodutivo adequado (Holt; Pickard, 1999; Wildt, 1989).

A possibilidade de obter células vivas a partir de fontes não-invasivas permitiria a coleta de material genético de uma variedade enorme de indivíduos de vida livre, assegurando a representatividade das populações selvagens, bem como material para estudos citogenéticos sem a necessidade de capturar esses animais. Para cervídeos, o uso de métodos não-invasivos para obtenção de amostras biológicas são recomendadas sempre que possível, visto que algumas espécies são extremamente raras, dificilmente avistadas ou localizadas devido a sua característica de habitarem ambientes florestais. Além disso, são animais evasivos e estressáveis, podendo desenvolver complicações graves em decorrência ao processo de captura (miopatia) (Catão-Dias; Camargo, 2010; Comizzoli *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2010). Assim, é preconizado o desenvolvimento de metodologias que não envolvam a contenção física/química para obtenção de amostras biológicas em cervídeos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar a obtenção, isolamento e cultivo de células somáticas obtidas a partir de fezes de cervídeos neotropicais;

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar por até quanto tempo é possível obter células viáveis quando as fezes são mantidas em temperatura ambiente e refrigeradas;
- Estabelecer um método eficiente para o isolamento das células obtidas a partir das fezes;
- Testar o estabelecimento do cultivo celular de obtidas de fezes frescas;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. EVOLUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS

A história evolutiva da família Cervidae apresenta diversas lacunas e questionamentos devido a inexistência de fósseis na região da América Central, região para qual os indivíduos do gênero *Mazama* possivelmente migraram para América do Sul (Webb, 2000). Os dois principais ramos de cervídeos do Novo Mundo pertencem às tribos Rangiferina e Odocoileini, tendo começado a se diversificar há cerca de 3 milhões de anos, no final do período Pleistoceno e se estabelecendo de início na América do Norte (Webb, 1991).

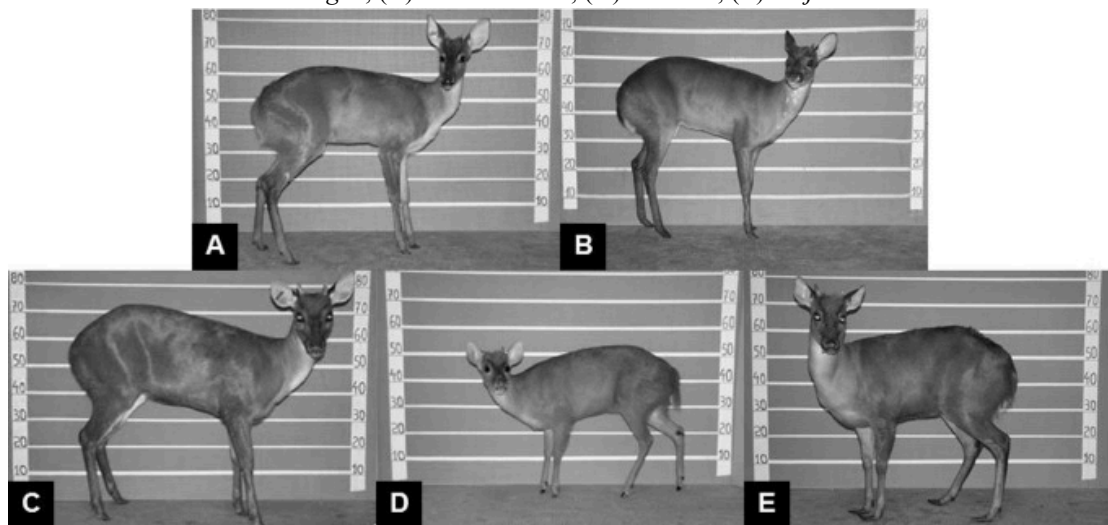
O Grande Intercâmbio Americano é conhecido como sendo um importante evento paleogeográfico que promoveu intensa migração de fauna entre a América do Norte para América do Sul, sendo um movimento facilitado pelo surgimento do istmo do Panamá, onde houve uma conexão entre os dois continentes, e permitiu que mamíferos adaptados cruzassem do Norte para o Sul (Duarte *et al.*, 2008; Webb, 1991; Woodburne, 2010). Dentre os animais imigrantes, estavam os cervídeos, que se dispersaram rapidamente pelo continente, adaptando-se a variados nichos ecológicos e ocupando uma ampla diversidade de *habitats*.

A região neotropical inclui grande parte da América Latina e é considerada um *hotspot* de biodiversidade, incluindo os cervídeos, com o Brasil sendo o país que abriga o maior número de espécies descritas: *Odocoileus virginianus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Blastocerus dichotomus*, *Passalites nemorivagus*, *Subulo gouazoubira*, *Mazama nana*, *Mazama americana*, *Mazama rufa* e *Mazama jucunda*. Os cervídeos formam um grupo de animais extremamente diversificado, devido às características não só morfológicas como também ecológicas e genéticas (Duarte; González, 2010). Eles podem ser divididos em dois grupos morfológicos: espécies de pequeno porte, com peso inferior a 25kg e altura máxima de 60 cm na cernelha, caracterizados por machos sem chifres com ramificações e hábitos a vegetações mais densas; já o segundo grupo é de espécies maiores, com peso acima de 25kg em que os machos apresentam chifres ramificados, além de terem hábitos relacionados a ambientes abertos e com vegetação esparsa (Duarte; Reis, 2012).

A família Cervidae apresenta uma variação cariotípica ampla, com números de cromossomos que variam de $2n = 6$ (*Muntiacus muntjak*) até $2n = 80$ (*Capreolus pygargus*) (Neitzel, 1987). Essas variações ocorrem tanto em nível interespecífico quanto intraespecífico, sendo possível observar polimorfismos cromossômicos que incluem diferenças no número de cromossomos e na presença ou quantidade de cromossomos supranumerários. No gênero *Mazama* essa discrepância pode ser bem observada, pois há uma variação cariotípica que vai desde $2n = 32$ até $2n = 52$. Especificamente na espécie *Mazama*

americana, o número de cromossomos varia de $2n = 42$ a 53 , com a identificação de sete citótipos distintos (variações cariotípicas que se correlacionam com a localização geográfica dos indivíduos) (Abril *et al.*, 2010). Essas disparidades tornam controversos diversos aspectos da taxonomia desta espécie, incluindo a quantidade de subespécies existentes ou qual a real situação da sua conservação, dificultando a identificação de quantas e quais são as espécies que estão em situação de ameaça.

Fig 1. Exemplos das espécies de cervídeos florestais com ocorrência no Brasil. (A) *S. gouazoubira*; (B) *P. nemorivagus*; (C) *M. americana*; (D) *M. nana*; (E) *M. jucunda*



Fonte: Oliveira *et al.*, (2016).

Embora sejam considerados relativamente jovens em termos evolutivos, os cervídeos exibem um grau elevado notável de diversificação cromossômica. Fontana e Rubini (1990) ao analisarem dados citogenéticos de diversas espécies e subespécies de cervídeos, identificaram que enquanto o gênero *Odocoileus* apresentou grau de diferenciação menos complexo durante seu processo de evolução, o gênero *Mazama* passou por rearranjos cromossômicos interespecíficos complexos, que incluem fusões em tandem e rearranjos robertsonianos.

A elevada semelhança entre os táxons torna apenas a morfologia pouco confiável na diferenciação entre as espécies, fazendo com que os estudos cariotípicos tenham extrema relevância na busca em resolver os problemas taxonômicos do gênero *Mazama*, pois através deles é possível identificar isolamentos reprodutivos e validar a distinção entre espécies. Da mesma maneira, os estudos genéticos moleculares frequentemente apresentam resultados que não correspondem às variações cromossômicas observadas, dificultando a identificação de unidades evolutivas por meio de marcadores mitocondriais e nucleares, como foi evidenciado em estudos realizados com a espécie *Mazama americana* (Abril *et al.*, 2010; Cifuentes-rincón, 2016; Maran, 2016).

