

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PEIXE-BOI-DAS-ANTILHAS (*Trichechus manatus manatus*) COMO FERRAMENTA PARA A CONSERVAÇÃO *EX SITU*

RODRIGUES, Luanna Lorennia Vieira¹; AQUINO, Leonardo Vitorino Costa de²; ASSUNÇÃO, Pedro Rafael Ribeiro³; SILVA, Yara Letícia Frutuoso e⁴; SANTOS, Maria Valéria de Oliveira⁵; ATTADEMO, Fernanda Loffler Niemeyer⁶; PEREIRA, Alessandra Fernandes^{7*}

¹Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA); ²Pós-doutorando (CNPq), UFERSA; ³Graduando em Biotecnologia, UFERSA; ⁴Mestranda em Ciência Animal, UFERSA; ⁵Pós-doutoranda (CNPq), UFERSA; ⁶Docente visitante do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), UFERSA; ⁷Docente do PPGCA e coordenadora do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), UFERSA
*alexandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

O peixe-boi das Antilhas, espécie ameaçada de extinção, demanda estratégias integradas e eficazes de conservação. Este estudo objetivou caracterizar linhagens celulares em passagens iniciais (2ª e 4ª passagem) a partir de biópsias de pele de indivíduos sob cuidados humanos. As células apresentaram alta viabilidade, atividade metabólica estável e capacidade proliferativa consistente ao longo das passagens analisadas, sem diferenças significativas. Esses resultados evidenciam a robustez do cultivo celular como ferramenta para a formação de biobancos e aplicações biotecnológicas, contribuindo diretamente para o fortalecimento das estratégias de conservação *ex situ* da espécie.

Palavras-chave: Biobancos. Células somáticas. Cultivo celular. Mamíferos aquáticos.

Introdução

O peixe-boi das Antilhas desempenha um papel ecológico fundamental, atuando na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Garcés-Cuartas et al., 2025). Contudo, a espécie foi reclassificada globalmente como em perigo de extinção (Morales-Vela et al., 2024) e, especificamente no Brasil, como criticamente ameaçada (Attademo et al., 2025). Esse acentuado declínio populacional está associado tanto às baixas taxas reprodutivas intrínsecas à espécie quanto à intensificação de pressões antropogênicas.

Nesse sentido, estratégias de conservação que integrem metodologias *in situ* e *ex situ* são essenciais para garantir a manutenção da espécie. A coleta de amostras de pele de animais se destaca, pois permite a obtenção de células somáticas *in vitro* (Nascimento et al., 2023). Isto permite o estabelecimento de linhagens celulares, as quais podem ser empregadas em biotecnologias, como a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), fundamentais para medicina regenerativa, reprodutiva e terapêutica (Jun et al., 2019). Ainda, essas amostras são valiosas para a formação de biobancos de recursos somáticos, contribuindo para a conservação da espécie a longo prazo.

Objetivos

Caracterizar linhagens celulares em passagens iniciais a partir do cultivo da derme de peixe-boi das Antilhas visando contribuir com a conservação *ex situ* da espécie.

Metodologia

O experimento foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (no. 23091.010755/2019-32) e SISBIO (no. 71804-1). Os animais utilizados estavam alocados na Base Avançada do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Aquáticos pelo Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (CMA/ICMBio). As amostras foram coletadas de sete indivíduos vivos durante o manejo. Para tanto, os animais foram contidos, a região abdominal lateral foi desinfetada com um agente antisséptico tópico e foram coletadas biópsias de pele utilizando um *punch* dermatológico. As biópsias foram limpas e transportadas para o laboratório a 4 °C. No laboratório, foram processadas, fragmentadas e destinadas ao cultivo em Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco: mistura de nutrientes F-12 com 20% soro fetal bovino (SFB) e 2% antibiótico-antimicótico (suspensão de penicilina-estreptomicina-anfotericina B) a 38,5 °C e 6,5% CO₂. Ao atingir confluência ao redor dos explantes, estes foram removidos e as células foram avaliadas na segunda passagem (2P) e quarta passagem (4P) quanto à viabilidade, metabolismo e atividade proliferativa.

