ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – BE06

INFLUÊNCIA DOS CANAIS DE CÁLCIO NA PROLIFERAÇÃO E CICLO CELULAR DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELEIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

W. D. C. GAIÃO¹, J. P. AGUIAR¹, G. J. B. ALBERTIM¹, M. B. SILVA¹, C. G. RODRIGUES¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Biofísica e Radiobiologia

E-mail para contato: wyndly@hotmail.com

RESUMO – Os canais iônicos têm importância fundamental na modulação e progressão do ciclo celular de diferentes linhagens de células. A importância dos canais de potássio na proliferação de células-tronco e cancerígenas já é conhecida, porém, a influência dos canais de cálcio neste processo ainda é elusiva. Desse modo, analisamos a influência dos canais de cálcio na proliferação e regulação do ciclo celular, das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton do cordão umbilical humano (WJ-MSCs). A obtenção das células foi realizada de acordo com a técnica da migração espontânea. Foram realizados ensaios de proliferação (contagem em câmara de Neubauer), ciclo celular (citometria de fluxo) e registros eletrofisiológicos (Técnica de Patch Clamp). A Nifedipina, um inibidor do canal de cálcio, diminuiu a taxa de proliferação das WJ-MSCs e aumentou de 53,3% para 91,5% a porcentagem das células na fase G0/G1 do ciclo celular. Além disso, as correntes iônicas características aos canais de cálcio foram inibidas em ~90% na presença de 4 μ M de Nifedipina. Portanto, a taxa de proliferação e o controle do ciclo celular das WJ-MSCs são reguladas via ativação dos canais de cálcio.

Palavras-chave: Canais iônicos. Citometria de fluxo. Patch-clamp.

ABSTRACT – Ion channels are of fundamental importance in the modulation and progression of the cell cycle of different cell lines. The importance of potassium channels in the proliferation of stem cells and carcinogens is already known, however, the influence of the calcium channels in this process is still elusive. Thus, we analyzed the influence of calcium channels on cell cycle proliferation and regulation of human umbilical cord Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs). The cells were obtained according to the technique of spontaneous migration. We performed: proliferation assays (counting in Neubauer chamber) cell cycle (flow cytometry) and electrophysiological records (Patch Clamp technique). Nifedipine a calcium channel inhibitor decreased the proliferation rate of WJ-MSCs and increased from 53.3% to 91.5% the percentage of cells in the G0 / G1 phase of the cell cycle. In addition, the ionic currents characteristic of the calcium channels were inhibited by ~90% in the presence of 4 μ M of

Nifedipine. Therefore, proliferation rate and cell cycle control of WJ-MSCs are regulated via activation of the calcium channels.

Key words: *Ion channels. Flow cytometry. Patch-clamp.*

1. INTRODUÇÃO

Os canais iônicos são proteínas transmembrana formadoras de poros que permitem o fluxo de íons devido ao gradiente de potencial eletroquímico, portanto, estão diretamente envolvidos em diversos processos como: propagação de biopotenciais, contração muscular, secreção hormonal e regulação do volume celular. Cada célula tem um conjunto de canais iônicos que atendem as necessidades e funções específicas (HILLE, 2001).

Adicionalmente, evidências indicam que os canais iônicos têm importância fundamental na modulação e progressão do ciclo celular de diferentes linhagens de células. A progressão normal do ciclo celular é uma tarefa fundamental para qualquer organismo multicelular, uma vez que determina a morfologia, renovação, reparação dos tecidos e senescência, assim, é um processo muito bem regulado pelo organismo. Sabe-se da importância dos canais de potássio na proliferação de células-tronco e cancerígenas, porém, a influência dos canais de cálcio neste processo ainda é elusiva (URREGO et al., 2016). As cascatas de sinalização intracelular via cálcio são bem conhecidas como reguladoras da proliferação em vários tipos celulares (KAWANO et al 2003; TAKEUCHI et al., 2007; LOECHNER et al., 2009; HATCHKISS et al., 2014). Desse modo, é provável que esse processo ocorra também nas células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton de cordão umbilical humano (WJ-MSCs).