Atualmente, para o gênero *Mazama*, são aceitas as seguintes espécies: *M. americana* (Erxleben 1777), *M. rufina* (Pucheran 1951), *M. nana* (Hensel 1872), *M. jucunda* (Thomas, 1913) e *M. temama* (Kerr 1792). Porém, com o avanço nos estudos científicos, é esperado que novas espécies sejam descritas, sendo possível assim caracterizar apropriadamente o status de ameaça de cada uma delas, desenvolver estratégias de conservação, bem como a criação de áreas protegidas, que auxiliem espécies que eram até então desconhecidas ou negligenciadas.

3.2. *MAZAMA JUCUNDA*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E GENÉTICAS

O *Mazama jucunda* é uma espécie conhecida comumente como veado-mateiro-pequeno, veado-bororó de São Paulo ou veado-vermelho. Sendo exclusiva do Brasil, está confinada à ecorregião das florestas costeiras da Serra do Mar nos estados de São Paulo e do Paraná. Recentemente, após uma revisão taxonômica, a espécie *Mazama jucunda* (Thomas, 1913) passou-se a considerar *Mazama bororo* (Duarte, 1996) como seu sinônimo júnior (Vogliotti e Duarte, 2012). A espécie *M. jucunda*, se encontra classificada como “Quase Ameaçada” de acordo com a avaliação do risco de extinção do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e “Vulnerável” (VU) de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (Duarte *et al.*, 2023).

Figura 2. Área de distribuição do *M. jucunda*



Fonte: IUCN (2015)

Assim como as demais espécies do gênero *Mazama*, o veado-mateiro-pequeno (*M. jucunda*) exibe o corpo com a porção anterior ligeiramente mais baixa do que a posterior, tendo chifres pequenos e não ramificados nos machos, com peso médio de 25 kg e altura que não ultrapassa 50 cm. Em geral, apresenta coloração avermelhada, com o pescoço tendo laterais cinzas claro (Duarte *et al.*, 2023). Como o nome comum da espécie sugere, há diversas semelhanças fenotípicas entre *M. jucunda* e as espécies inseridas no complexo *M. americana*, sendo o peso a maior diferença entre elas, onde os *M. americana* podem chegar até 60 kg (Branan e Marchinton, 1987).

Dada sua recente descrição ter ocorrido, não há informações sobre sua distribuição histórica. No entanto, assume-se por evidências geográficas que a espécie sempre ocupou uma área restrita, tal como observado no período atual (Duarte & Jorge, 2003). Esses animais apresentam um padrão de atividade noturno e crepuscular, além de serem naturalmente evasivos, com tendência a serem solitários e territorialistas, ocupando pequenas áreas de vida (Barrette, 1987). Através de ferramentas moleculares, Duarte *et al.*, (2005) mostraram a distribuição restrita desses animais, sendo uma das menores do mundo dentre toda família *Cervidae*, o que demonstra sua vulnerabilidade inerente a populações pequenas e em declínio. Esse resultado também acrescentou o veado-mateiro-pequeno à lista de mamíferos endêmicos da Mata Atlântica, classificando-o como o maior animal endêmico em território brasileiro.

Assim como os demais aspectos comportamentais, não há grandes informações sobre o hábito alimentar da espécie. De forma geral, os animais do gênero *Mazama* são descritos como seletores, ou seja, possuem uma dieta altamente especializada, consumindo apenas determinados tipos de alimentos ou partes específicas das plantas. O sistema digestório apresenta pouca complexidade, sendo composto por um rúmen pequeno, omaso e abomaso pouco desenvolvidos, e os intestinos curtos, tendo um pequeno tempo de retenção do alimento no retículo (Putman, 1988). Esses animais selecionam uma dieta pobre em fibra, mas rica em carboidrato, proteína e gordura, sendo alimentos de fácil digestão e nutricionalmente concentrados (Putman, 1988; Oliveira e Duarte, 2006).

De acordo com Duarte e Jorge (2003), a espécie *M. jucunda* possui um número diploide que varia entre 32 e 34 cromossomos, com um número fundamental de braços cromossômicos (NF) igual a 46. Em relação a sua morfologia cromossômica, é possível observar de 8 a 10 cromossomos grandes submetacêntricos (grupo A: grandes submetacêntricos), de 4 a 6 cromossomos supranumerários (grupo B: supranumerários), 2 cromossomos pequenos submetacêntricos (grupo C: pequenos submetacêntricos), 4 grandes acrocêntricos (grupo D: grandes acrocêntricos) e entre 14 e 18 cromossomos pequenos acrocêntricos (grupo E: pequenos acrocêntricos).

3.3. METODOLOGIAS NÃO-INVASIVAS COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO DOS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS

Tendo em vista todas as questões taxonômicas abordadas em relação ao gênero *Mazama* e a importância da obtenção de células vivas para que a citogenética seja aplicada na resolução dos problemas, é essencial que os métodos utilizados para sua coleta sejam desenvolvidos de forma cuidadosa e eficiente.

Entre as metodologias não-invasivas que foram elaboradas para a obtenção de amostras biológicas de fauna, já foram coletados materiais como saliva, urina, casca de ovos, pele (no caso de serpentes), penas, pelos e fezes (Taberlet *et al.*, 1999). Com relação a esse último, diversos estudos fazem uso das fezes como fonte de obtenção de DNA. No entanto, essa matriz tem se mostrado ainda mais promissora do que inicialmente se supunha, pois, pesquisas que exploraram a composição presente nas fezes demonstraram a possibilidade de isolar células viáveis a partir dessa fonte, inclusive de recém-nascidos (Albaugh *et al.*, 1990; Iyengar *et al.*, 1991; Chandel *et al.*, 2011).

Grande parte dos estudos que foram realizados até o momento para obtenção de células fecais tem como objetivo auxiliar no diagnóstico de doenças em humanos, oferecendo

informações sobre o epitélio colônico. O estudo dos componentes das fezes humanas e animal (coprocitobiologia) se caracteriza como sendo uma abordagem não-invasiva para análises de patologias no trato gastrointestinal, podendo ser usada como substituta para a biópsia de tecidos para verificar alterações gênicas ou danos no DNA, proteínas e acúmulo de componentes dietéticos do paciente (Davis, 2003; Nair *et al.*, 2003; Kamra *et al.*, 2005). Quando a abordagem para uso das fezes é realizada visando o diagnóstico de doenças em humanos, podem ser utilizados marcadores moleculares, sendo importante observar apenas a integridade da célula, mas sem a necessidade em realizar cultivo *in vitro* posterior (Chandel *et al.*, 2011).

O cultivo de células viáveis a partir das fezes apresenta grandes desafios, a exemplo da dificuldade de seu isolamento em número adequado a partir da amostra inicial, chance de contaminação já no início do processo do cultivo, população celular heterogênea e complexidade para impedir o início do processo de *anoikis*, que se trata da morte celular programada após destacamento do tecido de origem.

Apesar das fezes serem consideradas uma fonte promissora para a obtenção de células esfoliadas, para a maioria das espécies de mamíferos esse pode ser um processo bastante complexo. Isso se deve ao fato de que após ser realizada a lavagem da superfície da amostra, as fezes absorvem a solução aquosa e formam uma pasta de difícil manipulação. Já nos cervídeos, as fezes apresentam-se em cíbalas, o que garante maior firmeza da amostra após a lavagem da superfície e facilita a obtenção celular. A possibilidade na obtenção das células vivas em espécies selvagens a partir de uma fonte não-invasiva tornaria possível a obtenção de células de número expressivo de indivíduos de vida livre sem que houvesse a necessidade de captura dos indivíduos, garantindo a obtenção de material para estudos citogenéticos, bem como recursos genéticos representativos das populações selvagens.

