



**Anais da 49ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Zootecnia
A produção animal no mundo em transformação**

Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012



Formação de um banco de germoplasma de mamíferos silvestres por meio de isolamento e criopresevação de fibroblastos e espermatozóides de animais mortos¹

Elisa Ribeiro da Cunha^{2,4}, Carolina Gonzales da Silva^{2,4}, Heidi Christina Bessler⁴, Carolina Lobo⁵, Carlos Frederico Martins^{3,4}

¹ Parte do trabalho de pesquisa da Rede de Recursos Genéticos da Embrapa em parceria com o Jardim Zoológico de Brasília, financiado pela FAPDF.

² Bolsista Capes, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

³ Pesquisador da Embrapa Cerrados- Brasília. e-mail: carlos.frederico@cpac.embrapa.br

⁴ Laboratório de Reprodução Animal - Embrapa Cerrados, CTZL, DF, Brasil

⁵ Fundação Jardim Zoológico de Brasília

Resumo: O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de isolar e criopreservar fibroblastos e espermatozóides de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado. Os animais foram provenientes do bioma Cerrado e encaminhados ao Jardim Zoológico de Brasília, de rodovias e encontrados no próprio meio ambiente. Um banco de germoplasma foi composto com 378 amostras de fibroblastos de 13 diferentes animais e 5 amostras de sêmen de um animal. Apesar da diferença morfológica encontrada entre as células de três espécies, a melhor molécula para crioproteção celular foi o DMSO 10%. Estes achados indicam que é possível resgatar material genético que seria perdido pela a morte animal e compor um criobanco de células para estudos de caracterização molecular e de multiplicação pelas técnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: bioma Cerrado, biotecnologia, , criobiologia, material genético

Formation of a genebank from wild mammals by isolation and cryopreserving of fibroblasts and spermatozoa from dead animals

Abstract: The objective of this study was to investigate the possibility of isolating and cryopreserving sperm from fibroblasts and killed wild mammals in the Cerrado. The animals were from the Cerrado biome and sent to the Brasilia Zoo, roads and found the environment itself. A germplasm bank was composed of fibroblasts with 378 samples of 13 different animals and five semen samples from one animal. Although morphological difference found between the three types of cells, the best molecule for the cryoprotection of cells was 10% DMSO. These findings indicate that it is possible to recover genetic material that would be lost by the animal death and compose a criobanco cells for studies of molecular characterization and multiplication by assisted reproduction techniques.

Keywords: biotechnology, biome Cerrado, cryobiology. genetic material

Introdução

A expansão das cidades e das fronteiras agrícolas e o crescimento das populações humanas tem pressionado os recursos naturais do Bioma Cerrado no sentido de esgotamento dos mesmos. A fragmentação de habitats é consequência inevitável desse processo e acaba por isolar as populações de animais silvestres (Bamberg et al., 1991), impedindo o fluxo gênico e, em uma perspectiva futura, inviabilizando a continuidade da espécie.

A morte de um animal representa a perda de seu patrimônio genético (germoplasma) e conseqüentemente a perda de genes importantes para uma população. No entanto, ainda é possível recuperar este material genético (espermatozóides e fibroblastos) com o auxílio das biotécnicas de reprodução animal, e formar um criobanco de germoplasma, o qual poderá ser utilizado para multiplicação animal por meio da inseminação artificial, fecundação *in vitro* e transferência nuclear (clonagem).

Material e Métodos

Os animais foram recolhidos logo após a morte no Jardim Zoológico de Brasília, rodovias do Distrito Federal ou do Cerrado e encaminhados para isolamento. Para realizar o isolamento e criopresevação dos fibroblastos de pele após a morte natural, realizou-se retirada de fragmento de pele da orelha. 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. Em placa de petri as amostras foram lavadas 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. Posteriormente, a placa foi preenchida com 3 mL de DMEM e levada para cultivo em estufa com 5% de CO₂ 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 e cultivadas até alcançar a confluência celular. Foi realizada a comparação



**Anais da 49ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Zootecnia
A produção animal no mundo em transformação**

Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012



da viabilidade celular, tempo de confluência e características morfológicas e dos efeitos da criopreservação em amostras de Lobo Guará, Cachorro do Mato e Veado Catingueiro. Para isso os fibroblastos isolados destas espécies foram criopreservados em duas soluções crioprotetoras 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) em DMEM versus 5% de Dimetilformamida (DMF) em DMEM. As palhetas foram armazenadas em freezer – 80°C por 24 horas e depois armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Os espermatozoides foram isolados por várias incisões na cauda do epidídimo e por pressão manual os espermatozoides foram liberados, coletados e diluídos com meio crioprotetor Tris-gema com 3,5% de glicerol e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). A viabilidade celular foi avaliada após o descongelamento (36°C/30s) e incubadas com corante Trypan Blue (TB) 4% 1:1 (v/v) por 6 minutos e contadas em microscópio de campo claro. A microscopia eletrônica dos fibroblastos foi realizada segundo Martins et al, 2007.

Resultados e Discussão

Foram coletados materiais de 31 animais, sendo possível isolar e criopreservar fibroblastos da orelha de 14 (45,16%) deles. O maior número de animais obtidos foi proveniente do Jardim Zoológico de Brasília (51,69%), outros foram recolhidos em missões nas rodovias do Distrito Federal (25,80%), no cerrado (9,67%) e de outros locais (12,9%). Muitos animais já se encontravam estado avançado de decomposição dificultando a recuperação de germoplasma.

