



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

WALLISSON BRUNO DE MORAIS PACHECO

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A
VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ
DURO**

TERESINA- PI

2021

WALLISSON BRUNO DE MORAIS PACHECO

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A
VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ
DURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como
requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia, Biotécnicas da
Reprodução e Fisiopatologia do Estresse.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Teresina – PI

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

P116e Pacheco, Wallisson Bruno de Morais.
Efeito de diferentes protocolos de criopreservação sobre a viabilidade de fibroblastos de bovinos da raça Curraleiro Pé Duro / Wallisson Bruno de Morais Pacheco. – 2021.
48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias, Teresina, 2021.
“Orientador: Prof. Dr. José Aldamir Torres de Souza.”
“Co-orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula.”

1. Células somáticas. 2. Banco de germoplasma. 3. Cultivo celular. I. Título.

CDD 636.089

**EFEITO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE
A VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS DA RAÇA
CURRALEIRO PÉ DURO**

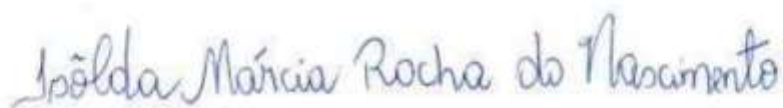
WALLISSON BRUNO DE MORAIS PACHECO

Dissertação aprovada em: 30/09/2021

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento (Interna) / CTT/UFPI



Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFMA

Dedico...

A todos os pesquisadores do Brasil.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por todas as graças e bênçãos de minha vida, pela capacidade de raciocinar e me desenvolver. Agradeço pelas oportunidades e pela capacidade de saber aproveitá-las da maneira correta.

A minha Mãe Maria das Dores de Moraes Pacheco, pela força e persistência que sempre teve em me colocar no caminho da educação, todo esforço que fez para me manter em desenvolvimento, pela paciência, gentileza e amor que só uma mãe pode dar.

A minha Tia Conceição de Maria de Moraes Pacheco, pelo exemplo que sempre foi e é, como Tia/Mãe, profissional da educação e como uma mulher forte e vencedora.

Ao meu avô, avó, tios, tias, padrinhos, madrinhas, primos, primas, sobrinhos e sobrinhas, que foram essenciais para a formação de meu caráter.

À minha querida, Luciana de Sousa Silva, pela paciência e horas dedicadas, a me inspirar e me manter empenhado, obrigado por ser uma boa companheira.

A meu orientador Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, por ter me orientado e me conduzido de maneira correta e justa, sempre disposto a me ajudar quando precisei bem como ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LBRA) e aos meus colegas discentes de Doutorado, Mestrado, Estágio e os Profissionais do programa de Residência bem como alunos de graduação.

Agradeço à Universidade Federal do Piauí, o Centro de Ciências Agrárias e o Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pela formação e qualificação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fundação de fomento, com inigualável valor para os pesquisadores e/ou cientistas do Brasil, pela bolsa que me permitiu desenvolver minha pesquisa com aporte financeiro suficiente e fundamental.

Ao Dr. João Batista Soares Luzardo Filho, proprietário das Fazendas Angico Branco e Montevidéu, que reunidas formam a Fazenda Vale do Rio Titara em Campo Maior – PI.

A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho direta ou indiretamente bem como a aqueles que me apoiam.

Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos. “Albert Einstein”