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

A viabilidade celular refere-se à proporção de células saudáveis em uma amostra, sendo uma etapa essencial para a seleção de suspensões e cultivos celulares. Os métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular podem ser classificados em duas categorias principais: (1) métodos que examinam populações inteiras e (2) métodos que avaliam células individualmente (Andrade; Sobral, 2020; Stoddart, 2011).

O ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán foi inicialmente desenvolvido por Paul Ehrlich como uma ferramenta clínica para o tratamento da tripanossomíase africana. Este

método, um dos primeiros propostos para avaliar a viabilidade celular, permanece amplamente utilizado em laboratórios até os dias de hoje. A técnica baseia-se no princípio de que células vivas possuem membranas celulares intactas, impedindo a absorção do corante, enquanto células mortas, com membranas danificadas, perdem essa capacidade de exclusão e captam o corante, adquirindo uma coloração azul que indica sua inviabilidade. Para a análise, as células são contadas em uma câmara hemocitométrica com o auxílio de um microscópio óptico, permitindo o cálculo do número total de células viáveis e inviáveis em uma população. No entanto, quando realizado de forma manual e subjetiva (sem dispositivos automáticos de contagem), o ensaio pode superestimar a viabilidade celular, subestimando o número de células inviáveis e, assim, levando a interpretações equivocadas sobre a viabilidade geral do cultivo (Altman *et al.*, 2003; Stoddart, 2011).

O uso do Azul de Tripán apresenta algumas limitações e dentre eles, o principal é o curto intervalo de tempo disponível para que seja realizada a contagem celular. Isso ocorre devido a fatores como: (a) a toxicidade do corante, que pode afetar as células poucos minutos após a exposição a ele; (b) sua ligação a artefatos inespecíficos, gerando resultados falso-positivos; (c) a dificuldade em identificar células em estágios iniciais de apoptose, mas que ainda mantêm a integridade da membrana; (d) a falta de padronização na concentração do corante para análise da viabilidade; e (e) o tempo prolongado necessário para a contagem manual. Apesar dessas desvantagens, o método continua amplamente utilizado devido às suas vantagens significativas, como rapidez na execução, simplicidade de uso, baixo custo e facilidade de análise, podendo ser realizada tanto em laboratório quanto no campo. Além disso, o Azul de Tripán pode ser integrado a sistemas de contagem automatizada por computadores especializados, consolidando-se como um método de referência para a avaliação da viabilidade celular (Piccinini *et al.*, 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram utilizados 6 animais fêmeas da espécie *Mazama jucunda* pertencentes ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Jaboticabal, localizado no Estado de São Paulo, Brasil. Os animais utilizados no experimento apresentaram média de peso de 21 kg, sendo mantidos em baias e sob sistema de rodízio para acesso aos piquetes externos para banho de sol diariamente. Os animais possuem manejo

diário padronizado, havendo fornecimento do alimento concentrado na forma de ração equina da marca Equitech e frutas (abóbora, banana ou mamão) no turno da manhã e volumoso (soja-perene, folha de amora ou rami), sendo a água oferecida *ad libitum*.

Figura 3. Indivíduo de *Mazama jucunda* utilizado no experimento



Fonte: Arquivo pessoal

A facilitação para a obtenção das amostras foi realizada fazendo-se uso do comportamento natural da espécie, uma vez que quando são trocados de baia, o animal imediatamente defeca para demarcação de território. Ao realizar a troca de baia, o pesquisador ficava aguardando até que o animal defecar e imediatamente após a defecação, o animal era devolvido para sua baia de origem e as fezes eram recolhidas em uma placa de plástico devidamente identificada e eram encaminhadas ao laboratório, tendo seu peso anotado.

Figura 4. Coleta das amostras



Fonte: Arquivo pessoal

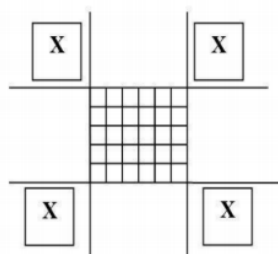
4.2. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Ao chegar ao laboratório, 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 maximizar a recuperação celular, uma segunda lavagem de 50 mL foi realizada. Os lavados obtidos foram recolhidos da placa com o auxílio de uma seringa e foram filtrados em filtro Falcon de 70µm. Foram então 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.

Figura 5. Lavagem das fezes com PBS

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Após a centrifugação, 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 μ L da solução foram adicionados a 50 μ L de Azul de Tripán (1:1) para avaliar a viabilidade celular, sendo que 10 μ L da solução com corante foram depositadas em câmara hemocitométrica de Neubauer para contagem do número total de células viáveis e inviáveis. Foram contabilizadas as células presentes nos quadrantes indicados com o X (esquema abaixo) sendo as células coradas em azul aquelas consideradas como células inviáveis. Para cada amostra, a contagem foi realizada em duplicata, sendo os valores obtidos aplicados na fórmula a seguir:



$$N = (Nq/4) \times 10000 \times 2$$

Sendo N = Número de células obtidas; Nq = Número contado nos quatro quadrantes; 10.000 corresponde ao volume; 2 corresponde ao fator de diluição (50 μ L de azul de tripan e 50 μ L de células).

Outras coletas fecais foram realizadas com os mesmos indivíduos, sendo as amostras encaminhadas ao laboratório, pesadas e submetidas a manutenção em temperatura ambiente (27°C) ou armazenadas em refrigeração (4°C) por diferentes períodos de tempo. Foi avaliada a manutenção da viabilidade celular das amostras mantidas em temperatura ambiente e em refrigeração por períodos de 1 hora, 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. USO DE MUCOLÍTICO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES

Foi observada grande quantidade de muco recobrindo os cíbalos das fezes de cervídeos, o que dificultava a lavagem das amostras. Além disso, a camada de muco foi descrita em outros estudos como o local de maior deposição de células da amostra fecal (Ahlquist *et al.*, 1999; White *et al.*, 2006). Assim, baseando-se no trabalho de Bandaletova *et al.*, (2002) e White *et al.*, (2006), foi testado o uso do agente mucolítico Tioglicolato de Amônio (60%). Foram realizadas duas lavagens, onde a primeira lavagem (L1) continha 50 mL de solução de Tampão Fosfato Salino (PBS) com pH ajustado para 8,5 contendo 0,5% de Tioglicolato de amônio (TA 60%) a cada grama de fezes e a segunda lavagem (L2) contendo apenas PBS, visando uma maior taxa de recuperação celular. Os lavados foram alocados em sacos, suavemente agitados e deixados em repouso por 30 minutos para que o TA 60% agisse na mucólise. Em seguida, os lavados foram transferidos para tubos falcon de 50 mL e centrifugados por 5 minutos a 111 G (ou 800 RPM). Logo após a centrifugação, os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados com auxílio de pipeta de pasteur. O pellet formado então foi ressuspensão em 30 mL de PBS e centrifugado novamente. Essa última etapa foi repetida cinco vezes, com o objetivo de retirar o máximo possível de Tioglicolato de amônio (60%) da amostra, visto que o composto pode ser tóxico para as células quando expostas por período prolongado. Após a quinta e última centrifugação, após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 1mL de PBS. Em seguida, o pellet ressuspensão foi depositado na solução do gradiente de densidade.

