

ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS COM O TESTE: "EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (CFE)" APLICADO NO CULTIVO DE QUERATINOCITOS BUCAIS HUMANOS

Daniele Yoshito, Maria Fátima Guarizo Klingbeil e Mônica Beatriz Mathor

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Centro de Tecnologia das Radiações

INTRODUÇÃO

A mucosa bucal, assim como a pele, é constituída por uma camada epitelial de células, denominadas queratinócitos, as quais formam o seu maior componente celular.

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 [1]. Neste tipo de cultura, os queratinócitos crescem em forma de colônias. As células com capacidade clonogênicas dão origem às colônias. Essas colônias podem ser classificadas como colônias basais ou colônias abortivas, sendo determinadas pelos diferentes tipos de clones, a saber: holoclones são clones que possuem grande capacidade de duplicação; paraclones são os queratinócitos com potencial de duplicação limitado, portanto suas colônias são menores e disformes, não dão origem a mais do que 15 gerações; meroclones são células de tamanhos variados e de estágio transitório entre holoclones e paraclones [2].

A conversão de holoclone para meroclone e posteriormente paraclone é um processo unidirecional e irreversível, resultado de redução progressiva do potencial de duplicação dos queratinócitos [2].

O teste denominado "Eficiência de Formação de Colônias" nada mais é, que um parâmetro da cultura que está sendo realizada paralelamente ao teste. Este nos mostra visualmente o potencial da cultura, permitindo determinar o número máximo de duplicações que esta cultura *in vitro* pode gerar.

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 Nº 087/CEP-IPEN/SP.

OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo a classificação dos tipos de colônias obtidas, baseada nos diferentes tipos de clones.

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 [3,4].

Essas células foram semeadas numa proporção de $0,5 \times 10^3$ células/cm² [5]. Quando as mesmas atingiram determinado estágio, denominado subconfluência, ou seja, 70% a 80% de população na placa ou garrafa, estas células foram retiradas e ressemeadas, em outra placa ou garrafa, sobre uma nova camada de sustentação. A isto denominamos repique ou passagem. Ao mesmo tempo em que se deu o repique ou passagem, foi realizado o teste denominado Eficiência de Formação de Colônia (CFE), o qual foi derivado de culturas obtidas a partir de 100 células, sendo que estas foram semeadas sobre a

camada de sustentação, mencionada anteriormente. 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

Os resultados obtidos com os testes realizados em culturas de alguns pacientes estão demonstrados na TAB.1.

TABELA 1 - Porcentagem das colônias basais e abortivas de quatro pacientes analisados, em diferentes passagens.

PASS	PACIENTE A		PACIENTE B		Paciente C		PACIENTE D	
	Colônias bas.	Colônias abort	Colônias bas.	Colônias abort	Colônias bas.	Colônias abort	Colônias bas.	Colônias Abort
P 0	2.45%	-	1.5%	-	1.85%	-	0.55%	-
P 1	48.5%	-	95%	-	78%	-	58%	-
P 2	25%	12.5%	76%	9%	62%	8%	38%	-
P 5	7.75%	2.75%	6.5%	7%	8.5%	13%	6.25%	5.25%
P 8	4%	6.1%	4.75%	2.5%	6.25%	2.25%	10.7%	2.1%

O cultivo dos queratinócitos, provenientes desses doadores, não foi finalizado até o momento. Essas culturas terão continuidade até a total diferenciação e perda da capacidade de multiplicação das células. Nota-se nas primeiras passagens (P0, P1) a não existência das colônias abortivas.

CONCLUSÕES

A tabela acima demonstra que a quantidade do total de colônias (basais e abortivas) decresce com o aumento do número de passagens. No início da cultura (P0 e P1) essas colônias são do tipo basal exclusivamente. Com exceção do paciente D, onde as colônias abortivas surgem após a segunda passagem (P2).

Através da observação a olho nu e sob microscópio de luz invertida, podemos diferenciar os tipos de colônias que as células foram capazes de formar. As colônias basais são aquelas constituídas por holoclones e as

colônias diferenciadas ou abortivas, são as constituídas por meroclones e paraclones. O teste "Eficiência de Formação de Colônias", mostrou ser uma ferramenta de extrema importância no cultivo dos queratinócitos bucais humanos, nos permitindo dimensionar a vida útil dos mesmos. Por meio da cultura *in vitro* buscamos reproduzir as condições do local de origem destas células. Assim como na pele, não poderia ser diferente no meio bucal, essas células possuem capacidade vital limitada, se estratificando e se diferenciando. Os queratinócitos ao longo do período em cultura diminuem a capacidade de multiplicação e se direcionam para aquilo que chamamos de senescência e conseqüentemente apoptose. Esse teste nos permite revelar com certa precisão o estágio e a situação que se encontram as células da cultura que estamos analisando.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rheinwald, J.G.; Green, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from single cells. *Cell*, Vol.6: 331-4, 1975.
- [2] Barrandon, Y.; Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.84, p. 2302-2306, 1987.
- [3] 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.
- [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] 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.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC