

Isolamento de 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}

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

Email: patriciapranke@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

As 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 espermatogônias tronco murinas (mSSCs) partir da seleção por morfologia, bem como comparar as características de pluripotência com as CTEs.

MATERIAIS E METÓDOS

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 collagenase/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), bmercaptoetanol, N21, Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial (GDNF), Factor de Crescimento 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, bmercaptoetanol 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.

RESULTADOS

A análise da morfologia por contraste de fase e marcação com DAPI/Faloidina mostrou que as mSSC estavam organizadas em colônias como as CTEs (Figura 1). 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 (Figura 3). A expressão do SSEA-1 foi positiva apenas para as CTEs (Figura 4). 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 (Figura 2). 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.

RESULTADOS

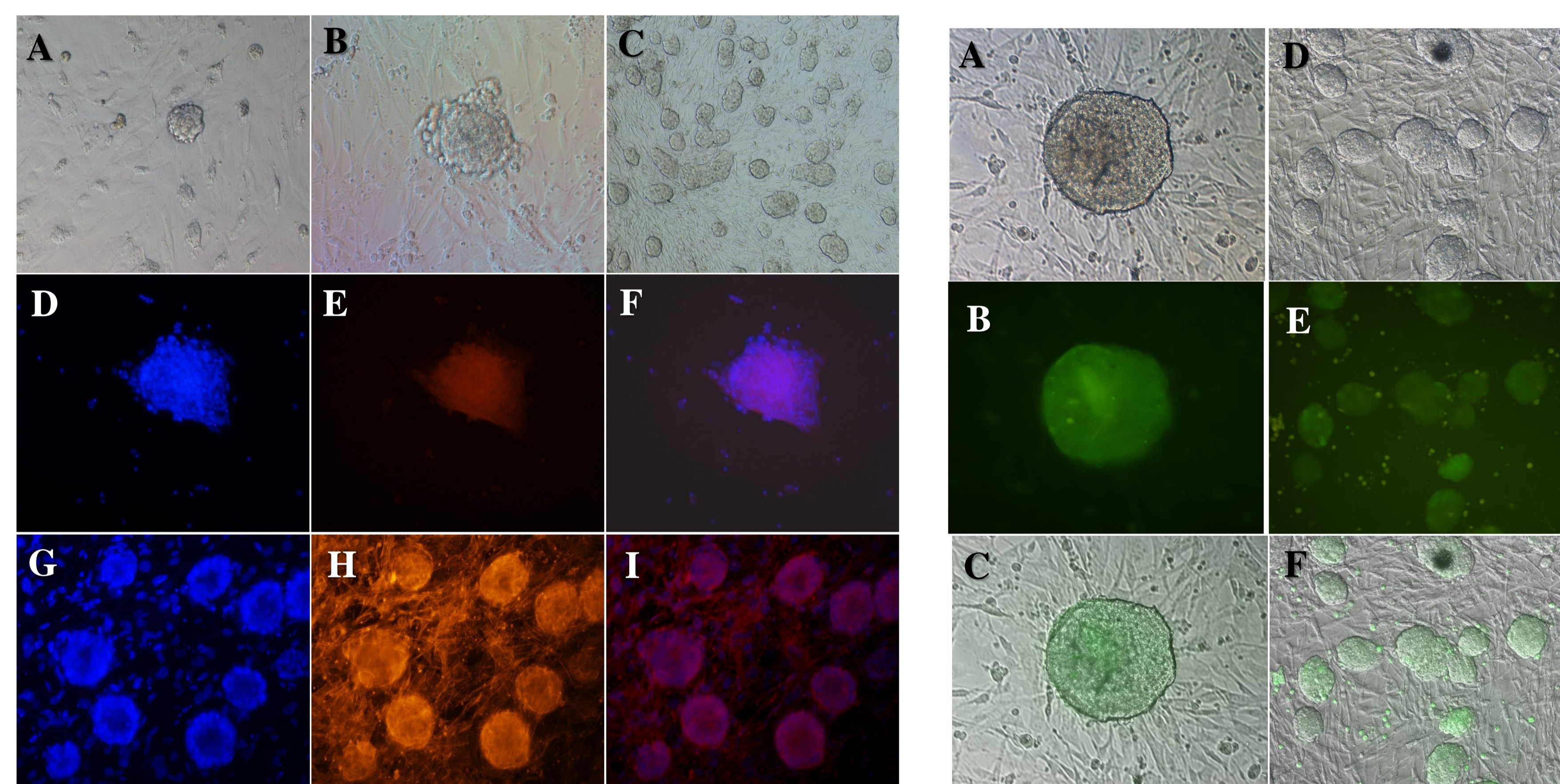


Figura 1: Imagens mostrando análise morfológica de colônias de mSSc (A, B, D-F) e mESC (C, G-I) por contraste de fase e imunofluorescência de DAPI/Faloidina. Avaliação da morfologia por contraste de fase: A: colônia de que mSSC (200x); B: mSSC (400x) e C: mESC (200x). Imunofluorescência de colônias de mSSC e mESC mostrando os núcleos (D, G: DAPI/azul) e o citoesqueleto (E, H: Faloidina/vermelho); F: fusão D/E e I: fusão G/H (200x).

Figura 2: Imagens mostrando a marcação da atividade da enzima fosfatase alcalina nas mSSC (A-C) e nas mESC (D-F). A e D: microscopia de contraste de fase; B e E – microscopia de fluorescência usando marcador de fosfatase alcalina; C e F – sobreposição de A e B e de D e E, respectivamente (200x).