Para a avaliação da viabilidade, células foram coradas com o corante azul de tripan (0,4%) e contadas usando câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi calculada dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células contadas × 100. Para a avaliação do metabolismo, uma concentração celular foi distribuída em placa. Após 5 dias, a solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ensaio de MTT) foi adicionada a cada poço e incubado. Então, a solução foi removida e dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado sob agitação para solubilizar os cristais de formazan. As soluções formadas foram analisadas em espectrofotômetro. Para a avaliação da atividade proliferativa pelo tempo de duplicação da população (PDT), uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL foi distribuída em placa e contada a cada 24 h usando câmara de Neubauer por 216 h. O PDT foi estimado de acordo com a equação $PDT = T \ln 2 / \ln (X_e/X_b)$, onde PDT é o tempo de cultivo (h), T é o tempo de incubação, X_b é o número de células no início da incubação, X_e é o número de células no final da incubação e ln é o logaritmo neperiano.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e analisados utilizando o GraphPad Prism versão 7.0. Todos os resultados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Tukey. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Quanto à viabilidade, foram observadas taxas consistentemente altas, com valores de $87,3 \pm 4,1\%$ (2P) e $84,4 \pm 3,3\%$ (4P), que não apresentaram diferença estatística entre si ($P > 0,05$), indicando que houve a manutenção da integridade estrutural celular mesmo após o aumento do número de passagens. Taxas de viabilidade semelhantes já foram observadas em células primárias derivadas da pele de peixe-boi das Antilhas (Nascimento et al., 2023), demonstrando que o aumento do tempo de cultivo e do número de passagens não causa efeitos significativos na membrana celular. Do mesmo modo, quanto ao metabolismo, o ensaio de MTT não revelou diferenças entre as passagens ($P > 0,05$), com taxas de $94,2 \pm 2,2\%$ (2P) e $78,3 \pm 10,7\%$ (4P). Esses achados indicam que as células mantiveram a função metabólica estável ao longo do período de cultivo, sugerindo a ausência de alterações ao longo das passagens. Esses achados corroboram com o observado em células primárias de peixe-boi (Nascimento et al., 2023).

Quanto ao PDT, este permaneceu estatisticamente consistente ao longo das passagens analisadas ($P > 0,05$), com valores de $21,1 \pm 1,5$ h (2P) e $42,0 \pm 11,2$ h (4P). Esses resultados indicam que o aumento no número de passagens não afetou a capacidade proliferativa celular. Esses valores foram inferiores aos observados em células derivadas da pele de outros mamíferos

aquáticos como baleia-jubarte (41 h, Burkard et al. 2015) e peixe-boi amazônico (63,7 h, *Trichechus inunguis*) (Tavares et al. 2024), demonstrando que as células de peixe-boi das Antilhas requerem menos tempo para se proliferar em condições *in vitro*.

Conclusão

Os resultados demonstram que as linhagens celulares de peixe-boi das Antilhas apresentam estabilidade estrutural, metabólica e proliferativa nas passagens iniciais, evidenciando sua adequação como modelo *in vitro* e reforçando seu potencial para aplicações biotecnológicas. Ainda, destaca-se a eficiência do princípio de conservação única, que alinha estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*. Portanto, este estudo contribui para o fortalecimento de estratégias de conservação, ampliando as ferramentas disponíveis para a preservação da espécie.

Referências

ATTADEMO, F.L.N. *et al.* *Trichechus manatus*. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade (SALVE) - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 2025.

BURKARD, M. *et al.* Establishment of the first humpback whale fibroblast cell lines and their application in chemical risk assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 240–247, 2015.

GARCÉS-CUARTAS, N. *et al.* Stable isotope analysis in bone collagen reveals new insights into the feeding ecology of free-ranging manatees in the Mexican Caribbean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 758, p. 179–194, 2025.

MORALES-VELA, B. *et al.* *Trichechus manatus ssp. manatus*: The IUCN Red List of Threatened Species. **IUCN**, 2024.

JUN, S. *et al.* Single cell-derived clonally expanded mesenchymal progenitor cells from somatic cell nuclear transfer-derived pluripotent stem cells ameliorate the endometrial function in the uterus of a murine model with Asherman's syndrome. **Cell Proliferation**, v. 52, p. e12597, 2019.

NASCIMENTO, M.B. *et al.* The initial steps toward the formation of somatic tissue banks and cell cultures derived from captive Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) skin biopsies. **Zoo Biology**, v. 42, p. 709–722, 2023.

TAVARES, F.S. *et al.* Establishment and characterization of a primary fibroblast cell culture from the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*). **Animals**, v. 14, p. 686, 2024.