

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

### MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

## CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE PEIXE-BOI MARINHO, *Trichechus* manatus manatus (LINNAEUS, 1758) USANDO DIFERENTES TÉCNICAS E SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO

MOSSORÓ–RN 2022

#### MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

## CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE PEIXE-BOI MARINHO, *Trichechus* manatus manatus (LINNAEUS, 1758) USANDO DIFERENTES TÉCNICAS E SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

**Orientadora:** Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira © Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

N244c Nascimento, Matheus Barbosa do. Conservação de tecido somático de peixe-boi marinho, Trichechus manatus manatus (Linnaeus, 1758) usando diferentes técnicas e soluções de criopreservação / Matheus Barbosa do Nascimento. -2022. 110 f. : il.
Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2022.
1. Sirênios. 2. Criobanco. 3. Mamífero marinho. 4. Criopreservação tecidual. 5. Espécie ameaçada. I. Pereira, Alexsandra Fernandes, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automáto em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo) autor(a). Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

#### MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO

## CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE PEIXE-BOI MARINHO, *Trichechus* manatus manatus (LINNAEUS, 1758) USANDO DIFERENTES TÉCNICAS E SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 25/03/2022.

#### **BANCA EXAMINADORA**

Discondra Firmandes Porira

Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira (UFERSA) Presidente e Orientadora

Alana Izwedo Borger

Profa. Dra. Alana Azevedo Borges (UERN) Membro Examinador

Fernande b. N. Attaclemo

Profa. Dra. Fernanda Löffler Niemeyer Attademo (ICMBio/CMA) Membro Examinador

#### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MATHEUS BARBOSA DO NASCIMENTO** – Nascido em Fortaleza, CE, no dia 15 de agosto de 1995, filho de Maria das Graças Barbosa do Nascimento e Iran Honório do Nascimento. Graduou-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, 2014–2019). Estagiou no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), participando de Programas de Iniciação Científica (Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica, 2017–2018 e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, 2018–2019), participando em diferentes experimentos relacionados à criopreservação, histologia e cultivo *in vitro* de amostras somáticas em mamíferos silvestres, sob a orientação da Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira. Em janeiro de 2020, após ser aprovado no processo seletivo para o mestrado acadêmico em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA), iniciou suas atividades de mestrado no LBA com bolsa de auxílio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*A minha família por todo amor, carinho, confiança, apoio e incentivo.* 

A minha orientadora, Alexsandra Fernandes Pereira, por toda paciência, confiança, dedicação e ensinamentos passados ao longo do percurso.

#### AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bençãos, proteção e força nos dias mais difíceis durante essa jornada, que fez tudo ser como é.

À toda minha família, em especial minha mãe Maria das Graças Barbosa do Nascimento, meu pai Iran Honório do Nascimento e minha irmã Mariana Barbosa do Nascimento, vocês são exemplos de garra, perseverança, amor, compreensão, renúncias e apoio. Muito obrigado pelas oportunidades de estudo, conversas, carinho, apoio e esforço descomunal para que atingisse meu objetivo. Sempre estiveram ali presentes, sejam nos bons ou maus momentos, sendo a palavra de incentivo, o ombro amigo, o colo compreensivo. Tudo que sou e faço é por vocês e para vocês.

À minha orientadora Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, a melhor orientadora que um discente de pós-graduação pode ter. Exemplo de profissionalismo, garra, determinação, força e paixão pelo que faz, mesmo com todas as dificuldades que é ser mulher cientista e fazer pesquisa no nosso país. Agradeço a dedicação, tempo, paciência, carinho e atenção durante toda nossa trajetória, por todas as conversas, puxões de orelha, conselhos, preocupações e ensinamentos, por não desistir de mim. Obrigado por me confiar este trabalho, sua primeira incursão no mundo marinho, dando todo o suporte e apoio possível para a concretização dele. Não consigo colocar suficientemente em palavras toda sua importância nessa jornada desafiadora. Meu eterno agradecimento à senhora, por seus ensinamentos acadêmicos, profissionais e pessoais!

À Profa. Dra. Alana Azevedo Borges, que me acompanha desde a graduação. Obrigado por sua determinação, auxílio, paciência e compreensão. Também agradeço os carões e puxões de orelha, foram todos necessários para o crescimento. Te acompanhar e auxiliar em seus experimentos do doutorado foi um dos melhores momentos em minha trajetória acadêmica. Sua alegria, vontade de viver e o esforço de sempre fazer melhor são luz que contagia todos ao seu redor. Minha eterna gratidão por tudo que você fez e pela pessoa que és!

Ao meu braço direito e esquerdo na realização dos experimentos, Yasmin Beatriz França Moura. Você com um jeito meigo conquistou o seu espaço no laboratório e na minha vida. Sua dedicação e compromisso na realização das atividades foi algo lindo de se ver, sempre realizando-as com afinco e esmero. Continue sendo essa menina leve, radiante, calorosa, acolhedora, dedicada e compromissada. Te agradeço principalmente por ter me aguentado nos dias mais corridos e estressantes, quando fui ríspido contigo e você nunca desistiu de estar ali e me ajudar. Te levarei sempre no meu coração com muito carinho e orgulho, principalmente da estudante que está se tornando.

À toda a equipe que esteve junto comigo e auxiliou nos experimentos: Alana Azevedo Borges, Gabriela Pereira de Oliveira Lira e Yasmin Beatriz França Moura. Vocês foram parte essencial na realização desta pesquisa, compraram a ideia, vestiram a camisa do time e estiveram sempre ali, auxiliando em todos os momentos, principalmente naqueles dias de caos com as análises. Essa pesquisa é fruto do nosso esforço e dedicação. Sem a contribuição de vocês, nada disso seria possível. Muito obrigada por toda confiança e amor!

Aos meus companheiros e companheiras de pós-graduação Leonardo Vitorino Costa de Aquino e Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira, por serem verdadeiros amigos, pessoas extraordinárias, com quem posso contar nos bons e maus momentos. Também agradeço a Maria Valéria de Oliveira Santos, Érika Almeida Praxedes, Denilsa Pires Fernandes e Luanna Lorenna Vieira Rodrigues, por serem grandes amigos e me permitirem ajudar e ser ajudado nos experimentos. Vocês proporcionaram vários momentos alegres, situações engraçadas, convívios diários no laboratório que tornaram a pós-graduação um pouco mais leve de ser carregada. Vocês levaram alegria e tornaram meus dias melhores. Muito obrigado pela dedicação e amizade de todos vocês.

À Dra. Fernanda Löffler Niemeyer Attademo por ter sido nossa grande intermediária e colaboradora na obtenção das amostras dos animais, sempre muito atenciosa e prestativa com nossas dúvidas, e de forma especial por ter nos acolhido gentilmente em sua residência no período de colheita das amostras. Ao M.Sc. Radan Elvis Matias de Oliveira, por ter nos apresentado o universo dos animais marinhos, bem como ter sido nossa ponte nos primeiros contatos com a Dra. Fernanda, e em especial por sua disponibilidade para a colheita das amostras.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA, responsável: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira), desde 2017 foi praticamente minha segunda casa, fundamental no decorrer de minha trajetória acadêmica. Naquele espaço me senti acolhido, querido, vivi momentos felizes, adquiri muitos conhecimentos, fiz grandes amizades que levarei para o resto da vida. Sou muito honrado e grato por ter feito parte dessa história e orgulhoso de cada um que passou e que permanece nessa grande família. Sentirei muitas saudades do cotidiano no laboratório, nossos momentos de brincadeira, as rotinas de experimentos, os cafés da tarde. Sempre terei cada um de vocês em meu coração com muito orgulho e carinho. À toda equipe do Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA/UFERSA, responsável: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira) pela parceria e disponibilidade da infraestrutura laboratorial.

À banca avaliadora, Profa. Dra. Alana Azevedo Borges e Profa. Dra. Fernanda Löffler Niemeyer Attademo, pela disponibilidade em avaliar, buscando contribuir da melhor maneira possível com este trabalho.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por autorizar o acesso e colheita das amostras nos peixes-boi marinho.

À Base Avançada do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos (BAV/CMA/ICMBio, responsável: Dra. Fábia de Oliveira Luna), em especial a todos os seus colaboradores, por toda a dedicação no cuidado e tratamento dos animais, bem como pelo auxílio na colheita das amostras dos peixes-boi marinhos, uma tarefa bastante desafiadora e exaustiva, mas que com a ajuda de todos vocês tornou-se possível.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) pela formação acadêmica e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos animais, peixe-boi marinho, uma espécie formidável e que apresenta um papel fundamental no ecossistema, mas que se encontra ameaçada de extinção. Sem eles, a realização desta pesquisa não seria possível.

Finalmente, agradeço a todos que de forma direta ou indireta auxiliaram e torceram para que eu pudesse finalizar mais um ciclo, e que porventura não tenham sido aqui citados.

"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem".

João Guimarães Rosa in Grande Sertão Veredas

#### CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE PEIXE-BOI MARINHO, *Trichechus* manatus manatus (LINNAEUS, 1758) USANDO DIFERENTES TÉCNICAS E SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO

NASCIMENTO, Matheus Barbosa do. CONSERVAÇÃO DE TECIDO SOMÁTICO DE PEIXE-BOI MARINHO, *Trichechus manatus manatus* (LINNAEUS, 1758) USANDO DIFERENTES TÉCNICAS E SOLUÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2022.

RESUMO: Os criobancos de tecidos somáticos são importantes ferramentas para a conservação e conhecimento das espécies, especialmente aquelas ameaçadas de extinção como o peixe-boi marinho, que vem tendo sua população reduzida por ações antrópicas. Assim, faz-se necessário a otimização de protocolos para redução de danos ocasionados pelas técnicas de criopreservação. Diante deste cenário, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial da criopreservação para tecidos somáticos de peixe-boi marinho (Etapa 1), bem como aperfeiçoar o protocolo de vitrificação (Etapa 2). Para tanto, foram coletados fragmentos oriundos da pele de seis peixes-boi marinho mantidos no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos, na Ilha de Itamaracá, Pernambuco, e divididos em duas etapas. Na primeira etapa, fragmentos foram distribuídos nos grupos congelação lenta (CL) e vitrificação em superfície sólida (VSS). Já na segunda etapa, fragmentos foram alocados nos grupos vitrificados com diferentes soluções: 3M-EG+3M-DMSO, 1,5M-EG+1,5M-DMSO, 3M-EG e 3M-DMSO. Tecidos não criopreservados foram utilizados como grupo controle nas duas etapas. Para todos os experimentos, fragmentos foram avaliados quanto à ultraestrutura, espessura da derme, quantificação de fibroblastos, percentual de fibras colágenas e potencial proliferativo tecidual. Além disso, células resultantes dos explantes cultivados foram avaliadas quanto à morfologia, aderência, viabilidade, atividade proliferativa, atividade metabólica, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta \Psi m$ ) e níveis de apoptose. Na primeira etapa, a VSS não alterou a espessura da derme (P > 0.05), mas, ambas as técnicas diminuíram a quantidade de fibroblastos e aumentaram o percentual de fibras colágenas (P < 0,05). A CL manteve o potencial proliferativo tecidual, semelhante aos tecidos não criopreservados. No cultivo in vitro, apenas fragmentos do grupo VSS não apresentaram crescimento celular no período de 60 dias. Para o grupo CL, células obtidas não apresentaram redução na sua viabilidade e atividade proliferativa (P > 0.05), entretanto, houve redução no metabolismo e aumento dos níveis de apoptose, EROs e  $\Delta \Psi m$  em comparação com células de tecidos não criopreservados. Já na segunda etapa, não houve diferença na ultraestrutura, sendo observado aumento na espessura da derme no grupo 1,5M-EG+1,5M-DMSO. Em todos os grupos vitrificados houve redução nos fibroblastos e aumento da matriz colágena (P < 0.05). Contudo, a vitrificação com 3,0M-EG+3,0M-DMSO manteve o potencial proliferativo dos tecidos. Nenhum dos fragmentos vitrificados foram capazes de produzir células em cultivo in vitro. Em conclusão, tecidos somáticos de peixe-boi marinho podem ser criopreservados por congelação lenta, produzindo células viáveis após cultivo in vitro. Os tecidos quando vitrificados, mesmo com redução na concentração, bem como a associação dos crioprotetores intracelulares não permitiram a obtenção de células, o que evidencia necessidade do aperfeiçoamento de protocolos, visando aumentar a qualidade dos bancos de tecidos somáticos nesta espécie.

Palavras-chave: criobanco, mamífero marinho, criopreservação tecidual, espécie ameaçada

#### CONSERVATION OF SOMATIC TISSUE OF MARINE MANATEE, *Trichechus* manatus manatus (LINNAEUS, 1758) USING DIFFERENT CRYOPRESERVATION TECHNIQUES AND SOLUTIONS

NASCIMENTO, Matheus Barbosa do. CONSERVATION OF SOMATIC TISSUE OF MARINE MANATEE, *Trichechus manatus manatus* (LINNAEUS, 1758) USING DIFFERENT CRYOPRESERVATION TECHNIQUES AND SOLUTIONS. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, 2022.

Abstract: Somatic tissue cryobanks are important tools for the conservation and knowledge of species, especially those threatened with extinction such as the Antillean manatee, whose population has been reduced by human actions. Thus, it is necessary to optimize protocols to reduce damage caused by cryopreservation techniques. Given this scenario, the present study aimed to evaluate the potential of cryopreservation for somatic tissues of marine manatee (Step 1), as well as to improve the vitrification protocol (Step 2). For this, fragments from the skin of six Antillean manatees kept at the National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals, on the island of Itamaracá, Pernambuco, were collected and divided into two stages. In the first step, fragments were distributed in the slow freezing (SF) and solid surface vitrification (SSV) groups. In the second step, fragments were allocated to groups vitrified with different solutions: 3M-EG+3M-DMSO, 1.5M-EG+1.5M-DMSO, 3M-EG and 3M-DMSO. Non-cryopreserved tissues were used as a control group in both stages. For all experiments, fragments were evaluated for ultrastructure, thickness of the dermis, quantification of fibroblasts, percentage of collagen fibers and tissue proliferative potential. In addition, cells resulting from cultured explants were evaluated for morphology, adherence, viability, proliferative activity, metabolic activity, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ( $\Delta \Psi m$ ) and levels of apoptosis. In the first step, SSV did not change the thickness of the dermis (P > 0.05), but both techniques reduced the number of fibroblasts and increased the percentage of collagen fibers (P < 0.05). SF maintained tissue proliferative potential, similar to non-cryopreserved tissues. In the in vitro culture, only fragments of the SSV group did not show cell growth in the period of 60 days. For the SF group, cells obtained showed no reduction in their viability and proliferative activity (P >0.05), however, there was a reduction in metabolism and increased levels of apoptosis, ROS and  $\Delta \Psi m$  compared to cells from non-cryopreserved tissues. In the second stage, there was no difference in the ultrastructure, with an increase in the thickness of the dermis being observed in the 1.5M-EG+1.5M-DMSO group. In all vitrified groups there was a reduction in fibroblasts and an increase in collagen matrix (P < 0.05). However, vitrification with 3.0M-EG+3.0M-DMSO maintained tissue proliferative potential. None of the vitrified fragments were able to produce cells in in vitro culture. In conclusion, Antillean manatee somatic tissues can be cryopreserved by slow freezing, producing viable cells after in vitro culture. The tissues when vitrified, even with a reduction in concentration, as well as the association of intracellular cryoprotectants did not allow obtaining cells, which shows the need to improve protocols, aiming to increase the quality of somatic tissue banks in this species.

Keywords: cryobanking, marine mammal, tissue cryopreservation, endangered species

#### LISTA DE FIGURAS

#### **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## CAPÍTULO 2 – THE INITIAL STEPS TOWARDS THE FORMATION OF SOMATIC TISSUE BANKS AND CELL CULTURES DERIVED FROM CAPTIVE ANTILLEAN MANATEE (*Trichechus manatus manatus*) SKIN BIOPSIES

**Fig. 3.** Quantification of collagen fiber matrix in the dermis of Antillean manatees subjected to different cryopreservation techniques stained with Gomori Trichrome. **a**) Non-cryopreserved tissues. **b**) Slow freezing. **c**) Solid-surface vitrification. **d**) Quantification of the

Fig. 7. Effect of slow freezing cryopreservation in somatic tissues of Antillean manatees on oxidative stress and cellular apoptosis levels. Fluorescent H<sub>2</sub>DCFDA in cells from **a**) non-cryopreserved and **a'**) cryopreserved fragments. MitoTracker<sup>TM</sup> Red CMXRos fluorescent in cells from **b**) non-cryopreserved and **b'**) cryopreserved fragments. Evaluation of apoptosis levels in cells from **c**) non-cryopreserved and **c'**) cryopreserved fragments. Quantification of levels of **d**) ROS, **e**)  $\Delta\Psi$ m and **f**) apoptosis. Viable cells: thin arrow, early apoptotic cells:

## CAPÍTULO 3 – INFLUENCE OF INTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS ON THE CONSERVATION OF DERMAL SOMATIC TISSUES DERIVED FROM ANTILLEAN MANATEES (*Trichechus manatus manatus LINNAEUS*, 1758)

FIG. 5. *In vitro* culture of fragments derived from the skin of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions. (A) Primary culture of non-vitrified fragments, with cell

### LISTA DE QUADRO

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quadro	1.	Criopreservação	por	congelação	lenta	de	diferentes	amostras	somáticas	de
mamíferos marinhos								30		

#### LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 2 – THE INITIAL STEPS TOWARDS THE FORMATION OF SOMATIC TISSUE BANKS AND CELL CULTURES DERIVED FROM CAPTIVE ANTILLEAN MANATEE (*Trichechus manatus manatus*) SKIN BIOPSIES

Table 1. Details of the main biological aspects of Antillean manatees used in this study..... 55

## CAPÍTULO 3 – INFLUENCE OF INTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS ON THE CONSERVATION OF DERMAL SOMATIC TISSUES DERIVED FROM ANTILLEAN MANATEES (*Trichechus manatus manatus LINNAEUS*, 1758)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
×	Vezes
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
AgNOR	Argyrophilic nucleolar organizer regions
BAV	Base Avançada (Advanced Base)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
	Superior
CE	Ceará
Cells/mL	Células por mililitro
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais (Ethics Committee in the
	Use of Animals)
СМА	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos
	Aquáticos (National Center for Research and Conservation of
	Aquatic Mammals)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
	Tecnológico (National Counsel of Technological and
	Scientific Development)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco (Dulbecco's
	Modified Eagle Medium)
DMEM/Ham's F-12	Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco:Mistura de
	nutrientes F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient
	Mixture F-12)
DMSO	Dimetilsufóxido (dimethyl sulfoxide)
EG	Etilenoglicol ( <i>ethylene glycol</i> )
g/mol	Grama por mol

GT	Gomori trichrome
h	Hora
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HE	Hematoxylin-eosin
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
	(Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation)
iPS	Indução de células pluripotentes
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza
	(International Union for Conservation of Nature)
LABMORFA	Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal (Laboratory of Animal
	Biotechnology)
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LN	Liquid nitrogen
Μ	Molar
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
no.	Número
PBS	Solução tampão fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PDT	Population doubling time
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
RN	Rio Grande do Norte
ROS	Reactive oxygen species
SAC	Sucrose

sec	Second
SF	Slow freezing
SFB	Soro Fetal Bovino (FBS: fetal bovine sérum)
TNCS	Transferência nuclear de célula somática
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Federal Rural
	University of Semi-Arid)
VDC	Vitrificação direta em criotubos
VSS	Vitrificação em superfície sólida (SSV: Solid-surface
	vitrification)
ΔΨm	Mitochondrial membrane potential
µg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. ASPECTOS FILOGENÉTICOS E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DO	PEIXE-BOI
MARINHO	25
2.2. QUANTITATIVO POPULACIONAL, RISCO DE EXTINÇÃO E ESTADO	) DA ARTE
DA CONSERVAÇÃO DO PEIXE-BOI MARINHO	27
2.3. FORMAÇÃO DE BANCOS DE TECIDOS SOMÁTICOS APLICA	ADOS AOS
MAMÍFEROS MARINHOS	29
2.4. PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS PARA A FORMAÇÃO DO BANCO DI	E TECIDOS
SOMÁTICOS	
2.4.1. Técnicas de criopreservação	32
2.4.2. Influência de crioprotetores intracelulares	34
3. JUSTIFICATIVA	
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO GERAL	
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO 2 – PASSOS INICIAIS PARA A FORMAÇÃO DE BA	NCOS DE
TECIDOS SOMÁTICOS E CULTIVOS DE CÉLULAS DERIVADAS DE	BIÓPSIAS
DA PELE DE PEIXES-BOI MARINHO (Trichechus manatus mat	natus) EM
CATIVEIRO	49
CAPÍTULO 3 – INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES INTRACELUI	LARES NA
CONSERVAÇÃO DE TECIDOS SOMÁTICOS DÉRMICOS DERIV	ADOS DE
PEIXES-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus LINNAEUS, 1758).	
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	106
ANEXOS	107

#### **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

#### 3 1. INTRODUÇÃO

4

O peixe-boi marinho (Trichechus manatus manatus) é um importante mamífero 5 aquático herbívoro, distribuído por mais de 15 países ao longo do continente americano, 6 incluindo o litoral brasileiro (LUNA et al., 2012; ATTADEMO et al., 2021). Esta espécie 7 possui um importante papel ecológico junto à cadeia alimentar do ecossistema que habita, 8 sendo indicadora de qualidade ambiental (LUNA et al., 2008a). Contudo, segundo a União 9 Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), encontra-se classificada atualmente 10 11 como vulnerável (DEUTECHS et al., 2008), e do ponto de vista nacional como em perigo de extinção (LUNA et al., 2018) com perspectivas crescentes de redução populacional. 12

13 Entre as causas responsáveis por essa redução do quantitativo populacional, destacamse as ações antrópicas, como a degradação dos ambientes, mudança e perda de habitats, 14 15 elevação dos níveis de poluentes sólidos e líquidos e degradação do litoral (LIMA et al., 2011). Nesse cenário, estratégias de conservação tornam-se essenciais para a garantia da 16 17 biodiversidade mundial (OLIVEIRA et al., 2019). No Brasil, propostas de conservação têm sido desenvolvidas por meio do Plano de Ação Nacional para Conservação do Peixe-boi 18 marinho (Trichechus manatus) denominado PAN Peixe-boi Marinho (portaria no. 249/2018, 19 20 BRASIL, 2018) elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Entre as recomendações desse plano de ação têm-se a redução dos efeitos das 21 atividades antrópicas sobre as populações naturais, ampliação do conhecimento aplicado a sua 22 23 conservação e aperfeiçoamento de ações de conservação *ex situ* nos próximos cinco anos.

