



Bancos de recursos somáticos: Como eles contribuem para a conservação de grandes felídeos?

Somatic resource bank: How they contribute to the conservation of large felines?

Alexsandra Fernandes Pereira^{*}, Leonardo Vitorino Costa de Aquino, Erika Almeida Praxedes

Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

Resumo

Distintas estratégias de conservação têm sido adotadas visando a manutenção e recuperação da biodiversidade, especialmente de espécies que se encontram em diferentes níveis de ameaça à extinção. Neste grupo de espécies, encontram-se os grandes felídeos, os quais em virtude das ações antrópicas, como a destruição e a fragmentação de habitat, necessitam de esforços voltados para a conservação de seu material genético. Uma estratégia empregada para essa finalidade consiste nos bancos de recursos somáticos, os quais são definidos como a criopreservação de tecidos e células somáticas oriundas de diferentes populações. Essas amostras biológicas, quando adequadamente conservadas, são elementos-chave para a multiplicação das espécies por meio de seu emprego na clonagem por transferência nuclear e indução de células à pluripotência. Assim, o objetivo desta revisão é abordar os aspectos relevantes envolvidos na formação de bancos de recursos somáticos em grandes felídeos, destacando os estudos desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em onças-pintadas e onças-pardas.

Palavras-chave: biodiversidade, células somáticas, criopreservação, mamíferos silvestres

Abstract

Different conservation strategies have been adopted to maintain and recover biodiversity, especially for species that are at different levels of threat to extinction. In this group of species are the large felids, which, due to anthropic actions, such as habitat destruction and fragmentation, require efforts aimed at the conservation of their genetic material. A strategy employed for this purpose consists of somatic resource banks, which are defined as the cryopreservation of tissues and somatic cells from different populations. These biological samples, when properly preserved, are key elements for the multiplication of species through their use in cloning by nuclear transfer and induction of cells to pluripotency. Thus, the aim of this review is to address the relevant aspects involved in the formation of somatic resource banks in large felids, highlighting the studies carried out by the Laboratory of Animal Biotechnology (LBA) of the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA) in jaguars and pumas.

Keywords: biodiversity, somatic cells, cryopreservation, wild mammals

Introdução

Os grandes felídeos, representados pelo tigre (*Panthera tigris*), leão (*P. leo*), onça-pintada (*P. onca*), leopardo (*P. pardus*), leopardo das neves (*P. uncia*), leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), leopardo-nebuloso-de-bornéu (*N. diardi*), guepardo (*Acinonyx jubatus*), puma (*Puma concolor*), caracal (*Caracal caracal*), serval (*Leptailurus serval*) e todas as espécies de lince (*Lynx spp.*) (Davis et al., 2010; Turner; Anton, 1997), são felídeos importantes para a manutenção dos ecossistemas em que habitam. De acordo com a União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN, 2021), em virtude da fragmentação ou perda de habitat, associado a outras atividades humanas, populações destas espécies têm sido reduzidas, sendo esses indivíduos classificados desde níveis de ameaça até a risco de extinção.

Nesse sentido, estratégias de conservação voltadas para o conhecimento das espécies e sua multiplicação têm sido desenvolvidas (Thongphakdee et al., 2020). Dentre estas estratégias, incluem-se

¹Correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebido: 24 de agosto de 2021

Aceito: 27 de novembro de 2021



os bancos de recursos somáticos (Pereira *et al.*, 2019), os quais têm sido implementados em várias espécies (lince-ibérico – *L. pardinus*, León-Quinto *et al.*, 2009; onça-pintada – *P. onca*, Praxedes *et al.*, 2019, onça-parda – *P. concolor*, Lira *et al.*, 2021), visando a exploração do potencial de tecidos e células somáticas, especialmente para a clonagem por transferência nuclear de célula somática (Moulavi *et al.*, 2017) e indução de células à pluripotência (Verma *et al.*, 2013).