As células-tronco podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas. A compreensão da regulação dos canais iônicos nessas células pode contribuir para o desenvolvimento de terapia celular e engenharia tecidual. Com essa perspectiva, analisamos a influência dos canais de cálcio, nas WJ-MSCs na proliferação e regulação do ciclo celular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de proliferação

Os cordões umbilicais foram doados voluntariamente por parturientes saudáveis, submetidas à cirurgia cesariana no hospital De Ávila (protocolo comitê de ética-25000.172291/2006-61). A obtenção das células foi realizada de acordo com a técnica da migração espontânea (MITCHELL et al., 2003). As células foram cultivadas em garrafas de cultura com meio Low DMEM (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), fator de crescimento (F12, Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) em incubadora a 37°C, 80% de umidade e 5% de CO₂. Utilizou-se uma câmara de Neubauer para a contagem das células durante três dias consecutivos. As células do grupo controle foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (5000 células/poço) em volume de 500 µL de meio Low DMEM (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), fator de crescimento (F12, Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). No grupo teste, as

células foram submetidas a 4 μ M de Nifedipina. A placa foi acomodada em incubadora a 37°C em 5% de CO₂ e 80% de umidade. Os experimentos foram realizados em triplicata e curva de proliferação celular foi plotada através do Origin (OriginLab.V8.1).

Ciclo celular

Após 48hs de expansão em garrafas de cultura de 25 cm², as células foram incubadas em meio sem (controle) ou com a Nifedipina. Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídio e a quantificação do conteúdo do DNA (ácido desoxirribonucléico) foi determinada através do citômetro BD Accuri C6. Analisou-se 10.000 eventos para cada amostra.

Registros eletrofisiológicos

Os registros eletrofisiológicos foram realizados nas WJ-MSCs na segunda passagem. As células em garrafas de cultura foram tripsinizadas (Trypsina+EDTA 0,25%), centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM. Posteriormente 1 mL deste meio foi adicionado em uma placa de Petri (40x10mm), e mantido em repouso por aproximadamente 15 minutos para a adesão das células ao fundo da placa. As correntes iônicas através da membrana plasmática foram registradas, como descritos por Hamill et al (1981). As micropipetas foram confeccionadas (resistência 3-5M Ω) com capilares (vidro/borosilicato) usando-se um puxador (Micropuller PP-830, Narishige). Todas as medidas foram realizadas na configuração whole-cell voltage clamp, utilizando um amplificador axopatch 200B (Molecular Devices). Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente (25 °C). Solução da micropipeta: CsCl, 140 mM; ATP, 2 mM; EGTA, 1 mM; HEPES, 10 mM. Solução externa (em mM): KCl, 5 mM; NaCl, 120 mM; CaCl₂, 2,5 mM; MgCl₂, 1 mM; HEPES, 10 mM; BaCl₂, 5 mM; TEA, 100 mM; TTX, 100 nM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da Proliferação e Ciclo Celular

Na figura 1A, demonstra-se o perfil de proliferação das WJ-MSCs na condição controle (em preto) e também sob a ação do inibidor Nifedipina (em vermelho), na concentração de 4 μ M. O potencial de proliferação das WJ-MSCs mostrou que o inibidor foi capaz de influenciar de forma significativa a diminuição da taxa de proliferação.

Figura 1 – Efeito da Nifedipina no perfil de proliferação e no ciclo celular das WJ-MSCs. **A.** Proliferação das WJ-MSCs na condição controle (preto) e sob a influência da Nifedipina, na concentração de 4 μ M (vermelho) (n =3). **B.** Influência da Nifedipina no Ciclo Celular.