Espermatozoides foram isolados e criopreservados apenas de Quati (*Nasua nasua*) (5 palhetas criopreservadas). A dificuldade de isolamento do gameta masculino foi devido principalmente ao longo tempo entre a morte e o isolamento, a menor resistência dos espermatozoides e imaturidade de muitos animais.

O banco de germoplasma formado possui 382 palhetas criopreservadas, de 7 espécies diferentes, sendo: cachorro do mato, *Cerdocyon thous*, (37 amostras); lobo guará, *Chrysocyon brachyurus*, (9 amostras); veado catingueiro, *Mazama gouazoubira*, (234 amostras); furão, *Mustela putorius*, (72 amostras); macaco da noite, *Aotus sp.*, (20 amostras); mico leão preto, *Leontopithecus chrysopygus*, (6 amostras); quati, *Nasua nasua*, (4 amostras). O banco de germoplasma está localizado no Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira – CTZL da Embrapa Cerrados. Este banco constitui o primeiro banco de material genético proveniente de animais silvestres mortos do Brasil e servirá para estudos moleculares e de multiplicação animal, especialmente pela técnica de transferência nuclear.

A molécula de DMSO 10% foi mais eficiente que a molécula de DMF em preservar a viabilidade dos fibroblastos nas diferentes espécies animais (Tabela 1). Estes resultados corroboram as informações obtidas em animais domésticos.

Tabela 1. Estudo da viabilidade após criopreservação com DMSO 10% e DMF 5% e avaliados por Trypan Blue, tempo de confluência e morfologia de fibroblastos de Cachorro do Mato, Lobo Guará e Veado Catingueiro

		Lobo-Guará	Veado-Catingueiro	Cachorro do Mato	Média
Viabilidade com TB	DMSO 10%	84,5%	68%	79,5%	77,33%
	DMF 5%	61,5%	23%	53,0%	45,83%
Tempo de confluência (dias)		40	18	18	25,3
Morfologia celular		Ramificada	Fusiforme	Esférico	

O tempo para atingir confluência celular foi diferente entre espécies (tabela 1), sendo que esta variação ocorreu devido as diferenças na quantidade de fragmentos cultivados (quanto maior a quantidade, maior a dispersão e menor o tempo para confluência celular) e as diferenças morfofisiológicas. Foi observado também diferenças morfológicas das células entre as espécies como mostra a figura 1.

Na microscopia eletrônica de transmissão foi possível aprofundar a diferenciação morfológica, as diferenças de tamanho celular e do efeito da criopreservação em cada espécie estudada, porém mais amostras precisão ser avaliadas e outras avaliações complementares devem ser realizadas para confirmar os achados (figura 2).

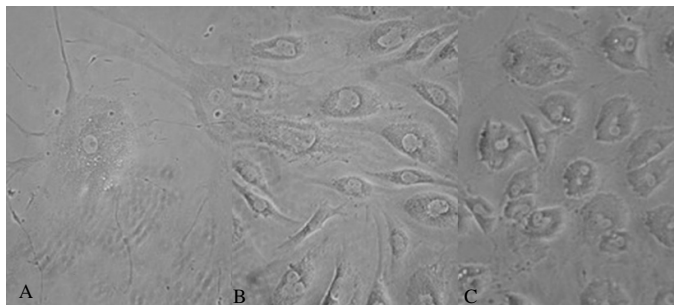


Figura 1. Microscopia de campo claro de fibroblastos isolados com diferentes formatos: a) Ramificado (Lobo Guará) b) Fusiforme (Veado Catingueiro); b) Esférico (Cachorro do mato).

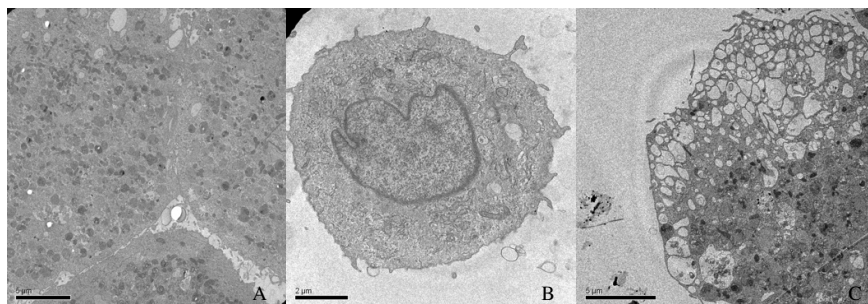


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos isolados apresentado diferentes formatos e estados de criopreservação: a) Lobo Guará b) Veado Catingueiro; c) Cachorro do mato.

Conclusões

Conclui-se que é possível isolar e criopreservar fibroblastos e espermatozóides de animais silvestres mesmo após a morte, visando a formação de um banco de germoplasma para uso em biotécnicas reprodutivas. A molécula de DMSO é mais indicada para criopreservação de fibroblastos de animais silvestres. Os dados obtidos contribuem no sentido de acrescentar conhecimento em biologia reprodutiva das espécies estudadas, sendo ferramentas úteis em programas de conservação animal *in-situ* e *ex-situ*.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal-FAPDF e a Embrapa (Rede de Recursos Genéticos) pelo apoio financeiro. Ao Jardim Zoológico de Brasília pela disponibilização dos animais.

Literatura citada

Bamberg, E.; Mostl, E.; Patzl, M. et al. Pregnancy by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J. Zoa Wlldl. Med.*, v.22, p.73-77, 1991.
Martins, C.F.; Baó, S.N.; Dode, M.N.; Correa, G.A.; Rumpf, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*. v.67-8, p.1307-1315, 2007.