

Isolamento de células-tronco mesenquimais de saco vitelino criopreservado

Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved yolk sac tissue

**Vitória Mattos Pereira^{1*}, Lina Castelo Branco Motta², Priscilla Avelino Ferreira Pinto²,
Vanessa Cristina Oliveira³, Carlos Eduardo Ambrósio³**

¹Graduanda de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil; ²Alunas de pós-graduação do programa de Anatomia dos animais domésticos e silvestres da faculdade de medicina veterinária e zootecnia (FMVZ), São Paulo SP; ³Departamento de Medicina Veterinária, FZEA, USP, Pirassununga, SP, Brasil.

*E-mail: vitoria.mattos.pereira@usp.br

O cultivo primário pós criopreservação já se é praticado com tecidos, como no caso do cordão umbilical e polpa dentária. Essa técnica além de se mostrar útil para o posterior cultivo e aplicação de células-tronco, ela pode ser utilizada para a melhor organização e realização dos experimentos *in vitro*. Com a criopreservação prévia é possível coletar as amostras, armazenar a quantidade de material necessária e executar os experimentos com maior controle sobre o material obtido. Para o estudo foram escolhidas células-tronco oriundas do saco vitelino, pois nos últimos tempos esse folheto extra-embriônico tem se tornado alvo de pesquisas científicas nas áreas de reprodução, toxicologia, biologia evolutiva e biologia do desenvolvimento. Dessa maneira, foram coletados embriões de suíno (n=3), canino (n=3) e bovino (n=3) no primeiro terço gestacional. Os sacos vitelinos foram isolados, macerados e digeridos usando colagenase IV. No caso dos embriões suínos, a técnica por splicing (somente digestão mecânica) foi a que se obteve melhor resultado. Após a digestão do tecido, parte do material seguia para cultivo primário com meio de cultivo e mantidas em estufa de 80% de umidade relativa com atmosfera gasosa de 5% de CO₂, a 37°C. Enquanto outra parte era congelado com meio composto de: 900µL de SFB + 900µL de meio de cultivo + 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para as análises iniciais da viabilidade da técnica utilizada, foram examinadas o tempo para confluência em cultivo primário e capacidade de unidades formadoras de colônia (UFC). Como resultado, não encontrou-se diferença estatística entre as análises em questão (p < 0.05). O tempo de cultivo primário para as células-tronco fresca era de: 21 dias (suínos), 15 dias (bovinos) e 7 dias (caninos), enquanto que as células oriundas de tecido criopreservado eram de: 23 dias (suínos), 17 dias (bovinos) e 11 dias (caninos). E as análises de UFC das células-tronco frescas era de: 10 unidades (suínos), 14 unidades (bovinos) e 15 unidades (caninos), enquanto que as células oriundas de tecido criopreservado eram de: 11 unidades (suínos), 13 unidades (bovinos) e 12 unidades (caninos). Com os resultados prévios é possível perceber que as células-tronco mesenquimais oriundas de tecido saco vitelino criopreservado apresentam as mesmas características básicas das células a fresco, demonstrando ser uma forma viável de preservação e uma alternativa para formação de bancos celulares, tanto para posterior transplante, quanto futura multiplicação em experimentos.

Palavras-chave: viabilidade celular, saco vitelino, células-tronco mesenquimais.

Keywords: *cell viability, yolk sac, mesenchymal stem cell.*

Comparação entre o meio padrão Batata-Dextrose-Ágar (BDAP) e o meio Batata-Dextrose-Ágar a base do caldo de batata (BDA) em análise microbiológica de diluidores seminais
Comparison between standard medium Potato-Dextrose-Agar (BDAP) and the Potato-Dextrose-Agar medium on potato-basis (BDA) in microbiological analysis for seminal extenders

Willias Silva Santos Greison^{1,*}, Jose Natanael Tavares Silva¹, Mariana de Sousa Santos Hempel¹, Clóvis Gouveia da Silva², Sildivane Valcácia Silva³