Em geral, as ações *ex situ* envolvem dois tipos, a *in vivo* e a *in vitro*. As ferramentas *in vivo* consistem na conservação do animal vivo fora de seu habitat natural, geralmente em reservas ou parques ecológicos (ANDRABI; MAXWELL, 2007). Já as ferramentas *in vitro* consistem na criopreservação de recursos biológicos na forma de criobancos (COMIZZOLI, 2017), sendo atualmente uma ferramenta altamente sugerida em virtude de poder conservar materiais biológicos de diferentes populações de uma espécie (PRAXEDES et al., 2019).

30 Os bancos de recursos biológicos podem ser constituídos de gametas, embriões, 31 tecidos gonadais, tecidos e células somáticas mantidos em condições criogênicas de 32 temperatura e armazenamento (LERMEN et al., 2009; MACHADO et al., 2016). Nos últimos 33 anos, amostras somáticas têm despertado interesse na formação dos criobancos, em virtude 34 destas amostras poderem ser coletadas de maneira menos invasiva, não se restringindo ao gênero e idade do animal (PRAXEDES et al., 2018), bem como poderem ser empregadas em
estudos de reprogramação nuclear por meio de clonagem por transferência nuclear de célula
somática (TNCS) e indução de células pluripotentes (iPS; BORGES; PEREIRA, 2019a).

Para todas essas aplicações, o primeiro passo consiste em formar um criobanco
adequado de tecidos somáticos. Nesse sentido, dois fatores são responsáveis pela eficiência
desses bancos, a técnica de criopreservação e a solução de crioprotetores empregados.
Estudos em outros mamíferos silvestres têm demonstrado variações quanto a esses dois
fatores, mesmo quando utilizando o mesmo tipo tecidual (BORODA et al., 2015; BORGES;
PEREIRA, 2019a; COSTA et al., 2020).

44 Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar diferentes técnicas de
45 criopreservação e crioprotetores intracelulares visando o estabelecimento de um banco de
46 recursos somáticos para a conservação do peixe-boi marinho.

#### 2. REVISÃO DE LITERATURA

69

# 70 2.1. ASPECTOS FILOGENÉTICOS E IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DO PEIXE-BOI 71 MARINHO

72

Os sirênios são mamíferos aquáticos herbívoros, não-ruminantes, totalmente adaptados à vida aquática, pertencentes à ordem Sirenia, um grupo monofilético que taxonomicamente compreende duas famílias: Dugongidae e Trichechidae (**Figura 1**) (LUNA et al., 2008a). A primeira família é constituída por uma espécie vivente e uma espécie extinta: dugongo (*Dugong dugon*) e vaca-marinha-de-Steller (*Hydrodamalis gigas*), respectivamente. Já a segunda é composta por um único gênero com quatro espécies de peixes-boi (BARROS et al., 2016).



**Figura 1.** Espécies pertencentes à ordem Sirenia. Fonte: FREIRE (2016).

81

A família Trichechidae por possuir sensibilidade e intolerância à água fria, necessita 82 de uma temperatura mínima tolerável de 20 °C, encontra-se distribuída nas regiões tropicais e 83 subtropicais (BALENSIEFER et al., 2017; Figura 2): Trichechus inunguis (peixe-boi da 84 Amazônia) se encontra ao longo da Bacia Amazônica; Trichechus manatus (peixe-boi 85 marinho ou das Índias Ocidentais) ao longo do continente americano, desde a Flórida nos 86 Estados Unidos, até a região Nordeste do Brasil, habitando as águas costeiras e rios; 87 Trichechus senegalensis (peixe-boi africano) cuja distribuição abrange o continente africano, 88 sendo encontrado ao longo da costa, estuários e rios desde o Senegal até Angola (MARSH; 89

90 LEFEBVRE, 1994; DOMNING, 2001). Há registros de hibridação de espécies encontradas na



91 América do Sul (VIANNA et al., 2006; LUNA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022).

Figura 2. Distribuição das espécies da família Trichechidae e Dugongidae, incluindo as
subespécies derivadas do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus latirostris* e *T. manatus manatus*). Fonte: HOULGUIN-MEDINA (2008) modificado.

95

A espécie marinha de peixe-boi, Trichechus manatus (Linnaeus, 1758) é subdivida em 96 97 duas (HATT, 1934): Trichechus manatus latirostris (peixe-boi da Flórida), presente nos Estados Unidos, do Texas ao estado da Virgínia, e Norte do Golfo do México; e Trichechus 98 manatus manatus (peixe-boi das Antilhas), que se distribui ao longo do Caribe, costa atlântica 99 do México, América Central e América do Sul. No Brasil, esta espécie ocorre de maneira 100 descontínua do extremo norte do país até o litoral do nordeste, não estando presentes nos 101 litorais dos estados de Sergipe, Bahia e Espírito Santo, provavelmente devido à caça do 102 103 mesmo (LUNA et al., 2012).

104 Em relação ao *T. manatus manatus*, Vianna et al. (2006) relataram que a população 105 brasileira de *T. m. manatus* possui 2n = 48 (cariótipo não apresentado), com um conjunto 106 diploide semelhante ao da Flórida. Mais detalhadamente, Barros et al. (2016) descreveram o 107 cariótipo do peixe-boi marinho presente no Brasil, o qual identificou como 2n = 48 e 108 composto de nove cromossomos metacêntricos, cinco submetacêntricos, oito subtelocêntricos e um acrocêntrico. Tais informações tornaram-se cruciais para o conhecimento do perfil
cromossômico da espécie, bem como a detecção futura de alterações cromossômicas.

Os sirênios, assim como os outros grupos de mamíferos marinhos, sofreram diversas adaptações anatômicas e fisiológicas para se tornarem aptos a viver no ambiente aquático. As principais modificações foram relacionadas ao ambiente e à ecologia alimentar das espécies. O corpo de um sirênio é fusiforme e quase desprovido de pelos; não apresenta membros traseiros e pavimentos auriculares e possui nadadeiras peitorais reduzidas em forma de remo (MARMONTEL et al., 1997).

117 A pele destes animais é finamente enrugada em toda sua extensão. A coloração do 118 corpo varia de cinza a marrom, podendo ficar esverdeada em virtude do crescimento de algas 119 verdes. Os escassos pelos dorsais parecem ser sensíveis às correntes e são receptivos a 120 vibrações de baixa frequência ou pressão das ondas (KIPPS et al., 2002).

Ecologicamente, os espécimes contribuem para a manutenção do ciclo de plantas e outros seres da biota. Suas fezes, ricas em nutrientes, fertilizam as águas e transformam-se em adubo para o crescimento de vegetais, tornando o ecossistema mais estável e produtivo (LIMA et al., 2015). O peixe-boi marinho pode ser considerado uma espécie-sentinela, na qual indica alterações que ocorrem no ambiente onde habita (BONDE et al., 2004), atribuindo-lhe importante função ecológica. Portanto, pesquisas e incentivos para conservação dessa espécie são fundamentais para o equilíbrio do ambiente (CHOI et al., 2011).

128

## 129 2.2. QUANTITATIVO POPULACIONAL, RISCO DE EXTINÇÃO E ESTADO DA ARTE 130 DA CONSERVAÇÃO DO PEIXE-BOI MARINHO

131

A estimativa populacional, bem como detalhamentos da área de distribuição do peixeboi marinho no Brasil ainda carece de maiores informações (CHOI-LIMA et al., 2017). No ano de 2010, foi realizado um único sobrevoo entre os estados de Alagoas e Ceará, sendo estimado na região uma avistagem de 67 peixes-boi, resultando numa população entre 485 e 2221 indivíduos, com média de 1104 (ALVES et al., 2016), denotando uma grande incerteza do tamanho populacional real.

As causas para a diminuição populacional dos sirênios são variadas para cada espécie, assim como entre as áreas de ocorrência. A vaca-marinha-de-Steller, apenas 27 anos após sua descoberta foi extinta devido a caça indiscriminada (ANDERSON, 1995). Assim como a vaca marinha, as espécies brasileiras também sofreram grande exploração de caça no passado, fato que persiste ainda para a espécie amazônica (LUNA et al., 2008b).

A redução do quantitativo populacional do peixe-boi marinho ocorre principalmente 143 em decorrência das atividades humanas (LUNA et al., 2008a), como as ações relacionadas às 144 atividades petroquímicas, uso abusivo e inconsciente de agrotóxicos e fertilizantes, somado ao 145 crescimento urbano desordenado, vêm intensificando a contaminação por agentes químicos, 146 físicos e biológicos em enormes áreas utilizadas pelos sirênios no Brasil (PARENTE et al., 147 2004; LIMA et al., 2011). Estes animais são especialmente afetados, pois possuem uma longa 148 149 expectativa de vida e utilizam as águas costeiras, onde há uma maior concentração de poluentes em virtude da proximidade de áreas de uso e ocupação humana, favorecendo seu 150 contato com a contaminação ambiental (ANZOLIN et al., 2012). 151

Essas interferências antropogênicas, somado a fatores naturais ambientais, vêm 152 contribuindo com um número crescente de encalhe de animais adultos e filhotes 153 (MEIRELLES, 2008; ATTADEMO et al., 2021) causados especialmente devido à perda de 154 habitat pela degradação ambiental até ingestão de lixo (SILVA; MARMONTEL, 2009). O 155 aumento no número de embarcações determinou também um maior risco de traumas 156 157 (BORGES et al., 2007), além de afastar a espécie da área de uso habitual. Estes fatores somados a contínua modificação da costa, seja ela de origem física, acústica, visual ou 158 159 química, contribuíram para elevar os riscos relacionados à sobrevivência da espécie nas áreas 160 costeiro-litorâneas (BALENSIEFER et al., 2017).

Entre os fatores naturais que dificultam a reposição populacional dos sirênios, e os ameaçam de extinção está a ocorrência limitada da espécie, reprodução lenta, comportamento relativamente dócil, o que permite a aproximação de seres humanos e suscetibilidade a doenças infecciosas e agentes contaminantes, entre eles os metais pesados (BOSSART et al., 2002; RECTOR et al., 2004; BOSSART, 2007).

Especialmente nos últimos anos, trabalhos envolvendo o peixe-boi marinho têm se direcionado principalmente para o entendimento das suas características fisiológicas e histológicas, bem como para doenças que acometem esses animais. Oliveira et al. (2019) descreveram o arco aórtico destes animais. Seguindo o mesmo raciocínio, a descrição histológica do trato reprodutivo destes animais e de seus anexos fetais foi observada por Bezerra et al. (2018). Estas descrições são essenciais no entendimento de anormalidades morfológicas, fisiológicas e histológicas, doenças, determinação da *causa mortis* de animais.

Quanto aos estudos voltados para a compreensão da associação de doenças nestes
animais, encontram-se trabalhos envolvendo a parasitologia da urina (PIRES et al., 2016),
investigação de ervas marinhas na transmissão e soroprevalência de toxoplasmose
(ATTADEMO et al., 2016; WYROSDICK et al., 2017), identificação de bactérias no sangue

177 (SILVA et al., 2017), ocorrência de endoparasitas (VÉLEZ et al., 2018) e microbiota fecal
178 (SUZUKI et al. 2019). Estudos como estes indicam que contaminações microbianas são muito
179 preocupantes para a saúde dos peixes-boi marinho.

Além disso, foram realizados estudos que mostraram a distribuição do peixe-boi 180 marinho no litoral norte do Brasil (LUNA et al., 2008b), histórico da presença deste animal na 181 costa brasileira (BALENSIEFER et al., 2017), em especial no estado do Rio Grande do Norte 182 183 (ATTADEMO et al., 2021), mostrando que o encalhamento de peixes-boi vivos ocorreu no litoral nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. 184 Estudos vêm alertando sobre o encalhe de peixes-boi marinhos recém-nascidos e imaturos no 185 Brasil, indicando que essa situação tem sido persistente ao longo dos anos (PARENTE et al., 186 2004; LUNA et al., 2012). A partir de estudos como estes, pode-se entender o padrão de 187 distribuição da espécie em nosso país, bem como acompanhar os índices de encalhamento. 188

Dessa forma, vendo os resultados já obtidos nos estudos anteriores e as associações entre as causas e danos que impactam na saúde destes animais, bem como buscando contribuir na conservação do peixe-boi marinho, soma-se nas estratégias de conservação já realizadas a formação de bancos de recursos somáticos. Esses criobancos, quando apropriadamente estabelecidos, otimizam a amostragem da população e podem ser empregados em estudos como multiplicação, entendimento da espécie e medicina regenerativa (PEREIRA et al., 2018).

196

197 2.3. FORMAÇÃO DE BANCOS DE TECIDOS SOMÁTICOS APLICADOS AOS198 MAMÍFEROS MARINHOS

199

Um criobanco de amostras somáticas é definido como a conservação de amostras (tecidos e células) criopreservadas sob temperaturas criogênicas (-196 °C) por tempo indeterminado (LERMEN et al., 2009). Tais criobancos têm se tornado ferramentas essenciais em estudos genéticos, citotóxicos, indução de células a pluripotência e conservação das espécies (PEREIRA et al., 2018, 2019).

Em mamíferos marinhos, as informações sobre as condições adequadas de criopreservação de tecidos somáticos ainda são escassas (**Quadro 1**). Inicialmente, Sweat et al. (2001) criopreservaram linhagens celulares derivadas do epitélio renal do peixe-boi da Flórida. Posteriormente, em 2003, os mesmos autores criopreservaram linhagens celulares derivadas do tecido pulmonar da mesma espécie, evidenciando uma taxa de crescimento e morfologia celular adequada após a descongelação (SWEAT et al., 2003). Em tecido somático proveniente da pele, o primeiro registo data de 2015, onde Boroda et al. criopreservaram pele de Golfinho-do-irrawaddy, Leão-marinho-de-Steller e Morsa por congelação lenta, obtendo fibroblastos dérmicos cultivados em meio enriquecido com soro fetal bovino, e aminoácidos.

215

216 Quadro 1. Criopreservação por congelação lenta de diferentes amostras somáticas de
217 mamíferos marinhos.

Espécie	Origem da amostra	Amostra	Solução de criopreservação	Autores	
Peixe-boi da Flórida	Rim	Célula renal	DMEM/Ham's F-12 7,5% DMSO 10% SFB	Sweat et al. (2001)	
latirostris)	Pulmão Célula bronquial		DMEM/Ham's F-12 10% DMSO 50% SFB	Sweat et al. (2003)	
Cachalote-pigmeu (Kogia breviceps)	Pulmão	Tecido pulmonar	DMEM 10% DMSO 10% SFB	Mancia et al. (2011)	
Golfinho-do-irrawaddy (Orcaella brevirostris), Leão- marinho-de-Steller (Eumetopias jubatus), Morsa	Cauda	Derme	DMEM I) 6% DMSO, 6% EG, 15 mg/mL sacarose II) 10% DMSO, 15 mg/mL trealose 10% SFB	Boroda et al. (2015)	
(Guodenus rosmarus)		Fibroblasto	DMEM 10% DMSO 10% SFB		
Baleia jubarte ( <i>Megaptera</i> novaeanglia)	Cauda	Fibroblasto	DMEM 10% DMSO 90% SFB	Burkard et al. (2015)	
Golfinho-pintado-pantropical (Stenella attenuata)	Cauda	Fibroblasto	DMEM 10% DMSO 90% SFB	Rajput et al. (2018)	
Orca pigmeia (Feresa attenuata)	Cauda	Fibroblasto	DMEM 10% DMSO 90% SFB	Yajing et al. (2018)	
Foca-pintada ( <i>Phoca largha</i> ), Leão-marinho-de-steller ( <i>Eumetopias jubatus</i> ), Morsa do Atlântico ( <i>Odobenus</i> <i>rosmarus</i> ), Golfinho-nariz-de- garrafa ( <i>Tursiops truncatus</i> ), Beluga ( <i>Delphinapterus</i> <i>leucas</i> ), Lontra-marinha ( <i>Enhydra lutris</i> )	Nadadeira traseira (pinípedes), barbatana caudal (cetáceos), abdome (lontras marinhas)	Derme	DMEM 6% DMSO 6% EG 15 mg/mL sacarose 10% SFB	Boroda et al. (2020)	

Portanto, observa-se que apesar dos níveis de ameaça a extinção em diversas espécies silvestres, estudos voltados para a criopreservação de amostras, especialmente as somáticas, ainda são escassos na literatura para mamíferos aquáticos e inexistentes para o caso do peixeboi marinho (*T. manatus manatus*), tornando necessário o estabelecimento destes criobancos para salvaguardar material genético e assim auxiliar nas estratégias de conservação para as espécies.

224

## 225 2.4. PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS PARA A FORMAÇÃO DO BANCO DE TECIDOS226 SOMÁTICOS

227

Para a obtenção de um banco de tecidos somáticos, faz-se necessário conhecer os 228 componentes e estruturas histológicas da região que está sendo coletada, além do 229 estabelecimento das condições adequadas de criopreservação tecidual (PEREIRA et al., 2018; 230 231 BORGES; PEREIRA, 2019a). Em geral, a pele, órgão mais empregado para a formação 232 desses bancos, possui uma composição e estrutura que variam entre espécies e entre regiões 233 de colheita (HOSSAIN et al., 2016). Nesse contexto, o conhecimento da região da pele a ser 234 recuperada torna-se essencial para a definição dos processamentos posteriores, como a 235 escolha das substâncias crioprotetoras durante a criopreservação (BORGES et al., 2018b).

Em um estudo realizado por Graham (2015) com o tegumento do peixe-boi da Flórida (*Trichecus manatus latirostris*), o autor descreveu um tegumento excepcionalmente espesso em toda a derme e epiderme, especialmente no estrato espinhoso e estrato córneo, falta de estrato granuloso, ausência de glândulas por toda a pele e presença de melanócitos na derme. Assim, as características da pele deste animal se diferencia dos demais mamíferos que tiveram seu tegumento estudado visando a criopreservação ou cultivo celular

242 Na maioria dos estudos em mamíferos silvestres, a colheita da pele tem sido em 243 indivíduos vivos, o que resulta na biópsia da pele de regiões menos invasivas do animal, 244 como na região caudal (WANG et al., 2011; JIN et al., 2013; RAJPUT et al., 2018). Após a biópsia, amostras de pele são higienizadas com etanol 70% e transportadas ao laboratório em 245 246 baixa temperatura (4 °C) em um menor intervalo de tempo possível (PEREIRA et al., 2018). No laboratório, as amostras são lavadas em meio de cultivo suplementado com antibióticos, 247 tampões e fontes proteicas, e fragmentados em tamanhos variáveis de 1,0-9,0 mm<sup>3</sup> (WANG 248 et al., 2011; RAJPUT et al., 2018). Após essas etapas, tecidos são submetidos ao processo de 249 criopreservação. 250

251

#### 2.4.1. Técnicas de criopreservação

253

Fundamentalmente, dois tipos de técnicas são utilizados: a congelação lenta e a 254 vitrificação, que divergem entre em si, principalmente pela taxa de redução de temperatura e 255 concentração de crioprotetores (CASTRO et al., 2011). Em geral, para realização da 256 257 congelação lenta, utilizam-se baixas concentrações de crioprotetores que promovem uma 258 desidratação celular gradual que reduz a formação de cristais de gelo, associado a uma 259 redução progressiva da temperatura de maneira controlada com o objetivo de reduzir o 260 estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (CAAMAÑO et al., 2008; GURRUCHAGA et al., 2019). O material biológico passa pela 261 262 congelação sob o controle de um freezer programável ou recipientes adequados que permitam a redução gradativa da temperatura da amostra, em uma taxa média de -1 °C/min e, uma vez 263 atingido uma adequada desidratação celular, a qual ocorre quando a temperatura se encontra 264 entre -30 a -80 °C, o material é estocado em nitrogênio líquido à -196 °C (CASTRO et al., 265 2011). Um grande desafio a ser contornado nessa técnica consiste na formação de cristais de 266 267 gelo intracelulares um dos principais responsáveis por danos celulares irreversíveis durante a 268 criopreservação (MARTIN et al., 2000; CARVALHO et al., 2011).

A congelação lenta já foi utilizada em mamíferos aquáticos por Boroda et al. (2015) para a criopreservação de amostras da pele de Golfinho-do-irrawaddy (*Orcaella brevirostris*), leão-marinho-de-Steller (*Eumetopias jubatus*) e morsa (*Odobenus rosmarus*), garantindo a recuperação celular posterior durante cultivo *in vitro*.