Contudo, para que os bancos de recursos somáticos atendam a essas finalidades, é interessante o estabelecimento adequado das condições de colheita das amostras biológicas, bem como a criopreservação e o cultivo *in vitro* das células. Tais condições podem variar desde a região coletada do animal (Santos *et al.*, 2021), tipo de técnicas de criopreservação tecidual empregada (Praxedes *et al.*, 2019), soluções de crioprotetores usadas (Oliveira *et al.*, 2021), suplementações dos meios (León-Quinto *et al.*, 2014), e tempo de cultivo (Silva *et al.*, 2021).

Portanto, sabendo da influência destas diferentes condições, nesta revisão, nós abordaremos os aspectos relevantes da formação destes bancos de recursos somáticos em grandes felídeos, especialmente em onça-pintada (*P. onca*) e onça-parda (*P. concolor*), apresentando alguns resultados alcançados pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Fonte e colheita de tecidos somáticos

Conceitualmente, bancos de recursos somáticos consistem na criopreservação de tecidos e células somáticas a -196 °C derivados de diferentes populações (Pereira *et al.*, 2018). Em geral, uma das principais vantagens destes bancos consiste na formação ocorrer a partir da colheita de animais independente do sexo, idade, e estágio reprodutivo (Praxedes *et al.*, 2018). Ainda, tecidos podem ser coletados tanto de animais vivos (Silva *et al.*, 2021), quanto de indivíduos post-mortem (Santos *et al.*, 2021).

A escolha da região do animal a ser coletada é primordialmente relacionada a uma área menos invasiva do animal (Praxedes *et al.*, 2018). Em grandes felídeos, diferentes regiões já foram usadas para a colheita de amostras somáticas (Tabela 1), desde músculo a regiões da pele do animal. Em 2021, Santos *et al.* avaliaram diferentes regiões da pele (caudal, femoral e auricular) de onça-pintada (*P. onca*) quanto à eficiência da criopreservação tecidual e verificaram que a pele caudal e auricular foram as mais adequadas para a conservação quando comparada à pele femoral. Adicionalmente, os autores reforçaram o procedimento menos invasivo da região auricular, a qual foi confirmada por outros autores (Praxedes *et al.*, 2019, 2020; Lira *et al.*, 2021).

Como a maioria dos estudos em grandes felídeos empregam a colheita em animais vivos, todos os procedimentos são realizados em indivíduos previamente anestesiados (Praxedes *et al.*, 2018). Em onças-pintadas (*P. onca*) e onças-pardas (*P. concolor*), cloridrato de dexmedetomidina tem sido o sedativo empregado (Praxedes *et al.*, 2018) para a colheita de fragmentos auriculares (1–2 cm²).

Após a colheita, todos os fragmentos são transportados ao laboratório a 4 °C por um período de até 8 h (Praxedes *et al.*, 2019). Em geral, o meio de transporte consiste em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 2% de solução de antibióticos-antimicóticos (Lira *et al.*, 2021). Contudo, estudos já foram desenvolvidos usando solução salina estéril acrescida de 1% de gentamicina (Santos *et al.*, 2021).

No laboratório, amostras são lavadas em solução com composição similar à do meio de transporte, fragmentadas (9,0 mm³) e destinadas à criopreservação para formação de bancos de tecidos ou cultivo *in vitro* para a formação de bancos de células.

Aspectos técnicos da conservação de tecidos e células somáticas

O sucesso dos bancos de tecidos e células somáticas depende do estabelecimento adequado das condições de criopreservação e cultivo *in vitro*. Em diferentes espécies de grandes felídeos, estudos relacionados à determinação da técnica de criopreservação (Praxedes *et al.*, 2019), solução de crioprotetores (Oliveira *et al.*, 2021), isolamento e caracterização de linhagens celulares (Lira *et al.*, 2021), meios de cultivo *in vitro* (León-Quinto *et al.*, 2014) e tempo de cultivo (Lira *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021) têm sido desenvolvidos buscando garantir a formação adequada destes bancos.