RESUMO

Os bovinos da raça Curraleiro Pé Duro possuem grande rusticidade e capacidade de adaptação, o que despertou interesse em cruzamentos genéticos, contribuindo com a diminuição drástica do número de animais. A técnica de Criopreservação de Células Somáticas, permite estocar por tempo indeterminado o material genético. Objetivou-se com essa pesquisa avaliar a viabilidade de células somáticas, pós criopreservação em três protocolos. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal LBRA/CCA/UFPI, Teresina-PI. Utilizou-se um bovino da raça Curraleiro Pé Duro, saudável, alimentado a pasto com suplementação de ração, acesso a água e sal à vontade. Após os exames iniciais, ocorreram as etapas de assepsia, tricotomia, anestesia e colheita da biópsia do tecido auricular, que foi transportada dentro de uma caixa com temperatura controlada. A biópsias foram processadas e incubadas em atmosfera controlada, a 39°C, 5% de CO₂ na atmosfera e umidade saturada. As células foram observadas quando a confluência e a morfologia até a quarta e quinta passagem e então, criopreservadas em 3 tratamentos, o primeiro (T1) utilizando um freezer a -20°C/24h e imersão em botijão com Nitrogênio Líquido, o segundo tratamento (T2) utilizando um freezer a -80°C/24h e imersão em botijão com Nitrogênio Líquido e o terceiro tratamento (T3) utilizando uma máquina com curva de criopreservação controlada, que após estabilização de -6°C, decresceu -0,5°C/min até -32°C e então, após estabilizadas foram imersas no botijão criogênico. Após 10 dias foram descongeladas e analisadas quanto a sua viabilidade celular, pela técnica de Azul de Tripán, colocadas novamente em cultura e em 7 dias, analisadas quanto a confluência e morfologia novamente. Os dados passaram por análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%. Não foram observadas nos protocolos de criopreservação, diferenças estatísticas entre a viabilidade celular (T1 = 68,00%, T2 = 72,14% e T3 = 70,99%), a capacidade de confluência (T1 = 80%, T2 = 90%, T3 = 85%) ou passagem de origem das células. A criopreservação de fibroblastos auriculares de bovinos Curraleiro Pé Duro, não teve diferença entre os três métodos de criopreservação, sugerindo até que o método que demanda equipamentos menos especializados (T1) é tão eficiente quanto os demais. Os protocolos se mostram uma ferramenta positiva para a conservação do material genético de raças nativas em risco de extinção, na forma de bancos de germoplasma, com grande potencial para utilização em biotécnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Células Somáticas; Banco de Germoplasma; Cultivo Celular

ABSTRACT

Bovine of the breed Curraleiro Pé Duro have great rusticity and adaptability, which aroused interest in genetic crossings, contributing to a drastic reduction in the number of animals. The Somatic Cell Cryopreservation technique allows the storage of genetic material indefinitely. The objective of this research was to evaluate the viability of somatic cells, post cryopreservation in three protocols. The experiment was carried out at the Laboratory of Biotechnology in Animal Reproduction LBRA/CCA/UFPI, Teresina-PI. A healthy cattle of the breed Curraleiro Pé Duro was used, fed on pasture with supplemental feed, access to water and salt at will. After the initial exams, there were the steps of asepsis, trichotomy, anesthesia and collection of the auricular tissue biopsy, which was transported inside a temperature-controlled box. Biopsies were processed and incubated in a controlled atmosphere, at 39°C, 5% CO₂ in the atmosphere and saturated humidity. Cells were observed at confluence and morphology until the fourth and fifth passage and then cryopreserved in 3 treatments, the first (T1) using a freezer at -20°C/24h and immersion in a cylinder with Liquid Nitrogen, the second treatment (T2) using a freezer at -80°C/24h and immersion in a cylinder with Liquid Nitrogen and the third treatment (T3) using a machine with controlled cryopreservation curve, which after stabilization at -6°C, decreased by -0.5 °C/min to -32°C and then, after stabilized, they were immersed in the cryogenic cylinder. After 10 days they were thawed and analyzed for cell viability by the Trypan Blue technique, placed again in culture and after 7 days, analyzed for confluence and morphology again. The data underwent analysis of variance and means were compared using the Tukey test with a significance level of 5%. Statistical differences were not observed in the cryopreservation protocols between cell viability (T1 = 68.00%, T2 = 72.14% and T3 = 70.99%), and confluence capacity (T1 = 80%, T2 = 90 %, T3 = 85%) or cell origin passage. The cryopreservation of ear fibroblasts from bovine Curraleiro Pé Duro had no difference between the three cryopreservation methods, even suggesting that the method that requires less specialized equipment (T1) is as efficient as the others. The protocols are a positive tool for the conservation of genetic material from native breeds at risk of extinction, in the form of germplasm banks, with great potential for use in assisted reproduction biotechniques.