Amostras da pele de Foca-pintada (*Phoca largha*), Leão-marinho-de-steller (*Eumetopias jubatus*), Morsa do Atlântico (*Odobenus rosmarus*), Golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), Beluga (*Delphinapterus leucas*) e Lontra-marinha (*Enhydra lutris*) foram criopreservadas por congelação lenta em solução composta por DMEM + 10% SFB + 6% DMSO + 6% EG + 15 mg/mL sac. Células foram obtidas de tecidos criopreservados e submetidos duas abordagens diferentes para o isolamento celular: a desagregação mecânica e a desagregação mecânica seguida de desagregação enzimática (BORODA et al., 2022).

Nos últimos anos, a vitrificação vem sendo empregada como método promissor de criopreservação, uma vez que consiste num procedimento de baixo custo, não requerendo equipamentos sofisticados e podendo ser aplicado em diferentes amostras biológicas (SILVA et al., 2015). Esta técnica consiste no método de criopreservação na qual a redução de temperatura ocorre de forma brusca (-2.500 °C/min), cujo objetivo é a obtenção de um sólido

amorfo ou em estado vítreo sendo necessário o emprego de altas taxas de crioprotetores
(CARVALHO et al., 2011).

A vitrificação em superfície sólida (VSS), a qual se realiza pela sobreposição da 287 amostra em um cubo de metal, de fácil confecção, posicionado acima do nitrogênio líquido, 288 que por ser um bom condutor de calor proporciona um rápido resfriamento da amostra, 289 290 condição necessária para uma vitrificação eficiente (BORGES et al., 2017). Em estudos que 291 realizaram a comparação das diferentes técnicas de vitrificação com amostras somáticas de 292 mamíferos, foi evidenciado o bom desempenho da VSS na conservação destes tecidos sejam por análises histológicas como pelo cultivo in vitro (BORGES et al., 2017, PRAXEDES et al., 293 2019). 294

Em estudo que comparou a congelação lenta e a vitrificação direta em criotubos (VDC) para a conservação da pele do urso-pardo (*Ursus arctos*), Caamaño et al. (2008) observaram que vitrificação resultou numa menor proliferação e maior número de dias para atingir a subconfluência quando comparado a congelação. Portanto, observa-se que a técnica ideal pode sofrer variação entre as espécies, demonstrando que estudos são necessários para o estabelecimento da metodologia que provoque menos danos ao tecido.

Já em onça-pintada (*Panthera onca*), ao se comparar a congelação lenta, vitrificação direta em criotubos (VDC) e a vitrificação em superfície sólida, foi possível observar que a VSS foi a técnica mais eficiente, tendo em vista que ela manteve a matriz de fibras colágenas similar ao grupo controle, bem como o potencial proliferativo do tecido. Com o cultivo *in vitro*, observou-se que a VSS foi mais eficiente para a recuperação de células somáticas, principalmente quanto a sua atividade metabólica (PRAXEDES et al., 2019).

Costa et al. (2020), utilizando análises histológicas na comparação da VDC e VSS em
tecido somático auricular de cutias (*Dasyprocta leporina*), observaram que a VSS se mostrou
mais eficiente, tendo em vista que a mesma apresentou um maior quantitativo de fibroblastos
e condrócitos normais, células essas de grande importância biotecnológica.

Em jaguatirica (*Puma concolor*), amostras da pele submetidas a VSS mostraram-se viáveis e com a integridade do tecido mantida, com poucas alterações após o aquecimento, sendo capaz de manter o número de fibroblastos e potencial proliferativo do tecido. No cultivo in vitro, foi mantida a viabilidade, atividade proliferativa e níveis de apoptose, entretanto, as células apresentaram uma diminuição no seu metabolismo e potencial de membrana mitocondrial (LIRA et al., 2021).

317 Dessa forma, observa-se que a técnica de criopreservação mais adequada, depende de 318 diferentes fatores, como o tecido a ser criopreservado e sua espessura (BORGES; PEREIRA, 2019b), influenciando diretamente na eficiência da técnica, fazendo-se necessária a correta
investigação da metodologia mais adequada.

Independentemente do método empregado, a adição de um crioprotetor representa um 321 fator chave para o sucesso da criobiologia, sendo indispensável sua presença para que as 322 células possam resistir às injúrias resultantes do procedimento de criopreservação (YONG et 323 324 al., 2020). Contudo, os metabólitos resultantes da degradação dos crioprotetores pela célula 325 podem ser tóxicos para as células, sendo este um fator limitante para o sucesso da utilização 326 dos mesmos (FAHY, 2010; RAJU et al., 2021). Portanto, o equilíbrio entre o tipo de crioprotetor escolhido, em combinação ou isolado, e a combinação ideal das concentrações 327 para que não ofereçam danos as amostras biológicas são fatores determinantes para o sucesso 328 da criopreservação e, consequentemente, da formação de bancos de amostras somáticas 329 (LEÓN-QUINTO et al., 2014). 330

331

#### 332 2.4.2. Influência de crioprotetores intracelulares

333

Os crioprotetores intracelulares são classificados como agentes de baixo peso 334 335 molecular que conseguem penetrar nas células e são essenciais para a criopreservação dos 336 sistemas biológicos (RAJU et al., 2021). Essas substâncias atuam substituindo parcialmente a 337 água do interior das células, reduzindo o ponto de congelação a partir do aumento da 338 viscosidade da solução de congelação (FAHY, 2010). Em geral, a eficiência dos 339 crioprotetores intracelulares sobre a conservação de tecidos é influenciada por sua concentração, tempo de exposição, tipo de tecido, e organização molecular entre as espécies 340 341 (CASTRO et al., 2011).

O etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO) são os crioprotetores intracelulares 342 343 mais utilizados na criopreservação de tecidos (CASTRO et al., 2011). O EG é um álcool 344 obtido a partir da hidrólise do óxido de eteno, apresenta baixo peso molecular (62,07 g/mol) e 345 baixo ponto de fusão (-12,9 °C) (MARTINS; CARDOSO, 2005). Contudo, quando metabolizado pelo retículo endoplasmático, essa substância pode gerar componentes tóxicos, 346 347 entre eles o ácido glicólico e oxalacetato (CASTRO et al., 2011). Quanto ao DMSO, este apresenta peso molecular mais elevado (78,13 g/mol), quando comparado ao EG, e 348 temperatura de congelação de 18,5 °C (BRAYTON, 1986). As vias metabólicas utilizadas 349 pelo DMSO na sua metabolização ainda não são completamente elucidadas, assim como os 350 efeitos que causam em sistemas biológicos (OTSUKI et al., 2002). 351

A combinação de crioprotetores intracelulares na concentração de 2,82 M de DMSO e 3,58 M de EG mostrou-se eficiente em processos de vitrificação de tecidos somáticos de diferentes animais, onde após o processo de criopreservação foi possível obter células com qualidade a partir dos fragmentos e a histologia não mostrou grandes danos nos tecidos criopreservados (CAAMAÑO et al., 2008; BORGES et al., 2017, COSTA et al., 2020).

357 (2018a,b) testaram distintos crioprotetores intracelulares, Borges et al. individualmente (3,0 M de EG e 3,0 M de DMSO) em associação com crioprotetores 358 359 extracelulares (0,25 M de sacarose e 10% de SFB) na vitrificação de tecido somático de catetos (*Pecari tajacu*), e concluíram que a solução de criopreservação composta por 3,0 M 360 EG e 0,25 M de sacarose com 10% de SFB permitiu a conservação de diversas características 361 362 do tecido após o aquecimento, corroborando com Borges et al. (2017), que relataram que os crioprotetores mais utilizados para vitrificação tecidual são EG e DMSO, associados ou não a 363 364 açúcares e proteínas.

Já a combinação de 1,5 M de DMSO, 0,25 M de sacarose (sac) e 10% de SFB mostrou-se eficiente na criopreservação por congelação lenta, vitrificação direta em criotubos e vitrificação em superfície sólida da pele auricular de onça-pintada (*Panthera onca*), permitindo a recuperação de células após o aquecimento dos tecidos (PRAXEDES et al., 2019).

Diferentes combinações (DMSO e/ou EG) e concentrações (3,0 M e 1,5 M) de crioprotetores intracelulares associados ou não a um crioprotetor extracelular (sac) foram avaliados em fragmentos oriundos da pele auricular de cutias (*D. leporina*), sendo observado posteriormente que a solução composta por 1,5 M DMSO + 1,5 M EG + 0,25 M sac manteve parâmetros como espessura da derme e da pele, número de halos perinucleares, potencial proliferativo, número de lacunas vazias e condrócitos degenerados, sendo considerada a solução ideal (RODRIGUES et al., 2021).

Assim, é possível observar uma certa diferença na composição e concentração dos
agentes crioprotetores intracelulares empregados na conservação de amostras somáticas,
fazendo-se necessária a correta investigação dos mesmos nos protocolos de criopreservação
tecidual.

- 381
- 382
- 383
- 384
- 385

#### 386 **3. JUSTIFICATIVA**

387

A redução do quantitativo populacional de peixes-boi marinho em níveis nacional e 388 internacional, associado à sua importância nos ecossistemas como uma espécie-chave no elo 389 populacional e integrante da cadeia alimentar, tem resultado em estudos que visam 390 principalmente sua conservação no ambiente. Dessa forma, uma lacuna a ser estudada nesta 391 392 espécie consiste no estabelecimento de bancos de amostras somáticas, especialmente de 393 tecidos, visando a elucidação da estrutura tecidual bem como no estabelecimento dos procedimentos. Atualmente, tais bancos têm-se tornado importantes ferramentas na 394 conservação de espécies silvestres que se encontram ameaçadas de extinção, devido a 395 possibilidade de armazenar as amostras por tempo indeterminado e posteriormente empregá-396 las em biotécnicas, como a TNCS e iPS, bem como seu emprego em estudos de 397 ecotoxicológicos, importante nos esforços para diminuir a redução de sua população. 398

Portanto, visando à formação eficiente destes bancos de recursos somáticos e posterior utilização das amostras, faz-se necessário o adequado estabelecimento de protocolos otimizados desde a colheita e processamento da amostra, cultivo *in vitro*, técnica de criopreservação e crioprotetores intracelulares. Ainda para o peixe-boi marinho, faz-se necessário que estas amostras somáticas provenientes da pele sejam caracterizadas quanto aos seus aspectos histológicos, ultraestruturais e características celulares em cultivo, auxiliando assim na definição adequada de protocolos de criopreservação tecidual e cultivo *in vitro*.

Atrelado às técnicas já empregadas para a conservação da espécie, a formação de criobancos, em especial os de tecidos somáticos, surge para potencializar as possibilidades de impedir a diminuição populacional, sendo mais uma ferramenta disponível para a conservação destes animais.

- 410
- 411
- 412
- 413
- 414

415

- 416
- 417
- 418
- 419
# 4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

422 I) Ambas as técnicas de criopreservação promovem a conservação de tecidos somáticos de
423 peixe-boi marinho com recuperação de células viáveis, sendo a vitrificação em superfície
424 sólida uma metodologia interessante para aplicação a campo.

426 II) A redução das concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG)
427 combinados garante a adequada proteção tecidual e celular durante a vitrificação, mantendo as
428 características do tecido, otimizando a criopreservação tecidual.

453	5. OBJETIVOS
454	
455	5.1. OBJETIVO GERAL
456	
457	Estabelecer um criobanco de tecido somático da pele abdominal do peixe-boi marinho, na
458	busca pelo seu aperfeiçoamento ao empregar métodos eficientes de criopreservação tecidual
459	para conservação da espécie
460	
461	5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS
462	
463	- Avaliar a técnica mais eficiente de criopreservação (congelação lenta vs. vitrificação em
464	superfície sólida) para conservação da pele abdominal de peixe-boi marinho;
465	
466	- Avaliar diferentes combinações e concentrações de crioprotetores intracelulares (DMSO
467	e/ou EG) na vitrificação em superfície sólida da pele abdominal de peixe-boi marinho.
468	
469	
470	
471	
472	
473	
474	
475	
476	
477	
478	
479	
480	
481	
482	
483	
484	
485	
486	

487	REFERÊNCIAS
488	
489	ALVES, M.; KINAS, P.; MARMONTEL, M.; BORGES, J.; COSTA, A.; SCHIEL, N.;
490	ARAÚJO, M. First abundance estimate of the Antillean manatee (Trichechus manatus
491	manatus) in Brazil by aerial survey. Journal of the Marine Biological Association of the
492	United Kingdom, v. 96, p. 955–966, 2016.
493	ANDERSON, P.K. Competition, predation, and the evolution and extinction of Steller's sea
494	cow, Hydrodamalis gigas. Marine Mammal Science, v. 11, p. 391–394, 1995.
495	ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for
496	conservation of endangered mammalian species. Animal Reproduction Science, v. 99, p.
497	223–243, 2007.
498	ANZOLIN, D.G.; SARKIS, J.E.S.; DIAZ, E.; SOARES, D.G.; SERRANO, I.L.; BORGES,
499	J.C.G.; SOUTO, A.S.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R.C.; BAINY, A.C.D.; CARVALHO,
500	P.S.M. Contaminant concentrations, biochemical and hematological biomarkers in blood of
501	West Indian manatees Trichechus manatus from Brazil. Marine pollution bulletin, v. 64, p.
502	1402–1408, 2012.
503	ATTADEMO, F.L.N.; LUNA, F.O.; FREIRE, A.C.B.; LIMA, S.A.; SILVA, F.J.L. O estado
504	do Rio Grande do Norte como área estratégia para conservação de peixe-boi-marinho
505	(Trichechus manatus) no Brasil. Revista Brasileira de Meio Ambiente, v. 9, p. 201–209,
506	2021.
507	ATTADEMO, F.L.N.; RIBEIRO, V.O.; SOARES, H.S.; LUNA, F.O.; SOUSA, G.P.;
508	FREIRE, A.C.B.; GENNARI, S.M.; ALVES, L.C.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.
509	Seroprevalence of Toxoplasma gondii in captive Antillean manatee (Trichechus manatus
510	manatus) in Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 47, p. 423–426, 2016.
511	BALENSIEFER, D.C.; ATTADEMO, F.L.N.; SOUSA, G.P.; FREIRE, A.C.B.; CUNHA,
512	F.A.G.C.; ALENCAR, A.E.B.; SILVA, F.J.L.; LUNA, F.D.O. Three decades of Antillean
513	manatee (Trichechus manatus manatus) stranding along the Brazilian coast. Tropical
514	Conservation Science, v. 10, p. 1–9, 2017.
	DADDOG HANDD, MEIDELLEG A.C., LUNIA E.O., MADMONITEL M.

515 BARROS, H.M.D.R.; MEIRELLES, A.C.; LUNA, F.O.; MARMONTEL, M.;
516 CORDEIRO-ESTRELA, P.; SANTOS, N.; ASTÚA, D. Cranial and chromosomal geographic

variation in manatees (Mammalia: Sirenia: Trichechidae) with the description of the Antillean
manatee karyotype in Brazil. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary
Research, v. 55, p. 73–87, 2016.

- 520 BEZERRA, A.R.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; BERSANO, P.R.O.; CARVALHO,
- 521 V.L.; MEIRELLES, A.C.O.; ATTADEMO, F.L.N.; LUNA, F.O.; SILVA, L.D.M.
- 522 Histological characterization of reproductive tract and fetal annexes of the West Indian
- Manatee (*Trichechus manatus*) from Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 38, p. 2166–
  2174, 2018.
- 525 BONDE, R.K.; AGUIRRE, A.A.; POWELL, J. Manatees as sentinels of marine ecosystem
- health: are they the 2000-pound canaries?. **EcoHealth**, v. 1, p. 255–262, 2004.
- 527 BORGES, A.A.; LIMA, G.L.; QUEIROZ NETA, L.B.Q.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA,
- 528 M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Conservation of somatic tissue derived from collared
- 529 peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques.
- 530 **Cytotechnology**, v. 69, p. 643–654, 2017.

532

- 531 BORGES, A.A.; LIRA, G.P.O.; NASCIMENTO, L.E.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS,
- 533 solution on the in vitro culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu*

M.V.O.; OLIVEIRA M.F; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Influence of cryopreservation

- Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, p. 77–81, 2018b.
- BORGES, A.A.; PEREIRA, A.F. Potential role of intraspecific and interspecific cloning in
  the conservation of wild mammals. Zygote, v. 27, p. 111–117, 2019a.
- BORGES, A.A.; PEREIRA, A.F. Progressos e perspectivas da criopreservação da pele de
  mamíferos como estratégia de conservação da biodiversidade. Uma Revisão. Revista
  Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 13, p. 289–303, 2019b.
- 540 BORGES, A.A; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA,
- A.R.; PEREIRA, A.F. Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate
- after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).
- 543 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 350–356, 2018a.
- 544 BORGES, J.C.G.; VERGARA-PARENTE, J.V.; ALVITE, C.M.C.; MARCONDES, M. C.C.;
- 545 LIMA, R.P. Embarcações motorizadas: uma ameaça aos peixes-boi marinhos (Trichechus
- 546 *manatus*) no Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 199–204, 2007.

BORODA, A.V.; KIPRYUSHINA, Y.O.; GOLOCHVASTOVA, R.V.; SHEVCHENKO,
O.G.; SHULGINA, M.A.; EFIMOVA, K.V.; KATIN, I.O.; MAIOROVA, M.A. Isolation,
characterization, and ecotoxicological application of marine mammal skin fibroblast cultures.

- 550 *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 56, p. 744–759, 2020.
- 551 BORODA, A.V.; ZACHARENKO, P.G.; MAIOROVA, M.A.; PETERSON, S.E.; LORING,

552 J.F.; ODINTSOVA, N.A. The first steps towards generating induced pluripotent stem cells

from cryopreserved skin biopsies of marine mammals. Russian Journal of Marine Biology,
v. 41, p. 405–408, 2015.

- BOSSART, G.D. Emerging diseases in marine mammals: from dolphins to manatees.
  Exposures to viruses, pollutants may lead to diseases, sometimes involving immune
  dysfunctions, among marine mammals. Microbe-American Society for Microbiology, v. 2,
  p. 544–549, 2007.
- BOSSART, G.D.; MEISNER, R.A.; ROMMEL, S.A.; SHIN-JE, G.; JENSON, A.B.
  Pathological features of the Florida manatee cold stress syndrome. Aquatic Mammals, v. 29,
  p. 9–17, 2002.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente/Instituto Chico Mendes de Conservação da
  Biodiversidade. Portaria nº 249, de 4 de abril de 2018. Aprova o Plano de Ação Nacional para
  a Conservação do Peixe-boi marinho. Diário Oficial da União. 06 abril 2018, ed. 66, seção 1,
  p. 174.
- BRAYTON C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. Cornell Veterinarian, v. 76, p. 76–
  90, 1986.
- BURKARD, M.; WHITWORTH, D.; SCHIRMER, K.; NASH, S.B. Establishment of the first
  humpback whale fibroblast cell lines and their application in chemical risk assessment.
  Aquatic Toxicology, v. 167, p. 240–247, 2015.
- 571 CAAMAÑO, J.N.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; FRUTOS, C.; DIEZ, C.; GÓMEZ, E.
  572 Cryopreservation of brown bear skin biopsies. Cell Preservation Technology, v. 6, p. 83–86,
  573 2008.
- 574 CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.;
  575 COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material

- 576 genético de fêmeas mamíferas em criobancos. Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, p. 236–248,
  577 2011.
- 578 CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO,
- 579 J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização
- 580 na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. Acta Scientiae Veterinariae, v. 39, p. 957-
- **581** *962*, 2011.
- 582 CHOI, K.F; CAMPOS, T.M; MEIRELLES, A.C.O; CAMPOS, A.A.; FERNANDES, M.B.
  583 Desenho da área de um refúgio de vida silvestre para a conservação do peixe-boi-marinho.
  584 Natureza & Conservação, v. 7, p.82–89, 2009.
- 585 CHOI-LIMA, K.F.; CAMPOS, T.M.; MEIRELLES, A.C.O.; SILVA, C.P.N.; COSTA,
- 586 T.E.B.; ABESSA, D.M.S. (2017). Using traditional ecological knowledge to prospect the
- 587 distribution of the Antillean manatee Trichechus manatus manatus (Sirenia: Trichechidae) in
- 588 the states of Ceará and Rio Grande do Norte, Brazil. Pan-American Journal of Aquatic
- 589 Sciences, v. 12, p. 234–247, 2017.
- 590 COMIZZOLI, P. Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species.
  591 Animal Reproduction, v. 14, p. 30–33, 2017.
- 592 COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.; SILVA, A.R.;
- 593 OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of vitrification techniques on the somatic tissue
- 594 preservation of Agouti (Dasyprocta leporina Linnaeus, 1758). Biopreservation and
- 595 **Biobanking**, v. 18, p. 165–170, 2020.
- 596 DEUTECHS, C.J..; SELF-SULLIVAN, C.; MIGNUCCI-GIANNONI, A. *Trichechus*597 *manatus*. The IUCN Red List of Threatened Species (2008) e.T22103A9356917, 2008.
- 598 DOMNING D.P. Sirenians, seagrasses, and Cenozoic ecological change in the Caribbean.
- **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 166, p. 27–50, 2001.
- 600 FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. Cryobiology, v. 60, p. S45–S53, 2010.
- 601 FREIRE, A.C.B. Pesquisa de metais pesados em peixes-bois marinhos (Trichechus manatus
- 602 manatus Linnaeus, 1758). 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) -
- 603 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