Técnicas de criopreservação

A formação de bancos de tecidos somáticos pode ser realizada por duas técnicas, a congelação lenta (Mestre-Citrinovit *et al.*, 2016) e a vitrificação (Praxedes *et al.*, 2019). Em um estudo realizado em.



Tabela 1. Fontes de tecidos somáticos em grandes felídeos.

Espécie	Classificação IUCN*	Fonte	Objetivo do estudo	Autores
<i>Panthera tigris</i>	Ameaçado de extinção	Pele auricular	Indução da pluripotência	Verma et al. (2013)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçada	Pele auricular	Indução da pluripotência	Verma et al. (2013)
<i>Lynx pardinus</i>	Ameaçado de extinção	Pele fetal	Criopreservação celular	León-Quinto et al. (2014)
<i>Acinonyx jubatus</i>	Vulnerável	Pele auricular	TNCS	Moro et al. (2015)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçada	Pele, cartilagem, músculo	Cultivo <i>in vitro</i> de células	Mestre-Citrinovitz et al. (2016)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçada	Pele	Criopreservação celular	Arantes et al. (2021)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçada	Pele femoral, caudal, auricular	Criopreservação tecidual	Santos et al. (2021)
<i>Panthera onca</i>	Quase ameaçada	Pele auricular	Estabelecimento de linhagens celulares	Silva et al. (2021)
<i>Puma concolor</i>	Quase ameaçada	Pele auricular	Criopreservação tecidual	Lira et al. (2021)

*IUCN: União Internacional para Conservação da Natureza (2021).



onças-pintadas (*P. onca*), nós demonstramos os efeitos positivos da vitrificação quando comparada à congelamento lento na conservação de tecidos auriculares (Praxedes *et al.*, 2019). Neste estudo, duas técnicas de vitrificação foram também comparadas [vitrificação direta em criotubos (VDC) e vitrificação em superfície sólida (VSS)], sendo evidenciada a VSS como técnica mais adequada para a conservação das características morfológicas e de proliferação celular. Adicionalmente, nós destacamos as vantagens da VSS quando comparada à congelamento lento, sendo a primeira uma técnica mais exequível, de menor custos e podendo ser realizada mais rapidamente a campo. Ainda, em onça-parda (*P. concolor*), a VSS apresentou ser eficiente na conservação do tecido auricular nesta espécie (Lira *et al.*, 2021).

Já na formação de bancos de células somáticas, a congelamento lento tem sido a metodologia de escolha (Praxedes *et al.*, 2018). Estudos realizados tanto em onça-pintada (*P. onca*, Arantes *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021), quando onça-parda (*P. concolor*, dados não publicados) demonstraram que células destas espécies foram eficientemente criopreservadas, mantendo os padrões de viabilidade, morfologia e proliferação após a descongelamento.

Soluções de criopreservação

A proteção de tecidos e células contra injúrias durante a criopreservação é fornecida em função da composição dos crioprotetores. Em grandes felídeos, o dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido o crioprotetor intracelular de escolha, acrescido de 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Praxedes *et al.*, 2019). Em geral, a concentração de DMSO pode variar na criopreservação de células somáticas de grandes felídeos. Silva *et al.* (2021) relataram a obtenção de 73,2% de taxa de viabilidade de fibroblastos de onça-pintada (*P. onca*) ao utilizar 10% DMSO em solução crioprotetora, demonstrando a eficiência desse composto. Ao avaliar diferentes concentrações de DMSO (2,5% e 10%) na criopreservação de fibroblastos de onça-pintada, Arantes *et al.* (2021) relataram não observar diferenças na viabilidade das células após a descongelamento, obtendo taxas que variaram de 82,2–98% de células viáveis. Nesse sentido, ambos os trabalhos corroboram estudos anteriores em fibroblastos de grandes felídeos, os quais demonstraram a obtenção de boas taxas de viabilidade celular após a descongelamento ao utilizar 10% DMSO como crioprotetor, os quais obtiveram taxas acima de 80% de viabilidade (León-Quinto *et al.*, 2011; Mestre-Citrinovitz *et al.*, 2016).

