

# **CULTIVO DE FIBROBLASTOS MURINOS 3T3-J2 E POSTERIOR IRRADIAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO COMO CAMADA DE SUSTENTAÇÃO "FEEDER LAYER" NO CULTIVO DE QUERATINÓCITOS BUCAIS HUMANOS**

Tiago Luiz de Almeida, Maria Fátima Guarizo Klingbeil e Monica Beatriz Mathor

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

## **INTRODUÇÃO**

Em 1975, Rheinwald e Green publicaram um método de cultivo de queratinócitos *in vitro* no qual utilizaram fibroblastos murinos modificados 3T3-J2, os quais foram previamente irradiados a 60Gy, com o objetivo de formar uma camada de sustentação denominada "Feeder-Layer" [1]. Essa modificação tornou possível o cultivo de queratinócitos por período de tempo ainda maior do que o conseguido sem sua utilização, quando cultivados em alta densidade. Esta otimização da cultura permite diversas aplicações clínicas. No caso da pele, podemos ressaltar o tratamento de pessoas com perda extensa ocasionada por queimaduras, úlceras crônicas, no tratamento de nevus gigante, defeitos de pele devido a diferentes causas etiológicas e outras patologias, reparos cirúrgicos e terapia gênica [2]. Igualmente no meio bucal, isso se torna possível com a mucosa gengival. Neste sentido, poderíamos citar desde reconstruções em casos de traumas graves; cirurgias reparadoras, em casos de ressecções; tratamentos estéticos e reparos por danos patológicos [3,4,5]. Portanto, enfocamos dessa maneira, a importância de uma aprimorada metodologia, a qual nos direcionar na busca de novas respostas para as patologias e reparos.

O cultivo desses fibroblastos e sua posterior utilização como camada de sustentação para o cultivo de queratinócitos, após terem sido irradiados, faz parte de uma das etapas de trabalho do plano de mestrado intitulado "Cultura Primária de Queratinócitos Bucais 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**

Esse trabalho visa o aprimoramento da técnica de cultivo dos fibroblastos, desde seu descongelamento, cultivo, irradiação e

semeadura pós irradiação, na sua utilização como camada de sustentação, para o posterior cultivo dos queratinócitos.

## **METODOLOGIA**

Esses fibroblastos murinos estavam acondicionados em meio próprio para congelamento, contendo: 10% de DMSO, 30% de soro fetal bovino e 60% de meio de cultura, em vials próprios para congelamento, com capacidade para 1,8 mL, em tambor contendo nitrogênio líquido à temperatura de -180°C. Essas células foram descongeladas e semeadas em garrafas próprias para cultivo celular, numa densidade de  $2,8 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Seu cultivo foi feito com DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), contendo 10% de soro fetal bovino, acrescido com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL), e enriquecido com glutamina (4 mM). Esse cultivo foi feito em uma incubadora própria, numa temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento desses fibroblastos foi observado diariamente sob microscópio de luz invertida. Assim que as células atingiram a sub-confluência (70% a 80% da garrafa), as mesmas foram retiradas da garrafa. Para a retirada das células foi utilizado uma solução de Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%, a qual irá agir durante 5 minutos. Quando as células estiverem desprendidas do fundo da garrafa, acrescenta-se ao conjunto a mesma quantidade de solução enriquecida com 10% de soro fetal bovino, acrescida de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). A função dessa solução é de neutralizar o efeito da enzima tripsina sobre as células. Após, todo o conteúdo foi colocado em um tubo próprio para centrifuga e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação e a aspiração do sobrenadante, as células que agora estavam no fundo do tubo formando um botão celular foram ressuspensas com o respectivo meio de cultura. Realizou-se em seguida a

contagem do número de células contidas no todo com o auxílio de uma câmara hemocitométrica. Após essa etapa essas células se encontravam prontas para ser irradiadas a 60 Gy, no irradiador de Cobalto-60 tipo Gammacell, que se encontra no prédio do CTR/IPEN. Posterior à irradiação, esses fibroblastos foram semeados novamente, desta vez numa densidade superior ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), para sua utilização como camada de sustentação para o cultivo dos queratinócitos. O objetivo desta segunda etapa de cultivo foi o cultivo dos queratinócitos, portanto o meio de cultura utilizado desta vez, foi um meio específico para a duplicação dessas células contendo reagentes específicos, portanto denominado "meio de crescimento de queratinócitos". Este conjunto fibroblastos/queratinócitos foi encubado a 37°C em ambiente úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Todos esses procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar e foram monitorados diariamente sob microscópio de luz invertida.

## RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados livre de qualquer contaminação. O rendimento da viabilidade desses fibroblastos pós-descongelamento foi em torno de 90%. Esses fibroblastos podem ser repicados, por pelo menos cinco passagens, mantendo dessa maneira uma camada de sustentação com qualidade para sua posterior utilização no cultivo dos queratinócitos. A imagem e a morfologia dessas células, com os queratinócitos já cultivados, estão mostradas na FIG. 1 e 2.

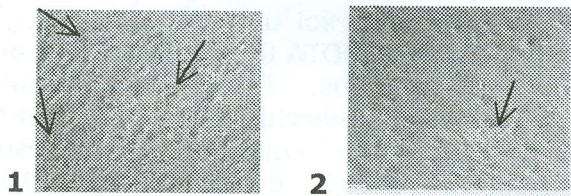


FIGURA 1 - Três colônias de queratinócitos no início do processo de duplicação. "Feeder-layer" com aspecto bastante favorável.

FIGURA 2 - Única colônia de queratinócitos em estágio de diferenciação avançado. "Feeder-layer" com aspecto comprometido devido vários dias em cultura.

## CONCLUSÕES

A utilização dos fibroblastos murinos irradiados como camada de sustentação, inicialmente proposto por Rheinwald e Green em 1975, demonstrou ser uma das principais contribuições para o cultivo dos queratinócitos, aumentando expressivamente a qualidade do mesmo. Foi observado que os fibroblastos depois de irradiados perdem a capacidade de se duplicar. Os mesmos continuam viáveis por alguns dias, sendo que nos primeiros dias, são capazes de liberar nutrientes para os queratinócitos.

## 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] 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.
- [3] Bodner, L.; Grossman, N.; Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: A clinical study. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 61: 1699-173, 2003
- [4] De Luca, M.; Albanese, E.; Megna, M.; Cancedda, R.; Mangiante, P. E.; Cadoni, A.; Franzi, A. T. Evidence that Human Oral Epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation*. Vol. 50(3), 454-9, 1990.
- [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