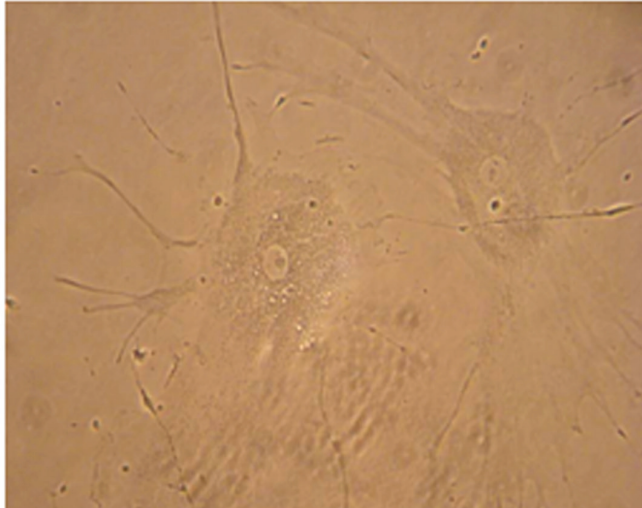


Isolamento, Cultivo e Criopreservação de Células Somáticas de Mamíferos Silvestres para Formação de um Banco de Germoplasma

Carlos Frederico Martins¹
Heidi Christina Bessler Cumpa²
Elisa Ribeiro da Cunha³
Carolina Gonzales da Silva⁴
Luciana Almeida Borges⁵
José Berlamino da Gama Filho⁶

Foto: Carlos Frederico Martins



Introdução

A diversidade biológica é a chave para a manutenção da vida como nós a conhecemos e não há dúvida de que a destruição do habitat é o principal fator responsável pela redução na biodiversidade ou no número total de espécies que coexistem no planeta (LOSKUTOFF, 1998).

Material genético de animais silvestres pode ser perdido a qualquer momento por morte animal, representando uma redução em seu patrimônio genético (pool gênico) e possivelmente uma perda de genes importantes para a espécie. Nesse caso, esforços podem ser realizados por meio da utilização das técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total desse material genético de importância (MARTINS et al., 2007).

Bancos de recursos genéticos são repositores de germoplasma (gametas, embriões, produtos

sanguíneos, tecidos e DNA) para programas de conservação definidos (WILDT, 1997), os quais são ligados diretamente com as biotecnologias para a execução do objetivo final, que é a reprodução animal.

Uma possibilidade para preservar o germoplasma de animais silvestres mortos é o isolamento, cultivo e criopreservação de fibroblastos ou células do tecido adiposo (adipócitos). Essas células podem servir para caracterizações moleculares e também para multiplicação animal pela técnica de transferência de núcleos (clonagem).

Este documento tem por objetivo apresentar o procedimento prático de recuperação e criopreservação de células somáticas (fibroblastos de pele e adipócitos) de mamíferos silvestres, visando à formação de um banco de germoplasma, quando os animais são encontrados mortos.

¹ Médico-veterinário, D.Sc. em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Cerrados, carlos.martins@embrapa.br

² Bióloga, M.Sc. em Biologia Molecular, analista da Embrapa Cerrados, heidi.cumpa@embrapa.br

³ Médica-veterinária, M.Sc. em Biologia Animal, técnica da Emater-DF, SAIN – Parque Estação Biológica, Ed. Sede Emater, CEP 70770-915, Caixa Postal 8735, ercunha@gmail.com

⁴ Médica-veterinária, doutoranda em Biologia Animal pela Universidade de Brasília, bolsista da Embrapa Cerrados, carolgonzaless@gmail.com

⁵ Médica-veterinária, pesquisadora do Jardim Zoológico de Brasília, Avenida das Nações Via L4, Km 9, lucianaborjes.veterinaria@gmail.com

⁶ Médico-veterinário, Dr. Em Ciência Animal, diretor-presidente do Jardim Zoológico de Brasília, belar@turbo.com.br