Um outro crioprotetor intracelular utilizado na criopreservação é o etilenoglicol (EG). Especificamente quanto à utilização em grandes felídeos, 10% de EG foi avaliado como crioprotetor na criopreservação de células somáticas de onça-pintada (*P. onca*) na presença ou ausência de sacarose, onde foi observado que, quando utilizado isoladamente, resultou em uma menor taxa de viabilidade celular (45,8%), quando comparado ao grupo acrescido de sacarose (52,4%, Oliveira *et al.*, 2021).

Já os crioprotetores extracelulares são compostos permeáveis utilizados em combinação com crioprotetores intracelulares e são divididos em grupos: dissacarídeos (como, a sacarose) e proteínas (SFB). Com relação à sacarose, diversos estudos apontam a eficiência da sacarose em associação com crioprotetores intracelulares para a criopreservação de células em grandes felídeos, como demonstraram León-Quinto *et al.* (2011), onde foi observado que a combinação de 10% de DMSO associado à 0,1 M ou 0,2 M de sacarose, em ambas as concentrações, foi mais eficiente na criopreservação quando comparado à ausência de sacarose.

Quanto ao SFB, este atua aumentando a viscosidade da solução de criopreservação. Diversos estudos em grandes felídeos abordam com sucesso a criopreservação de células utilizando o SFB, em diferentes concentrações, como um crioprotetor extracelular. Song *et al.* (2007) utilizaram 10% de DMSO em combinação com 40% de SFB, obtendo 95% de viabilidade em células de tigre-siberiano (*P. tigris altaica*). Posteriormente, Liu *et al.* (2010) utilizaram 50% de SFB em associação com 10% de DMSO para criopreservar células de tigre-siberiano e relataram que as células apresentaram uma viabilidade superior a 90% após a congelamento. Já Verma *et al.* (2012), ao utilizar 10% DMSO e 90% SFB obtiveram 80% de taxa de sobrevivência em células de leopardo-das-neves. De acordo com Moulavi *et al.* (2017), 50% de SFB, quando utilizado em associação com 10% DMSO na criopreservação de células de chita-asiática (*Acinonyx jubatus venaticus*), foi eficiente na manutenção dessas células, das quais 85% foram viáveis.

Meios e tempo de cultivo in vitro

A composição do meio utilizada para cultivo de células somáticas de grandes felídeos em geral apresenta DMEM, SFB e solução de antibióticos-antimicóticos (Lira *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Essa



composição tem assegurado o crescimento e qualidade celular, reduzindo chances de contaminação. Além disso, as condições de temperatura e oxigenação também são consideradas, onde em grandes felídeos o cultivo ocorre em 38,5 °C e 5% de CO₂ (Praxedes *et al.*, 2019).

Durante o cultivo *in vitro*, o número de passagens celulares pode influenciar na qualidade celular (Praxedes *et al.*, 2018). Silva *et al.* (2021) avaliaram parâmetros de normalidade em fibroblastos de onça-pintada (*P. onca*) na primeira, terceira e décima passagem. Nesse estudo, foi reportado uma boa qualidade da viabilidade e metabolismo celular independentemente do número de passagens.

Resultados das aplicações de tecidos e células somáticas

O primeiro relato de sucesso da utilização de células somáticas visando a multiplicação de felídeos silvestres foi reportado por Gómez *et al.* (2004) obtendo o nascimento de crias por clonagem por transferência nuclear de célula somática interespecífica (iTNCs) utilizando células somáticas do gato-dalíbia (*Felis lybica*) e oócitos do gato doméstico. Posteriormente, a produção *in vitro* de embriões por iTNCs em grandes felídeos foi reportado por outros grupos, utilizando fibroblastos isoladas de animais *post-mortem* tanto em leão (*P. leo*), leopardo (*P. pardus*) e tigre (*P. tigris*) (Yelisseti *et al.*, 2016), bem como em *chita-asiática* (*A. jubatus venaticus*) (Moulavi *et al.*, 2017), expandindo ainda mais o potencial de aplicação que as células possuem quanto ao resgate de espécies em níveis críticos de extinção.

