

# POTENCIAL DE RECUPERAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE MAMÍFEROS SILVESTRES MORTOS PARA FORMAÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA: RESULTADOS PRELIMINARES

Guilherme Reis Blume<sup>1\*</sup>, Carlos Thiago S.A.M. de Oliveira<sup>2</sup>, David Germano Gonçalves Schwarz<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Siqueira<sup>4</sup>, Rafael Bodorino<sup>5</sup>, Gisely Duarte<sup>5</sup>, Fabiane Rodrigues Ferrão<sup>6</sup>, Filipe Reis<sup>7</sup>, Renato Peixoto Brandão Bravo<sup>7</sup>, Carlos Frederico Martins<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970, Planaltina-DF, \*gui\_blume@hotmail.com

<sup>2, 3, 4, 6</sup> Embrapa Cerrados, Planaltina, DF

<sup>5</sup> Jardim Zoológico de Brasília

<sup>7</sup> Centro Universitário de Brasília, UniCEUB, Brasília, DF

## Introdução

A diversidade biológica é a chave para a manutenção da vida que conhecemos. Entretanto, o rápido crescimento populacional humano exerce forte pressão nos ecossistemas, como destruição ambiental em larga escala, conversão, fragmentação de habitats e poluição. Virtualmente todos os biólogos conservacionistas concordam que a preservação dos habitats é o melhor caminho para conservar a biodiversidade. Os programas de reprodução em cativeiro, os bancos de recursos genéticos e as técnicas de reprodução assistida tem sido sugeridos como importantes ferramentas para a conservação. Após a morte de um animal, ocorre a perda de seu patrimônio genético (germoplasma) e conseqüentemente de genes importantes para uma população. No entanto, ainda é possível recuperar e aproveitar este material genético com o auxílio das biotécnicas de reprodução assistida. As principais biotécnicas potencialmente importantes para auxiliarem na reprodução dos animais selvagens são: criopreservação de gametas e embriões, a inseminação artificial, a fecundação in vitro, a injeção intracitoplasmática de espermatozóide e a transferência nuclear. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a possibilidade de isolamento e cultivo de fibroblastos de mamíferos silvestres após a morte no Jardim Zoológico de Brasília, bem como do bioma Cerrado do DF.

## Material e Métodos

Após a morte natural no zoológico ou acidental em áreas do bioma cerrados, realizou-se necrópsia e retirada de fragmento de pele da orelha de animais silvestres (n=3; Lobo Guará, *Chrysocyon brachyurus*; Cachorro do Mato, *Cerdocyon thous*; e Veado Catingueiro, *Mazama gouazoubira*, Figura 1).



Figura 1. Animais utilizados no experimento: a) Cachorro do Mato e b) Lobo Guará.

Para isolar os fibroblastos foi realizada tricotomia local na orelha coletada, lavagem com álcool 70% e retirada de um fragmento de 3 x 3 cm com auxílio de bisturi, pinça dente de rato e tesoura (Figura 2). Colocou-se a biópsia em placa de petri esteril e levada para o fluxo laminar. No fluxo laminar, a amostra foi lavada com *Dulbeccos Modified Eagle* (DMEM) e fragmentos menores (1-2 mm) foram retirados da biópsia e depositados em placa de petri de 30 mm até começarem a secar. Em seguida, cuidadosamente depositou-se uma gota de DMEM com 10% de soro fetal bovino em cima de cada fragmento para evitar movimentação. Posteriormente, a placa foi preenchida com 3 ml de DMEM (Figura 3) e levada para incubação em estufa com 5% de saturação de CO<sub>2</sub> e temperatura de 38,5 °C. Após 10 dias, os fragmentos foram retirados e o meio DMEM trocado. No sétimo dia após a troca do meio, as células foram re-suspensas em tripsina-EDTA e transferidas para garrafas de cultivo com 3 ml de DMEM (Figura 4), e incubadas a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> até alcançar a confluência celular. O crescimento celular foi observado sob microscópio invertido.



Figura 2. Biópsia de pele retirada da orelha.



Figura 3. Fragmentos menores (1-2 mm) imersos em meio DMEM.



Figura 4. Cultivo de fibroblastos em garrafa.

## Resultados e Discussão

Foi possível recuperar fibroblastos em todas as amostras coletadas. Contudo, o tempo para atingir confluência celular foi diferente entre espécies (40, 18 e 18 dias para Lobo Guará, Veado Catingueiro e Cachorro do Mato, respectivamente). Esta variação ocorreu devido a diferenças na quantidade de fragmentos cultivados (quanto maior a quantidade, maior a dispersão e menor o tempo para confluência celular). Foi observado também diferenças morfológicas das células entre as espécies (Figura 5). Os fibroblastos do Veado Catingueiro apresentaram-se fusiformes, os do Cachorro do Mato mais esféricos, e do Lobo Guará com ramificações. Estes resultados preliminares indicam ser possível o isolamento e cultivo de fibroblastos após a morte de animais silvestres de diferentes espécies. Potencialmente, os fibroblastos cultivados podem ser criopreservados para o estabelecimento de um banco de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção.

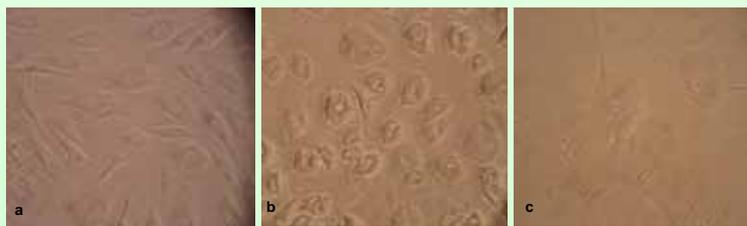


Figura 5. Cultivo de fibroblastos de Veado Catingueiro (a), Cachorro do Mato (b), Lobo Guará (c). Observar a diferença de morfologia das células entre as espécies.

## Conclusões

Conclui-se então que, seguindo os passos corretamente, é possível o isolamento e cultivo de fibroblastos de animais silvestres mortos. Este procedimento permite a criação de um banco de células (germoplasma) para futuramente utilizá-las em técnicas de reprodução assistida, visando a conservação e preservação de espécies ameaçadas de extinção.

## Agradecimento

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF pelo apoio financeiro