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 H₂O. 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. As partículas de Percoll foram removidas através da diluição da amostra colhida em PBS + meio de cultivo DMEM e nova centrifugação a 200 g por 5 minutos para obtenção do pellet celular. Após o isolamento celular, 50 μ L da solução contendo as células foram adicionados a 50 μ L de Azul de Tripán (1:1) e foi feita novamente a avaliação de viabilidade celular.

4.4. CULTIVO CELULAR

Os colonócitos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 100U/ml de penicilina/estreptomicina, 2,5 μ g/ml de anfotericina b, 50 μ g/ml de Gentamicina, 10 μ g/ml de insulina, 0,15 mM de aminoácidos não-essenciais, 4mM de L-glutamina, 0,5 ng/ml de Epidermal Growth Factor (EGF), 20 μ g/ml de Cell Growth Solution (CGS) 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 CO₂ 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. NÍVEL DE APOPTOSE

Uma alíquota de células foi ressuspensa em 2 μ g/mL de laranja de acridina e 10 μ g/mL de iodeto de propídio. Posteriormente, as células foram colocadas entre lâmina e lamínula e avaliadas a 480 nm em microscópio de fluorescência sob objetiva de 60x. As células foram classificadas como (I) células viáveis, com núcleo verde claro uniforme; (II) células em apoptose inicial, com núcleo verde não uniforme; (III) células em apoptose tardia, com núcleo laranja brilhante não uniforme, e (IV) células necróticas, com núcleo laranja uniforme (Kosmider *et al.*, 2004).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento foi conduzido em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com um arranjo fatorial 2 $\times$ 6, consistindo de dois fatores:

- **Condição:** dois níveis (Ambiente e Refrigerado);
- **Tempo:** seis níveis (0h, 1h, 4h, 6h, 12h e 24h).

Os dados foram transformados usando a função logarítmica natural para melhorar a normalidade dos resíduos. Foi realizada análise de variância para avaliar os efeitos de Condição e Tempo, bem como a interação entre os fatores. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk,

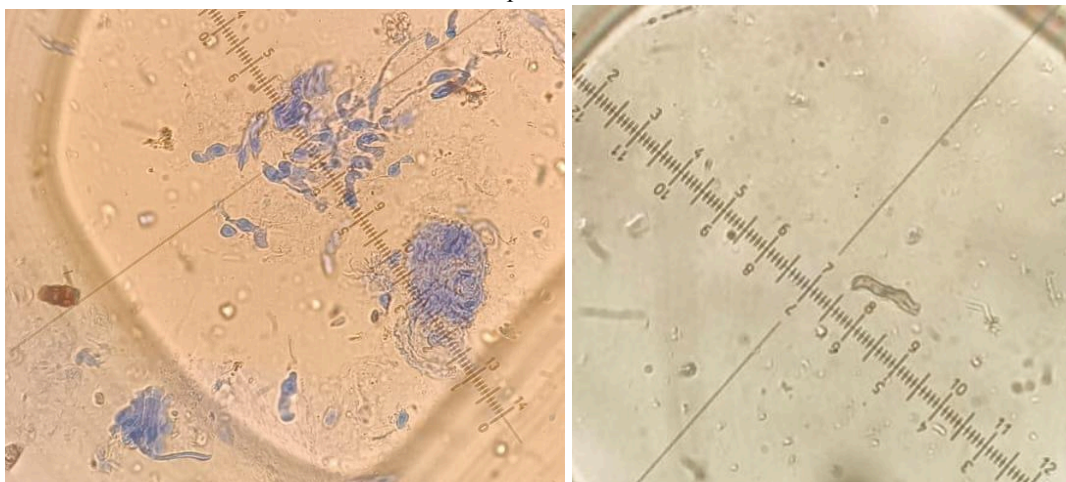
onde $p > 0,05$ indicou que os resíduos podem ser considerados normalmente distribuídos. Quando identificados efeitos significativos, as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Tukey a $p < 0,05$, para determinar quais níveis dos fatores diferiam entre si. As médias e desvios padrão também foram calculados para cada combinação de fatores, e os resultados foram apresentados graficamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Foi possível a realização de coletas com todos os animais, totalizando 66 amostras obtidas e havendo a presença de células viáveis na maior parte delas. 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) em humanos.

Figura 6. Colonócitos esfoliados inviáveis (a esquerda) e viáveis (a direita) corados com azul de tripan obtidos por meio das fezes



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

No gráfico 1 e tabela 1 é possível observar a quantidade de células totais obtidas a partir de fezes submetidas à temperatura ambiente (27°C) ou refrigeradas (4°C) e mantidas sob essas condições por diferentes períodos. As médias de células totais (ou seja, a soma de viáveis e inviáveis) foi maior nos tempos iniciais (0h e 1h), havendo uma redução ao longo do tempo, principalmente a partir das 6h. A média em 24h foi menor, o que demonstra uma diminuição expressiva na quantidade de células totais obtidas. Apesar de haver uma queda acentuada em ambas as condições, em temperatura refrigerada, esse fato é menos acentuado.

Em estudo realizado por Stewart *et al.*, (2022) observou-se o cultivo de células-tronco epiteliais intestinais de equinos (ISCs) após armazenamento prolongado do tecido a 4°C e demonstrou que é possível isolar e cultivar com sucesso essas células mesmo após 48 horas, sem que houvesse prejuízo significativo em comparação ao processamento imediato, mostrando que a refrigeração pode mitigar os efeitos do tempo na integridade celular.

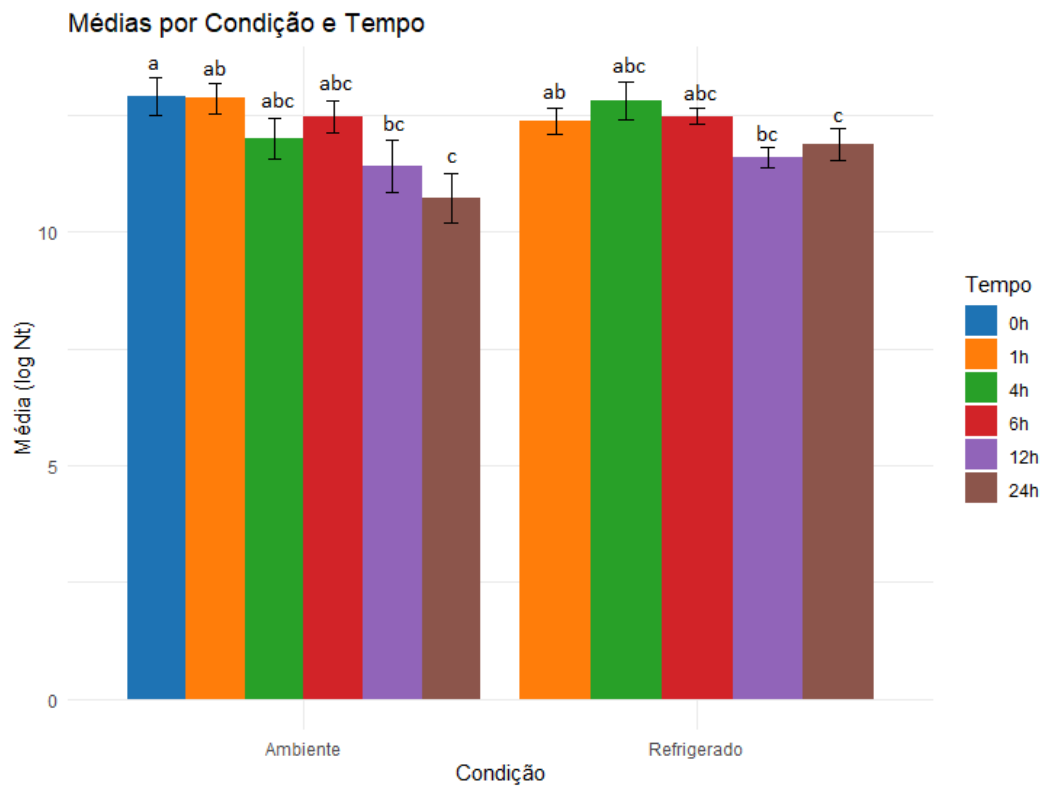


Gráfico 1. Médias da quantidade de células totais obtidas em diferentes tempo e condições