No estudo de Hatochkiss e cols (2014) também foi observado que o aumento da dose de Nifedipina provocou uma diminuição da síntese de DNA da população de células progenitoras de cardiomiócitos. A Nifedipina também causou um bloqueio do ciclo celular das células corticotróficas de rato na prometáfase (LOECHNER et al., 2009). Para verificar se isso também ocorria nas WJ-MSCs, foi realizada a análise do ciclo celular através da citometria de fluxo, como mostrado na figura 1B. Observa-se que a porcentagem de células em G0/G1 passou de 53,3%, na condição controle, para 91,5% com a ação do inibidor.

Registros eletrofisiológicos

Para os registros eletrofisiológicos obtivemos regularmente uma população celular em que observamos uma morfologia em formato fusiforme (Figura 2A). As gravações eletrofisiológicas foram realizadas usando células em forma de esfera obtidas após o tratamento com tripsina-EDTA das culturas mostradas na Figura 2B. As correntes transmembranas foram induzidas por 500 milissegundos (ms) com um potencial de voltagem de -100 a +70 mV (incrementos de 5mV), partindo de um potencial de holding de -80 mV, conforme ilustrado na figura 2C. Os dados eletrofisiológicos mostram um perfil de corrente característico aos das correntes de cálcio no potencial de -65 mV (Figura 2C). Esses dados corroboram com os encontrados por Heubach e cols. em 2004 em células-tronco mesenquimais da medula óssea. Além disso, a cinética da corrente obtida é consistente com as correntes conduzidas por Ba^{2+} nos canais de Ca^{2+} do tipo L, também de outros tipos celulares. Na tentativa de isolar as correntes de entrada características de Ca^{2+} utilizamos o inibidor farmacológico Nifedipina. A corrente interna foi quase que totalmente inibida (~90%) (n=3) na presença de 4 μ M de Nifedipina (Figura 2D).

Figura 2 – Efeito da Nifedipina nas correntes de Cálcio. **A.** Micrografia das WJ-MSCs na segunda passagem aumento de 10x. **B.** Fotomicrografia da WJ-MSCs após o tratamento com tripsina-EDTA e 15 minutos de fixação no fundo da placa de Petri, com a micropipeta de patch clamp inserida na célula, aumento de 40X **C.** Corrente ativada em -65 mV, característica das correntes dos canais de cálcio do tipo L. **D.** Efeito de 4 μ M de Nifedipina na corrente de cálcio.

4. CONCLUSÃO

A taxa de proliferação e o controle do ciclo celular são regulados via ativação dos canais de cálcio, estacionando as células-tronco mesenquimais da geleia Wharton do cordão umbilical humano na fase G0/G1.

5. REFERÊNCIAS

HAMILL, O. P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers arch**, v. 391, p. 85-100, 1981.

HEUBACH et al. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. **J Physiol**. V. 554, p. 659-72, 2004.

HATCHKISS, A. et al. The effects of calcium channel blockade on proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. **Cell Calcium**, v. 55, n. 5, p. 238-251, 2014.

HILLE, B. Ion Channels of Excitable Membranes, Sinauer 3rd ed., Sunderland, MA, 2001. **Histochem.Cell Biol.**, 131(2): 267-282, 2009.

KAWANO, S. et al. Ca^{2+} oscillations regulated by Na^{+} - Ca^{2+} exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. **Cell Calcium**, v. 34, n. 2, p. 145-156, 2003.

LOECHNER, K. J. et al. Cell Cycle-Dependent Localization of Voltage-Dependent Calcium Channels and the Mitotic Apparatus in a Neuroendocrine Cell Line(A1T-20). **Int J Cell Biol**, v. 2009, p. 487959, 2009.

MITCHELL K.E., et al. 2003 Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. **Stem cells**, 21: 50-60.

TAKEUCHI, R. et al. Differences of cell growth and cell cycle regulators induced by basic fibroblast growth factor between nifedipine responders and non-responders. **J Pharmacol Sci**, v. 103, n. 2, p. 168-174, 2007.

URREGO, D. et al. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, p. 1-9, 2014.

WANG, H. S., et al., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells** 22:1330-1337.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Hospital De Ávila. Às parturientes voluntárias. Aos órgãos de fomento, FACEPE, UFPE e CNPQ.