Keywords: Somatic Cells; Germplasm Bank; Cell Culture

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Bovinos da raça Curraleiro Pé Duro, são bem adaptados ao cerrado Nordestino, com grande rusticidade, adaptação ao clima e resistência a ervas tóxicas 16
- Figura 2** - Coleta de Biópsia Auricular. **A.** Tricotomia. **B.** Antissepsia. **C.** Anestesia local. **D.** Coleta do fragmento auricular.32
- Figura 3** - Acondicionamento e processamento da biópsia. **A.** Tubo tipo Falcon de 15 ml para transporte, com PBS e antibiótico. **B.** Caixa com temperatura controlada, com gelo reciclável e água. **C.** Debridamento e Antissepsia. **D.** Repique em pequenos fragmentos. 33
- Figura 4** - Passagens celular. **A.** Amostras incubadas a 39°C, 5% CO₂ e umidade saturada. **B.** Amostras em meio de cultura. **C.** Células semelhantes a fibroblastos, após serem tripsinizadas e adquirirem um formato arredondado. **D.** Células centrifugadas e o pellet ressuspensão em meio de cultura.34
- Figura 5** - Fórmula de concentração para células grandes na câmara de Neubauer. **A** = Quantidade de células contadas. **B** = Quantidade de quadrantes contados35
- Figura 6** - Equação da Viabilidade celular. **VC** = Viabilidade celular. **A** = Células vivas. **B** = Células mortas.37
- Figura 8** - **A.** Fibroblasto, fusiforme, com núcleo grande e arredondado. **B.** Confluência celular em aproximadamente 90%.38
- Figura 9** - **A.** Célula viável. **B.** Célula morta.....39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Viabilidade (%) e confluência (%) celular dos tratamentos ($p>0,05$).....	40
Tabela 2 – Viabilidade celular (%) em relação a passagem de origem ($p>0,05$).....	40
Tabela 3 - Confluência celular (%) em relação a passagem de origem ($p>0,05$).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS – Cultivo de Células Somáticas

CPD – Bovino Curraleiro Pé Duro

CS – Células Somáticas

DMEM – Meio de cultivo “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”

mL - Mililitros

mm – Milímetros

NL₂ – Nitrogênio Líquido

PBS – Solução Tampão “Phosphate-buffered saline”

TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas

TNCSi – Transferência Nuclear Interspecífica de Células Somáticas

uL – Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Bovinos Curraleiro Pé Duro	16
2.2. Células somáticas e as biotecnologias reprodutivas	17
2.3. Criopreservação de Células somáticas	18
2.4. Bancos de germoplasma animal	19
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	25
CAPÍTULO 1	26
Resumo	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	38
Conclusão	42
Agradecimentos	43
Referências	44
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
ANEXO 1	48
Carta de Aprovação do Comitê de Ética	48

1. INTRODUÇÃO

A raça tropicalmente adaptada Curraleiro Pé-Duro, foi assim nominado após pesquisas revelarem a igualdade genética das raças Curraleiro e a Raça Pé-Duro (CARVALHO et al., 2012). Trata-se de uma das raças bovinas mais importantes na história do sertão nordestino e do Vale do São Francisco, presente a quase 500 anos no cerrado Nordeste (SANTIAGO, 1975). Dentre as características zootécnicas, dos animais da raça, vale destacar a grande longevidade com animais vivendo e produzindo por até 20 anos, grande fertilidade, precocidade e habilidade materna bem como sua produtividade elevada, visto que necessita de uma pouca quantidade de alimentos para atingir a maturidade sexual. Foi reconhecida oficialmente como raça de interesse zootécnico na Portaria nº 1.150 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituída em 14 de dezembro 2012 (BRASIL, 2012), ressaltando na raça a sua dupla aptidão para leite e carne de alta qualidade.

A conservação de raças nativas reflete diretamente no meio ambiente e na cultura, compondo além de um patrimônio genético, um patrimônio histórico-cultural. O cruzamento com outras raças para se criar novas linhagens, aproveitando sua grande rusticidade, adaptação ao clima e até resistência a ervas tóxicas, pode acabar subjugando o real potencial de uma raça (FIORAVANTI, 2015) que, com uma quantidade de indivíduos relativamente pequena, a perda do material genético pode ocorrer mesmo com a morte de um único indivíduo, reduzindo o pool gênico e até mesmo genes importantes para a manutenção da espécie, justificando assim a necessidade de técnicas assistidas que evitem a perda parcial ou total de um material genético importante (MARTINS et al., 2007).