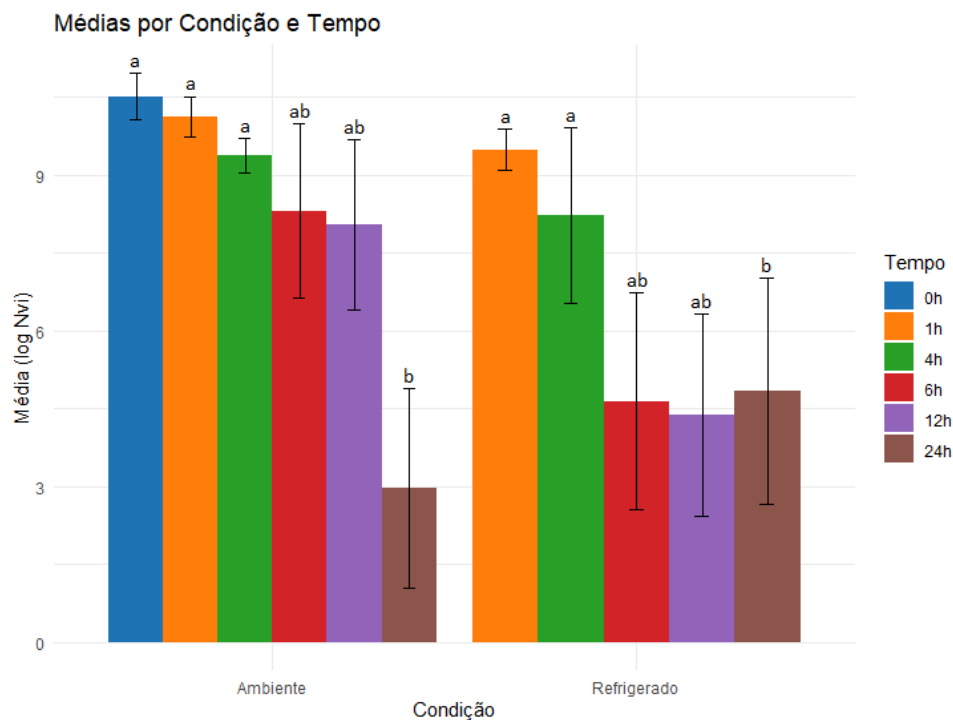


Gráfico 2. Médias da quantidade de células viáveis obtidas em diferentes tempo e condições

Os resultados observados nas tabelas 3 e 4 sugerem que o fator tempo influencia estatisticamente de forma significativa (indicado pelas letras diferentes) na quantidade de células totais e viáveis obtidas, no entanto, o fator condição (ambiente ou refrigerado) não apresenta efeito relevante. Essa análise confirma as diferenças significativas, principalmente entre os tempos iniciais (0h, 1h) e final (24h), destacando a queda progressiva na quantidade das células ao longo do tempo, sendo possível observar também na análise de regressão presente no gráfico 3.

Tabela 1. Médias e desvio padrão para quantidade de células totais obtidas em relação a condição e tempo (valores transformados para Log na base 10).

CONDIÇÃO	TEMPO	MÉDIA ± DP
Ambiente	0h	12.9 ± 0.40
	1h	12.9 ± 0.31
	4h	12.0 ± 0.42
	6h	12.5 ± 0.34
	12h	11.4 ± 0.55
	24h	10.4 ± 0.53
Refrigerado	1h	12.4 ± 0.28
	4h	12.8 ± 0.40
	6h	12.5 ± 0.15
	12h	11.6 ± 0.22
	24h	10.9 ± 0.33

Tabela 2. Médias e desvio padrão para condição e tempo para obtenção de células viáveis

CONDIÇÃO	TEMPO	MÉDIA ± DP
Ambiente	0h	10.5 ± 0.45
	1h	10.1 ± 0.38
	4h	9.3 ± 0.33
	6h	8.3 ± 1.68
	12h	8.0 ± 1.64
	24h	2.9 ± 1.92
Refrigerado	1h	9.4 ± 0.41
	4h	8.2 ± 1.69
	6h	4.6 ± 2.9
	12h	4.3 ± 1.96
	24h	4.8 ± 2.17

No gráfico 2 é possível observar as médias de células viáveis em função das condições de temperatura ambiente (27°C) e refrigerado (4°C) e dos tempos de coleta (0h, 1h, 4h, 6h, 12h, 24h). Em temperatura ambiente, as médias da quantidade de células viáveis obtidas e analisadas a fresco (0h) e após 1h são mais altas em relação aos tempos seguintes, no entanto, diferem significativamente apenas após 12 horas, tendo uma redução progressiva até atingir a menor média com 24h. Da mesma forma, pode ser observado em ambiente refrigerado onde há a mesma tendência decrescente conforme o tempo aumenta.

A média de células viáveis obtidas com 24h foi maior em temperatura refrigerada quando comparado à condição ambiente indicando que a refrigeração é eficiente para

preservar a viabilidade celular, corroborando com os dados encontrados por Silva *et al.*, (2022) em estudos realizados com cabras como modelo experimental para cervídeos. Essa queda pode ser observada no gráfico a seguir:

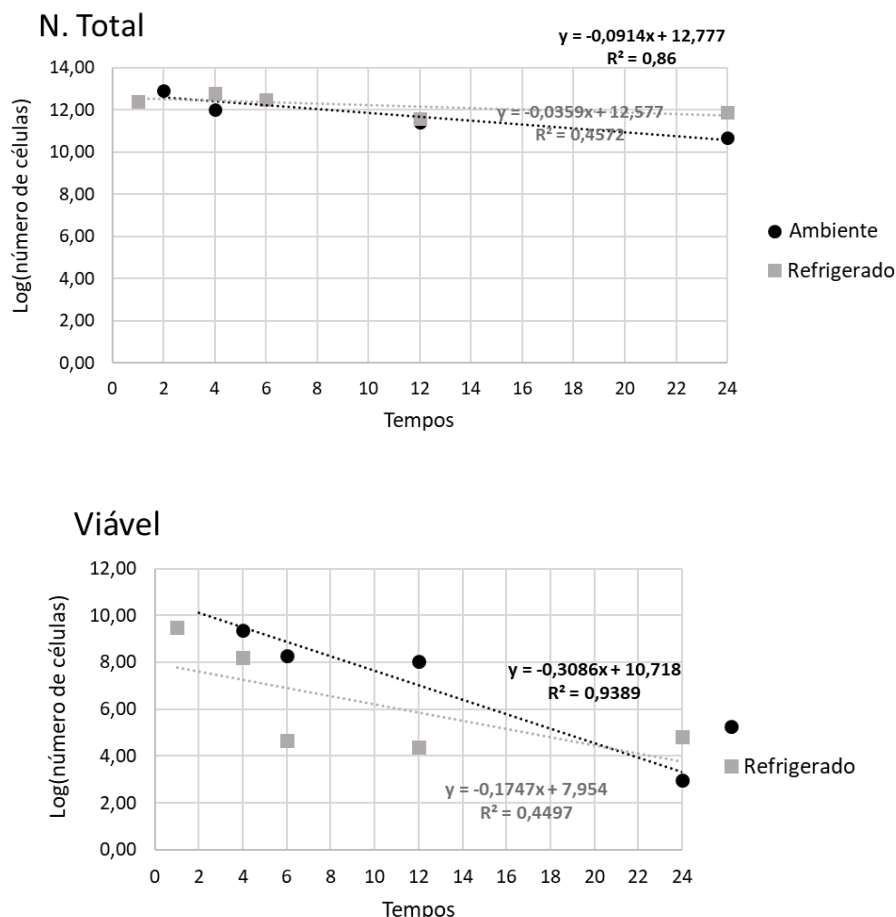


Gráfico 3. Regressão da interação tempo-temperatura em relação a quantidade de células totais e células viáveis.