Além da clonagem, a geração de células de pluripotência induzida (iPSCs) é uma outra aplicação para células somáticas, e tem sido buscada diante de seu grande potencial, sendo possível a utilização de tais células tanto como doadoras de núcleo para TNCS quanto para diferenciação direta em gametas (Verma *et al.*, 2012). Verma *et al.* (2012) reportaram pela primeira vez a geração de iPSCs em leopardo-das-neves (*P. uncia*) utilizando os fatores de reprogramação (OCT4, SOX2, KLF4, cMYC e NANOG). Posteriormente, os mesmos autores em 2013 comprovaram a essencialidade do fator de reprogramação NANOG em outras espécies de felídeos (*P. tigris*, *Leptailurus serval* e *P. onca*) (Verma *et al.*, 2013). Adicionalmente, Sukparangsi *et al.* (2018) reportaram a geração de iPSCs em leopardo nebuloso (*N. nebulosa*) utilizando dois vetores não integrativos, o vetor episomal e o piggyBAC transposon, representando um grande avanço que poderá servir para geração de iPSC em outras espécies de felídeos ameaçados.

Considerações finais

Os bancos de tecidos e células somáticas representam alternativas valiosas empregadas na conservação de grandes felídeos. Na formação destes bancos, a pele auricular tem sido a região de escolha para obtenção de tecidos somáticos a serem submetidos à criopreservação e cultivo *in vitro*. Embora a congelamento lenta seja a técnica empregada para a criopreservação de células somáticas em grandes felídeos, a vitrificação tem sido a técnica mais eficiente na conservação de tecidos somáticos destas espécies, sendo a vitrificação em superfície sólida um método promissor. Para todas as técnicas de criopreservação, DMSO, sacarose e SFB tem sido a combinação de crioprotetores mais adequada para a conservação celular. Quanto ao cultivo *in vitro*, células somáticas são mantidas em meio de cultivo acrescido de SFB e antibióticos, sem ocorrer alterações no metabolismo e viabilidade celular. Mais estudos são necessários para identificar todas as características destas células *in vitro* em avaliações mais específicas de qualidade celular, bem como a definição de protocolos mais eficientes para a clonagem por TNCS e produção de iPSCs em grandes felídeos.

Referências

- Arantes LG, Tonelli GS, Martins CF, Bão SN.** Cellular characterization and effects of cryoprotectant solutions on the viability of fibroblasts from three Brazilian wild cats. *Biopreserv Biobank*, v.19, p.11-18, 2021.
- Davis BW, Li G, Murphy WJ.** Supermatrix and species tree methods resolve phylogenetic relationships within the big cats, *Panthera* (Carnivora: Felidae). *Mol. Phylogenetics Evol*, v.56, p.64-76, 2010.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL.** Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)** Red List of