- GRAHAM, A. (2005). Histological examination of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) integument. 2005. Thesis (Master of Science). University of Florida, 2005.
- 606 GURRUCHAGA, H.; BURGO, S.; HERNANDEZ, R.M.; ORIVE, L.; SELDEN, C.;
  607 FULLER, B.; CIRIZA, J.; PEDRAZ, J.L. Advances in the slow freezing cryopreservation of
- microencapsulated cells. Journal of Controlled Release, v. 281, p. 119–138, 2019.
- HATT, R.A. Manatee collected by the American Museum Congo Expedition with
  Observation on the recent Manatess. Bulletin of the America Museum of Natural History,
  v. 66, p. 533–566, 1934.
- HOSSAIN, E.; UDDIN, M.; SHIL, S. K.; KABIR, M. H. B.; MAHMUD, S.M.; ISLAM, N.
- 613 Histomorphometrical characterization of skin of native cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh.
- **American Journal of Medical and Biological Research**, v. 4, p. 53–65, 2016.
- 615 HOULGUIN-MEDINA, V.E.H. Comportamento do peixe-boi (Trichechus manatus manatus)
- nos oceanários de Itamaracá: manejo e condições abióticas. 2008. Dissertação (Mestrado em
  Oceanografia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- ICMBIO. *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758. Em: Livro Vermelho da Fauna Brasileira
  Ameaçada de Extinção: Volume II Mamíferos (p. 103–109), 2018.
- JIN, W.; JIA, K.; YANG, L.; CHEN, J.; WU, Y.; YI, M. Derivation and characterization of
- 621 cell cultures from the skin of the Indo-Pacific humpback dolphin Sousa chinensis. In Vitro
- 622 Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 49, p. 449–457, 2013.
- 623 KIPPS, E.K.; MCLELLAN, W.A.; ROMMEL, S.A.; PABST, D.A. Skin density and its
- 624 influence on buoyancy in the manatee (Trichechus manatus latirostris), harbor porpoise
- 625 (Phocoena phocoena), and bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). Marine Mammal
- 626 Science, v. 18, p. 765–778, 2002.
- 627 LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different
- 628 cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal,
- 629 the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Cryobiology, v. 68, p. 227–233, 2014.
- 630 LERMEN, D.; BLÖMEKE, B.; BROWNE, R.; CLARKE, A.; DYCE, P.W.; FIXEMER, T.;
- FUHR, G.R.; HOLT, W.V.; JEWGENOW, K.; LLOYD, R.E.; LÖTTERS, S.; PAULUS, M.;
- REID, G.M.; RAPOPORT, D.H.; RAWSON, D.; RINGLEB, J.; RYDER, O.A.; SPÖRL, G.;

- SCHMITT, T.; VEITH, M.; MÜLLER, P. Cryobanking of viable biomaterials:
  implementation of new strategies for conservation purposes. Molecular Ecology, v. 18, p.
  1030–1033, 2009.
- LIMA, R.P.; ALVITE, C.M.C.; REID, J.P.; JUNIOR, A.B. Spatial and temporal distribution
  of manatees (*Trichechus manatus*) reintroduced in the northeastern coast of Brazil. Natural
- 638 **Resources**, v. 5, p. 14–28, 2015.
- LIMA, R.P.; PALUDO, D.; SOAVINSKI, R.J.; SILVA, K.G.; OLIVEIRA, E.M.A. Survey on
  Antillean manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) distribution, occurrence and
  conservation status in the Brazilian Northeast coast. Natural Resources, v. 1, p. 41–57, 2011.
- 642 LUNA, F. O.; PASSAVANTE, J. Z. O.; MENDES, P. P.; PESSANHA, M.; SOAVINSKI,
- 643 R.J.; OLVEIRA, E. M. Ocorrência do peixe-boi-marinho (Trichechus manatus manatus) no
- 644 litoral norte do Brasil. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, v. 23, p. 37–49. 2008b.
- 645 LUNA, F.O.; BALENSIEFER, D.C.; FRAGOSO, A.B.; STEPHANO, A.; ATTADEMO
- 646 F.L.N. Trichechus manatus Linnaeus, 1758. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da
- 647 Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume
- 648 II Mamíferos. Brasília: ICMBio. p. 103–109, 2018.
- 649 LUNA, F.O.; BEAVER, C.E.; NOURISSON, C.; BONDE, R.K.; ATTADEMO, F.L.N.;
- 650 MIRANDA, A.V.; TORRES-FLOREZ, J.P.; SOUZA, G.P.; PASSAVANTE, J. Z.O.;
- 651 HUNTER, M. E. Genetic Connectivity of the West Indian Manatee in the Southern Range
- and Limited Evidence of Hybridization With Amazonian Manatees. Frontiers in Marine
- 653 Science, v. 7, p. 1–15, 2021.
- LUNA, F.O.; BONDE, R.K.; ATTADEMO, F.L.N.; SAUNDERS, J.W.; MEIGS-FRIEND,
- 655 G.; PASSAVANTE, J.Z.O.; HUNTER, M.E. Phylogeographic implications for release of
- 656 critically endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil. Aquatic Conservation:
- 657 Marine and Freshwater Ecosystems, v. 22, p. 665–672, 2012.
- LUNA, F.O.; LIMA, R.P.; ARAÚJO, J.P.; OLIVEIRA PASSAVANTE, J.Z. Status de
  conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) no
  Brasil. Revista Brasileira de Zoociências, v. 10, p. 145–153, 2008a.

- 661 MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.; MARTINS,
- 662 D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of brazilian biodiversity by germplasm bank. Pesquisa
- 663 Veterinária Brasileira, v. 36, p. 62–66, 2016.
- 664 MANCIA, A.; SPYROPOULOS, D.D.; MCFEE, W.E.; NEWTON, D.A.; BAATZ, J.E.
- 665 Cryopreservation and *in vitro* culture of primary cell types from lung tissue of a stranded
- 666 pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C:
- **Toxicology & Pharmacology**, v. 155, p. 136–142, 2012.
- MARMONTEL, M.; HUMPHREY, S.R.; O'SHEA, T.J. Population viability analysis of the
  Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*), 1976-1991. Conservation Biology, v. 11,
  p. 467–481, 1997.
- MARSH, H.; LEFEBVRE, L. W. Sirenian status and conservation efforts. Aquatic
  Mammals, v. 20, p. 155–170, 1994.
- 673 MARTIN, H.; BOURNIQUE, B.; SARSAT, J.P.; ALBALADEJO, V.; LERCHE-
- 674 LANGRAND, C. Cryopreserved Rat Liver Slices: A critical evaluation of cell viability,
- histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. **Cryobiology**, v. 41, p. 135–144, 2000.
- MARTINS L.; CARDOSO, D. Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas
  de óxido de eteno. Química Nova, v. 28, p. 264–273, 2005.
- 678 MEIRELLES, A.C.O. Mortality of the Antillean manatee, Trichechus manatus manatus, in
- 679 Ceará State, north-eastern Brazil. Journal of the Marine Biological Association of the
- 680 **United Kingdom**, v. 88, p. 1133–1137, 2008.
- 681 OLIVEIRA, E.H.C.; GOMES, A.J.B.; COSTA, A.F.; EMIN-LIMA, R.; BONVICINO, C.R.;
- 682 VIANA, M.C.; REIS, L.M.A.; VIDAL, M.D.; CAVALCANTI, M.V.G.; ATTADEMO,
- 683 F.L.N.; LUNA, F.O.; SICILIANO, S. Karyotypical Confirmation of Natural Hybridization
- between Two Manatee Species, Trichechus manatus and Trichechus inunguis. Life, v. 12,
- 685 616-627, 2022.
- 686 OLIVEIRA, R.E.M.; SANTORO, G.A.; FREIRE, A.C.D.B.; ATTADEMO, F.L.N.; LIMA,
- 687 S.A.; BOMFIM, A.D.C.; FRAGOSO, A.B.L.; SILVA, F.J.L.; GAVILAN, S.A.; Oliveira, M.
- 688 F. Angioarchitecture of collateral arteries of the aortic arch of Antillean manatee (Trichechus
- 689 manatus manatus Linnaeus, 1758). Anatomia, Histologia, Embryologia, v. 49, p. 25–30,
- **690** 2019.

- OTSUKI, S.; QUITINA, W.; ISHIHARA, A.; KAE, T. Elicidation of dimethylsulfone
  metabolism in rat using a 35S radioisotope tracer method. Nutrition Researche, v. 22,
  p.313–322, 2002.
- 694 PARENTE, C.L.; VERGARA-PARENTE J.E.; LIMA R.P. Strandings of Antillean manatees,
- 695 Trichechus manatus manatus, in northeastern Brazil. Latin American Journal of Aquatic
- 696 **Mammals**, v. 3, p. 69–75, 2004.
- 697 PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; PRAXEDES, É.A.; SILVA, A.R. Use of somatic banks for
  698 cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals a review. Revista
  699 Brasileira de Reprodução Animal, v. 42, p. 104–108, 2018.
- PEREIRA, A.F.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; LIRA, G.P.O. Uso da clonagem por
  transferência nuclear na conservação e multiplicação de mamíferos silvestres. Revista
  Brasileira de Reprodução Animal, v. 43, p. 242–247, 2019.
- PIRES, J.M.L.; MOREIRA, A.B.; ROCHA, A. Parasitological research in urine from marine
   manatees (*Trichechus manatus manatus*) maintained in captivity in Brazil. Scientific
   Electronic Archives, v. 9, p. 47–52, 2016.
- 706 PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.;
- 707 SILVA, H.V.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Effects of
- ryopreservation techniques on the preservation of ear skin An alternative approach to
- conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). Cryobiology, v. 88, p. 15–22, 2019.
- PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; PEREIRA, A.F. Use of somatic cell
  banks in the conservation of wild felids. Zoo Biology, v. 37, p. 258–263, 2018.
- 712 RAJPUT, I.R.; XIAO, Z.; YAJING, S.; YAQOOB, S.; SANGANYADO, E.; YING, H.; FEI,
- Y.; LIU, W. Establishment of pantropic spotted dolphin (*Stenella attenuata*) fibroblast cell
  line and potential influence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on cytokines
  response. Aquatic Toxicology, v. 203, p. 1–9, 2018.
- RAJU, R.; BRYANT, S.J.; WILKINSON, B.L.; BRYANT, G. The need for novel
  cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical
  investigation and cell permeability. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General
  Subjects, v. 1865, p. 129749, 2021.

- RECTOR, A.; BOSSART, G.D.; GHIM, S.; SUNDBERG, J.P.; JENSON, A.B.; RANST,
  M.V. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida manatee by
  using multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris*Papillomavirus Type 1. Journal of Virology, v. 78, p. 12698–12702, 2004.
- 724 RODRIGUES, L.L.V.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.;
- 725 SANTOS, M.D.C.B.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Evaluation of
- 726 Different Cryoprotectant Solutions For the Cryopreservation of Somatic Tissues Of
- 727 *Dasyprocta Leporina* (Linnaeus, 1758). Cryoletters, v. 42, p. 210–219, 2021.
- 728 SILVA, A.B.; MARMONTEL, M. Ingestão de lixo plástico como provável causa mortis de
- peixe-boi amazônico (*Trichechus Inunguis* NATTERER, 1883). UAKARI, v. 5, p. 105–112,
  2009.
- SILVA, A.R.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X; SOUZA, A.L.P. Cryopreservation in
  mammalian conservation biology: current applications and potential utility. Dove Press
  Journal, Research and Reports in Biodiversity Studies, v. 4, p. 1–8, 2015.
- 734 SILVA, M.C.O.; ATTADEMO, F.F.L.; FREIRE, A.C.B.; SOUSA, G.P.; LUNA, F.O.;

LIMA, D.C.V.; MOTA, R.A.; MENDES, E.M.; SILVA, J.C.R. Identification of bacteria in

- blood cultures from clinically ill captive antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*).
- **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, p. 13–17, 2017.

- SUZUKI, A.; UEDA, K.; SEGAWA, T.; SUZUKI, M. Fecal microbiota of captive Antillean
  manatee *Trichechus manatus manatus*. FEMS Microbiology Letters, v. 366, p. fnz134,
  2019.
- SWEAT, J. M.; DUNIGAN, D.D.; WRIGHT, S.D. Characterization of kidney epithelial cells
  from the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *In Vitro* Cellular &
  Developmental Biology-Animal, v. 37, p. 386–394, 2001.
- SWEAT, J.M.; JOHNSON, C.M.; GIBBS, E.P.J. *In vitro* development and characterization of
  a manatee bronchial cell line. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 39, p.
  249–256, 2003.
- VÉLEZ, J.; HIRZMANN, J.; LANGE, M.K.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J.J.; TAUBERT,
  A.; HERMOSILLA, C. Occurrence of endoparasites in wild Antillean manatees (*Trichechus*)

*manatus manatus*) in Colombia. International Journal for Parasitology: Parasites and
Wildlife, v. 7, p. 54–57, 2018.

751 VIANNA, J.A.; BONDE, R.K.; CABALLERO, S.; GIRALDO, J.P.; LIMA, R.P.; CLARL,

A.; MARMONTEL, M.; MORALES-VELA, B.; SOUZA, M.J.; PARR, L.; RODRIGUEZLOPEZ, M.A.; MIGNUCCI-GIANNONI, A.A.; POWELL, J.A.; SANTOS, F.R.

754 Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications for

manatee conservation. Molecular Ecology, v. 15, p. 433–447, 2006.

756 WANG, J.; SU, W.; NIE, W.; WANG, J.; XIAO, W.; WANG, D. Establishment and 757 characterization of fibroblast cell lines from the skin of the Yangtze finless porpoise. *In Vitro* 

758 Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 47, p. 618–630, 2011.

759 WYROSDICK, H.M.; GERHOLD, R.; SU, C.; MIGNUCCI-GIANNONI, A.A.; BONDE,

760 R.K.; CHAPMAN, A.; RIVERA-PÉREZ, C.I.; MARTINEZ, J.; MILLER, D.L. Investigating

761 seagrass in Toxoplasma gondii transmission in Florida (Trichechus manatus latirostris) and

Antillean (*T. m. manatus*) manatees. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 127, p. 65–69, 2017.

YAJING, S.; RAJPUT, I.R.; YING, H.; FEI, Y.; SANGANYADO, E.; PING, L.;
JINGZHEN, W.; WENHUA, L. Establishment and characterization of pygmy killer whale
(*Feresa attenuata*) dermal fibroblast cell line. PloS One, v. 13, e0195128, 2018.

766

767

768

769

- 770
- 771
- 772
- 773

774

776	CAPÍTULO 2 – PASSOS INICIAIS PARA A FORMAÇÃO DE BANCOS DE
777	TECIDOS SOMÁTICOS E CULTIVOS DE CÉLULAS DERIVADAS DE BIÓPSIAS
778	DA PELE DE PEIXES-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus) EM
779	CATIVEIRO
780	
781	
782	Artigo Experimental Nº 1: The initial steps towards the formation of somatic tissue banks
783	and cell cultures derived from captive Antillean manatee (Trichechus manatus manatus) skin
784	biopsies
785	
786	
787	Periódico de submissão: Cryobiology
788	
789	
790	Qualis (Medicina Veterinária): B1. Qualis (Referência): A2. Fator de impacto: 2,487
791	
792	
793	Data de submissão: 02/03/2022
794	
795	
796	
797	
798	
799	
800	

801	The initial steps towards	the formation of somatic tissue banks and cell cultures derived						
802	from captive Antillean m	anatee (Trichechus manatus manatus) skin biopsies						
803								
804								
805	Matheus Barbosa do Naso	cimento <sup>a</sup> , Yasmin Beatriz França Moura <sup>a</sup> , Radan Elvis Matias de						
806	Oliveira <sup>b</sup> , Gabriela Pereir	a de Oliveira Liraª, Alana Azevedo Borgesª, Fábia de Oliveira						
807	Luna <sup>c</sup> , Fernanda Loffler N	iemeyer Attademo <sup>c</sup> , Alexsandra Fernandes Pereira <sup>a*</sup>						
808								
809								
810	<sup>a</sup> Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA),							
811	Mossoró, RN, Brazil. <sup>b</sup> Laboratory of Applied Animal Morphophysiology, UFERSA,							
812	Mossoró, RN, Brazil. °National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals,							
813	Chico Mendes Institute for	Biodiversity Conservation, Itamaracá Island, PE, Brazil						
814								
815								
816	*Corresponding author:	Alexsandra Fernandes Pereira						
817		Laboratory of Animal Biotechnology						
818		Federal Rural University of Semi-Arid						
819		Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, 59625-900, Brazil						
820		Phone: +55 84 3317 8361						
821		E-mail address: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br						
822								
823								
824								
825								

826 Abstract

827

828 The declining population of the Antillean manatee caused by ecosystem degradation and rising pollution has prompted interest in developing conservation strategies for this species. 829 830 Given this scenario, somatic tissue banks are important tools for acquiring knowledge about the species, as well as for obtaining somatic cells for biotechnological and ecotoxicological 831 applications. Therefore, we aimed to assess the effects of slow freezing (SF) and solid-surface 832 833 vitrification (SSV) of the dermis of captive Antillean manatees on the histology and ultrastructure of the tissue and cell viability in culture. While the SSV did not change the 834 dermis thickness, the SF maintained the tissue proliferative potential, assessed by the 835 nucleolar organizer region area, similar to non-cryopreserved tissues. Moreover, both 836 techniques reduced the number of fibroblasts and increased the percentage of collagen fibers. 837 Nevertheless, only tissues cryopreserved with SF and non-cryopreserved tissues were able to 838 produce cells after in vitro culture. Although SF did not alter cell viability and proliferative 839 activity, cells derived from cryopreserved tissues showed decreased metabolism, altered 840 841 apoptosis, increased levels of reactive oxygen species, and mitochondrial membrane potential 842 compared to cells from non-cryopreserved tissues. In summary, we demonstrated for the first time that Antillean manatee somatic tissues can be cryopreserved by SF, and cells can be 843 844 obtained after in vitro culture. Improvements in cryopreservation conditions, especially vitrification, of somatic samples are needed to increase the quality of somatic tissue banks in 845 this species. 846

847

848 Keywords: Marine mammals; biological resource banks; slow freezing; skin cell culture.

849

## 851 **1. Introduction**

852 The Antillean manatee (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758) is an important herbivorous aquatic mammal distributed along the American continent, including along the 853 Brazilian coast [1,22]. This species has an important ecological role in the food chain of the 854 855 ecosystem and is an indicator of environmental quality [23]. Different threats have been responsible for the declining population of this species, such as hunting, water pollution, and 856 857 coastal degradation [18]. According to the International Union for Conservation of Nature 858 (IUCN), the Antillean manatee is classified as endangered [11]. In Brazil, is also considered endangered with prospects of further population reduction [21,27]. 859

860

One strategy for the conservation of marine species is to establish *in vitro* somatic cell culture systems. These instruments are important tools for studies in the fields of cell biology, physiology, ecology, molecular biology, genetics, and ecotoxicological applications in these species [5]. Moreover, as in other marine and wild species, these cells can be valuable tools in the study of cellular reprogramming [42], aiming at the production of induced pluripotent cells for the generation of gametes. For all these applications, the first step is to establish somatic tissue banks, as well as to obtain and evaluate the cells during *in vitro* culture.

868

In general, systems of *in vitro* culture of cells of marine mammals have proven to be difficult because of the nature of the cells and the limitation of samples from protected species [15]. Reports on the cryopreservation of marine mammal skin are limited, and there is only one report on cryopreservation by slow freezing of skin samples from walrus (*Odobenus rosmarus*), Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*), and Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*), allowing the subsequent isolation of somatic cells [6]. Nevertheless, the authors reported difficulties in guaranteeing the culture and isolation of these cells, which shows the need to improve protocols as well as apply other cryopreservation methodologies. Therefore,
considering that slow freezing (SF) is a technique used in aquatic mammals, we examined the
damage caused by this technique on Antillean manatee tissue integrity and cell recovery.
Moreover, vitrification, especially solid-surface vitrification (SSV), has been used as a
promising method for tissue cryopreservation because it is a low-cost procedure that does not
require sophisticated equipment and can be applied to different biological samples [3,9].

882

Establishing a well-planned somatic sample bank requires the identification of adequate conditions for cryopreservation of somatic tissues and the study of cryoinjury [31]. The aim of this study was to evaluate the capacity of somatic tissues derived from the dermis of Antillean manatees to be cryopreserved using SF or SSV, to examine the maintenance of the morphological integrity of the tissue and quality of cells recovered from *in vitro* culture, and to establish a somatic tissue bank for the conservation of this species.

889

#### 890 2. Material and methods

Unless otherwise indicated, all reagents, solutions, and media were obtained from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco-BRL (Carlsbad, CA, USA), or Labimpex (São Paulo,
SP, Brazil).

894

### 895 *2.1. Compliance with ethical standards and animals*

All experimental protocols and procedures were carried out with the approval of the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal Rural University of Semi-Arid (CEUA/UFERSA, no. 14/2020) and Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, no. 20685-5/2020). Six healthy Antillean manatees were used, which were in the process of recovery and adaptation in the Advanced Base of the National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals of the Chico Mendes Institute for Biodiversity
Conservation (ICMBio/CMA, Itamaracá Island, PE, Brazil, 7°48'33" S, 34°50'19" W). Data
on biological aspects, such as age, sex, date, place of birth, and stranding of Antillean
manatees, are presented in Table 1.

