



Evento	Salão UFRGS 2015: SIC - XXVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2015
Local	Porto Alegre - RS
Título	Isolamento de células espermatogônias tronco de camundongos com características de pluripotência similares às células-tronco embrionárias murinas
Autor	LEONARDO ALVES SANTOS
Orientador	PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE

Isolamento de células espermatogônias tronco de camundongos com características de pluripotência similares às células-tronco embrionárias murinas

Aluno: Leonardo Alves Santos^{1,2}, Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke^{1,2,3,4}

¹ Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia; ² Instituto de Ciências Básicas da Saúde; ³ Programa de pós-graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande Sul; ⁴ Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, RS. Brasil.

As células espermatogônias tronco (SSCs - *spermatogonial stem cells*) são importantes para a manutenção do processo de espermatogênese. Atualmente acredita-se que as SSCs possuam características semelhantes às células pluripotentes. Essa semelhança com as células-tronco embrionárias (CTEs) pode ser considerada uma vantagem visto que, futuramente, as SSC talvez possam ser utilizadas em protocolos de terapia celular e medicina regenerativa, porém sem as limitações éticas associadas às CTEs. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma linhagem de mSSCs partir da seleção por morfologia, bem como comparar as características de pluripotência com as CTEs. As mSSC foram isoladas de camundongos C57Bl/6 com idade entre 5 e 10 dias. Os testículos foram removidos e os túbulos seminíferos tratados com colagenase/DNase seguido de tripsina. Após, as células foram passadas por um filtro de nylon de 70 µm e mantidas em cultura em placa tratada com gelatina 0,1%. As células foram submetidas a uma sequência de incubações. O sobrenadante da última incubação foi coletado e colocado sobre uma camada alimentadora de fibroblastos embrionários murinos inativados com mitomicina C. As mSSC foram mantidas a 32°C, em 5% de CO₂ e 90% de umidade. O meio de cultura utilizado foi o MEM alfa com soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina, aminoácidos não-essenciais (NEaa), b-mercaptoetanol, N21, Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial (GDNF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos beta (bFGF). Como controle de pluripotência, utilizou-se uma linhagem de mESC (C57Bl/6) previamente isolada no laboratório de pesquisa. As CTEs foram cultivadas em DMEM alta glicose com SFB, penicilina e estreptomicina, LIF, piruvato de sódio, L-glutamina, b-mercaptoetanol e NEaa. As condições de cultivo para as mESC foram 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade. A morfologia das colônias foi avaliada através de microscópio com contraste de fase e marcação com DAPI/Faloidina. Os marcadores de pluripotência, Oct-4 e Sox-2, foram avaliados por imunofluorescência e a expressão de SSEA-1 por citometria de fluxo. Também realizou-se a marcação da atividade da enzima fosfatase alcalina. A análise da morfologia por contraste de fase e marcação com DAPI/Faloidina mostrou que as mSSC estavam organizadas em colônias como as CTEs. A imunofluorescência para Oct-4 e Sox-2 foi positiva em ambos os grupos, o que demonstrou a presença nas mSSCs de dois dos mais importantes fatores de transcrição de pluripotência. A expressão do SSEA-1 foi positiva apenas para as CTEs. Entretanto, na literatura é descrito que a expressão do SSEA-1 é variável nas CTEs e, talvez, esse não seja a melhor referência em relação a pluripotência para as mSSCs. A fosfatase alcalina também se mostrou positiva. Esses resultados preliminares mostraram que o isolamento das mSSC, com base na morfologia, resulta em células com características de pluripotência quando comparadas com as CTEs. As mSSC parecem possuir características similares às CTEs, o que possibilita que sejam consideradas uma ferramenta importante em protocolos terapêuticos e de medicina regenerativa como, por exemplo, para o restabelecimento da espermatogênese após a quimio ou radioterapia. Entretanto, verificou-se que o cultivo dessas células é complexo e necessita de mais estudos para que seja possível mantê-las *in vitro* por um longo período de tempo, para que seja possível comprovar a sua pluripotência. Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS e Instituto de Pesquisa com Células-tronco.