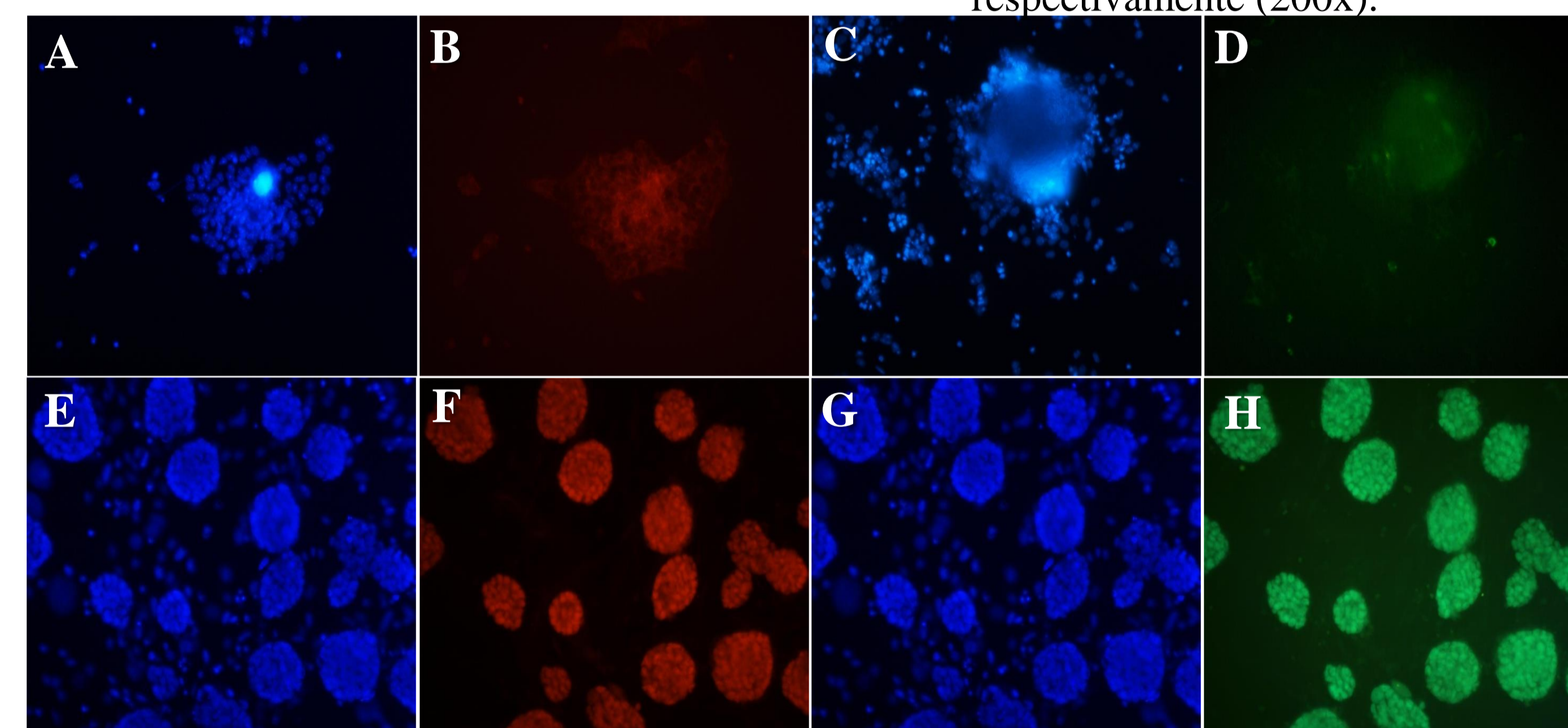


Figura 3: Imunofluorescência dos marcadores de pluripotência Oct3/4 e Sox-2 para mSSC (A-D) e mESC (E-H). A, C, E e G: núcleos celulares marcados com DAPI; B, F: Sox-2 (vermelho) e D, H: OCT3/4 (verde) (200x)

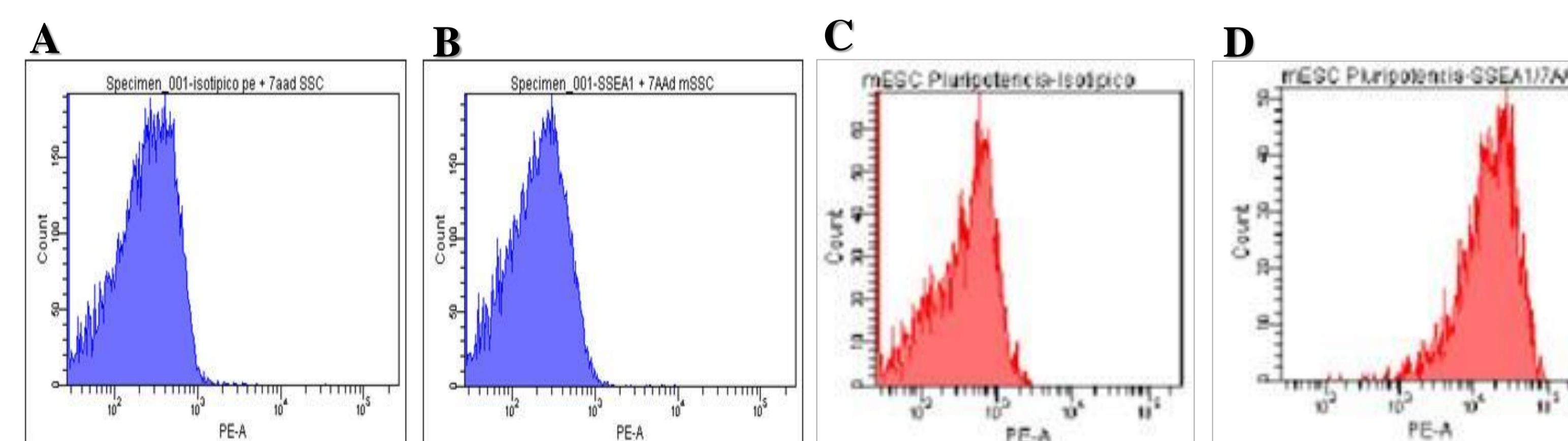


Figura 4: Análise por citometria de fluxo de mSSC (A, B) e mESC (C, D) para o marcador de pluripotência SSEA-1. Imagens A e C mostrando o controle isotópico; B e D células positivas para o marcador SSEA-1.

CONCLUSOES

Esses resultados preliminares mostram que 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.