Quando ambas as condições (ambiente e refrigerado) são comparadas em tempos iniciais (0h e 1h), as médias são similares, o que indica que, a curto prazo, a forma de armazenamento não impacta significativamente a viabilidade das células (como visto nos gráficos 1 e 2). Entretanto, após 12h e 24h, as amostras refrigeradas apresentam médias de células viáveis maiores quando comparado com as mantidas em temperatura ambiente, sugerindo um efeito protetor da refrigeração na manutenção da viabilidade celular, visto que há uma queda acentuada na quantidade de células viáveis em temperatura ambiente.

A condição de manutenção das amostras em temperatura ambiente pode ser inadequada em tempos de armazenamentos mais longos, acima de 12 horas, devido à rápida degradação celular e, por isso, a refrigeração demonstra ser uma estratégia eficaz para

prolongar a viabilidade e integridade celular quando as amostras necessitam ser transportadas para o laboratório.

Assim como para células totais, com respeito a quantidade de células viáveis, os tempos iniciais (0h, 1h, 4h) não diferem significativamente entre si, no entanto, o tempo mais longo correspondente a 24h apresenta valores significativamente menores, evidenciando a queda da quantidade de células vivas ao serem expostas a um período prolongado de intervalo desde a coleta até a análise.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os dados encontrados por Yazdani *et al.*, (2020) onde mostram que as células epiteliais orais humanas armazenadas a 4°C apresentaram a maior viabilidade e uma menor expressão de genes relacionados à apoptose quando comparado às células mantidas em temperatura de 24°C ou 12°C que sofreram maior degradação celular. No entanto, Eidet *et al.*, (2014) observaram que as células epiteliais conjuntivais humanas, ao serem armazenadas a 4°C apresentaram queda na viabilidade, sendo a temperatura ideal na faixa de 12°C, demonstrando que a temperatura de armazenamento varia de acordo com a matriz celular que está sendo analisada, sendo necessário mais estudos com relação aos colonócitos esfoliados.

Tabela 3. Dados da média da quantidade de células totais obtidas por diferentes tempos

TEMPO	MÉDIA
0h	12.8 ^A
1h	12.6 ^{AB}
4h	12.4 ^{ABC}
6h	12.3 ^{ABC}
12h	11.5 ^{BC}
24h	11.2 ^C

Médias com letras diferente diferem significativamente

Tabela 4. Dados da média da quantidade de células viáveis obtidas em diferentes tempos

TEMPO	MÉDIA
0h	10.5 ^A
1h	9.8 ^A
4h	8.8 ^A
6h	6.4 ^{AB}
12h	6.2 ^{AB}
24h	3.9 ^B

5.2. USO DE MUCOLÍTICO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESFOLIADAS DAS FEZES

Durante a execução do experimento de viabilidade celular, foi observado a presença de uma camada espessa de muco recobrindo as fezes dos cervídeos (Figura 6), diferindo do que havia sido encontrado anteriormente em pesquisa realizada utilizando caprinos como modelo experimental para cervídeos neotropicais (Silva *et al.*, 2022). Dessa forma, fez-se necessário que houvesse o uso de uma substância mucolítica para que as células pudessem ser recuperadas e, sendo assim, baseando-se no trabalho de Ahlquist *et al.*, (1999), White *et al.*, (2006) e Bandaletova *et al.*, (2002), fez-se uso do mucolítico Tioglicolato de Amônia 60%.

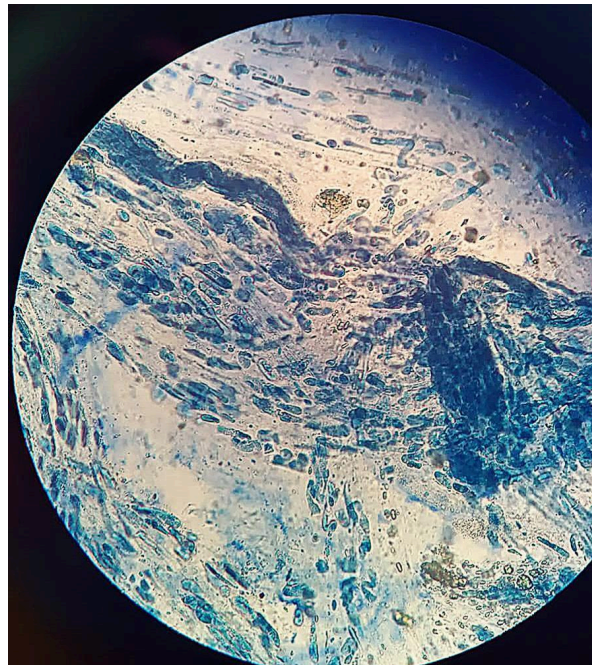
Figura 7. Camada de muco recobrindo as fezes de *M. jucunda*

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Após a lavagem realizada com solução de Tampão Fosfato Salino (PBS) com pH ajustado a 8,5 e acrescido de Tioglicolato de Amônio 60%, foi possível observar em

microscópio (em lente de aumento de 40x) a presença de diversas lâminas de muco contendo colonócitos aderidos a elas.

Figura 8. Lâmina de muco contendo colonócitos aderidos



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

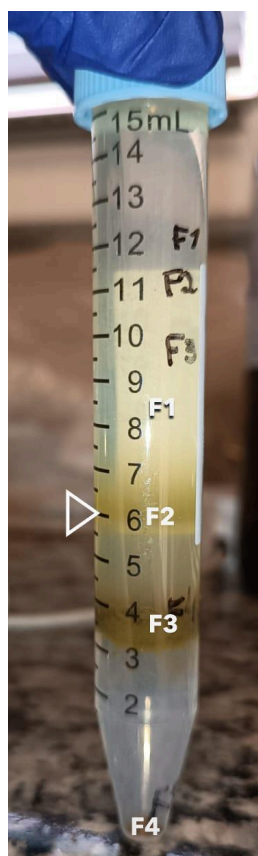
Em trabalho realizado por Bandaletova *et al.*, (2002) ao realizar lavagem de fezes com solução contendo Tioglicolato de amônio (TA) (5%), foi possível obter com sucesso colonócitos esfoliados bem preservados e com núcleo alongado típico, sem sinal de apoptose. Em alguns casos, os autores chegaram a encontrar grupos celulares que pareciam com fragmentos completos do epitélio, classificando-os como grupos de colonócitos organizados, o que também foi encontrado no presente trabalho, como é possível observar na figura 7. Em estudo realizado por White *et al.*, (2006), ao dividirem o lavado com solução de PBS + T.A. em três frações (fração F = filtro; fração S = sobrenadante e fração P = pellet), os autores observaram maior quantidade de células presentes na camada mucosa retida no filtro, tendo em média 433.8 células por 100 μ L de amostra, enquanto a fração S obteve média de 140.3 células e a fração P tendo 204.6 células, representando valores maiores do que os obtidos anteriormente pelos pesquisadores ao usarem esfregaços de fezes e recuperação com uso de microesferas magnéticas.