- 905
- 906 2.2. Skin biopsy collection, and experimental design

Sample collection was conducted under the guidance of experienced veterinary professionals (Fig. 1). For collection, the animals were mechanically restrained and the area to be collected was sterilized with 70% alcohol and 2% iodine solution. Four skin samples from the abdominal region of each Antillean manatee were collected using an  $8 \times 150$  mm disposable punch biopsy tool (Fig. 1a-b, Razormed Inc., Gurgaon, Haryana, India). After the procedure was completed, the manipulated region was treated with a local anti-inflammatory healing solution under constant medical observation.

914

The collected samples (Fig. 1c) were placed in tubes containing sterile Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 medium (DMEM:F-12) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 2% antibiotic-antimycotic solution (DMEM:F-12<sup>+</sup> medium), transported to the laboratory during a period of 10 h at 4°C, and immediately processed under sterile conditions (Fig. 1d). In the laboratory, the samples were washed in DMEM:F-12<sup>+</sup> medium and separated into epidermis and dermis (Fig. 1e). Dermal tissue was sectioned to 6.0 mm<sup>3</sup> (Fig. 1f, 3 × 2 × 1 mm) using a scalpel blade and tweezers [42].

922

923

924

Animal Estimated		Sex	Stranded or born in	Date	Estimated stranding	Localization	
	age (years)		captivity		age (days)		
AM1	2	Male	Stranded	October 23, 2018	1-4	2°53'S, 41°36'W	
AM2	10	Male	Stranded	March 24, 2010	1–3	2°35'S, 3°27'W	
AM3	15	Male	Stranded	January 05, 2005	1	5°5'S, 36°27'W	
AM4	3	Female	Stranded	April 15, 2017	2	2°53'S, 41°36'W	
AM5	23	Female	Born in captivity	April 10, 1997	-	7°48'S, 34°50'W	
AM6	M6 23 Female		Born in captivity	April 10, 1997	-	7°48'S, 34°50'W	

**Table 1.** Details of the main biological aspects of Antillean manatees used in this study.



931 Fig. 1. Collection and processing of somatic samples from the skin of Antillean manatees. a) Materials used to collect the samples. b) Moment of

- 932 collection of the somatic tissues, where the disposable dermatological punch is inserted in the animal's skin. c) Post-recovery sample being
- 933 removed from the dermatological punch. d) Skin samples obtained from one of the experimental animals. e) Sterilization and separation of the
- 934 dermis from the fragments. **f**) Tissue fragments  $(6.0 \text{ mm}^3)$ .
- 935

Sixteen fragments per animal were randomly distributed among the non-cryopreserved and 936 cryopreserved by slow freezing (SF) and solid-surface vitrification (SSV) groups. Then, the 937 morphology of non-cryopreserved and cryopreserved/warmed fragments, with emphasis on 938 dermal thickness, fibroblast quantification, and collagen matrix, and the tissue proliferative 939 activity were evaluated. The ultrastructure of the tissues was also evaluated. Other samples 940 were subjected to in vitro tissue culture. Cells were analyzed for morphology, adhesion, 941 confluence, viability, metabolism, proliferative activity, and population doubling time (PDT), 942 943 oxidative stress, and apoptosis, as described below

944

2.3. Cryopreservation by slow freezing and solid-surface vitrification for dermis preservation 945 946 SF was performed according to the methodology described for the skin of aquatic mammals [6]. Fragments were inserted into cryotubes containing 2.0 mL of cryopreservation solution 947 composed of DMEM:F-12 supplemented with 0.846 M dimethyl sulfoxide (DMSO), 1.074 M 948 ethylene glycol (EG), 10% FBS and 0.04 M sucrose (SUC). Cryotubes were then transferred 949 to a -80°C freezer in a Mr. Frosty system<sup>®</sup> container (Thermo Scientific Nalgene, Rochester, 950 951 NY, USA) for 12 h at a cooling rate of 1°C/min. Subsequently, all cryotubes were stored in liquid nitrogen (-196°C). 952

953

954 SSV was performed according to the methodology described for the skin of wild mammals 955 [19]. The SSV medium used was DMEM:F-12 supplemented with 3.0 M DMSO, 3.0 M EG, 956 10% FBS and 0.25 M SUC. Briefly, fragments were exposed to 2.0 mL cryoprotectant 957 solution for 5 min, dried on absorbent paper, placed on a metal cubic surface partially 958 immersed in liquid nitrogen, transferred to cryovials, and stored in liquid nitrogen.

After two weeks of storage in liquid nitrogen, all cryotubes were kept for 1 min at 25°C and then immersed in a water bath at 37°C. To remove the cryoprotectants, the fragments were washed three times for 5 min in DMEM:F-12 plus 10% FBS and SUC at decreasing concentrations (0.5 M, 0.25 M, and 0.0 M).

964

# 965 2.4. Evaluation of somatic tissues by histological analysis

For morphological evaluation through histological analysis, fragments derived from the noncryopreserved and cryopreserved groups were fixed with 4% paraformaldehyde, processed for inclusion in paraffin, and sectioned at 5.0  $\mu$ m [19]. Subsequently, sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), Gomori trichrome (GT), and silver nitrate to mark argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) for the analysis of morphometric aspects, collagen matrix, and tissue proliferative activity, respectively. Finally, 4×, 20× (HE), and 40× (GT, AgNOR) images were obtained using a light microscope (Leica DM500, Leica Microsystems,

973 Wetzlar, Germany) with a coupled camera (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems).

974

For morphometric analysis, the thickness of the dermis (in μm) and the number of fibroblasts
were determined in HE-stained sections [32]. For this analysis, 20 images per animal were
acquired for each group, with a total of 120 images per group, and evaluated using ImageJ
software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

979

GT was used to analyze the collagen matrix and quantify the collagen fibers in the dermis. The percentage of collagen fibers was calculated as the area of collagen divided by the total area of the image analyzed [19]. For this analysis, 10 images were obtained per animal for each treatment, with a total of 60 images per group using the threshold color plugin in ImageJ 984 software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA), converted to 32-bit RGB985 format bits.

986

To analyze tissue proliferative activity, the AgNOR assay was performed, where dark spots marked by silver nitrate bound to nuclear proteins were counted according to cell location [30]. In each group, 100 randomly selected labeled fibroblast nuclei were counted, and the AgNOR number/cell and AgNOR area/cell were quantified using the Image Pro Plus software. For this analysis, 10 images/animal were used, with a total of 60 images per group.

992

993 2.5. Evaluation of somatic tissues by ultrastructural analysis

994 Fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS) at 995 pH 7.4 for five days. After this period, the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide 996 and dehydrated using increasing concentrations of ethanol (15, 25, 30, 50, 70, 90, and 100%). 997 The dehydrated sample was mounted on a scanning electron microscopy sample holder (stub) 998 and metallized with a thin layer of gold [35]. Finally, tissue ultrastructures were visualized 999 using a scanning electron microscope TESCAN VEGA3 (Tescan Analytics, Fuveau, France).

1000

1001 2.6. Evaluation of primary cultures and subcultures in vitro

Four fragments per polystyrene plate were cultured in DMEM:F-12<sup>+</sup> medium at  $38.5^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub>. The cultures were monitored every 24 h with total medium replacement. Once cell growth started around the fragments, the medium was changed every 48 h. When the explants were surrounded by a considerable number of cells, they were removed, leaving only cells 1006 [38].

1008 At 70–80% confluence, the cells were trypsinized with trypsin-EDTA solution (0.25%/0.2%)1009 for 7 min and centrifuged at  $600 \times g$  for 10 min. The supernatant was removed, the cell pellet 1010 resuspended in culture medium, and the cells were used for analysis [33].

1011

1012 2.6.1. Assessment of tissue and cell morphology

Primary cultures were evaluated using an inverted microscope (Nikon TS100, Tokyo, Japan). The following parameters were evaluated for the explants: number of attached explants, day at which all explants were attached, number of subconfluent explants, day at which the explants had reached subconfluence, total time required to attain subconfluence, and total culture duration [42].

1018

1019 The morphological characteristics of the cells were evaluated in terms of cell adhesion and 1020 confluence, using an inverted microscope. Morphological characteristics were observed 1021 during *in vitro* cell culture, including nuclear forms and cytoplasmic extensions [33].

1022

1023 2.6.2. Analysis of cell viability and metabolic activity

1024 Cell viability was analyzed using the trypan blue assay. Briefly, an aliquot of suspended cells 1025 (20  $\mu$ L) was stained with 0.4% trypan blue (in PBS) in a 1:1 ratio and counted using a 1026 Neubauer chamber. Unstained cells were considered viable, whereas cells stained with trypan 1027 blue were considered nonviable. The percentage of viable cells was calculated by dividing the 1028 number of viable cells by the total number of cells counted [42].

1029

1030 To evaluate metabolic activity, the cells were subjected to the 3-(4.5-dimethylthiazole-2yl)-

1031 2.5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) assay. Briefly, cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) were cultured

1032 for 5 days in 5% CO<sub>2</sub> at 38.5°C. After this period, the cells were incubated with 5 mg/mL

1033 MTT solution (in DMEM:F-12) for 3 h at 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, DMSO was 1034 added as the MTT solubilization solution, and the absorbance was recorded at 595 nm [39].

1035

1036 2.6.3. Analysis of proliferative activity

The proliferative activity of the cells was quantified by elaboration of the growth curve and determination of the PDT. Cells ( $1 \times 10^4$  cells/mL) were seeded in 24-well plates, trypsinized, counted, and recorded every 24 h for 216 h. The average of the counts every 24 h was used to construct the growth curve [42] and the PDT was estimated (34) according to the following equation: PDT = T ln2/ln (Xe/Xb), where PDT is the time of the culture (in hours), T is the incubation time, Xb is the number of cells at the beginning of the incubation, Xe is the number of cells at the end of the incubation time, and ln is the Napierian logarithm.

1044

## 1045 2.6.4. Quantification of ROS and $\Delta \Psi m$

1046 To evaluate oxidative stress, trypsinized cells were labeled with the 2,7 -1047 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) probe diluted in DMSO for 30 min at 1048 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub>, protected from light, centrifuged twice at 300 x g for 3 min to remove 1049 excess probe, resuspended in PBS, and visualized by fluorescence microscopy (Olympus 1050 BX51TF, Tokyo, Japan) to quantify reactive oxygen species (ROS) levels [19]. To assess 1051 mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m), the cells were labeled with 500 nM MitoTracker 1052 Red<sup>®</sup> (CMXRos) following the same procedure as with the previous probe.

1053

For each probe, images of 100 cells from each animal were obtained a fluorescence microscope. The average background signal intensity of each photograph was subtracted from the fluorescence intensity values obtained from the cells. The mean fluorescence value obtained from cells from the *in vitro* culture of non-cryopreserved fragments was used as the 1058 calibrator. Relative expression levels (arbitrary fluorescence units) were calculated by
1059 dividing the value of cells derived from cryopreserved tissues by the mean of the calibrator
1060 [19]. Images were evaluated using ImageJ software to quantify the fluorescence intensity of
1061 each cell.

1062

1063 *2.6.5. Levels of apoptosis* 

1064 An aliquot of 50  $\mu$ L cells was resuspended in 2  $\mu$ g/mL acridine orange and 10  $\mu$ g/mL 1065 ethidium bromide. Subsequently, cells were evaluated at 480 nm under a fluorescence 1066 microscope, and 300 cells (from each animal and treatment) were counted at 200× 1067 magnification [19]. The cells were then classified as (i) viable, with a light green uniform 1068 nucleus; (ii) early apoptotic, with a non-uniform green nucleus; (iii) late apoptotic, with a 1069 non-uniform bright orange nucleus; and (iv) necrotic, with a uniform orange nucleus. 1070 Different cells were quantified using the ImageJ software.

1071

1072 2.7. Statistical analysis

1073 Data from six Antillean manatees were expressed as the mean  $\pm$  standard error (one animal/repetition) and analyzed using GraphPad Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, 1074 USA). All results were examined for normality using the Shapiro-Wilk test and 1075 1076 homoscedasticity using Levene's test. As the data regarding the trypan blue test, metabolic activity, and apoptosis did not show a normal distribution, they were arcsine-transformed. 1077 Data from the morphometric analysis were analyzed by ANOVA (multiple comparisons) 1078 1079 followed by Tukey's test. The results of AgNOR quantification and fibroblast numbers were 1080 analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn (multiple comparisons) tests. All in vitro culture data were analyzed using ANOVA, followed by an unpaired t-test. Statistical significance was 1081 set at P < 0.05. 1082

### 1083 **3. Results**

1084 *3.1. Assessment of somatic tissues by histological and ultrastructural analysis* 

To evaluate the effects of cryopreservation on the conservation of the dermis of Antillean 1085 manatees, 48 explants from six Antillean manatees were evaluated histologically. Using 1086 hematoxylin-eosin staining, the morphometric characteristics of non-cryopreserved (Fig. 2a-1087 a') and cryopreserved by SF (Fig. 2b-b') and SSV (Fig. 2c-c') tissues were observed. SSV 1088  $(2626.45 \pm 275.47 \text{ }\mu\text{m})$  did not change the dermis thickness when compared to non-1089 cryopreserved tissues (2515.94  $\pm$  216.71  $\mu$ m), whereas SF increased its thickness (2671.23  $\pm$ 1090 237.24 µm, Fig. 2d). Moreover, all cryopreserved fragments, regardless of the technique used, 1091 showed a reduction in the number of fibroblasts (Fig. 2e, P < 0.05). Additionally, using 1092 1093 scanning electron microscopy, similarities were observed in the ultrastructural patterns of non-cryopreserved (Fig. 2a'') and cryopreserved (Fig. 2b''-c'') tissues. 1094

1095

1096 Staining of collagen fiber matrix using Gomori's trichrome (Fig. 3a-c) indicated an increase in 1097 the collagen matrix (Fig. 3d). In the AgNOR proliferative activity assay (Fig. 4a-c), there was 1098 a reduction in the number of AgNOR per cell of the cryopreserved fragments (SF and SSV, 1099 Fig. 4d). In contrast, the AgNOR area was not reduced after warming the samples 1100 cryopreserved by SF (P > 0.05, Fig. 4e).

1101

1102

1103

1104

1105



Fig. 2. Histological evaluation with hematoxylin-eosin and ultrastructural evaluation of non-cryopreserved tissues (a, a', a''), cryopreserved by slow freezing (b, b', b'') and solid-surface vitrification (c, c', c'') derived from Antillean manatees. a, b, c) Tissue overview. a', b', c') Close-up view of the dermal layer identifying the fibroblasts (arrow). a'', b'', c'') Photoelectromicrographs of tissues. d) Morphometric analysis to measure the thickness of the dermal layer. e) Quantification of dermal fibroblasts. SF: Slow freezing. SSV: Solid-surface vitrification. Bars indicate standard error. <sup>a,b,c</sup>: Values with different superscripts differ (P < 0.05). Magnification: (a-c) = 4×, (a'-c') = 20×. Scale bar: (a-c) = 500µm, (a'-c') = 100µm.



1113 Fig. 3. Quantification of collagen fiber matrix in the dermis of Antillean manatees subjected to different cryopreservation techniques stained with

- 1114 Gomori Trichrome. a) Non-cryopreserved tissues. b) Slow freezing. c) Solid-surface vitrification. d) Quantification of the collagen fiber matrix.
- 1115 Square exemplifies dermal area of evaluation. SF: Slow freezing. SSV: Solid-surface vitrification. Bars indicate standard error. <sup>a,b,c</sup>: Values with
- 1116 different superscripts differ (P < 0.05). Magnification =  $20 \times$ . Scale bar =  $100 \mu m$ .



Fig. 4. Proliferative activity of Antillean manatee dermis subjected to different cryopreservation techniques. AgNORs labeled with silver nitrate in a) non-cryopreserved fragments and cryopreserved by b) slow freezing or c) solid-surface vitrification. d) Quantification of AgNOR/cell number. e) Measurement of AgNOR/cell area. AgNOR present in the fibroblast nucleus (arrow). SF: Slow freezing. SSV: Solid-surface vitrification. Bars indicate standard error. <sup>a,b</sup>: Values with different superscripts differ (P < 0.05). Magnification =  $40 \times$ . Scale bar =  $50 \mu$ m.

1130

1133 After collection, processing, cryopreservation, and warming, eight explants per animal were 1134 cultured *in vitro*. Only tissues cryopreserved with SF and non-cryopreserved tissues produced 1135 cells after *in vitro* culture (Fig. 5). No difference (P > 0.05) was observed in the adhesion 1136 capacity of non-cryopreserved and cryopreserved tissues (Table 2), with all tissues adhering 1137 to the dish on the first day. Nevertheless, only 79.2% and 50% of explants in culture from 1138 non-cryopreserved and SF cryopreserved tissues, respectively, showed cell growth around 1139 them (P < 0.05, Table 2).

1140

1141 Although SF did not alter cell viability or proliferative activity (Fig. 6), cells derived from 1142 cryopreserved tissues showed decreased metabolism (31.8%, P < 0.05). Moreover, the cell 1143 growth curve generated showed a typical "S" shape in all groups with a lag phase, exponential 1144 phase, and steady phase (Fig. 6d), with cells derived from the SF cryopreserved tissues 1145 showing a change in the growth curve between days 5 and 6.

1146

1147 ROS levels (Fig. 7a-a'-d) cells from SF cryopreserved tissues  $(1.6 \pm 0.7)$  showed an increase 1148 when compared to that in cells from non-cryopreserved tissues  $(1.0 \pm 0.4)$ . An increase was 1149 also observed in  $\Delta\Psi$ m values (Fig. 7b-b'-e); they were  $1.0 \pm 0.3$  and  $2.1 \pm 0.8$  for non-1150 cryopreserved and cryopreserved fragments. Finally, regarding apoptosis levels, there was a 1151 reduction in the percentage of viable cells from the cryopreserved tissues (95.1 ± 1.0%; 89.2 ± 1152 2.5%) and an increase in cells in the early apoptosis phase (0.4 ± 0.2%; 2.2 ± 0.5%) when 1153 compared to cells from non-cryopreserved tissues (7c-c'-f).

1154

1155

**Table 2.** Establishment of primary and subculture of dermal cells derived from Antillean manatees after cryopreservation by slow freezing and
solid-surface vitrification.

Groups	No. of	Attached	Day all	Fragments with	Day with cell	Total	Total
	initial	explants (%)	attached	subconfluence %	growth around	subconfluence	culture
	samples		explants ±	± S.E.	all fragments ±	time ± S.E.	time ±
			S.E.		S.E.		S.E.
Non-cryopreserved	24	24/24 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$19/24 (79.2 \pm 14)^{a}$	$12.8 \pm 1.7^{a}$	$23.0 \pm 4.1^{a}$	$47.8\pm5.8^{\rm a}$
tissues							
SF	24	24/24 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$8/24 (33.0 \pm 15)^{a}$	$29.0\pm1.9^{b}$	$38.5\pm3.7^{\rm a}$	$81.0\pm5.8^{a}$
SSV	24	24/24 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	-	-	-	-

1159 SF: Slow freezing. SSV: Solid-surface vitrification. S.E.: standard error. <sup>a,b</sup>: Within a column, values with different superscripts differ (P < 0.05).



**Fig. 5.** *In vitro* culture of somatic samples obtained from the skin of Antillean manatees submitted to different cryopreservation techniques. Primary culture of fragments **a**) non-cryopreserved and **b**) cryopreserved by slow freezing, with cell detachment and growth after 15 days. Secondary culture and cell morphology obtained from fragments **a'**) non-cryopreserved and **b'**) cryopreserved by slow freezing. Primary culture of cryopreserved fragments by solid-surface vitrification after **c**) 15 and **c'**) 60 days. (\*) Tissue fragment. Arrow indicates the beginning of cell detachment from tissue in primary culture. Magnification: (a, b, c, c') =  $20 \times$ , (a', b') =  $40 \times$ . Scale bar = (a, b, c, c') =  $200 \mu m$ , (a', b') =  $100 \mu m$ .





1170 Cell viability. **b**) Metabolic activity. **c**) Proliferative activity. **d**) Growth curve. SF: Slow freezing. Bars indicate standard error. <sup>\*</sup>Values differ in 1171 same time (P < 0.05).<sup>a,b</sup>: Values with different superscripts differ (P < 0.05).



**Fig. 7.** Effect of slow freezing cryopreservation in somatic tissues of Antillean manatees on oxidative stress and cellular apoptosis levels. Fluorescent H<sub>2</sub>DCFDA in cells from **a**) non-cryopreserved and **a'**) cryopreserved fragments. MitoTracker<sup>TM</sup> Red CMXRos fluorescent in cells from **b**) non-cryopreserved and **b'**) cryopreserved fragments. Evaluation of apoptosis levels in cells from **c**) non-cryopreserved and **c'**) cryopreserved fragments. Quantification of levels of **d**) ROS, **e**)  $\Delta\Psi$ m and **f**) apoptosis. Viable cells: thin arrow, early apoptotic cells: arrowhead, late apoptotic: thick arrow, necrotic cells: triangle. SF: Slow freezing. Bars indicate standard error. <sup>a,b</sup>: Values with different superscripts differ (P < 0.05). Magnification = 20×. Scale bar = 10µm.

