

Efeito da mitomicina C sobre a viabilidade e ciclo celular de fibroblastos adultos bovinos após diferentes tempos de exposição

Carolina Marinho de Assunção, Ana Luiza Sousa Azevedo, Carolina Capobiango Romano Quintão, João Henrique Moreira Viana, Nádia Rezende Barbosa Raposo, Luiz Sérgio Almeida Camargo

Resumo

O efeito da mitomicina C sobre fibroblastos bovinos adultos (FBA) ainda não é conhecido. Assim, o objetivo do presente trabalho é o estabelecimento de um protocolo para inativação mitótica do FBA através da MMC. Fibroblastos foram tratados com MMC em diferentes tempos de exposição: 2, 3, 4 e 5 hrs. A análise do ciclo celular foi feita em fibroblastos fixados (etanol 70%) a 4°C durante 2,5 hrs, tratadas com RNase (100 µg/mL) e iodeto de propídio (IP) (50 µg/mL). A viabilidade foi avaliada em células não-fixadas coradas com IP (50 µg/mL) por 30 min a 37 °C. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo. A estatística foi feita por análise de variância e médias comparadas pelo teste de Student Newman Keus. Na análise do ciclo celular ocorre um aumento das fases S e G2 e diminuição de G1 em todos os tratamentos em relação ao controle negativo. O tratamentos 2 (30,64 ± 3,05; 42,42 ± 3,29), 3 (30,85 ± 4,31; 44,82 ± 4,24), 4 (29,79 ± 4,81; 47,38 ± 5,39) hrs não mostraram diferença entre si nas fase S e G1, respectivamente. O tratamento de 5 hrs apresentou a maior fase G1/G0 (51,342 ± 3,67) e menor S (22,576 ± 3,21). Em G2/M não houve diferença significativa entre os tratamentos. A droga diminuiu a viabilidade dos tratamentos em relação ao controle (93,592 ± 2,12), mas não há diferença entre os tempos 2 (89,67 ± 3,78), 3 (89,87 ± 2,07), 4 (88,28 ± 3,82), 5 (87,122 ± 2,52) horas. Os resultados mostram que a MMC inibe a proliferação celular de fibroblastos e também diminui a viabilidade dessas células.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, mitomicina C, fibroblasto, bovino, células-suporte.

Effect of mitomycin C on viability and cell cycle of bovine adult fibroblasts after different exposure times

Abstract

The effect of mitomycin C on adult bovine fibroblasts (FBA) is not yet known. The objective of this study was establish a protocol for mitotic inactivation of FBA by MMC. Fibroblasts were treated with MMC at different exposure times: 2, 3, 4, 5 hrs. The cell cycle analysis was done on fixed fibroblasts (70% ethanol) at 4 °C for 2.5 hrs, treated with RNase (100 mg/mL) and propidium iodide (PI) (50 mg/mL). The viability was evaluated in non-fixed cells stained with PI (50 mg/mL) for 30 min at 37 °C. The readings were measured by flow cytometry. The statistical analysis was performed by ANOVA and means compared by Student Newman Keus. In the analysis of the cell cycle an increase in S and G2 phases and a decrease of G1 in all treatments compared to control (without exposure to MMC). The second treatment (30.64 ± 3.05, 42.42 ± 3.29), 3 (30.85 ± 4.31, 44.82 ± 4.24), 4 (29.79 ± 4.81; 47.38 ± 5.39) hrs showed no difference between them in S phase and G1. Treatment of 5 hrs G1/G0 phase showed the highest (51.342 ± 3.67) and lower S (22.576 ± 3.21). In G2/M with no significant difference between treatments. The drug decreased the viability of the treatments compared to control (93.592 ± 2.12), but there is no difference between the two times of 2 (89.67 ± 3.78), 3 (89.87 ± 2.07), 4 (88.28 ± 3.82), 5 (87.122 ± 2.52) hours. The results show that MMC inhibits cell proliferation of fibroblasts and also diminishes the viability of these cells.

Keywords: Flow cytometry, mitomycin C, fibroblasts, bovine

Introdução

Atualmente, em bovinos a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) é a técnica mais utilizada na produção de animais transgênicos. Apesar disso, esta técnica ainda possui muitas dificuldades que levam a uma baixa eficiência de animais normais nascidos vivos. Uma alternativa à TNCS seria a utilização de células embrionárias bovinas (CTE-like) transfectadas substituindo as células somáticas na transferência nuclear. Estudos tem demonstrado que núcleos derivados de células embrionárias possuem maior potencial de produção de embriões clones do que os provenientes de células mais diferenciadas. Além disso, a taxa de mortalidade embrionária, fetal e peri-natal é maior nos embriões reconstituídos com núcleo de células somáticas (SAITO et al., 2003). Mas a derivação de CTE-like é um grande desafio, pois os protocolos de cultivo utilizados são muito divergentes e ineficientes. Uma forma de melhorar essa metodologia seria a utilização de células suporte espécie-específicas. Essas para serem utilizadas como *feeder cells*, tem que ser inativadas mitoticamente através da mitomicina ou irradiação gama. As formas de inativação são consideradas equivalentes e apesar de parar o ciclo celular mantém as células metabolicamente ativas permitindo a expressão de ligantes específicos e citocinas importantes para o desenvolvimento das células-tronco. A mitomicina C (MMC) é um agente antiproliferativo, que tem sido aplicado com sucesso em diversos tipos celulares utilizados como monocamada para cultivo de células-tronco embrionárias. Essa substância química possui ação direta sobre a molécula de DNA, impedindo sua replicação e podendo conseqüentemente causar citotoxicidade. Assim, no presente trabalho avaliamos o efeito da mitomicina C sobre o ciclo celular e viabilidade de fibroblastos bovinos adultos sob diferentes tempos de exposição à droga, com objetivo de determinar em qual tempo temos maior inativação e viabilidade. Desta forma estabeleceríamos um protocolo de inativação dessas células, visando sua aplicação como monocamada para CTE-like bovinas.