Coleta e Transporte de Biópsias de Pele

Procedimentos

- Avaliar a condição da morte do animal, devendo-se evitar o aproveitamento de animais com causa da morte por doenças infecto-contagiosas. É importante que o animal ainda não esteja em processo de decomposição (Figura 1).
- Antes de retirar a biópsia, lavar bem a área da pele do animal com escova, água, sabão e álcool 170%.
- Fazer tricotomia na área para retirar os pelos.
- Remover uma amostra de pele da orelha, da base da cauda ou do abdômen. Cortar a amostra utilizando uma lâmina de bisturi estéril. Pode-se também retirar uma amostra do tecido adiposo subcutâneo para isolamento celular.
- Lavar a amostra com álcool 70% e com solução PBS ou salina 0,9% para retirada do excesso de sangue.
- Transferir as amostras para tubos cônicos de 15 mL ou 50 mL, contendo solução de PBS ou solução salina 0,9%.
- Transportar em condição estéril em caixa térmica com gelo e água.
- Para viagens de longa distância (acima de 8 horas), colocar a amostra em tubos de 15 mL com solução salina 0,9% e transportar dentro de uma garrafa térmica com água e gelo.



Foto: Carlos Frederico Martins

Figura 1. Cachorro do mato (*Cercopithecus thous*) coletado no Jardim Zoológico de Brasília para isolamento de células viáveis para compor o banco de germoplasma.

Processamento da Biópsia de Pele ou Tecido Adiposo no Laboratório

Procedimentos

- Depositar as biópsias em placas de petri de 100 mm de diâmetro e lavá-las com PBS adicionado de antibióticos à temperatura ambiente. Realizar 3 a 5 banhos nas biópsias.
- Separar área de cartilagem do tecido da pele utilizando pinça, bisturi e tesoura. Também remover pelos e excesso de tecidos.
- Cortar a pele ou tecido adiposo em pequenos quadrados com dimensões de 1 mm a 2 mm e lavá-las em PBS.
- Depositar 5 a 6 fragmentos de pele ou tecido adiposo no fundo da placa de petri estéril de 35 mm de diâmetro. No caso de biópsias de pele, colocá-las com a camada externa voltada para cima. Pressionar as biópsias contra a placa para que fiquem aderidas no fundo da placa. Aguardar 60 segundos para que as biópsias possam se aderir no fundo da placa de petri.
- Adicionar lentamente sobre a biópsia cerca de 300 μ L de meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para as amostras não se soltarem. Em seguida, adicionar meio DMEM até cobrir todas as biópsias.
- Manter as biópsias sob condição de cultivo em estufas de gás carbônico (tensão de 5% CO₂, temperatura de 39 °C e umidade saturada).
- Após 24 horas de cultivo, adicionar meio de cultivo DMEM, de forma que toda a superfície da base da placa e as biópsias sejam cobertas pelo meio.
- Após 2 dias de cultivo, fazer uma avaliação nas biópsias. Caso alguma biópsia tenha descolado, é necessário retirá-la e descartá-la.
- Após uma semana de cultivo, todas as biópsias deverão ser retiradas e descartadas. Trocar metade do meio antigo por meio novo e manter o cultivo celular por mais uma semana. A partir desse momento, as células devem ser cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm².
- Monitorar o crescimento celular a cada 2-3 dias (Figura 2a) e acompanhar o acontecimento do estado de confluência celular (80% aproximadamente) (Figura 2b). Quando as células alcançarem este estado, será o momento de repicagem para aumentar a quantidade de células ou congelá-las para formação do criobanco celular.

