

ISOLAMENTO DE CÉLULAS TESTICULARES DE RATOS A PARTIR DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO

TRIPSINA A 4°C. Terraciano PB , Paz AHR , Horn MM , Passos EP , Giugliani R , Matte,U , Cirne-Lima EO . Centro de Terapia Gênica, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Reprodução – Centro de Pesquisas do HCPA. HCPA.

O transplante de espermatogônias pode ser empregado com sucesso, a fim de restabelecer a espermatogênese de animais inférteis. Sendo esta uma técnica plausível de ser aplicada para seres humanos; nos casos onde a espermatogênese tenha sido afetada por agentes químicos, como nos tratamentos para alguns tipos de câncer. Nestes casos, a coleta e subsequente criopreservação de material testicular representa uma possibilidade de restabelecer a fertilidade perdida. Desta forma, faz-se necessário estabelecer-se a execução das técnicas, de forma rotineira, de isolamento de células, manipulação in vitro e transferência das espermatogônias para outros indivíduos, a fim de que o emprego desta técnica seja ampliado. As células testiculares apresentam características peculiares: podem ser colhidas do testículo de um doador, mantidas in vitro e transferidas para um testículo receptor; onde podem recolonizar o tecido lesado, estabelecer espermatogênese e produzir espermatozoides maduros com o haplótipo do doador (Brinster & Avarbock, 1994). Vale ressaltar que, apesar das células do tecido testicular do doador sofrerem manipulação, durante o processo de isolamento e transferência; a recolonização espermática dá-se de forma fiel à reconstrução de uma complexa associação celular, encontrada na espermatogênese normal. (Shinohara 2001, 2002). Os protocolos usuais para dissociar células testiculares fazem uso de colagenase, hialuronidase e tripsina que, apesar de eficazes, tornam o custo da técnica elevado. O experimento realizado, em nossos laboratórios, fez uso de um reagente disponível, a tripsina que apresenta desvantagem por poder causar danos às proteínas de membrana das células, devido a sua ação indiscriminada sobre proteínas em geral. Com a intenção de reduzir tais danos, utilizamos um protocolo onde a incubação, com esta solução (tripsina 0,25%), é realizada em baixas temperaturas (4° C), quando a ação da enzima é diminuída; uma vez que, a temperatura ótima de ação da tripsina localiza-se próxima aos 37° C. A utilização da tripsina em baixas temperaturas, para as técnicas de dissociação de células, a partir de tecidos (testículos), visa reduzir custos da técnica e produzir uma diminuição nos danos causados nas proteínas de membrana plasmática das células tratadas, o que leva a um aumento da viabilidade celular. Assim, os experimentos realizados, em nossos laboratórios, com a implementação do protocolo de dissociação de células testiculares com solução de tripsina a 4°C, demonstraram que, a técnica em questão, é bastante eficaz. Produzindo uma suspensão isolada de células (“single cells”) viáveis. As células, dissociadas do testículo, foram quantificadas através da técnica de exclusão de azul de trypan, onde a viabilidade celular foi mensurada, comprovando que este método, é uma excelente alternativa metodológica para isolar células viáveis. Desta maneira, com o presente trabalho foi possível estabelecermos uma alternativa metodológica mais simples e prática, com custos reduzidos, e que gera células isoladas de testículos, que serão utilizadas nas etapas subsequentes dos experimentos de transferências de células testiculares de um animal doador para outro receptor.