

Análise dos resultados obtidos com o teste: “Eficiência de Formação de Colônias (CFE)”, aplicado no cultivo de queratinócitos bucais humanos

Daniele Yoshito, M. Fátima Guarizo Klingbeil e Mônica Beatriz Mathor
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

A mucosa bucal, assim como a pele é constituída por uma camada epitelial, cuja maior proporção de células são as denominadas queratinócitos.

Essas células permitem ser cultivadas *in vitro*. Melhores resultados são alcançados se este cultivo for feito sobre camada de fibroblastos murinos previamente irradiados a 60 Gy. Esta forma de cultivo foi preconizada por Rheinwald e Green em 1975 [5]. Neste tipo de cultura, os queratinócitos crescem em forma de colônias. As células com capacidade clonogênica dão origem às colônias. Essas colônias podem ser classificadas como colônias em desenvolvimento ou colônias abortivas [1]. O teste denominado “Eficiência de Formação de Colônias” serve como parâmetro da cultura que esta sendo realizada paralelamente. Este nos mostra e nos informa o potencial de evolução da cultura, auxilia a determinação do número de duplicações destas células *in vitro*, e ainda permite analisar resultados provenientes de variáveis que possam influenciar a cultura dos queratinócitos.

No presente trabalho estas células foram extraídas por dois métodos diferentes (método enzimático e explante direto) e este teste foi utilizado para tais comparações [3]. Esses experimentos fazem parte de uma das etapas de trabalho do plano de mestrado intitulado “Cultura Primária de Queratinócitos Bucalis Humanos”, da aluna Maria Fátima Guarizo Klingbeil, o qual se encontra em andamento. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o N° 087/CEP-IPEN/SP.

OBJETIVO

Verificar a possibilidade da utilização do teste de “Eficiência de Formação de Colônias” na avaliação e comparação entre dois métodos diferentes de extração de células.

METODOLOGIA

Os queratinócitos foram semeados sobre uma camada de sustentação denominada “feeder layer”, constituída por fibroblastos murinos previamente irradiados a 60 Gy.

O conjunto queratinócitos/camada de sustentação foi nutrido por meio de cultura denominado “meio de crescimento para queratinócitos”, constituído de: DMEM e meio de Ham F12 (na proporção de 2:1), contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2.5 µg/mL), glutamina (4 mM), adenina (0,18 mM), insulina (5 µg/mL), hidrocortisona (0,4 µg/mL), toxina colérica (0,1 nM), triiodotironina (20 pM) e EGF (10 ng/mL, hormônio de crescimento epidérmico), em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ [2, 4].

Essas células foram semeadas numa proporção de 0,5x10³ células/cm² [3]. Quando as mesmas atingiram 70% a 80% de população na placa de cultura, estas células foram retiradas e ressemeadas, em outra placa, sobre uma nova camada de sustentação. A isto denominamos repique ou passagem e ao mesmo tempo foi realizado o teste denominado Eficiência de Formação de Colônia (CFE), o qual foi derivado de culturas obtidas a partir de 100 células, semeadas sobre a camada de sustentação. Estas células foram mantidas com troca de meio a cada dois dias, por catorze dias, sendo então coradas com um corante não vital (Rodamina B) para contagem das colônias. Cada colônia corresponde a uma célula semeada que aderiu à placa, multiplicando-se posteriormente.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados após a contagem das colônias.

Tabela 1 Quantidade de colônias obtidas durante a primeira passagem das células dos voluntários, extraídas pelos métodos: enzimático e explante direto

Voluntários	Métodos	Col. Desenv (%)	Col. Abort (%)	Col. Totais (%)
01	Enzimático	43	1,5	45,5
	Explante	38	15,5	53
02	Enzimático	1		0,5
	Explante		1	0,5
03	Enzimático	100		100
	Explante	53	11	58
04	Enzimático	78		78
	Explante	20	13	33
05	Enzimático	28		28
	Explante	17	0,5	35
06	Enzimático	29	15,5	44,5
	Explante	35,5		35,5
07	Enzimático	74		74
	Explante	58		58
08	Enzimático	53		53
	Explante	62		62
09	Enzimático	58,1		58,1
	Explante	4,6		4,6
10	Enzimático	31,8		31,8
	Explante	41,66		41,66

Os números obtidos de cada voluntário variam de acordo com o método e particularmente com as condições das células de cada voluntário. Desta maneira podemos estimar as condições das próximas culturas provenientes dessas células.

CONCLUSÕES

O teste de "Eficiência de Formação de Colônias" mostrou-se adequado para a avaliação e comparação entre dois métodos diferentes de extração de células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barrandon, Y.; Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc. Natl. Acad. Sci., v.84, p. 2302-2306, 1987.
- [2] Herson, M.R. Estudo da composição in vitro de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena, 141p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.
- [3] Kedjarune, U.; Pongorerachok, S.; Arpornmaekklong, P.; Ungkusonmongkhon K. Culturing primary human gingival epithelial cells: comparison of two isolation techniques. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. (29) 224-31, 2001.

[4] Mathor, M. B.; Estudos da expressão gênica mediante utilização de queratinócitos humanos normais transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica". São Paulo, 158p. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1994.

[5] Rheinwald, J.G.; Green, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from single cells. Cell, Vol.6: 331-4, 1975

APOIO FINANCEIRO

CNPq/PIBIC