Para a conservação do material genético e da biodiversidade, faz-se necessário desenvolvimento e aprimoramento de técnicas, como o cultivo de células somáticas que podem ser criopreservadas e armazenadas em criobancos para posteriormente serem empregadas em biotecnologias reprodutivas (WANI & HONG, 2018). De maneira resumida, células somáticas são todas as células diploides do corpo do animal, ou seja, todas as células que possuem um conjunto gênico completo, logo, todas as células do indivíduo com exceção das células reprodutivas (STRACHAN, 2013).

As células somáticas podem ser classificadas em primárias e de linhagem contínua, sendo as primárias as células que crescem a partir do fragmento de biópsia enquanto as de linhagem contínua, são as células que se destacam no crescimento em cultivo *in vitro*, com maior capacidade de aderência e proliferação (ALVES e GUIMARÕES, 2010). Mesmo que dificilmente se conseguida distinguir qual tecido da origem celular é o melhor doador, as mais

comuns células que são utilizadas como doadoras de núcleo são as provenientes do útero, do fígado, dos fibroblastos, de linfócitos, de células epiteliais de glândulas mamárias, células da granulosa e até células do cúmulo, mais de maneira geral, acredita-se que é inversamente proporcional a possibilidade da utilização dessas células em biotecnologias reprodutivas com o grau de diferenciação dessa célula somática (CAMPBELL et al., 2007; MIYOSHI et al., 2003).

As técnicas de criopreservação e de cultivo de células somáticas, visam o armazenamento do material genético da espécie de forma a preservá-lo biologicamente viável por longos períodos de tempo com a manutenção adequada de suas funções e estruturas celulares (TSAI; LIN, 2012). Em geral, as amostras somáticas para a criopreservação celular, são obtidas de tecidos derivados da pele e cultivados *in vitro* para a recuperação de células (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016).

Os bancos de germoplasma ou criobancos, são uma alternativa de grande viabilidade para a manutenção da diversidade biológica e genética, visto que a implementação de programas de conservação de animais *in situ* ou *ex situ*, apresentam algumas dificuldades como a quantidade de animais na área disponível e o alto custo de manutenção das propriedades, enquanto os bancos apresentam baixo custo e ocupam uma área pequena (SILVA et al., 2012). Sendo assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a viabilidade de fibroblastos auriculares de bovinos Curraleiro Pé Duro, pós criopreservação em três protocolos, observando assim, a sua viabilidade para compor criobancos de pesquisa e/ou conservação de material genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bovinos Curraleiro Pé Duro

A raça de bovino *Curraleiro Pé-Duro* (Figura 1), foi assim nomeado após pesquisas revelarem a igualdade genética das raças Curraleiro e a raça Pé-Duro (CARVALHO et al., 2012). Trata-se de uma das raças bovinas mais importantes na história do sertão nordestino e do Vale do São Francisco, presente a quase 500 anos no Cerrado Nordestino (SANTIAGO, 1975).

Foi reconhecida oficialmente como raça de interesse zootécnico na Portaria nº 1.150 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituída em 14 de dezembro 2012 (BRASIL, 2012), ressaltando na raça a sua dupla aptidão para leite e carne de alta qualidade. A conservação de raças nativas reflete diretamente no meio ambiente e na cultura, compondo além de um patrimônio genético, um patrimônio histórico-cultural.

Figura 1 - Bovinos da raça Curraleiro Pé Duro, são bem adaptados ao cerrado Nordestino, com grande rusticidade, adaptação ao clima e resistência a ervas tóxicas



FONTE: ABCPD - Associação Brasileira dos Criadores de Bovino Curraleiro Pé Duro

Dentre as características zootécnicas, dos animais da raça, vale destacar a grande longevidade com animais vivendo e produzindo por até 20 anos, grande fertilidade, precocidade e habilidade materna bem como sua produtividade elevada, visto que necessita de uma pouca quantidade de alimentos para atingir a maturidade sexual. Com o seu porte médio, em uma área onde ocupa uma vaca de outra espécie com aproximadamente 400 kg, se pode colocar duas vacas de bovino Curraleiro Pé Duro, de 180 a 200 kg de peso vivo, do ponto de vista em reprodução, a quantidade maior de vacas por hectare, resulta no dobro de bezerros/ano. A raça possui, grandes exemplares de reprodutores, como o premiado touro Chumbinho, com 700 kg de peso vivo e descendentes de ótima qualidade fenotípica e genotípica (ABCPD).

A conservação de raças nativas reflete diretamente no meio ambiente e na cultura, compondo além de um patrimônio genético, um patrimônio histórico-cultural. O cruzamento com outras raças para se criar novas linhagens, aproveitando sua grande rusticidade, adaptação ao clima e até resistência a ervas tóxicas, pode acabar subjugando o real potencial de uma raça nativa e diminuindo drasticamente sua população (FIORAVANTI, 2015). O número exato de Bovinos Curraleiros Pé Duro ainda é incerto, Fioravanti et al. (2011) estimou 3.692 animais, Dias et al. (2015) contabilizou 140 animais remanescentes no leste do Maranhão, a Embrapa Meio Norte possuía um total de 400 animais (DINIZ, 2005), porém estudos populacionais atuais da raça ainda são escassos.

Com uma quantidade de indivíduos relativamente pequena, a perda do material genético pode ocorrer mesmo com a morte de um único indivíduo, reduzindo o *pool gênico* e até mesmo genes importantes para a manutenção da espécie, justificando assim a necessidade de técnicas assistidas que evitem a perda parcial ou total de um material genético importante (MARTINS et al., 2007).

2.2. Células somáticas e as biotecnologias reprodutivas

As células somáticas são todas as células diploides do corpo do animal, ou seja, todas as células que possuem um conjunto gênico completo, logo, todas as células do indivíduo com exceção das células reprodutivas (STRACHAN, 2012). Essas células vêm sendo amplamente pesquisadas em mamíferos, de diferentes espécies, com diferentes regiões do tecido e para diferentes finalidades como o trabalho de Saini et al. (2015), com búfalo selvagem, no qual utilizou células epiteliais para TNCS, como Cetinkaya e Arat et al. (2011), com células do epitélio auricular de animais *Bos taurus* visando congelamento lento em DMSO.

O cultivo celular, pode ser classificado quanto aos diferentes tipos celulares, sendo as células primárias, as que crescem a partir de um fragmento de amostra, por desagregação mecânica ou enzimática, possuindo características das células de do tecido de origem e possuem um cultivo finito, limitado a um número de passagens. Outro tipo celular é o de linhagem contínua que são células de um cultivo primário, que se destacaram na capacidade de aderência e proliferação no cultivo *in vitro*, tornando assim, após algumas passagens, uma cultura mais resistente, que mantém as características das células de origem e podem ser mantidas em cultura por um período maior, chegando até a 80 passagens. Por fim as células podem ser classificadas como células transformadas, que são células que perderam a capacidade de apoptose, ou células obtidas de tumores e ainda células que foram induzidas com a telomerase a se reproduzirem

indefinidamente, perdendo assim as suas características originais e tendo a capacidade de se manter em cultivo infinitamente (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

Mesmo que dificilmente se consegue distinguir qual tecido da origem celular é o melhor doador, as mais comuns células que são utilizadas como doadoras de núcleo são as provenientes do útero, do fígado, dos fibroblastos, de linfócitos, de células epiteliais de glândulas mamárias, células da granulosa e até células do cúmulo, mais de maneira geral, acredita-se que é inversamente proporcional a possibilidade da utilização dessas células em biotecnologias reprodutivas com o grau de diferenciação dessa célula somática (CAMPBELL et al., 2007; MIYOSHI et al., 2003).

O maior potencial aplicado às biotécnicas de reprodução animal, está no uso as células somáticas para Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), a qual, permite a utilização das células somáticas para produção de embriões em oócitos enucleados, apesar de ainda ser uma técnica de baixa eficiência, Costa et al. (2020), demonstrou em seus trabalhos que a baixa eficiência da técnica pode estar ligada falhas de replicação no padrão no DNA, principalmente na região ICR / H19. As células somáticas estão sendo utilizadas como mecanismos para de maneira interespecífica, garantir a preservação genética da biodiversidade com o aprimoramento da TNCS, agora para a Transferência Nuclear Interespecífica de Células Somáticas (TNCSi), esta por sua vez, permite a utilização de uma carioteca de uma espécie em um carioplasto de outra, como por exemplo a possibilidade da produção e reprogramação de embriões com células somáticas proveniente de cervídeos utilizando carioplastos bovinos e caprinos (FREITAS et. al., 2020)

2.3. Criopreservação de Células somáticas

Objetivando a conservação do tecido celular, a criopreservação consegue trazer desde uma redução no metabolismo celular até uma manutenção dos aspectos funcionais e estruturais por longos períodos em nitrogênio líquido, possibilitando o uso futuro das amostras em biotécnicas reprodutivas como clonagens e Transferência Nuclear de Células Somáticas (COSTA et al., 2016). Em geral, as amostras somáticas para a criopreservação celular, são obtidas de tecidos derivados da pele e cultivados *in vitro* para a recuperação de células (MESTRE-CITRINOVITZ et al., 2016).

Em conjunto a técnica de criopreservação e de cultivo de células somáticas, visam o armazenamento do material genético da espécie de forma a preservá-lo biologicamente viável por longos períodos de tempo com a manutenção adequada de suas funções e estruturas celulares (TSAI; LIN, 2012)

Consiste basicamente em processos de congelamento lento ou vitrificação, aonde no congelamento lento o processo geralmente é realizado com auxílio de uma máquina automatizada e uma curva de congelamento, possibilitando a queda controlada da temperatura e menor lesão celular (LOUTRADI et al., 2008) enquanto na vitrificação a amostra é resfriada e submetida a uma queda abrupta de temperatura com a imersão direta em nitrogênio líquido, neste caso necessitando de grandes quantidades de crioprotetores para que não haja a formação de cristais de gelo e conseqüentemente injúrias e até mesmo a morte celular (CETINKAYA et al., 2014), pois os mesmos alteram a permeabilidade da membrana celular, para que durante o resfriamento a água possa sair do interior da célula, fazendo com que essa desidratação reduza o ponto de congelamento para -5°C e impedindo a formação dos cristais intracelulares (CASTILHO et al., 2008).

Vale ressaltar, que um dos pontos principais além da técnica de criopreservação, é a escolha dos crioprotetores, que podem ser divididos em intracelulares, que são solventes de baixo peso molecular e tem a capacidade de penetrar através da membrana celular e retirar a água no interior da célula por pressão osmótica enquanto os intracelulares, pelo seu peso molecular elevado, não penetram na célula e atuam na superfície da membrana plasmática, reparando e estabilizando-a (CAROLSFELD e HARVEY, 1999).

Atualmente a congelação lenta é o método mais utilizado, visto a sua capacidade de diminuir as injúrias celulares e a vitrificação por ser uma técnica de menor custo e com a necessidade de pouco equipamento especializado, tem sido pesquisada a fim de que se consiga elaborar protocolos que minimizem os danos as células. Silvestre et. al. (2004), empregou a vitrificação em células, bovinas, ovinas e caprinas conseguindo taxas de viabilidade celular de 40 a 75% e Cetinkaya e Arat (2011), observaram, em seu estudo com Bovinos que não há diferença significativa entre os métodos de congelação lenta e vitrificação.

2.4. Bancos de germoplasma animal

Os bancos de germoplasma ou criobancos, são uma alternativa de grande viabilidade para a manutenção da diversidade biológica e genética, visto que a implementação de programas de conservação de animais *in situ* ou *ex situ*, apresentam algumas dificuldades como a quantidade de animais na área disponível e o alto custo de manutenção das propriedades, enquanto os bancos apresentam baixo custo e ocupam uma área pequena (SILVA et al., 2012).

A conservação e variabilidade genética de raças locais é mantida através de Núcleos de Conservação (*in situ*) e pela conservação em criobancos de sêmen e embriões (EGITO et. at., 2002). Sendo assim, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), através do

Centro Nacional de Pesquisas em Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenagem) incluiu fontes de recursos genéticos de animais domésticos “locais” no seu programa de pesquisa, conservação e utilização de recursos genéticos, que até aquele momento abrangeria apenas plantas (MARIANTE & EGITO, 2002). E então no Piauí, a Embrapa Meio-Norte, iniciou um projeto de conservação *in situ* de bovinos da raça Curraleiro Pé Duro, com objetivo de evitar a completa substituição e/ou perda do material genético da raça (EMBRAPA).

A associação de técnicas de cultivo e criopreservação de células somáticas se mostram uma contribuição para a criação de criobancos e uma boa estratégia para a conservação das informações genéticas de espécies raras, de grande valor comercial, ameaçadas de extinção (LEÓN-QUINTO et al., 2014) e até mesmo de espécies já extintas (FOLCH et al., 2009).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCPD, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BOVINOS CURRALEIRO PÉ- DURO. Disponível em:< <http://www.abcpd.com.br> > Acesso: 01 de janeiro de 2021

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo celular**. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV. p. 215-253. 2010

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 1.150, de 17 de dezembro de 2012. Reconhece a raça de bovinos denominada Curraleiro Pé-Duro e estabelece outras medidas para sua conservação. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 dez. Seção 1, Edição 242, p. 2, 2012

CAMPBELL K, FISHER P, CHEN W, CHOI I, KELLY R, LEE J, XHU J. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68 p. S214- S231. 2007

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.J. Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática. **Curso de treinamento brasileiro**. Tradução HP. Godinho. Victória, Canadá: World Fisheries Trust, p.47, 1999

CARVALHO, G. M. C.; AZEVEDO, D. M. M. R.; NETO, A. F. L.; NASCIMENTO, H. T. S.; PAIVA, S. R.; MARIANTE, A. S.; BLACKBURN, H. D. Similaridade genética entre bovinos Curraleiro e Pé-Duro por marcadores microsatélite. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **Anais [...]**. Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012

CASTILHO, L.; MORAES, A.; AUGUSTO, E.; BUTLER, M. Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy. New York: Taylor & Francis Group, 2008

CETINKAYA G.; HATIPOGLU, I.; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, v.68, p.65-70, 2014

CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, v.63, p. 292–297, 2011

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Ferramentas para a avaliação de células e tecidos somáticos após a criopreservação em mamíferos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, p.820-829, 2016

COSTA, N. S; SILVEIRA, M. M; VARGAS, L. N; CAETANO, A. R; RUMPF, R; FRANCO, M. M. Caracterização epigenética do locus H19/IGF2 na placenta de bezerros clones. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 12, 22 dez. 2020

DIAS, E. F; LIMA, F. C; JUNIOR, J. C. A. T; ALVES, N. F; FERREIRA, A. P. S; COSTA, V. R. Bovinos remanescentes da raça Curraleiro Pé-Duro no Leste do Maranhão. **I Simpósio Internacional de Raças Nativas**, Teresina, Piauí. 2015

DINIZ, F. **Instituições se unem para salvar gado Curraleiro da extinção**. 27 set. 2005. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17980277/instituicoes-se-unem-para-salvar-gado-curraleiro-da-extincao>. Acesso em: 01 jan. 2021

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBURQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de Zootecnia*, Córdoba, v. 51, p. 39-52, 2002

FIORAVANTI, M. C. S.. Valoração Econômica para Raças Locais: Bovino Curraleiro Pé-Duro. *In: I simpósio internacional de raças nativas: sustentabilidade e propriedade intelectual*, Teresina. **Simpósio**. Teresina: EMBRAPA, 2015

FIORAVANTI, MCS; JULIANO, RS; COSTA, GL et al. Conservação do Curraleiro bovino: quantificação do censo e caracterização dos criadores. **Anim. Genet. Res.**, V.48, p.109-116, 2011

FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, New York, v.71, p.1026-1034, 2009