1178 **4. Discussion** 

1179 To our knowledge, this is the first study to demonstrate the culture of somatic cells derived 1180 from non-cryopreserved and cryopreserved dermis of Antillean manatees. In the present 1181 study, we obtained somatic cells from tissues cryopreserved with SF, showing that this 1182 cryopreservation technique allows the recovery of cells after *in vitro* culture. However, SSV 1183 was not efficient in cell recovery, requiring improvements in its use in Antillean manatee skin 1184 conservation.

1185

The establishment of somatic tissue banks for different species [3,10,19], especially those 1186 threatened with extinction [6,32], is important for the development of conservation strategies 1187 1188 for the species of interest. Specifically for marine mammals, these banks can be used for acquiring knowledge regarding the species [42], as well as for studying the influence of fuel 1189 and its derivatives [41], the impact of chlorine derivatives [25], the toxicity of heavy metals 1190 [40], and performing immunological and physiological studies [2]. Moreover, development of 1191 1192 primary cell cultures represents an interesting tool for elucidating the molecular etiology of physiological modifications, a step in accelerating genome-to-phenome studies [17]. Despite 1193 1194 the notorious importance of somatic tissue banks for species conservation, few studies have been conducted on tissue cryopreservation in marine mammals [4], and this study is the first 1195 step towards the formation of such bank for Antillean manatee tissues. 1196

1197

1198 Vitrification is a simple and low-cost technique that can be used to collect somatic samples 1199 [8]. Nevertheless, in the present study, SSV maintained dermis thickness, similar to non-1200 cryopreserved tissues, but altered most other histological parameters of somatic tissues of 1201 Antillean manatees. Rapid cooling, a striking feature of the technique, may have promoted the 1202 maintenance of the dermis, as has also been observed in puma (*Puma concolor*) somatic
tissues [19]. Nevertheless, the alteration in the other parameters of tissues cryopreserved by
SSV may have been caused by high concentrations of cryoprotectants. In a study by Caamaño
et al. [8], vitrification showed lower efficiency compared to SF and non-cryopreserved tissues
derived from brown bears (*Ursus arctos*), suggesting that high concentrations of
cryoprotectants affect the quality of vitrified tissues.

1208

Regarding the SF of somatic tissues of Antillean manatees, most histological parameters were altered. This effect may be associated with the negative effects produced by the formation of ice crystals in somatic tissues [12,29]. Nevertheless, the tissue proliferative activity assessed by the AgNOR area did not differ between SF and non-cryopreserved tissues. The AgNOR assay allows the analysis of possible changes in the tissue and its ability to induce ribosome biogenesis in cells [28]. It is likely that warming with decreasing concentrations of sucrose reduced the changes in these parameters.

1216

Moreover, both cryopreservation methods resulted in a reduction in fibroblasts and an 1217 1218 increase in collagen density. These changes may have occurred because cryopreservation promotes tissue dehydration [15]. Because of this process, a greater condensation of the 1219 collagen fibers present in the dermis was verified, which resulted in an increase in collagen 1220 1221 fibers after cryopreservation of the tissues. No differences were observed between cryopreservation techniques (SF and SSV) in the ultrastructure of somatic tissues derived 1222 1223 from Antillean manatees. In general, the analysis of tissue ultrastructure by scanning 1224 microscopy allows the analysis of damage induced by cryopreservation, which is a three-1225 dimensional technique with details of cell surface and depth [26]. In this study, no differences were observed in this parameter. 1226

Interestingly, recovery of somatic cells after *in vitro* culture of tissues cryopreserved with SF was observed. These cells derived from SF tissues reached confluence after 29.0 days of culture. In contract, this cell recovery did not occur in the SSV group. In general, skin tissues of aquatic mammals are cultured in the absence of the epidermis because no cells grow from tissue fragments of dissected epidermal tissue or fat [7,42]. In our study, as cryopreservation occurs in the absence of the epidermis, this factor may have been harmful to the tissues cryopreserved by SSV due to the high concentrations of cryoprotectants.

1235

Cells recovered from tissues cryopreserved with SF showed similar viability values when 1236 compared to cells recovered from non-cryopreserved tissues. In the present study, the mean 1237 values of viability evaluated by trypan blue were above 80%, similar to those observed in 1238 other species, such as the Hawaiian monk seal (Monachus schauinslandi), with a viability of 1239 87% [20]. The culture medium used in the present study was based on studies on aquatic 1240 mammals, and this factor may have guaranteed the quality of these parameters. Most studies 1241 1242 using somatic tissues in aquatic mammals have used 20% FBS in the culture medium, with 1243 variations in the base media [7,20]. No difference was observed in the PDT of cells derived 1244 from Antillean manatees between non-cryopreserved and SF tissues with values of 25.4-30.9 h. These values were still lower than those observed for cells derived from Hawaiian monk 1245 1246 seals with PDT values of 50 h [20] and humpback whales (Megaptera novaeangliae) with values of  $\sim 41 h [7]$ . 1247

1248

Moreover, fibroblast-like cells were observed in both the cryopreserved and noncryopreserved tissues. Similarly, fibroblast-like cells derived from the skin were observed in media with 10% FBS [7], 15% FBS [15,42] and 20% FBS [20]. Additionally, Antillean manatee cells reached confluence at 12.8 days after explant culture. In other species, confluence was observed at 5 days using explantation and enzymatic dispersion techniques [20]. In the pygmy killer whale (*Feresa attenuata*), confluence was reached after 16 days of tissue attachment using explantation [42]. In dolphins (*Stenella coeruleoalba*), bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), and common dolphins (*Delphinus delphis*), the first somatic cells were observed after 7–21 days of explant culture, reaching 90% confluence in 15–20 days [24]. It is likely that methods of tissue dissociation before culture could be strategies to accelerate the recovery of cells in these tissues.

1260

Nevertheless, cells derived from tissues cryopreserved with SF suffered damage in terms of 1261 metabolism, levels of apoptosis, ROS, and  $\Delta \Psi m$  compared to cells derived from non-1262 1263 cryopreserved tissues. The ideal temperature for culturing cells derived from cold-blooded species is slightly higher than that preferred by intact animals, while an incubation 1264 temperature of 37°C proved to be the preferred temperature for growing mammalian cells 1265 [16]. The Antillean manatee is a warm-blooded marine animal, and we used a temperature of 1266 38.5°C. We suppose that adjustments in the incubator temperature could reduce the oxidative 1267 1268 stress generated during in vitro culture.

1269

Studies using somatic cells derived from marine mammals have been conducted since the 1270 1271 1960s [13]. In manatees, cell types derived from multiple tissues have been obtained, such as kidney epithelial cells [36] and bronchial cells [37] derived from the Florida manatee 1272 (Tricheehus manatus latirostris). In this study, we performed the first culture of somatic cells 1273 1274 derived from the Antillean manatee dermis as a major step in the study of these cells as a 1275 conservation strategy for the species. Nevertheless, it is evident that improvements in tissue cryopreservation techniques necessary, especially regarding SSV and SF. Adjustments to the 1276 combination of cryoprotectants used and technical procedures that guarantee greater 1277

1278 efficiency in the recovered cells will ensure the use of these cells as banks of somatic1279 resources for the conservation and acquisition of knowledge regarding the species.

1280

## 1281 **5.** Conclusions

In summary, we demonstrated for the first time that Antillean manatee somatic tissues can be cryopreserved by slow freezing, resulting in viable cells after *in vitro* culture. However, cells undergo alterations in most of the parameters evaluated. Therefore, based on the data obtained, slow freezing showed to be most suitable technique for cryopreservation of dermis derived from Antillean manatees when compared solid-surface vitrification. Improvements in cryopreservation conditions, especially vitrification, of somatic samples are needed to increase the quality of somatic tissue banks in this species.

1289

# 1290 Statement of funding

1291 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

1292 Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001, and the National Counsel of Technological and

1293 Scientific Development, Brazil (CNPq). AF Pereira was a CNPq investigator.

1294

#### 1295 Declaration of competing interest

1296 The authors declare that they have no conflict of interest.

1297

## 1298 Acknowledgments

1299 The authors thank the National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals of

1300 Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation and their collaborators for the access,

1301 handling, and collection of tissue samples from Antillean manatees.

## 1303 **References**

- 1304 [1] F.L.N. Attademo, J.L.X. Nascimento, G.P Sousa, J.C.G. Borges, J.E. Vergara-Parentee,
- 1305 A.E.B Alencar, E.F. Foppel, A.C.B. Freire, R.E.M. Oliveira, R.P. Lima, F.O. Luna,
- 1306 Occurrences of aquatic mammals in the State of Pernambuco, Brazil, Arq. Ciên. Mar. 53
- 1307 (2020) 33–51, http://dx.doi.org/10.32360/acmar.v53i1.43288
- 1308 [2] A. Bogomolni, S. Frasca, M. Levin, K. Matassa, O. Nielsen, G. Waring, S. De Guise, *In vitro* exposure of harbor seal immune cells to Aroclor 1260 alters phocine distemper virus replication, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 70 (2016) 121e132, doi: 10.1007/s00244-015-0178-z
- [3] A.A. Borges, G.L. Lima, L.B. Queiroz Neta, M.V.O. Santos, M.F. Oliveira, A.R. Silva,
  A.F. Pereira, Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques,
  Cytotechnology 69 (2017) 643–654, doi: 10.1007/s10616-017-0074-7
- 1316 [4] A.V. Boroda, Marine mammal cell cultures: To obtain, to apply, and to preserve, Mar.
- 1317 Environ. Res. 129 (2017) 316–328, doi: 10.1016/j.marenvres.2017.06.018
- 1318 [5] A.V. Boroda, Y.O. Kipryushina, R.V. Golochvastova, O.G. Shevchenko, M.A. Shulgina,
- K.V. Efimova, I.O. Katin, M.A. Maiorova, Isolation, characterization, and
  ecotoxicological application of marine mammal skin fibroblast cultures, In Vitro Cell.
- 1321 Dev. Biol. Anim. 56 (2020) 744–759, https://doi.org/10.1007/s11626-020-00506-w
- 1322 [6] A.V. Boroda, P.G. Zacharenko, M.A. Maiorova, S.E. Peteson, J.F. Loring, N.A.
  1323 Odintsova, The first steps towards generating induced pluripotent stem cells from
  1324 cryopreserved skin biopsies of marine mammals, Russ. J. Mar. Biol. 41 (2015) 405–408,
- doi:10.1134/S106307401505003X

- [7] M. Burkard, D. Whitworth, K. Schirmer, S.B. Nash, Establishment of the first humpback
  whale fibroblast cell lines and their application in chemical risk assessment, Aquat.
  Toxicol. 167 (2015) 240–247, doi: 10.1016/j.aquatox.2015.08.005
- 1329 [8] J.N. Caamaño, A. Rodrigues, M. Muñoz, C. Frutos, C. Diez, E Gómez, Cryopreservation
- 1330 of brown bear skin biopsies, Cell Preserv. Technol. 6 (2008) 83–86,
  1331 https://doi.org/10.1089/cpt.2007.0518
- 1332 [9] A.A. Carvalho, L.R. Faustino, J.R. Figueiredo, A.P.R. Rodrigues, A.P.R. Costa,
  1333 Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian
  1334 females in cryobanking, Acta Vet. Bras. 5 (2011) 236–248.
- 1335 [10] C.A.S. Costa, A.A. Borges, M.B. Nascimento, L.V.C. Aquino, A.R. Silva, M.F. Oliveira,
- A.F. Pereira, Effects of vitrification techniques on the somatic tissue preservation of
  agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758), Biopreserv. Biobank. 18 (2020) 165–170,
  https://doi.org/10.1089/bio.2019.0109
- [11] C.J. Deutechs, C. Self-Sullivan, A. Mignucci-Giannoni, Trichechus manatus. *The IUCN Red List of Threatened Species* (2008) e.T22103A9356917
- 1341 [12] G.M. Fahny, B. Wowk, J. Wu, J. Phan, C. Rasch, A. Chang, E. Zendejas,
  1342 Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances,
  1343 Cryobiology 48 (2004) 157–178, doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.02.002
- 1344 [13] E.T. Feltz, F.H. Fay, Thermal requirements *in vitro* of epidermal cells from seals,
  1345 Cryobiology 3 (1996) 261–264, doi: 10.1016/s0011-2240(66)80020-2
- 1346 [14] A. Hubel, R. Spindler, A.P.N. Skubitz, Storage of human biospecimens: selection of the
- 1347 optimal storage temperature, Biopreserv. Biobank. 12 (2014) 165–175, doi:
  1348 10.1089/bio.2013.0084

- [15] W. Jin, K. Jia, L. Yang, J. Chen, Y. Wu, M. Yi, Derivation and characterization of cell
  cultures from the skin of the Indo-Pacific humpback dolphin *Sousa chinensis*, In Vitro
  Cell. Dev. Biol. Anim. 49 (2013) 449–457, doi: 10.1007/s11626-013-9611-7
- 1352 [16] K. Kadoi, A. Mochizuki, T. Ikeda, H. Kamata, M. Yukawa, Y. Inoue, Susceptibility of a
- line of dolphin kidney cell culture to several herpesviruses, J. Basic. Microbiol. 32 (1992)
- 1354 227–232, doi: 10.1002/jobm.3620320404
- [17] E.K. Lam, K.N. Allen, J.M. Torres-Velarde, J.P. Vasquez-Medina, Functional studies
  with primary cells provide a system for genome-to-phenome investigations in marine
  mammals, Integr. Comp. Biol. 60 (2020) 348–360, doi: 10.1093/icb/icaa065
- [18] R.P. Lima, D. Paludo, R.J. Soavinski, K.G. Silva, E.M.A. Oliveira, Survey on Antillean
  manatee (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758) distribution, occurrence and
  conservation status in the Brazilian Northeast coast, Nat. Resour. 1 (2011) 41–57,
  doi:10.6008/ESS2237-9290.2011.002.0012
- 1362 [19] G.P.O. Lira, A.A. Borges, M.B. Nascimento, L.V.C. Aquino, L.F.M.P. Moura, H.V.R.
- Silva, L.R. Ribeiro, M.F. Oliveira, A.F. Pereira, Effects of somatic tissue 1363 1364 cryopreservation on puma (Puma concolor Linnaeus, 1771) tissue integrity and cell Cryobiology 1365 preservation after vitro culture, 101 (2021)52-60, in https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.06.003 1366
- 1367 [20] Y. Lu, A.A. Aguirre, C. Hamm, Y. W. Yu, P.C. Loh, R. Yanagihara, Establishment,
  1368 cryopreservation, and growth of 11 cell lines prepared from a juvenile Hawaiian monk
- 1369 seal, Monachus schauinslandi, Methods Cell Biol. 22 (2010) 115–124, doi:
- 1370 10.1023/a:1009816715383
- 1371 [21] F.O. Luna, D.C. Balensiefer, A.B. Fragoso, A. Stephano, F.L.N. Attademo, *Trichechus* 1372 *manatus* Linnaeus, 1758. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

- 1373 (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II –
  1374 Mamíferos. Brasília: ICMBio. (2018) 103 –109.
- 1375 [22] F.O. Luna, R.K. Bonde, F.L.N. Attademo, J.W. Saunders, G. Meigs-Friend, J.Z.O.
  1376 Passavante, M.E. Hunter, Phylogeographic implications for release of critically
  1377 endangered manatee calves rescued in Northeast Brazil, Aquat. Conserv.: Mar. Freshw.
- 1378 Ecosyst. 22 (2012) 665–672, doi:10.1002/aqc.2260
- 1379 [23] F.O. Luna, R.P. Lima, J.P. Araújo, J.Z.O. Passavante, Conservation status of the
  1380 Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) in Brazil, Rev. Bras.
  1381 Zoociênc. 10 (2008) 145–153.
- [24] L. Marsili, M.C. Fossi, G. Neri, S. Casini, C. Gardi, S. Palmeri, E. Tarquini, S. Panigada,
  Skin biopsies for cell cultures from Mediterranean free-ranging cetaceans, Mar.
  Environ. Res. 50 (2000) 523–526, doi: 10.1016/s0141-1136(00)00128-8
- 1385 [25] L. Marsili, S. Maltese, D. Coppola, L. Carletti, S. Mazzariol, M.C. Fossi,
  1386 Ecotoxicological status of seven sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded
  1387 along the Adriatic coast of Southern Italy, Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst. 24
  1388 (2014) 103e118, doi:10.1002/aqc.2447
- [26] L.M. McClusky, A scanning electron microscopic study of germ cell maturation in the
  reproductive tract of the male soupfin shark (*Galeorhinus galeus*), Acta Zool. (2003)
  69–76, doi:10.1046/j.1463-6395.2003.00132.x
- [27] MMA, Ordinance of the Ministry of the Environment, no. 443, 17 December (2014) 1–
  1393 11.
- 1394 [28] N.K. Mondal, S. Roychoudhury, M.R. Ray M.R., Higher AgNOR expression in
  1395 metaplastic and dysplastic airway epithelial cells predicts the risk of developing lung
  1396 cancer in women chronically exposed to biomass smoke. J. Environ. Pathol. Toxicol.
  1397 Oncol. 34 (2015) 35–51, doi: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2015010708

- 1398 [29] D.E. Pegg, The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and
  1399 organs, Cryobiology 60 (2010) 36–44, doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.02.003
- 1400 [30] A.F. Pereira, L.V.C. Aquino, M.B. Nascimento, F.V.F. Bezerra, A.A. Borges, É.A.
- 1401 Praxedes, M.F. Oliveira, Ultrastructural and morphometric description of the ear skin and
- 1402 cartilage of two South American wild histricognate rodents (Dasyprocta leporina and
- 1403 *Galea spixii*), Pesq. Vet. Bras. 41 (2021) e06775, doi: 10.1590/1678-5150-pvb-6775
- 1404 [31] A.F. Pereira, A.A. Borges, M.V.O. Santos, G.P.O. Lira, Use of cloning by nuclear
  1405 transfer in the conservation and multiplication of wild mammals, Rev. Bras. Reprod.
  1406 Anim. 43 (2019) 242–247.
- 1407 [32] É.A. Praxedes, L.R.M. Oliveira, M.B. Silva, A.A. Borges, M.V.O. Santos, H.V.R. Silva,
- M.F. Oliveira, A.R. Silva, A.F. Pereira, Effects of cryopreservation techniques on the
  preservation of ear skin An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), Cryobiology 88 (2019) 15–22, doi:
  10.1016/j.cryobiol.2019.04.007
- 1412 [33] I.R. Rajput, Z. Xiao, S. Yajing, S. Yaqoob, E. Sanganyado, H. Ying, Y. Fei, W. Liu,
- 1413 Establishment of pantropic spotted dolphin (Stenella attenuata) fibroblast cell line and
- 1414 potential influence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on cytokines response,

1415 Aquat. Toxicol. 203 (2018) 1–9, doi: 10.1016/j.aquatox.2018.07.017

- 1416 [34] V. Roth, Available at: http://www.doubling-time.com/compute.php, (2006), Accessed
  1417 date: 10 June 2021.
- 1418 [35] A.P. Silva, A.S. Machado, A.E. Le Bas, R.G. Silva, E.A. Silva, F.J. Hernandez1419 Blazquez, The skin structures and their role in the thermoregulation of the South
  1420 American fur seal (*Arctocephalus australis*), Anat. Rec. 303 (2020) 3155–3167, doi:
  1421 10.1002/ar.24357

- 1422 [36] J.M. Sweat, D.D. Dunigan, S.D. Wright, Characterization of kidney epithelial cells from
  1423 the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*, In Vitro Cell. Biol.-Anim. 37
  1424 (2001) 386–394, doi: 10.1007/BF02577576
- [37] J.M. Sweat, C.M. Johnson, P.J. Gibbs, *In vitro* development and characterization of a
  manatee bronchial cell line, In Vitro Cell. Biol.-Anim. 39 (2003) 249–256, doi:
  10.1290/1543-706X(2003)039<0249:IVDACO>2.0.CO;2.
- [38] J. Wang, W. Su, W. Nie, J. Wang, W. Xiao, D. Wang, Establishment and
  characterization of fibroblast cell lines from the skin of the Yangtze finless porpoise, In
  Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 47 (2011) 618–630, doi: 10.1007/s11626-011-9448-x
- [39] S.J. Webb, G.V. Zychowski, S.W. Bauman, B.M. Higgins, T. Raudsepp, L.S. Gollahon, 1431 K.J. Wooten, J.M. Cole, C. Godard-Codding, Establishment, characterization, and 1432 toxicological application of loggerhead sea turtle (Caretta caretta) primary skin 1433 Environ. Sci. 1434 fibroblast cell cultures. Technol. 48 (2014)14728-14737, https://doi.org/10.1021/es504182e 1435
- [40] C.F. Wise, S.S. Wise, W.D. Thompson, C. Perkins, J.P. Wise, Chromium is elevated in
  fin whale (*Balaenoptera physalus*) skin tissue and is genotoxic to fin whale skin cells,
  Biol. Trace Elem. Res. 166 (2015) 108e117, doi: 10.1007/s12011-015-0311-x
- [41] C.F. Wise, J.T.F. Wise, S.S. Wise, W.D. Thompson, J.P. Wise, Chemical dispersants
  used in the Gulf of Mexico oil crisis are cytotoxic and genotoxic to sperm whale skin
  cells, Aquat. Toxicol. 152 (2014) 335e340, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.04.020
- 1442 [42] S. Yajing, I.R. Rajput, H. Ying, Y. Fei, E. Sanganyado, L. Ping, W. Jingzhen, L.
  1443 Wenhua, Establishment and characterization of pygmy killer whale (*Feresa attenuata*)
- 1444
   dermal fibroblast cell line, Plos One 13 (2018) e0195128, doi:

   1445
   10.1371/journal.pone.0195128

1446	CAPÍTULO 3 – INFLUÊNCIA DE CRIOPROTETORES INTRACELULARES NA
1447	CONSERVAÇÃO DE TECIDOS SOMÁTICOS DÉRMICOS DERIVADOS DE
1448	PEIXES-BOI MARINHO (Trichechus manatus manatus LINNAEUS, 1758)
1449	
1450	
1451	Artigo Experimental Nº 2: Influence of Intracellular Cryoprotectants on the Conservation of
1452	Dermal Somatic Tissues Derived from Antillean Manatees (Trichechus manatus manatus
1453	Linnaeus, 1758)
1454	
1455	
1456	Periódico de submissão: Biopreservation and Biobanking
1457	
1458	
1459	Qualis (Medicina Veterinária): B1. Qualis (Referência): A4. Fator de impacto: 2,300
1460	
1461	
1462	Data de submissão: 02/03/2022
1463	
1464	
1465	
1466	
1467	
1468	
1469	
1470	

1471 Influence of Intracellular Cryoprotectants on the Conservation of Dermal Somatic
1472 Tissues Derived from Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758)
1473

1474 Matheus B. Nascimento<sup>1</sup>, Yasmin B.F. Moura<sup>1</sup>, Radan E.M. Oliveira<sup>2</sup>, Alana A. Borges<sup>1</sup>,

1475 Moacir F. Oliveira<sup>2</sup>, Fábia O. Luna<sup>3</sup>, Fernanda L.N. Attademo<sup>3</sup>, Alexsandra F. Pereira<sup>1\*</sup>

1476

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA),
Mossoro, RN, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Applied Animal Morphophysiology, UFERSA,
Mossoro, RN, Brazil. <sup>3</sup>National Center for Research and Conservation of Aquatic Mammals
by Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation, Itamaracá Island, PE, Brazil

1481

Address correspondence to: Alexsandra F. Pereira, PhD, Laboratory of Animal
Biotechnology, Federal Rural University of Semi-Arid, Av. Francisco Mota, 572, Costa e
Silva, Mossoró-RN, Brazil, 59625900, E-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

1485

1486 **Running title:** Vitrification of somatic tissues from manatees

1487

1488 Abstract

Cryopreservation of somatic tissue has been studied as a tool for the knowledge and conservation of endangered species, such as Antillean manatees. Optimization of vitrification protocols is an important step in the establishment of biological banks. To decrease the damage caused by this technique, a reduction in the concentration of cryoprotectants has been proposed. Therefore, we aimed to evaluate different combinations and concentrations of intracellular cryoprotectants for the conservation of somatic tissues derived from Antillean manatees. Dulbecco modified Eagle medium: F12 composed of 10% fetal bovine serum and 1496 0.25 M sucrose was supplemented with 3.0 M ethylene glycol (EG) plus 3.0 M dimethyl sulfoxide (DMSO) or 1.5 M EG plus 1.5 M DMSO or 3.0 M EG or 3.0 M DMSO to produce 1497 four solutions for solid-surface vitrification. Non-cryopreserved tissues were used as the 1498 controls. After warming, dermal tissues derived from four Antillean manatees were evaluated 1499 1500 for ultrastructure, histology, and in vitro culture. No differences were observed among the vitrified and non-vitrified tissues in terms of ultrastructure. The dermis thickness of the 1501 vitrified fragments in solutions containing 3.0 M EG plus 3.0 M DMSO, 3.0 M EG, and 3.0 1502 DMSO were similar to that of the control. None of the vitrified fragments in the different 1503 solutions were able to maintain the number of fibroblasts and the percentage of collagen 1504 fibers as compared to that of the non-vitrified fragments. Nevertheless, vitrification with 3.0 1505 1506 M EG plus 3.0 M DMSO maintained tissue proliferative potential. None of the vitrified fragments in the different solutions were able to produce cells in vitro. In summary, even 1507 reducing the concentration of intracellular cryoprotectants as well as their association did not 1508 guarantee the maintenance of cells after in vitro culture. Further studies are needed to 1509 optimize the vitrification protocols in Antillean manatee somatic tissues. 1510

1511

1512 Key words: cryobanking, solid-surface vitrification, endangered species, marine mammals

1513

# 1514 Introduction

The cryopreservation of somatic tissues has been studied as an instrument for the knowledge and maintenance of endangered mammals<sup>1,2</sup>. This tool allows the storage of somatic resources for the establishment of somatic cells for applications in different studies, such as cell biology, genetics, physiology, and other conservation actions<sup>1,3</sup>. Thus, the development of suitable protocols for the preservation of somatic tissues is of great interest, especially when cellular use is not immediately required<sup>4,5</sup>. Prompt access to laboratories with tissue culture facilities is a challenge for the *ex situ* conservation of somatic tissues<sup>6</sup>, and the development
of conservation methods for use in the field is essential for the construction of biobanks of
these somatic tissues.

1524

Somatic tissue conservation techniques include cryopreservation via slow freezing<sup>7</sup> and 1525 vitrification<sup>8</sup>. Among vitrification methods, solid-surface vitrification (SSV) has been 1526 prominent for the conservation of somatic tissues<sup>9,10,11</sup>. SSV, as well as other vitrification 1527 methods, have the main advantage of reducing the formation of ice crystals and their use in 1528 the field, as they allow manipulation with low-cost materials<sup>12</sup>. Moreover, in SSV, the 1529 somatic tissues are not in contact with a large amount of cryoprotectants, which decreases the 1530 toxicity due to exposure to extreme temperature changes<sup>9</sup>. Nevertheless, cryoprotectants are 1531 important factors for SSV in species of interest. 1532

1533

In general, the toxicity of intracellular cryoprotectants is one of the main barriers to overcome 1534 for the success of cryopreservation protocols<sup>13</sup>. Differences in the concentrations and 1535 combinations of cryoprotectants can be observed among species and cell types<sup>14</sup>. The 1536 cryoprotectants most commonly used for SSV in somatic tissues are ethylene glycol (EG) and 1537 dimethyl sulfoxide (DMSO), in association with sugars and proteins<sup>15,16</sup>. In marine mammals, 1538 information on combinations of cryoprotectants in somatic tissue cryopreservation is scarce. 1539 In a single study by Boroda et al.<sup>7</sup> on Walrus (Odobenus rosmarus), Steller sea lion 1540 (Eumetopias jubatus), and Irrawaddy dolphin (Orcaella brevirostris), the authors applied the 1541 1542 association of EG and DMSO with sucrose in the cryopreservation of the skin somatic tissues of these species using slow freezing. We are now interested in evaluating different 1543 combinations and concentrations of intracellular cryoprotectants in SSV using Antillean 1544 manatee somatic tissue. 1545

87

Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) are herbivores that weigh more than 200 kg<sup>17</sup> and belong to the order Sirenia, distributed in more than 15 countries<sup>18</sup>. The Antillean manatee is one of the most endangered species of aquatic mammals in Brazil<sup>19,20</sup>; conservation strategies, such as the formation of somatic tissue banks, are essential for advances in population control of this species. Therefore, we aimed to evaluate different combinations and concentrations of intracellular cryoprotectants for the conservation of somatic tissues in Antillean manatees.

1554

## 1555 Material and Methods

All protocols were approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of the Federal Rural University of Semi-Arid (CEUA/UFERSA, no. 14/2020) and the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, no. 20685-5/2020). Reagents, media, and solutions were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco-BRL (Carlsbad, CA, USA), and Labimpex (São Paulo, SP, Brazil).

1561

## 1562 Animals and skin biopsy collection

In the course of this study, four healthy Antillean manatees were used; more specifically, two 1563 females and two males at  $20.8 \pm 7.5$  years of age and weighing  $462.0 \pm 126.9$  kg, belonging to 1564 the Advanced Base of the National Center for Research and Conservation of Aquatic 1565 Mammals by Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio/CMA, 1566 Itamaracá Island, PE, Brazil, 7°48'33"S 34°50'19"W). Abdominal region tissues derived from 1567 mechanically restrained Antillean manatees were obtained using an  $8 \times 150$  mm disposable 1568 punch biopsy (Razormed Inc., Gurgaon, Haryana, ID) and transported to the Laboratory of 1569 Animal Biotechnology (UFERSA) in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture 1570

## 1574 Processing of skin biopsies, experimental design, and cryopreservation

In the laboratory, the samples were washed in DMEM:  $F-12^+$  medium and separated into epidermis and dermis. Dermal tissue was sectioned to 6.0 mm<sup>3</sup> (3 × 2 × 1 mm) using a scalpel blade and tweezers<sup>21</sup>. Subsequently, 50 fragments derived from each animal were distributed equally into five groups among non-vitrified (control) and vitrification solutions, which were further divided for ultrastructural, histological analysis, and cell viability during the culture.

1580

1581 Dermal tissues were cryopreserved using the vitrification solution proposed by Borges et al.<sup>15</sup>

and Rodrigues et al.<sup>22</sup> with some modifications. Thus, DMEM: F-12 composed of 10% FBS 1582 and 0.25 M sucrose was supplemented with EG, and/or DMSO to produce the following four 1583 vitrification solutions: 3.0 M EG plus 3.0 M DMSO, 1.5 M EG plus 1.5 M DMSO, 3.0 M EG, 1584 1585 and 3.0 M DMSO. For SSV, fragments were exposed to a 2.0 mL cryoprotectant solution for 1586 5 min, dried on absorbent paper, placed on a metal cubic surface partially immersed in liquid 1587 nitrogen, transferred to cryovials, and stored in liquid nitrogen (-196 °C). For warming, all cryotubes were kept at 25 °C for 1 min and immersed in a water bath at 37 °C. To remove 1588 cryoprotectants, the fragments were washed three times for 5 min in DMEM: F-12 plus 10% 1589 FBS and sucrose in decreasing concentrations (0.5 M, 0.25 M, and 0.0 M). 1590

1591

1592 Thus, non-vitrified and vitrified fragments were evaluated for ultrastructure and 1593 morphological analysis, with an emphasis on dermal thickness, fibroblast quantification, 1594 collagen matrix, and tissue proliferative activity. Other samples were subjected to *in vitro* 1595 culture and subculture until the first passage. Cells were analyzed for morphology, adhesion, subconfluence, viability by trypan blue, metabolism by 3-(4.5-dimethylthiazole-2yl)-2.5diphenyl tetrazolium bromide (MTT), and proliferative activity by determining the population
doubling time (PDT), as described below.

1599

1600 Evaluation of somatic tissues using ultrastructure, morphometry, and histological stains

For ultrastructural analysis, two fragments from each group were fixed in 2.5% 1601 glutaraldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS) for five days. After this period, 1602 the tissues were post-fixed in 1% osmium tetroxide diluted in distilled water and dehydrated 1603 with increasing concentrations of ethanol<sup>23</sup>. For scanning electron microscopy analysis, the 1604 samples were conditioned in the drying equipment to the critical point of carbon dioxide 1605 1606 (K850 Critical Point Dryer; Quorum Technologies, Lewes, East Sussex, United Kingdom), placed in a stub, and metallized with gold. Finally, tissue ultrastructure was visualized using a 1607 scanning electron microscope (TESCAN VEGA3; Tescan Analytics, Fuveau, Bouches-du-1608 Rhône, France). 1609

1610

1611 For morphometric analysis using histological staining, four fragments from each group were fixed in 4% paraformaldehyde, processed for inclusion in paraffin, and sectioned at 5.0 µm<sup>8</sup>. 1612 Histological sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), Gomori trichrome (GT), and 1613 1614 silver nitrate to mark argyrophilic nucleolar organizing regions (AgNOR) to analyze the morphological and morphometric aspects, the collagen matrix, and tissue proliferative 1615 activity. Finally, images using the objectives of  $4 \times$  (HE),  $20 \times$  (HE, GT) and  $40 \times$  (AgNOR) 1616 were obtained using a light microscope (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, HE, 1617 1618 Germany) with a coupled camera (Leica ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Germany). ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) was used 1619 for all the analyses. 1620

HE-staining was used to evaluate the thickness of the dermis (in μm) and quantify the number
of dermal fibroblasts using 20 images per animal for each group. GT was used to quantify
collagen fibers using 10 random photographic records of each slide (one slide/one animal/one
treatment). AgNOR was used for evaluating tissue proliferative activity using 10
images/animal in each group derived from 100 randomly selected labeled fibroblast nuclei for
quantification of AgNOR cell/number and AgNOR area/cell.

1628

1629 *Evaluation of somatic tissues using in vitro culture* 

1630 Non-vitrified and vitrified fragments were seeded in culture dishes containing DMEM:  $F-12^+$ 1631 medium at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% air<sup>24</sup>. The culture medium was changed every day. The 1632 cells were harvested when they reached 70% subconfluence and were subcultured into dishes. 1633

Primary culture was evaluated using an inverted microscope (Nikon TS100, Tokyo, Japan). For the explants, the following parameters were evaluated: number of attached explants, day on which all explants were attached, number of subconfluent explants, day on which the explants had reached subconfluence, total time required to attain subconfluence, and total culture duration<sup>21</sup>. Additionally, cells were evaluated for morphological characteristics under a bright-field microscope throughout the culture period to trace cellular and nuclear shapes and cytoplasmic extensions.

1641

1642 Cell viability was evaluated using trypan blue assay. Briefly, cells were stained with 0.4% 1643 trypan blue in PBS, and the dead cells were identified (blue), which allowed permeabilization 1644 of the dye (nonviable cells). To analyze proliferative activity, cells seeded at a density of 1.0 1645  $\times 10^5$  cells/mL were trypsinized and counted at intervals of 8 days. The average cell counts recorded every 24 h were used to determine PDT. Subsequently, the cells were analyzed for metabolic activity using the MTT assay. Cells  $(5.0 \times 10^5 \text{ cells/mL})$  were cultured, and after 5 days, MTT solution (5 mg/mL in DMEM) was added, and the plates were incubated for 3 h. The MTT solution was removed and DMSO was added for 5 min. The samples were analyzed using a spectrophotometer (Shimadzu® UV-mini-1240, Kyoto, Japan) at 595 nm.

1651

# 1652 *Statistical analysis*

Data from four Antillean manatees were expressed as the mean ± standard error (one 1653 animal/repetition) and analyzed using GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, 1654 CA, USA). All results were verified for normality using the Shapiro-Wilk test and for 1655 homoscedasticity using Levene's test. Data from the morphometric analysis were analyzed 1656 via analysis of variance (ANOVA; multiple comparisons) followed by Tukey's test. The 1657 results of AgNOR quantification and fibroblast numbers were analyzed using the Kruskal-1658 Wallis and Dunn tests. All culture data were analyzed using ANOVA, followed by an 1659 unpaired t-test, with P < 0.05. 1660

1661

## 1662 **Results**

1663 Initially, using scanning electron microscopy, ultrastructural analysis of non-vitrified (Fig. 1664 1A) and vitrified tissues treated with different cryoprotectants revealed similar structural 1665 patterns (Fig. 1B–E). In all images, the presence of fiber bundles was observed, which are 1666 structural components of the dermis.

1667

1668 The morphological features of non-vitrified somatic tissue after vitrification using four 1669 different solutions are shown in Fig. 2. Regarding the effects of SSV on tissue morphometry, 1670 the vitrified fragments in solutions composed of 3.0 M EG plus 3.0 M DMSO, 3.0 M EG, and 1671 3.0 DMSO were similar to the control for dermis thickness (Table 1). None of the vitrified 1672 fragments in the different solutions were able to maintain the number of fibroblasts when 1673 compared to that in the non-vitrified tissues, showing a reduction in all groups (Table 1). 1674 Moreover, vitrified tissues, regardless of the solution used, presented a higher percentage of 1675 collagen fibers compared to that of the non-vitrified tissues, with values varying from 89.0 ± 1676 2.0% to 95.0 ± 1.0% (Fig. 3A–F).

1677

Additionally, for tissue proliferative potential evaluated by AgNOR number/cell and AgNOR area/cell, tissues vitrified with 3.0 M EG plus 3.0 M DMSO were able to maintain the proliferative potential when compared to that of the non-vitrified tissues (Fig. 4A–G). The values observed for the vitrified group using 3.0 M EG plus 3.0 M DMSO were  $1.14 \pm 0.17$ and  $0.76 \pm 0.15 \ \mu\text{m}^2$  for AgNOR number/cell and AgNOR area/cell, respectively, similar to that observed in the non-vitrified group  $(1.25 \pm 0.24 \text{ and } 0.83 \pm 0.16 \ \mu\text{m}^2)$ . In the other groups, a reduction in tissue proliferative potential parameters was observed (Fig. 4G).

1685

1686 Interestingly, none of the vitrified fragments in the different solutions produced cells in vitro 1687 (Fig. 5A-E). For in vitro cultures, 16 explants per animal, distributed across the experimental groups, were cultured in vitro for 50.8 days (Table 2). In the non-vitrified and vitrified groups, 1688 all tissues were attached to the dish from  $1.0 \pm 0.0$  days. Nevertheless, only the non-vitrified 1689 tissues resulted in cells with a viability of 89.8%. Additionally, cells derived from the non-1690 vitrified cells showed 100% metabolic activity and PDT of  $34.3 \pm 16.2$  h (Table 2). Finally, 1691 the cells showed morphological characteristics, such as fusiform shape and central oval 1692 1693 nucleus, similar to that of fibroblasts (Fig. 5A').

1694





B

FIG. 1. Photoelectromicrographs for ultrastructural analysis of the dermis of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions. (A) 1696

1697 Non-vitrified tissues. (B) 3M-EG+3M-DMSO. (C) 1.5M-EG+1.5M-DMSO. (D) 3M-EG. (E) 3M-DMSO.

1698

A



1700 FIG. 2. Histological analysis of the dermis of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions. (A-E) tissue overview, (A'-E')

- 1701 close-up view showing fibroblasts. (A, A') Non-vitrified tissues. (B, B') 3M-EG+3M-DMSO. (C, C') 1.5M-EG+1.5M-DMSO (D, D') 3M-EG.
- 1702 (E, E') 3M-DMSO. Fibroblasts (arrow). Magnification:  $(A-E) = 4\times$ ,  $(A''-E'') = 20\times$ . Scale bar:  $(A-E) = 500 \mu m$ ,  $(A'-E') = 100 \mu m$ .

Table 1. Dermal thickness and number of fibroblasts of Antillean Manatee skin subjected to vitrification with different concentrations and
combinations of intracellular cryoprotectants.

		Dermis thickness (µm)	No. of fibroblast				
	Groups	Mean $\pm$ S.E.	Mean $\pm$ S.E.				
	Non-vitrified tissues	$2470.64 \pm 232.02^{a}$	$55 \pm 10^{a}$				
	3M-EG+3M-DMSO	$2590.00\pm262.19^{ab}$	$40\pm7^b$				
	1.5M-EG+1.5M-DMSO	$2834.08 \pm 292.64^{b}$	$37\pm5^b$				
	3M-EG	$2704.62\pm 405.36^{ab}$	$39\pm5^{b}$				
	3M-DMSO	$2697.42 \pm 361.93^{ab}$	$40\pm9^{b}$				
1705	S.E.: standard error. Different letters indicate statistical difference within each column ( $P < 0.05$ ).						
1706							
1707							
1708							
1709							
1710							
1711							



FIG. 3. Quantification of collagen fiber matrix in the dermis of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions stained with Gomori Trichrome. Photomicrographs of the tissue showing the measured area in non-vitrified tissues (A), 3M-EG+3M-DMSO (B), 1.5M-EG+1.5M-DMSO (C), 3M-EG (D), 3M-DMSO (E). (F) Quantification of the collagen fiber matrix. Bars indicate standard error. <sup>a,b</sup>: P < 0.05. Magnification: (A–E) = 20×. Scale bar = 100 µm.



FIG. 4. Quantification and measurement of AgNORs labeled with silver nitrate in the dermis of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions. Tissue photomicrography in non-vitrified (A), 3M-EG+3M-DMSO (B), 1.5M-EG+1.5M-DMSO (C), 3M-EG (D), 3M-DMSO (E). (F) Quantification of AgNOR/cell number. (G) Measurement of AgNOR/cell area. Bars indicate standard error. <sup>a,b</sup>: P < 0.05. AgNOR present in the fibroblast nucleus (arrow). Magnification: (A–E) = 40×. Scale bar = 50 µm.



FIG. 5. *In vitro* culture of fragments derived from the skin of Antillean manatees subjected to different vitrification solutions. (A) Primary culture of non-vitrified fragments, with cell detachment and growth after 15 days. (A') Secondary culture and cell morphology obtained from non-vitrified fragments. Primary culture of fragments, with no detachment and cell growth after 60 days of culture in 3M-EG+3M-DMSO (B), 1.5M-EG+1.5M-DMSO (C), 3M-EG (D), 3M-DMSO (E). (\*) Tissue fragment. Arrow indicates the beginning of cell detachment from tissue in primary culture. Magnification: (A–E) =  $10 \times$ , (A') =  $20 \times$ . Scale bar: (A–E) =  $200 \mu$ m, (A') =  $100 \mu$ m.

- 1738
- 1739
- 1740

- 1741 **Table 2.** Evaluation of *in vitro* culture of somatic tissues derived from Antillean Manatees subjected to vitrification with different concentrations
- 1742 of intracellular cryoprotectants.

Groups	Attached	Day all	Fragments with	Day with	Total	Cell	Metabolic	PDT
	explants (%)	attached	subconfluence (%)	cell growth	culture	viability	activity	(h)
	1 ()	explants		around all	time	(%)	(%)	
		•		fragments	(days)			
Non-vitrified tissues	16/16 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$11/16 \ (68.8 \pm 18.8)^{a}$	$14.8 \pm 1.9$	$50.8\pm8.8^{\rm a}$	89.6 ± 2.9	$100.0 \pm 0.0$	34.3 ±
								16.2
3M-EG+3M-DMSO	16/16 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$0/0 \ (0.0 \pm 0.0)^{b}$	-	-	-	-	-
1.5M-EG+1.5M-DMSO	16/16 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$0/0 \ (0.0 \pm 0.0)^{b}$	-	-	-	-	-
3M-EG	16/16 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$0/0 \ (0.0 \pm 0.0)^{b}$	-	-	-	-	-
3M-DMSO	16/16 (100) <sup>a</sup>	$1.0\pm0.0^{a}$	$0/0 \ (0.0 \pm 0.0)^{b}$	-	-	-	-	-

1743 Values are media  $\pm$  standard error. Different letters indicate statistical difference within each column (P < 0.05).

#### 1744 Discussion

Considering the importance of vitrification as a tissue cryopreservation technique for 1745 endangered mammals, such as the Antillean manatees, to collect samples in the field in a 1746 simpler way and with low-cost material, we hypothesized that reduced concentrations of 1747 intracellular cryoprotectants (EG and DMSO) as well as combinations of these 1748 cryoprotectants could guarantee adequate maintenance of tissue viability and cell recovery 1749 after in vitro culturing of these tissues. Intriguingly, in the present study, none of the 1750 combinations (EG and DMSO in association or not) and concentrations (6.0 M or 3.0 M) of 1751 intracellular cryoprotectants were efficient in conserving Antillean manatee somatic tissues 1752 for the recovery of somatic cells. 1753

1754

SSV consists of a technique in which the sample is superimposed on a cubic hollow metal 1755 surface partially submerged in liquid nitrogen, which causes vitrification followed by storage 1756 in cryovials<sup>9</sup>. The main characteristic of this technique is the sudden temperature change 1757 associated with high cryoprotectant concentrations<sup>12</sup>. In SSV, tissues are generally not 1758 1759 exposed to a large amount of cryoprotectants before undergoing a drastic change in temperature. Different from what was observed in somatic tissues of other wild mammals, 1760 such as collared peccaries<sup>9</sup>, red-rumped agouti<sup>10</sup>, jaguar<sup>11</sup>, and puma<sup>8</sup>, SSV was an efficient 1761 1762 method for conserving these somatic resources. In these studies, skin fragments containing epidermis and dermis were cryopreserved; however, in the present study, only the dermal 1763 fragments were vitrified. The epidermis, the outermost layer of the skin, along with several 1764 1765 layers of tissues and cells, protect the internally located cells, allowing their preservation after cryopreservation<sup>25</sup>. In general, the skin of aquatic mammals is cultured in the absence of the 1766 epidermis, as no cells grow in tissue fragments of epidermal tissue or fat<sup>21,26</sup> and therefore, the 1767 tissues without epidermis were cryopreserved. 1768

Moreover, even without producing cells during in vitro culture, tissues vitrified with 3.0 M 1770 EG plus 3.0 M DMSO maintained adequate values for epidermal thickness and tissue 1771 proliferative potential, as depicted by the AgNOR assay. AgNOR is a good marker of cell 1772 proliferation because it labels nucleolus organizer regions, which are nucleolar substructures 1773 associated with ribosomal RNA transcription<sup>27</sup>. Additionally, no difference was observed in 1774 the tissue ultrastructure, regardless of the SSV solution used, between the vitrified and non-1775 vitrified tissues. These parameters were probably not altered because the combination of 1776 cryoprotectants and their concentrations ensured the maintenance of these parameters by 1777 conserving the vitreous stage that SSV promotes<sup>12</sup>. The combination of cryoprotectants (EG 1778 and DMSO) at 6.0 M (3.0 M/3.0 M) with extracellular cryoprotectants (sucrose and FBS) has 1779 already been shown to be efficient in the cryopreservation of somatic tissues from different 1780 species, both domestic (goat, sheep, and cattle<sup>28</sup>) and wild (collared peccaries<sup>7</sup>, red-rumped 1781 agoutis<sup>10</sup>), including the recovery of cells. 1782

1783

Moreover, cells recovered from non-cryopreserved tissues were cultured for up to 50.8 days showing viability and metabolic activity values above 80%. Similar values have been observed for cells from other marine mammals, such as the Hawaiian monk seal<sup>29</sup>. Additionally, the PDT value obtained was 34.2 h, which is lower than that in studies with humpback whales<sup>26</sup>).

1789

In conclusion, SSV at different concentrations and combinations of cryoprotectants affected
the ability of Antillean manatee abdominal tissue and cells during *in vitro* culture. Although
3.0 M EG plus 3.0 M DMSO maintained dermal thickness and tissue proliferation potential
similar to that of the non-vitrified tissues, cells could not be recovered from these tissues *in*

*vitro*. Further studies are needed to optimize the vitrification protocols in Antillean manateesomatic tissues.

1796

## 1797 Acknowledgments

- 1798 This study was supported by the Brazilian Council of Scientific Development (CNPq) and the
- 1799 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES, Financial
- 1800 Code 001). MF Oliveira and AF Pereira are CNPq investigators.
- 1801

## 1802 Author Disclosure Statement

- 1803 No conflicting financial interests exist
- 1804

#### 1805 **References**

- Boroda AV. Marine mammal cell cultures: To obtain, to apply, and to preserve. *Mar Environ Res* 2017; 129:316–328.
- 1808 2. Praxedes EA, Borges AA, Santos MVO, Pereira AF. Use of somatic cell banks in the
  1809 conservation of wild felids. *Zoo Biol* 2018; 37:258–263.
- 1810 3. Boroda AV, Kipryushina YO, Golochvastova RV, et al. Isolation, characterization, and
- 1811 ecotoxicological application of marine mammal skin fibroblast cultures. *In Vitro Cell Dev*
- 1812 *Biol Anim* 2020; 56:744–759.
- 1813 4. Cetinkaya G, Arat S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking.
  1814 *Cryobiology* 2011; 63:292–297.
- 1815 5. Queiroz Neta LB, Lira GPO, Borges AA, et al. Influence of storage time and nutrient
- 1816 medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (Pecari
- 1817 *tajacu* Linnaeus, 1758) skin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2018; 54: 486–495.
- 1818 6. Tovar H, Navarrete F, Rodríguez L, Skewes O, Castro FO. Cold storage of biopsies from

- wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of
  primary culture cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008; 44:309–320.
- 1821 7. Boroda AV, Zacharenko PG, Maiorova MA, Peteson SE, Loring JF, Odintsova NA. The
- 1822 first steps towards generating induced pluripotent stem cells from cryopreserved skin
- 1823 biopsies of marine mammals. *Russ J Mar Biol* 2015; 41: 405–408.
- 1824 8. Lira GPO, Borges AA, Nascimento MB, et al. Effects of somatic tissue cryopreservation on
- puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) tissue integrity and cell preservation after in vitro
  culture. *Cryobiology* 2021; 101:52–60.
- 1827 9. Borges AA, Lima GL, Queiroz Neta LB, et al. Conservation of somatic tissue derived from
- 1828 collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification
- techniques. *Cytotechnology* 2017; 69:643–654.
- 1830 10. Costa CAS, Borges AA, Nascimento MB, et al. Effects of vitrification techniques on the
  1831 somatic tissue preservation of agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Biopreserv*1832 *Biobank* 2020; 18:165–170.
- 1833 11. Praxedes EA, Oliveira LRM, Silva MB, Borges AA, Santos MVO, Silva HVR, Pereira
- 1834 AF. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin–An alternative
- approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology* 2019;
  88:15–22.
- 1837 12. Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR. Vitrification: an
  1838 alternative for preserving embryos and genetic material mammalian females in
  1839 cryobanking, *Acta Vet Bras* 2011; 5:236–248.
- 1840 13. Raju R, Bryant SJ, Wilkinson BL, et al. The need for novel cryoprotectants and
  1841 cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and
  1842 cell permeability. *Biochim Biophys Acta* 2021; 1865:129749.
- 1843 14. Tanpradit N, Comizzoli P, Srisuwatanasagul S, et al. Positive impact of sucrose

- 1844 supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle
  1845 morphology, and DNA integrity. Theriogenology 2015; 83:1553–1561.
- 1846 15. Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF,
- 1847 Silva AR, Pereira AF. Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin
- 1848 tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreserv Biobank*

1849 2018; 16:77–81.

- 16. Yong KW, Laouar L, Elliott JAW, et al. Review of non-permeating cryoprotectants as
  supplements for vitrification of mammalian tissues. *Cryobiology* 2020; 96:1–10.
- 1852 17. Borges JCG, Freire, ACB, Attademo FLN, Serrano IL, Anzolin DG, Carvalho PSM,
- 1853 Vergara-Parente JE. growth pattern differences of captive born Antillean manatee
  1854 (*Trichechus manatus*) calves and those rescued in the Brazilian northeastern coast. J Zoo
- 1855 *Wildl Med* 2012; 43:494–500.
- 1856 18. Attademo FLN, Nascimento JLX, Sousa GP, et al. Occurrences of aquatic mammals in
  1857 the State of Pernambuco, Brazil. Arq Ciên Mar 2020; 53:33–51.
- 1858 19. MMA, Ordinance of the Ministry of the Environment, no. 443, 17 December 2014; 1–11.
- 1859 20. Luna FO, Balensiefer DC, Fragoso AB, Stephano A, Attademo FLN, *Trichechus manatus*
- 1860 Linnaeus, 1758. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.).
- 1861 Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II Mamíferos.
- 1862 Brasília: ICMBio. 2018; 103–109.
- 1863 21. Yajing S, Rajput IR, Ying H, Fei Y, Sanganyado E, Ping L, et al. Establishment and
- characterization of pygmy killer whale (*Feresa attenuata*) dermal fibroblast cell line. *Plos one* 2018; 13:195128.
- 1866 22. Rodrigues LLV, Borges AA, Nascimento MB, et al. Evaluation of different cryoprotectant
- solutions for cryopreservation of somatic tissues of *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758).
- 1868 *CryoLetters* 2021; 42: 210–219.

- 1869 23. Silva AP, Machado AS, Le Bas AE, Silva RG, Silva EA, Hernandez-Blazquez FJ. The
  1870 skin structures and their role in the thermoregulation of the South American fur seal
  1871 (*Arctocephalus australis*), *Anat Rec* 2020; 303:3155–3167.
- 1872 24. Wang J, Su W, Nie J, Wang J, Xiao D. Establishment and characterization of fibroblast
- 1873 cell lines from the skin of the Yangtze finless porpoise, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011;
  1874 47:618–630.
- 1875 25. Abazari A, Jomha NM, Elliott JA, McGann LE. Cryopreservation of articular cartilage.
  1876 *Cryobiology* 2013; 66:201–209.
- 1877 26. Burkard M, Whitworth D, Schirmer K, Nash SB. Establishment of the first humpback
- 1878 whale fibroblast cell lines and their application in chemical risk assessment. *Aquat Toxicol*1879 2015; 167:240–247.
- 1880 27. Yang JG, Deng Y, Zhou LX, Li XY, Sun PR, Sun NX (2013) Overexpression of
  1881 CDKN1B inhibits fibroblast proliferation in a rabbit model of experimental glaucoma
  1882 filtration surgery when CDKN1B inhibits fibroblast proliferation. *Invest Ophthalmol Vis*1883 *Sci* 2013; 54:343–352.
- 1884 28. Silvestre MA, Sánchez JP, Gómez EA. Vitrification of goat, sheep, and cattle skin
  1885 samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times
  1886 and temperatures. Theriogenology 2004; 49:221–229.
- 1887 29. Lu Y, Aguirre AA, Hamm C, Yu YW, Loh PC, Yanagihara R. Establishment,
  1888 cryopreservation, and growth of 11 cell lines prepared from a juvenile Hawaiian monk
  1889 seal, *Monachus schauinslandi*, *Methods Cell Biol* 2010; 22:115–124.
- 1890
- 1891
- 1892
- 1893

#### **1894 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

1895

O presente trabalho apresentou pela primeira vez os parâmetros histológicos e de 1896 cultivo in vitro com amostras somáticas derivadas da pele de peixe-boi marinho. O estudo é 1897 pioneiro na criopreservação de tecidos somáticos desta espécie, onde eles podem ser 1898 submetidos à congelação lenta, mantendo o potencial proliferativo tecidual quando 1899 1900 comparado a tecidos não criopreservados. As células obtidas de tecidos criopreservados por 1901 congelação lenta não apresentaram alteração na viabilidade e atividade proliferativa, contudo, apresentaram redução no metabolismo, níveis de apoptose alterados, bem como aumento nas 1902 espécies reativas de oxigênio e potencial de membrana mitocondrial, o que denota a 1903 1904 necessidade de ajuste nos protocolos, como por exemplo na concentração dos crioprotetores intracelulares, utilização de solução de equilíbrio antes da criopreservação. 1905

Além disso, foi também analisado se a vitrificação em superfície sólida, uma técnica 1906 alternativa com custo reduzido e facilidade de realização em campo, ao ser realizada com 1907 1908 diferentes combinações e concentrações de crioprotetores intracelulares, seria capaz de apresentar adequados resultados ao se comparar à congelação lenta. Quando comparado a 1909 1910 fragmentos não vitrificados, nenhum dos grupos criopreservados foi capaz de manter o número de fibroblastos, e somente aquele com a maior concentração dos crioprotetores 1911 manteve o potencial proliferativo tecidual. Ainda, mesmo com a redução da concentração e 1912 1913 associação dos crioprotetores intracelulares, nenhum dos fragmentos vitrificados foi capaz de 1914 produzir células in vitro. Esses resultados demonstram que mais estudos devem ser conduzidos visando a otimização dos protocolos de vitrificação em tecidos somáticos de 1915 1916 peixe-boi marinho, como por exemplo o emprego de outras substâncias crioprotetoras.

Finalmente, este estudo compreendeu o primeiro passo objetivando a formação de 1917 bancos de tecidos somáticos de peixe-boi marinho, visando o uso destas amostras para 1918 diferentes finalidades biotecnológicas no futuro, como a clonagem por TNCS, iPS, permitindo 1919 1920 salvaguardar uma amostragem genética de diferentes indivíduos. Essas amostras também podem ser utilizadas na realização de estudos ecotoxicológicos, buscando compreender a ação 1921 1922 de substâncias, toxinas e poluentes nestes animais. Ainda, futuros estudos podem ser direcionados no estabelecimento de linhagens celulares e a formação de bancos de células 1923 1924 somáticas, complementando o de tecidos, foco do presente trabalho.

1925 Esses criobancos surgem para potencializar as possibilidades de impedir a redução 1926 populacional, sendo mais uma ferramenta a ser empregada na conservação destes animais.

ANEXO A – CERTIFICADO DE REVISÃO PARA LÍNGUA INGLESA DO ARTIGO 01:
THE INITIAL STEPS TOWARDS THE FORMATION OF SOMATIC TISSUE BANKS
AND CELL CULTURES DERIVED FROM CAPTIVE ANTILLEAN MANATEE

1965 (*Trichechus manatus manatus*) SKIN BIOPSIES. EMPRESA: EDITAGE – 28/02/2022.



1966
## ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 01: THE INITIAL STEPS TOWARDS THE FORMATION OF SOMATIC TISSUE BANKS AND CELL CULTURES DERIVED FROM CAPTIVE ANTILLEAN MANATEE (*Trichechus manatus manatus*) SKIN BIOPSIES. PERIÓDICO: CRYOBIOLOGY – 02/03/2022.

### Confirm co-authorship of submission to Cryobiology

Cryobiology <em@editorialmanager.com> Qua, 02/03/2022 12:36 Para: Matheus Barbosa do Nascimento <matheus\_mbn@hotmail.com> \*This is an automated message.\*

Journal: Cryobiology

Title: The initial steps towards the formation of somatic tissue banks and cell cultures derived from captive Antillean manatee (Trichechus manatus manatus) skin biopsies

Corresponding Author: Dr Alexsandra Fernandes Pereira

Co-Authors: Matheus Barbosa do Nascimento, MSc.; Yasmin Beatriz França Moura; Radan Elvis Matias de Oliveira, MSc.; Gabriela Pereira de Oliveira Lira, MSc.; Alana Azevedo Borges, Ph.D; Fábia de Oliveira Luna, Ph.D; Fernanda Loffler Niemeyer Attademo, Ph.D

Manuscript Number:

Dear Nascimento,

Dr Alexsandra Fernandes Pereira submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

1972	
1973	
1974	
1975	
1976	
1977	
1978	
1979	
1980	
1981	
1982	
1983	
1984	
1985	

1986 ANEXO C – CERTIFICADO DE REVISÃO PARA LÍNGUA INGLESA DO ARTIGO 02:
1987 INFLUENCE OF INTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS ON THE CONSERVATION
1988 OF DERMAL SOMATIC TISSUES DERIVED FROM ANTILLEAN MANATEES

1989 (*Trichechus manatus manatus* LINNAEUS, 1758). EMPRESA: EDITAGE – 01/03/2022.



1990 1991

1991 .

1992

# ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 02: INFLUENCE OF INTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS ON THE CONSERVATION OF DERMAL SOMATIC TISSUES DERIVED FROM ANTILLEAN MANATEES (*Trichechus manatus manatus* LINNAEUS, 1758). PERIÓDICO: BIOPRESERVATION AND BIOBANKING –

1997 02/03/2022.

### Biopreservation and Biobanking - Manuscript ID BIO-2022-0044

Biopreservation and Biobanking <onbehalfof@manuscriptcentral.com> Qua, 02/03/2022 15:31

Para: ale\_lfcr@yahoo.com.br <ale\_lfcr@yahoo.com.br>; alexsandra.pereira@ufersa.edu.br <alexsandra.pereira@ufersa.edu.br>

Cc: matheus\_mbn@hotmail.com <matheus\_mbn@hotmail.com>; yasminbfm8718@gmail.com <yasminbfm8718@gmail.com>; radan\_elvis@hotmail.com <radan\_elvis@hotmail.com>; alanaazevedob@gmail.com <alanaazevedob@gmail.com>; moacir@ufersa.edu.br <moacir@ufersa.edu.br>; fabialunacma@gmail.com <fabialunacma@gmail.com>; niemeyerattademo@yahoo.com.br <niemeyerattademo@yahoo.com.br>; ale\_lfcr@yahoo.com.br <ale\_lfcr@yahoo.com.br>; alexsandra.pereira@ufersa.edu.br <alexsandra.pereira@ufersa.edu.br>

02-Mar-2022

Dear Prof. Pereira:

Your manuscript entitled "Influence of Intracellular Cryoprotectants on the Conservation of Dermal Somatic Tissues Derived from Antillean Manatees (Trichechus manatus manatus Linnaeus, 1758)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Biopreservation and Biobanking.

Your manuscript ID is BIO-2022-0044.

2013

### 2014 ANEXO E – COMPROVANTE DA AUTORIZAÇÃO DE ATIVIDADES COM 2015 FINALIDADE CIENTÍFICA EMITIDA PELO ICMBio NO SISTEMA SISBIO, 2016 REQUISITO PARA A COLHEITA DAS AMOSTRAS DOS ANIMAIS.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

 Número: 20685-5
 Data da Emissão: 27/10/2020 17:03:47
 Data da Revalidação\*: 12/10/2014

 De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

### Dados do titular

Nome: Fernanda Loffer Niemeyer Attademo	CPF: 073.122.037-44			
Título do Projeto: Estudo epidemiológico e de fatores de risco de doenças em peixe-boi marinho (Trichechus manatus) no Brasil				
Nome da Instituição: CENTRO DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS - CMA	CNPJ: 03.659.166/0044-42			

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita de amostras	09/2020	09/2025
2	Envio de amostras para laboratório	09/2020	09/2025
3	Análise laboratorial e interpretação das amostras	09/2020	09/2025

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Fabia De Oliveira Luna	Pesquisadora	012.615.617-40	Brasileira
2	Glaucia Pereira De Sousa	Médica Veterinária	805.705.851-04	Brasileira
3	Fabio Adonis Gouveia Carneiro Da Cunha	Coleta e analise de amostras	833.270.294-15	Brasileira
4	RADAN ELVIS MATIAS DE OLIVEIRA	Coleta e análise de amostras	076.974.554-71	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0206850520201027

2017

2018

2019

Página 1/5

### 2020 ANEXO F – COMPROVANTE DO PARECER TÉCNICO DO CEUA/UFERSA 2021 APROVANDO A REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA, REQUISITO PARA A 2022 COLHEITA DAS AMOSTRAS DOS ANIMAIS.



Certificamos que o projeto intitulado "Conservação de tecido somático de peixe-boi marinho, Trichechus manatus manatus (Linnaeus, 1758): Avaliação das técnicas de criopreservação e crioprotetores intracelulares" sob a responsabilidade de Alexsandra Fernandes Pereira, o qual envolve a produção, manutenção e/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 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião de 19/05/2020.

1	
Vigência do projeto 🧧	Julho de 2020 a dezembro de 2025
Espécie/linhagem	Trichechus manatus manatus
N. de Animais	6
Peso/idade	Filhotes ou juvenis
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro de Reabilitação da Fauna Marinha/Projeto Cetáceos da Costa
	Branca (Areia Branca, RN)

