

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