- Threatened Species. Disponível em < <http://www.iucnredlist.org/details/15953/0> > Acesso em: 01 de agosto de 2021.
- León-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Martínez-Hernandez FJ, Moreno JM, Soria B.** Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.347-361, 2009.
- León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Martínez A, Serna A.** Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, v.68, p.227-233, 2014.
- León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Martínez A, Serna A.** Different cryopreservation requirements in fetal versus adult skin cells from endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, v.68, p.227-233, 2014.
- Lira GPO, Borges AA, Nascimento MB, Aquino LVC, Moura LFMP, Silva HVR, Ribeiro, LR, Oliveira MF, Pereira AF.** Effects of somatic tissue cryopreservation on puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) tissue integrity and cell preservation after *in vitro* culture. *Cryobiology*, v. 101, p. 52-60, 2021.
- Liu C, Guo Y, Liu D, Guan W, Ma Y.** Establishment and characterization of fibroblast cell line derived from Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Biopreserv Biobank*, v. 8, p. 99-105, 2010.
- Mestre-Citrinovitz AC, Sestelo AJ, Ceballos MB, Baraño JL, Saragueta P.** Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: The *Panthera onca* case to preserve a South American. *Curr Protoc Mol Biol*, v.116, p.28.7.1-28.7.14, 2016.
- Moro LN, Hiriart MI, Buemo C, Jarazo J, Sestelo A, Veraguas D, Rodriguez-Alvarez L, Salamone DF.** Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. *Reproduction*, v.150, p.1-10, 2015.
- Moulavi F, Hosseini SM, Tanhaie-Vash N, Ostadhosseini S, Hosseini SH, Hajinasrollah M, Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD, Nasr-Esfahani MH.** Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-mortem frozen tissue in absence of cryoprotectant and *in vitro* matured domestic cat oocytes. *Theriogenology*, v.90, p.197-203, 2017.
- Oliveira LRM, Praxedes ÉA, Silva MB, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF.** Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *An Acad Bras Ciênc*, v.93, p.e20190314, 2021.
- Pereira AF, Borges AA, Praxedes ÉA, Silva AR.** Use of somatic banks for cloning by nuclear transfer in the conservation of wild mammals a review. *Rev Bras Reprod Animal*, v.42, p.104-108, 2018.
- Pereira AF, Borges AA, Santos MVO, Lira GPO.** Use of cloning by nuclear transfer in the conservation and multiplication of wild mammals. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, p.242-247, 2019.
- Praxedes ÉA, Borges AA, Santos MVO, Pereira AF.** Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biol*, v.37, p.258-263, 2018.
- Praxedes ÉA, Oliveira LRM, Silva MB, Borges AA, Santos, MVO, Silva, HVR, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Effects of cryopreservation 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 ÉA, Queiroz Neta LB, Borges AA, Silva MB, Santos MVO, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF.** Quantitative and descriptive histological aspects of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) ear skin as a step towards formation of biobanks. *Anat Histol Embryol*, v.49, p.121-129, 2020.
- Santos MDCB, Aquino LVC, Nascimento MB, Silva MB, Rodrigues LLV, Praxedes ÉA, Oliveira LRM, Silva HVR, Nunes TGP, Oliveira MF, Pereira AF.** Evaluation of different skin regions derived from a post-mortem jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), after vitrification for development of cryobanks from captive animals. *Zoo Biol*, v.40, p.280-287, 2021.
- Silva MB, Praxedes ÉA, Borges AA, Oliveira LR, Nascimento MB, Silva HV, Silva AR, Pereira AF.** Evaluation of the damage caused by *in vitro* culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. *Zoo Biol*, v.40, p.288-296, 2021.
- Song J, Hua S, Song K, Zhang Y.** Culture, characteristics and chromosome complement of Siberian tiger fibroblasts for nuclear transfer. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, v.43, p.203-209, 2007.
- Sukparangsi W, Bootsri R, Sikeao W, Karoon S, Thongphakdee A.** Establishment of induced pluripotent stem cells from Fishing Cat and Clouded Leopard using integration-free method for wildlife conservation. *Reprod Fertil Dev*, v.30, p.230-230, 2018.
- Thongphakdee A, Sukparangsi W, Comizzoli P, Chatdarong K.** Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology*, v.150, v.360-373, 2020.
- Turner A, Anton M.** The big cats and their fossil relatives illustrated ed. [S.l.]: Columbia University



Press. pp.79-81, 1997.

Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology*, v.77, p.220-228, 2012.

Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *BioResearch*, v.2, p.72-76, 2013.

Yelisetti UM, Komjeti S, Katari VC, Sisinthy S, Brahmasani SR. Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected *post mortem* as donor cells and rabbit oocytes as recipients. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.52, p.632-645, 2016.
