IX SIMPÓSIO Nacional Cerrado
Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais

12 a 17 de outubro de 2008
ParlaMundi, Brasília, DF

II SIMPÓSIO Internacional Savanas Tropicais

# ISOLAMENTO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTOS BOVINOS RECUPERADOS DE PELE DE ORELHA RESFRIADA A 3°C POR LONGOS PERÍODOS.

Carlos Frederico Martins[1], Moacir Gabriel Saueressig[1], José Robson Bezerra Sereno[1], Rodolfo Rumpf[2], José de Oliveira Carvalho Neto[3], Margot Nunes Dode[2] *([1]Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF. e-mail: carlos.frederico@cpac.embrapa.br; [2]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), 70770-900, Brasília, DF – Brasil; [3]Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF).*

**Termos para indexação:** *animais mortos, germoplasma, fibroblastos, transferência nuclear.*

## Introdução

Células somáticas adultas podem sofrer reprogramação nuclear após a fusão com um ovócito maduro, um processo conhecido como transferência nuclear de células somáticas ou clonagem. A competência do blastocisto produzido por transferência nuclear tem sido demonstrada em primeiro lugar pela produção de animais vivos (WILMUT et al., 1997; WAKAYAMA et al., 1998) e em segundo lugar pela derivação de células tronco embrionárias provenientes da massa celular interna do embrião (WAKAYAMA et al., 2001). Estas observações fornecem provas definitivas que o núcleo de uma célula somática pode se reprogramar para um estado pluripotente por fatores citoplasmáticos do ovócito, e que o núcleo reprogramado pode desenvolver um indivíduo a termo.

Devido a estas possibilidades, a clonagem bovina no Brasil tem levado investimentos de vários grupos de empresários para multiplicar seus animais de alto valor genético, comercial, e representativos da raça. No entanto, estes animais normalmente são muito velhos e acabam morrendo antes mesmo de serem multiplicados pela transferência nuclear. Então, permanece um grande dilema sobre o que fazer quando um animal valioso morre e é encontrado um ou dois dias depois.

Para tentar resolver a este entrave, o presente estudo foi desenvolvido para verificar o potencial de recuperação de fibroblastos a serem utilizados na transferência nuclear, a partir de orelhas obtidas de animais mortos e resfriadas por 2, 4, 7, 14, 21 e 30 dias a 3°C, simulando a necessidade de um transporte prolongado do material recuperado até um laboratório especializado.

## Material e Métodos

*Coleta, transporte e armazenamento de orelha bovina para biópsia de pele e isolamento celular.*

Após a morte de uma fêmea Nelore mocha, marca BRGN da Embrapa Cerrados, que exibia grande potencial para produzir bezerros de grande porte e boa conformação, a orelha do animal foi retirada, colocada em saco plástico estéril e enviada ao laboratório em caixa de isopor com gelo. A caixa foi colocada em uma câmara fria com tampa com 2 orifícios, a uma temperatura de 3 °C. A orelha do animal permaneceu armazenada por 30 dias. Após 2, 4, 7, 14, 21 e 30 dias de armazenamento, uma biópsia foi extraída em cada período para o isolamento dos fibroblastos.

*Isolamento da biópsia e obtenção dos fibroblastos*

Para a retirada da biópsia, inicialmente foi realizada uma tricotomia da área e lavagem focal com álcool 70%, com auxílio de gases de pano. Para retirar a biópsia foi utilizada pinça e tesoura estéril. A biópsia foi imediatamente depositada em uma placa de petri e levada para o fluxo laminar. No fluxo laminar, a biópsia foi lavada 3 vezes com 1 ml de Dubelccos Modified Eagle Médium (DMEM). Depois a cartilagem foi extraída e pequenos fragmentos da pele foram produzidos com um bisturi. Seis a oito fragmentos foram distribuídos em uma placa de petri de 35 mm até sua adesão ao fundo da placa e então foram cobertos com 3 ml de DMEM.

*Cultivo dos fibroblastos*

Após um semana, as biópsias foram retiradas, o cultivo das células dispersas e aderidas no fundo da placa permaneceu por mais uma semana. Após este período, as células confluentes na placa de petri foram tripsinisadas e depositadas em garrafas de cultivo com 3 ml de DMEM, onde permaneceram até alcançarem a confluência celular.

*Criopreservação dos Fibroblastos*

As células em cultivo dos diferentes períodos de isolamento foram tratadas com tripsina-EDTA para desprendimento das células e centrifugadas a 200 g por 5 minutos em meio DMEM. O precipitado celular foi diluído com meio de criopreservação composto de DMEM, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, as células foram alocadas em palhetas de 0,25 ml, armazenadas em freezer -80 por 24 horas e finalmente mergulhadas em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas.

*Avaliação da viabilidade dos fibroblastos obtidos dos diferentes períodos de resfriamento do fragmento de orelha.*

A viabilidade dos fibroblastos obtidos da orelha resfriada por 2, 4, 7, 14, 21 e 30 dias foi avaliada em microscópio invertido Zeiss, pela ocorrência de dispersão celular, multiplicação e confluência celular. Para as células criopreservadas, a viabilidade foi monitorada pela ocorrência de cultivo e formação de confluência celular após o descongelamento.

**Resultados e Discussão**

Até o 21° dia de resfriamento da pele de orelha foi possível isolar fibroblastos, que apresentaram uma mesma velocidade de dispersão e crescimento, assumindo a característica de confluência uma semana após a retirada das biópsias (Tabela 1). Este fato indica que o resfriamento a 3°C da pele da orelha é uma estratégia importante que garante a diminuição do metabolismo celular, mantendo as células vivas por longos períodos após a morte do animal.

**Tabela 1.** Ocorrências durante o período de isolamento de fibroblastos da pele de orelha resfriada por longos períodos.

| Tratamentos | Dispersão Celular | Crescimento em 2 Semanas | Confluência Celular em 1 semana | Contaminação | Crescimento Celular após Criopreservação |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 dias | Sim | Sim | Sim | Não | Sim |
| 4 dias | Sim | Sim | Sim | Não | Sim |
| 7 dias | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim |
| 14 dias | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim |
| 21 dias | Sim | Sim | Sim | Não | Sim |
| 30 dias | Não | Não | Não | Não | Não |

Apesar do período máximo para obtenção de células viáveis ser de 21 dias, deve-se priorizar antecipar ao máximo o transporte, para evitar riscos de perdas, uma vez que entre o 7° e o 14° dias de resfriamento houve uma tendência de contaminação de parte das amostras (Tabela 1). Desta forma, parece que 4 a 7 dias de transporte por resfriamento sejam os períodos suficientes e adequados alcançar um laboratório nos países continentais, onde as distâncias e a dificuldade de transporte podem ocorrer.

**Conclusões**

Estes resultados preliminares demonstraram que o resfriamento de toda orelha é uma importante conduta para o transporte de tecido de animal morto, possibilitando a obtenção de células somáticas para serem utilizadas na transferência nuclear, mesmo após longos períodos de resfriamento. Sendo assim, quando um fazendeiro identificar um animal morto em sua propriedade, poderá ainda ter uma chance para recuperar células somáticas a serem utilizadas na clonagem, caso resfrie fragmentos de pele de seu animal e envie imediatamente para um laboratório especializado.

**Referências bibliográficas**

WAKAYAMA, T., PERRY, A.C., ZUCCOTTI, M, JOHNSON, K.R, YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, 369–374, 1998.

WAKAYAMA, T., TABAR. V., RODRIGUEZ, I., PERRY, A.C., STUDER, L., MOMBAERTS, P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. **Science**, v. 292, p.740–743, 2001.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997.