FREITAS, V. J. F; MELO L. M; MAGALHÃES, L. C; DUARTE, J. M. B. Transferência Nuclear de Células Somáticas interespecífica (TNCSi) na conservação de cervídeos em risco de extinção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, n. 2, p. 45-49, 2020

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, London, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014

LOUTRADI, K.E.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; PAPANIKOLAOU, E.G.; PADOS, G.; TARLATZIS, B.C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v.90, p.186-193, 2008

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 223-235, 2002

MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORRÊA, Geórgia Assis; RUMPF, Rodolfo. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, ano 2007, v. 67, ed. 8, p. 1307-1315, 2007

MESTRE-CITRINOVITZ AC, SESTELO AJ, CEBALLOS MB, BARAÑAO JL, SARAGÜETA P. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Curr Protoc Molec Biol**, v.116, p.1-14, 2016

MIYOSHI K, RZUCIDLO S, PRATT S, STICE S. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. **Biology of reproduction**, v. 68 p. 1079-1086. 2003

SAINI, M.; SELOKAR, N. L.; RAJA, A. K.; SAHARE, A. A.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R.S.; PALTA, P. Effect of donor cell type on developmental competence,

quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. **Theriogenology**, v. 84, p. 101–108, 2015

SANTIAGO, A. A. Os cruzamentos na pecuária bovina. São Paulo: **Instituto de Zootecnia**. São Paulo, SP: Instituto de Zootecnia. 549 p. 1975

SILVA, A.; SOUZA, A. L.P.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SOUZA, P. C. & CASTELO, T. S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**: Edição especial, 2, 219-234. 2012

SILVESTRE, M.A.; SÁNCHEZ, J.P.; GÓMEZ, E.A. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Theriogenology*, v. 49, p. 221-229, 2004

STRACHAN, T; READ, A. **Genética molecular humana**. 4. ed. Artmed. 808 p. ISBN 978-8565852517. 2012

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 425-433, 2012

WANI, N. A; HONG, S. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with stored epididymal spermatozoa in camel (*Camelus dromedarius*): Effect of exogenous activation on in vitro embryo development. **Theriogenology**, , v. 113 p. 44-49, 2018

4. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este estudo encontra-se estruturado com as seguintes seções de texto: Resumo, Abstract, Introdução, Revisão de Literatura, Capítulo I, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências Bibliográficas, de acordo com a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. O capítulo I contém o artigo “VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO” que foi submetido à revista ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, de classificação B2 para área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No processamento, cultivo e criopreservação do tecido auricular de bovinos da raça Curraleiro Pé Duro, é possível a obtenção de células somáticas com morfologia semelhante a fibroblastos e que as mesmas possuem boa capacidade de resistência a processos de congelamento em diferentes protocolos de congelamento incluindo protocolo utilizando um freezer mais simples de -20°C e que após o descongelamento, se mantiveram preservados a viabilidade celular e as capacidades tanto de crescimento como de confluência celular, sendo assim capazes de serem mantidas em criobancos como estratégia de conservação genética da raça nativa e da biodiversidade, seja como fonte de material biológico de pesquisas como para biotécnicas de reprodução assistida, como Transferência Nuclear Interespecífica (ou na mesma espécie) de Células Somáticas (TNCS e TNCSi) e na Indução de Pluripotência de Células Somáticas (iPCS).

ANEXO 1

Carta de Aprovação do Comitê de Ética



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeito da criopreservação sobre células somáticas de bovinos da raça Curraleiro pé duro submetidas a diferentes curvas de congelamento*", registrada nº 673/21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **17/05/2021**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/06/2021 a 01/05/2021
Espécie/Linhagem/raça	Bovino/ Curraleiro Pé-duro
Nº de Animais	01
Peso/ Idade	+600 kg/ +5 anos
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Vale do Rio Titara - Teresina/PI
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Fazenda Vale do Rio Titara - Teresina/PI
Grau de Invasividade	2

Teresina, 20 de Maio de 2021.

Eilika Andréia F. Vasconcelos

Profa. Dra. Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos.
Vice- Coordenadora da CEUA/UFPI