

ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS DE RATOS WISTAR ATRAVÉS DA DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM TRIPSINA A 4° C. Paz AHR. , Terraciano PB. , Ramos, ARL. , Giugliani R , Matte U , Cirne-Lima EO . Centro terapia Gênica, Laboratório de Hepatologia Experimental, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Reprodução – Centro de Pesquisas do HCPA . HCPA.

Predominantemente, encontra-se na literatura, protocolos, para dissociar hepatócitos, que utilizam soluções de colagenase ou esta combinada com outras enzimas. A colagenase é uma enzima que degrada a molécula de matriz extracelular mais abundante no estroma hepático, que é o colágeno. Porém, os protocolos, que utilizam a colagenase, apesar de serem eficazes, são muito dispendiosos. A fim de viabilizar a realização desta prática, como rotina, no Centro de Pesquisas do HCPA, buscamos fazer uso de um reagente disponível em nosso laboratório. Para tanto, adaptamos um protocolo, que utiliza a solução tripsina para dissociar tecidos. Diferentemente da colagenase, a tripsina é uma enzima que age, inespecificamente, em proteínas, clivando-as. A solução de tripsina é correntemente utilizada em manutenção de cultura de células aderentes. Onde esta tem a função de quebrar ligações peptídicas, de forma indiscriminada, no momento em que faz-se necessário romper as interações protéicas intercelulares e entre as células e a superfície do frasco de cultura, na ocasião do repique celular, por exemplo. A maior desvantagem quanto à utilização da tripsina, para desagregar tecidos, é o fato desta causar danos às proteínas de membranas das células, devido a sua ação indiscriminada sobre as proteínas em geral. Com a intenção de reduzir tais danos causados às células, pela ação da tripsina, utilizamos um protocolo onde a incubação, com esta solução, é realizada em baixas temperaturas (4° C), onde a ação da enzima é diminuída; uma vez que, a temperatura ótima de ação da tripsina localiza-se próximo aos 37° C. Assim, os experimentos realizados, em nossos laboratórios, com a implementação do protocolo de dissociação de hepatócitos com solução de tripsina em baixas temperaturas, demonstraram que a presente técnica é eficiente. Produzindo uma suspensão isolada de células ("single cell") viáveis. As células, dissociadas do fígado, foram quantificadas através da técnica de exclusão de azul de trypan, onde a viabilidade celular foi mensurada, e comprovou que este método, para dissociação de células a partir de tecidos, é uma excelente alternativa metodológica para isolar células viáveis.