¹Graduandos do Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil;

²Coordenador Técnico do Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas, Centro de Tecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil; ³Docente do Bacharelado em Biotecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

*E-mail: williaswg2@gmail.com

Meios de cultura são insumos preparados em laboratórios com o intuito de fornecer nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos, como fungos e bactérias, fora do seu habitat natural. Uns dos problemas em relação aos meios de cultura são o alto custo e curto tempo de prateleira, sendo inviáveis à laboratórios que não possuem rotina de microbiologia. Assim, objetivou-se testar a eficácia do meio Batata-Dextrose-Ágar a base do caldo de batata (BDA) como um possível substituto ao meio Batata-Dextrose-Ágar padrão (BDAP) em testes microbiológicos para diluidores seminais de origem vegetal. O extrato utilizado para a base do diluidor de sêmen foi a algaroba (*Prosopis juliflora*). Após processamento, o extrato de algaroba foi dividido em quatro lotes (A, B, C e D). Dois lotes (A e B) foram pasteurizados em temperatura de 60 °C/30 min. Em sequência, o lote A foi refrigerado à 5 °C (Extrato Pasteurizado Refrigerado - EPR) e o lote B foi congelado e mantido a -6°C (Extrato Pasteurizado Congelado - EPC). Os lotes C e D não foram pasteurizados, sendo o C refrigerado (Extrato Fresco Refrigerado - EFR) e o D congelado (Extrato Fresco Congelado - EFC). Devido à alta concentração de açúcar encontrado no extrato de algaroba (estudos prévios), realizou-se diluição de cada extrato, na concentração de 20%, em tampão TRIS (3,605g de TRIS; 2,024g de ácido cítrico; 100 mL), formando os grupos: EPR 20%; EPC 20%; EFR 20%; EFC 20%. Utilizou-se dois grupos controle, o negativo (CG), com meio de cultura comercial e o positivo (CGT), contendo o TRIS (3,605g de TRIS; 2,024g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 100 mL), ambos sem adição do extrato. Para a realização das análises microbiológicas foram utilizados dois meios: BDAP (KASVI[®]; 1 L de água destilada, 19,5g de BDAP, submetido à autoclavagem) e meio BDA (500g de batatas inglesas frescas, lavadas, descascadas, cortadas e cozidas em 1,250 L de água destilada/30 min; o caldo foi filtrado, acrescentado 50g de dextrose e 50g de ágar e posterior autoclavagem). Os meios foram depositados em placas de Petri estéreis, em fluxo laminar até solidificação. Em seguida, alíquotas de 5 µL de cada grupo experimental do extrato de algaroba foram retiradas e espalhadas nas placas com auxílio de *swab* estéreis. Ao final do processo, as placas foram armazenadas em estufas a 37 °C. A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada em 24, 48 e 72 horas. O GC não apresentou crescimento microbiano em ambos os meios de cultura; O CGT apresentou 1,9X10⁻¹ UFC em BDAP e 9.3X10⁻¹ UFC em meio BDA. O EFR 20% apresentou maior crescimento em ambos os meios. Foi possível observar que após 48h em meio BDA, o grupo EPC 20% não apresentou crescimento, mantendo suas UFCs após 72h. Houve crescimento fúngico após 72h em BDAP EPR 20% e em meio BDA (EFC 20%). O meio BDA apresentou maior número de UFC quando comparado ao meio comercial, que pode ter ocorrido devido ao teor de carboidratos e proteína, que são facilmente quebrados e disponibilizados no meio. Baseado no exposto, conclui-se que o meio BDA pode ser um substituto ao meio BDAP, apresentando facilidade no manuseio, rápida solubilização, aspecto mais claro, que facilita a contagem de UFC, além de ser mais barato.

Palavras-chave: algaroba, microbiologia, reprodução.

Keywords: algaroba, microbiology, reproduction.