Tendo em vista a possibilidade promissora da obtenção das células presentes na camada mucosa das fezes dos cervídeos, decidiu-se isolá-las com uso do gradiente de Percoll (1,5M). O Percoll é composto por partículas de sílica coloidal revestidas com uma camada de

polivinilpirrolidona (PVP) e quando submetido à centrifugação em alta velocidade, forma gradientes de diferentes densidades, sendo não tóxico para células e organelas celulares, e, portanto, amplamente utilizado para a separação de diversos tipos celulares, incluindo espermatozoides, linfócitos, células mononucleares e hepatócitos. Por essa razão, foi escolhido para a separação entre o muco, os colonócitos e material fecal (Pertoft *et al.*, 1979; Timonen; Saksela, 1980; Lessley; Garner, 1983; Pino; Cardona, 2011).

Foram realizadas seis coletas onde os pellets de cada amostra foram ressuspensos em 15 mL de Percoll para melhor eficiência na separação visto que o muco estava ligado a bastante material fecal. Nesse gradiente foi possível distinguir visualmente no máximo 4 frações (Figura 9), diferentemente do que foi obtido por Albaugh *et al.*, (2002), que obteve 9 frações.

Figura 9. Gradiente Percoll com pellet ressuspensão após centrifugação



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Foi possível observar com clareza a fração onde se encontravam as lâminas de muco (indicado pela cabeça de seta na figura 9) no gradiente formado pelo Percoll. Com auxílio de pipeta, essa fração foi coletada e, após retirada do Percoll, analisada para observação das células. Conforme é possível verificar, havia uma quantidade expressiva de colonócitos. Esse

dado corrobora com o que foi obtido por White *et al.*, (2002) bem como por Loktionov (2007), que afirmam ser abundantes a presença de colonócitos na camada mucocelular em fezes humanas, em análises realizadas para estudos sobre câncer em humanos.

Após observar a presença de grande quantidade de células esfoliadas, visando obter maior confiabilidade, foi realizado teste de apoptose com algumas amostras onde foi possível observar a presença de diversas células viáveis, indicadas pelo núcleo corado em verde e uniforme como visto na figura 10 e indicado pela cabeça de seta na figura 11.

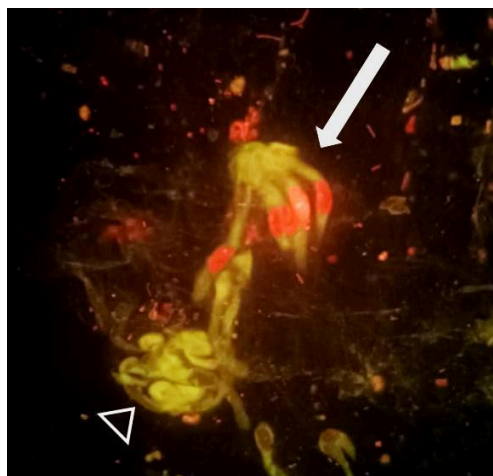
Figura 10. Colonócitos viáveis vistos em microscópio de fluorescência (Aumento de 60x)



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Assim como na análise de viabilidade através da exclusão com azul de tripan e no estudo elaborado por Bandaletova *et al.*, (2002), na análise realizada com corantes fluorescentes, foi possível observar grupos de colonócitos interligados, tanto viáveis quanto apoptóticos, como o indicado pelo núcleo corado em vermelho pela seta na Figura 11. O destacamento das células da sua matriz de origem resulta em uma deficiência de sinais/estímulos para que haja sobrevivência celular, como a ausência de fatores de crescimento ou ativação de integrinas, acarretando no acionamento da cascata que resulta na apoptose (Marastoni *et al.*, 2008), e esse fato explica a grande quantidade de células apoptóticas encontradas nas amostras.

Figura 11. Conjunto de colonócitos apoptóticos (seta) e viáveis (cabeça de seta) em microscópio de fluorescência



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Apesar de ser possível a visualização das células viáveis e apoptóticas/necróticas nas amostras, não foi possível realizar a contagem celular devido a alta presença de material fecal, camada mucosa, artefatos e sobreposição da grande quantidade de células presentes.

5.3. CULTIVO CELULAR

Foram realizadas seis cultivos (com amostras de dois indivíduos cada cultivo) de células fecais de cervídeos da espécie *Mazama Jucunda* no momento da defecação, evitando-se possíveis contaminantes ambientais, sendo as amostras imediatamente encaminhadas ao laboratório onde foi realizada a metodologia previamente descrita de lavagem com o agente mucolítico e isolamento das células através do gradiente de Percoll.

Em cinco dos seis cultivos houve contaminação dentro de quarenta e oito horas, sendo a placa descartada por completo. No entanto, em um dos cultivos realizados, após quarenta e oito horas ainda era possível observar a presença de colonócitos difundidos pela placa sem indícios de contaminação, sendo assim realizada a troca do meio de cultivo para manutenção das células.

Fig 12. Colonócitos observados no primeiro após 48 horas. Visto em microscópio invertido sob lente de aumento de 40x



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Quando esse cultivo atingiu cento e vinte horas (5 dias) (Figura 12), os poços restantes não apresentavam indícios de proliferação e foi possível observar alta taxa de mortalidade celular e toda a placa de cultivo foi descartada.

A contaminação do cultivo celular pode acontecer por diversos fatores, como: biológicos (fungos, vírus e bactérias), químicos (endotoxinas, detergentes residuais, metais pesados e radicais livres) ou contaminação cruzada decorrente de diferentes fontes (Routray *et al.*, 2016; Baust *et al.*, 2017; Mahmood; Ali, 2017). Tendo em vista que a matriz utilizada já apresenta um importante grau de contaminação, faz-se necessário estudos específicos para identificação de qual a classificação das bactérias estão presentes nas fezes e, assim, fazer uso de antibióticos específicos ou aumentar as dosagens presentes no meio de cultivo utilizado para colonócitos obtidos através dessa fonte.

A ligação das células com sua matriz extracelular (MEC) é essencial para sua sobrevivência e proliferação, e a falta dessa interação desencadeia o processo de morte celular denominado *anoikis*. O *anoikis* se caracteriza como sendo um mecanismo de manutenção da homeostase necessária para tecidos que apresentam alta taxa de renovação, como a mucosa do

trato gastrointestinal. A ligação entre a célula e sua matriz é mediada em sua maioria por integrinas (proteínas transmembranas) e há conhecimento da existência de ao menos 20 integrinas diferentes, onde desempenham um papel fundamental nos processos de proliferação e diferenciação das células ao permitir o contra célula-matriz e célula-célula (Grossman *et al.*, 2001; Gilmore, 2005).

A matriz extracelular desempenha um papel importante no cultivo das células provenientes do trato gastrointestinal. O Matrigel e o Geltrex são substâncias que podem ser acrescentadas ao cultivo celular *in vitro* na intenção de promover substrato para células dependentes de ancoragem (como é o caso dos colonócitos) sendo amplamente utilizadas em cultivos monocamadas ou 3D visando a mimetização do ambiente *in vivo* (Goissis, 2008). Sato *et al.*, (2009), utilizou o Matrigel para o cultivo de células Lgr5+ (criptas e vilosidades intestinais), demonstrando sua capacidade de fornecer estrutura adequada para o crescimento desse tipo celular. Em estudo realizado por Jung *et al.*, (2011) demonstrou que células-tronco colônicas humanas podem ser isoladas e cultivadas utilizando Matrigel como suporte tridimensional de forma bem sucedida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos nesse estudo conclui-se que é possível isolar células viáveis a partir de fezes de cervídeos neotropicais, havendo possibilidade de cultivá-las posteriormente após o refinamento da técnica, o que forneceria uma alternativa viável para pesquisas citogenéticas e para conservação. A análise da viabilidade celular revelou que o tempo de armazenamento das amostras tem um impacto significativo na viabilidade celular, onde os resultados indicaram uma queda progressiva na quantidade de células viáveis ao longo do tempo, sendo a refrigeração uma estratégia eficaz para mitigar esse fato, em especial quando as amostras serão armazenadas por tempo superior a 6 horas. Outro aspecto relevante identificado no estudo foi a observação do fato que a camada mucosa presente nas fezes dos cervídeos é uma fonte rica em células epiteliais. Com a utilização do tioglicolato de amônia como agente mucolítico, foi possível observar um aumento expressivo na obtenção de celular, reforçando a relevância dessa matriz para estudos citogenéticos e de biologia celular. No entanto, faz-se necessário que sejam realizados experimentos utilizando outro agente mucolítico para analisar o grau de sua eficiência, definindo qual seria o mais indicado para realizar a quebra do muco presente nas fezes de cervídeos sem que haja prejuízo na viabilidade celular.