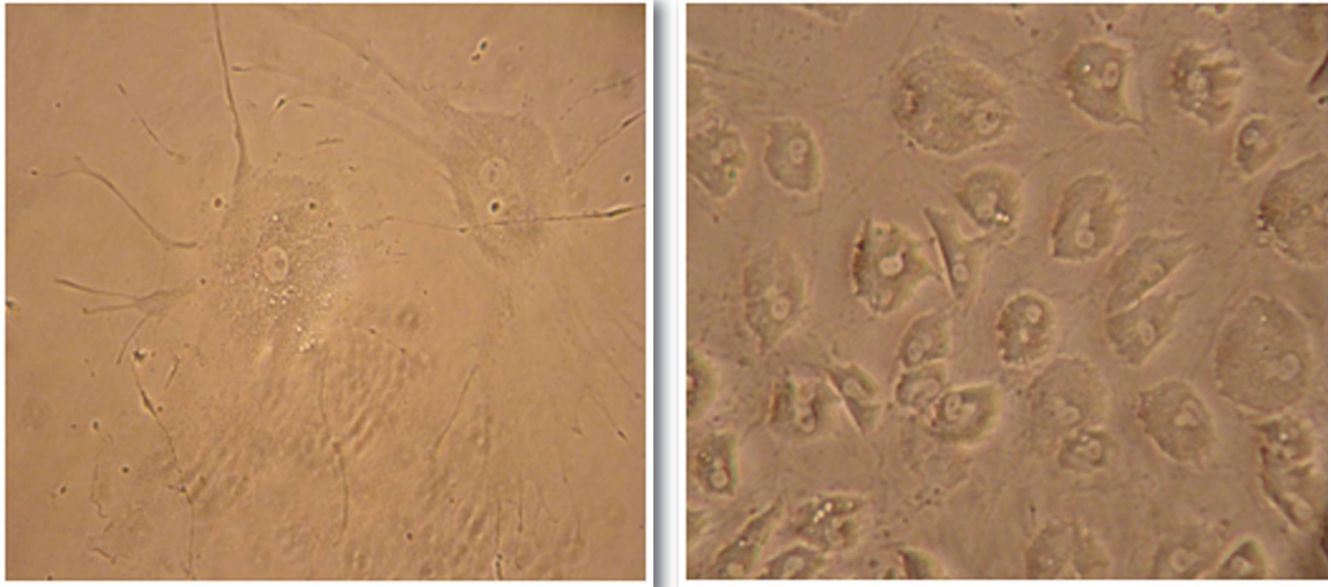


Figura 2. Fibroblastos isolados de Cachorro do mato (a) e fibroblastos de Lobo Guará iniciando o estado de confluência celular (b).

Repicagem dos Fibroblastos de Pele ou Adipócitos

Procedimentos

- Retirar e descartar todo o meio de cultivo da placa de petri.
- Adicionar 1 mL de meio Tripsina e EDTA sem soro fetal. Movimentar a placa ou frasco manualmente para espalhar o meio adicionado e em seguida descartá-lo.
- Adicionar mais 2 mL de solução de Tripsina e EDTA à garrafa e manter por 5-10 minutos em estufa de gás carbônico à 39°C. Após esse período, verificar a dissociação das células. Caso não ocorra, manter por mais 5 minutos.
- Adicionar 2 mL de DMEM à garrafa para neutralizar a ação da tripsina.
- Transferir todo o conteúdo da placa (meio com células em suspensão) para tubos de 1,5 mL.
- Centrifugar os tubos por 5 minutos a 200 x g.
- Retirar o sobrenadante do tubo e diluir o *pellet* celular com 1 mL de meio DMEM.
- Transferir todo o conteúdo para frascos de cultivo de 25 cm².
- Adicionar 3 mL de DMEM em cada frasco e colocá-los imediatamente na estufa de cultivo.
- Quando as células estiverem subconfluentes, deve ser feita uma nova repicagem.

- Após 3 dias, uma troca de meio deve ser feita, retirando-se 2 mL de meio de cada frasco e substituindo por 2 mL de meio novo.
- Após 3-4 passagens, serão obtidas células fibroblásticas ou adipócitas sem contaminação com outro tipo celular na cultura.