Para o cultivo das células isoladas é extremamente importante que haja o controle da contaminação através do uso de antibióticos e antifúngicos mais específicos, mitigando a presença de microrganismos desde a coleta das amostras até seu processamento e posterior cultivo. Faz-se necessário também o uso de matrizes extracelulares nos cultivos, analisando se elas serão suficientes para impedir que os colonócitos ativem o processo de *anoikis* após se desprenderem do seu tecido de origem.

Tais achados têm implicações importantes para a conservação de espécies ameaçadas, como *Mazama juncunda*, ao viabilizar a obtenção de material biológico de maneira menos invasiva, possibilitando que haja coletas amostras de populações selvagens sem a necessidade de captura direta dos indivíduos. No entanto, é necessário que haja refinamento e padronização das técnicas empregadas, o que oportuniza a possibilidade de estudos futuros mais aprofundados. Dessa forma, sugere-se a exploração de novas abordagens para otimização dos processos de isolamento e cultivo celular, bem como a investigação da aplicabilidade desta metodologia em outras espécies de cervídeos.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V.V. et al. Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 128, n. 1-3, p. 177-187, 2010.
- AHLQUIST, D. A. et al. Morphometric analysis of the "mucocellular layer" overlying colorectal cancer and normal mucosa: relevance to exfoliation and stool screening. *Human Pathology*, v. 31, n. 1, p. 51-57, 2000. DOI: 10.1016/s0046-8177(00)80198-7.
- 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*, v. 9, n. 6, p. 671-674, 1993.
- 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*, v. 110, n. 3, p. 239-246, 2002.
- BARRETTE, C. The comparative behavior and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: WEMMER, C. M. (ed.). *Biology and management of the Cervidae*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 200-213.
- 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.
- BRANAN, W. V.; MARCHINTON, R. L. Reproductive ecology of white-tailed and red brocket deer in Suriname. In: WEMMER, C. M. (ed.). *Biology and management of the Cervidae*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 344-35.
- CATÃO-DIAS, J.L.; CAMARGO, C.M.S. Capture Myopathy. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical Cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, p. 324-329, 2010.
- 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.
- CHANDEL, D. S. et al. Live colonocytes in newborn stool: surrogates for evaluation of gut physiology and disease pathogenesis. *Pediatric Research*, v. 70, n. 2, p. 153-158, 2011. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3182225ac9.

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, C. D. "Use of exfoliated cells from target tissues to predict responses to bioactive food components," *Journal of Nutrition*, vol. 133, no. 6, pp. 1769–1772, 2003.

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; MERINO, M.L. **Taxonomia e Evolução**. In: Duarte, J.M.B. Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, p. 1-21, 1997.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. *Mammalia*, v. 67, p. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B. et al. Distribution and abundance of the small red brocket deer (*Mazama bororo*): Is it an endangered species?. In: SOCIETY FOR CONSERVATION BIOLOGY. *Proceedings of the XIX Annual Meeting of the Society for Conservation Biology*, 2005, Brasília. Resumo. 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. et al. Capture and physical restraint. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, p. 218-227, 2010.

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

DUARTE, José Maurício Barbanti; REIS, Marcelo Lima (Org.). *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção*. Brasília: ICMBio, 2012.

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

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; MANTELLATTO, A. M. B.; et al. *Mazama jucunda* Thomas, 1913. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE, 2023. Disponível em: <<https://salve.icmbio.gov.br>>. Acesso em: 5 jan. 2025.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. *BioSystems*, [s.l.], v. 34, p. 157-174, 1990.

GROSSMANN, J. et al., Hierarchical cleavage of focal adhesion kinase by caspases alters signal transduction during apoptosis of intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, v. 120, p. 79-88, 2001.

GOISSIS, M. D. *Estabelecimento de culturas de células-tronco embrionárias suínas: comparação da expressão de marcadores de pluripotência*. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GILMORE, A. P. Anoikis. *Cell Death & Differentiation*, v. 12, n. 2, p. 1473-1477, 2005.

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.

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.

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.

IUCN 2025. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/assessment/red-list-index>>. Acesso em: 05 jan. de 2025.

KAMRA, D.N. et al. Rumen microbial ecosystem. *Current science*, [s. l.], v. 89, ed. 1, p. 124-135, 2005.

KOSMIDER, B. et al. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research*, v. 563, p. 61-70, 2004.

LESSLEY, B.A.; GARNER, D.L. Isolation of Motile Spermatozoa by Density Gradient Centrifugation in Percoll. *Gamete Research*, v. 7, n. 1, p. 49-61, 1983.

LOKTIONOV, A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening. *International Journal of Cancer*, v. 120, n. 11, p. 2281-2289, 2007. DOI: 10.1002/ijc.22647.

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*, v. 2, n. 5, p. 1-8, 2017.

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.

MARASTONI, S. et al., Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connective Tissue Research*, v. 49, n. 3, p. 203-206, 2008. DOI: 10.1080/03008200802143190.

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.

OLIVEIRA, L. D.; DUARTE, J. M. B. Gastro-intestinal transit time in South American deer. *Zoo Biology*, v. 25, p. 47-57, 2006.

OLIVEIRA, M. L. et al. Phylogenetic signal in the circadian rhythm of morphologically convergent Neotropical deer species. *Mammalian Biology*, v. 81, n. 3, p. 281–289, 2016

PERTOFT, H. et al. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical Biochemistry*, 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.

PINO, P.A.; CARDONA, A.E. Isolation of Brain and Spinal Cord Mononuclear Cells Using Percoll Gradients. *Journal of visualized experiments*, v. 48, p. 1-3, 2011.

PUTMAN, R. J. *The natural history of deer*. London: Christopher Helm, 1988. p. 1991.

ROUTRAY, I. et al. Cell line cross-contamination and accidental co-culture. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*, v. 1, n. 5, 2017.

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.

SILVA, M.O.G. *et al.*, Obtenção de células esfoliadas viáveis utilizando caprinos como modelo experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA e XI ENCONTRO BRASILEIRO PARA O ESTUDO DE QUIRÓPTEROS, 2022, Fortaleza - CE. Anais do XI Congresso Brasileiro de Mastozoologia e XI Encontro brasileiro para o estudo de quirópteros. Fortaleza: S.I., 2022. p. 122-123.

STEWART, A. S. et al. Culture of equine intestinal epithelial stem cells after delayed tissue storage for future applications. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 445, 2022.

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*, 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*, 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.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. **Veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*)**. In: DUARTE, J. M. B.; REIS, M. L. (org.). *Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção*. 1. ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 2012. p. 70-79.

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.

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.

WHITE, V. et al. Isolation of stool-derived mucus provides a high yield of colonocytes suitable for early detection of colorectal carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 18, n. 7, p. 2006-2013, 2009. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1145.

YAZDANI, M. et al. Response of human oral mucosal epithelial cells to different storage temperatures: A structural and transcriptional study. *PLOS ONE*, v. 15, n. 12, p., 2020.