Criopreservação dos Fibroblastos e Adipócitos

Procedimentos

- Após descolar as células do fundo da placa durante o procedimento de repicagem, uma parte das células deve ser centrifugada a 200 x g. O sobrenadante deve ser descartado e o *pellet* celular reconstituído com 1 mL de meio de congelamento (DMEM suplementado com 10% de DMSO).
- Ajustar a concentração de células e transferir o conteúdo para palhetas e colocá-las dentro de um frasco e manter fechado.
- Levar este frasco para um congelador à temperatura de -80 °C ou -20 °C e manter por 24 horas.
- Após esse período, transferir as palhetas para botijão com nitrogênio líquido.

Descongelamento das Amostras

Procedimentos

- Usar água aquecida com temperatura entre 37 °C e 38 °C.
- Retirar a palheta do nitrogênio líquido e manter por 30 segundos na água aquecida.

- Transferir o conteúdo da palheta para tubo de 1,5 mL contendo 1 mL de DMEM.
- Homogeneizar.
- Centrifugar por 5 minutos a 200 x g.
- Desprezar o sobrenadante e reconstituir o *pellet* com 1 mL de DMEM.
- Transferir o conteúdo para frascos de cultivo com 3 mL de meio DMEM.
- Manter os frascos em condições de cultivo em estufa de gás carbônico.

Considerações Finais

A melhor situação seria não termos a preocupação com a extinção dos animais, bem como com a redução da variabilidade genética daqueles organismos de interesse humano, no entanto, para algumas espécies, a situação é crítica. Assim sendo, a obtenção de diferentes tecidos e células de animais silvestres que morrem subitamente é uma opção emergencial para resgatar germoplasma (sêmen, ovócitos, células espermatogoniais primordiais e células somáticas) que de outra forma seria perdido. Esse material deve ser obrigatoriamente utilizado com as técnicas de reprodução assistida, que ainda

devem ser desenvolvidas ou aperfeiçoadas para as diversas espécies de animais silvestres, como é o caso da transferência de núcleos de fibroblastos ou adipócitos criopreservados no banco de germoplasma.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal (FADF) e à Rede de Recursos Genéticos Animais da Embrapa (01060100.02.02.01 e 01060100602.02.02) pelo apoio financeiro. Ao Jardim Zoológico de Brasília pelo fornecimento das amostras biológicas dos animais.

Referências

- MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M. N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.101, p.326-331, 2007.
- LOSKUTOFF, N.M. Biology, technology and strategy of genetic resource banking in conservation programs for wildlife. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, L.; GIANAROLI, L. (Eds.). **Gametes: development and function**. Rome:Serono Symposia, 1998. p. 275-286.
- WILD, D.E.; RALL, W.F.; CRITSER, J.K. Genome resource banks. **BioScience**, Washington, DC, v.47, p. 690-699, 1997.

Isolation, Culture and Cryopreservation of Somatic Cells from Wild Mammals for Formation of a Germoplasm Bank

Abstract

The objective this document was to present the practical procedure of isolation, culture and cryopreservation of skin fibroblasts and adipocytes cells from dead wild mammals to form of the animal cryo genetic bank.

Index terms: animal conservation, biotechnology, reproduction, wild animals.

Comunicado Técnico, 175

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente no link: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2013/comtec/comtec_175.shtml

Embrapa Cerrados

Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa postal: 08223 CEP 73310-970
Fone: (61) 3388-9898 Fax: (61) 3388-9879
sac@cpac.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): 100 exemplares
Edição online (2013)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Claudio Takao Karia*
Secretária Executiva: *Marina de Fátima Vilela*
Secretárias: *Maria Edilva Nogueira*
Alessandra Gelape S. Faleiro

Expediente

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbues*
Equipe de revisão: *Francisca Elijani do Nascimento*
Jussara Flores de Oliveira Arbues
Normalização bibliográfica: *Fabio Lima Cordeiro*
Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*
Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*
Alexandre Moreira Veloso