Material e Métodos

Para inativação as células foram descongeladas em banho-maria a 37 °C. Foi feita a remoção da solução de congelamento diluindo (1:10, v/v) no meio de cultivo e centrifugada a 18 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram feitas duas lavagens. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspendido em DMEM (Nutricell) acrescido de 10% SFB e 0,1% de antibiótico para o cálculo da concentração da suspensão celular. Posteriormente, foi feita a contagem das células em hemocitômetro de *Neubauer*; as células foram distribuídas nas placas de cultivo na concentração de 20 mil fibroblastos/mL em cada poço e cultivadas em estufa incubadora à temperatura de 38,5 °C, 5% de CO₂ e 95% umidade. Após as células atingirem 80% de confluência o meio de cultivo era retirado e substituído por um novo meio contendo 10 µg/mL de mitomicina C sendo submetidos a diferentes tempos de exposição 2, 3, 4, 5 horas e controle (sem exposição). As células dos diferentes tratamentos 12 horas após sua inativação foram tratadas com tripsina 0,1% e EDTA 0,05% por 3 a 5 minutos. Após as células desprenderem do fundo da placa, a tripsina foi inativada com DMEM com 10% SFB e 0,1% antibiótico e centrifugada para ser separada. As células foram divididas em dois grupos:

- 1. Ciclo celular:** Os fibroblastos foram ressuspendidos em etanol 70% para sua fixação, durante 2,5 horas a 4 °C. Após este tempo o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes em PBS. Em seguida, adicionamos 100 µl de RNase A (100 µg/mL; Sigma) durante 10 minutos. O iodeto de propídio (50 µg/mL; Sigma) deve ser acrescentado 5 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo sendo mantido em temperatura ambiente e protegido da luz. As células serão analisadas no FACS Calibur (Becton-Dickinson) em comprimento de onda 585 ± 42 nm. Nos parâmetros do histograma de DNA visualizamos as fases do ciclo celular G0/G1 (quantidade 2C de DNA), S (entre 2C e 4C) e G2/M (4C).
- 2. Viabilidade:** Os fibroblastos foram ressuspendidos com solução de IP 50 µg/mL em PBS e mantidas em banho-maria a 37 °C ao abrigo da luz. Após 30 minutos de incubação a leitura deve ser realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton-Dickinson) em comprimento de onda 585 ± 42 nm.

Os cultivos foram realizados em triplicata para cada repetição, em um total de três repetições. Os dados foram analisados no WinMDI 2.8 e a análise estatística foi feita por análise de variância e médias comparadas pelo teste de Student Newman Keus.

Resultados e Discussão

1. Ciclo celular:

Na análise estatística desses dados observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos picos G1 dos tratamentos 2 ($30,64\% \pm 3,05$), 3 ($30,85\% \pm 4,31$), 4 ($29,79\% \pm 4,81$), 5 ($51,342\% \pm 3,67$) horas, em relação ao controle ($77,24\% \pm 3,82$). Os tempos 2, 3 e 4 horas não se mostraram diferentes estatisticamente ($p > 0,05$). Mas o tratamento 5 apresentou uma maior quantidade de células em G1, sendo estatisticamente diferente dos outros ($p < 0,05$). Também verificamos um aumento significativo ($p < 0,05$) da porcentagem de células dos tratamentos na fase S em relação ao controle ($7,162\% \pm 2,27$). Esse apresentou uma quantidade de células 3 a 4 vezes menor do que os tratamentos 2 ($30,64 \pm 3,05$), 3 ($30,85 \pm 4,31$), 4 ($29,79 \pm 4,81$), ($22,576 \pm 3,21$). Entre os tratamentos o 2, 3, 4 horas foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$), e diferentes do tempo 5 horas ($p > 0,05$). Nas fases G2 também observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) dos picos dos tratamentos em relação ao controle ($10,77\% \pm 1,92$). Mas não houve diferença em os tratamentos 2 ($22,906 \pm 2,59$), 3 ($20,61 \pm 3,48$), 4 ($19,52 \pm 3,48$), 5 ($21,82 \pm 1,56$) horas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Acredita-se que a MMC seja capaz de inibir a divisão celular em qualquer fase do ciclo celular G1, G2 e S, mas que ela tenha uma preferência pela fase S e G2. No nosso trabalho observamos aumento significativo da porcentagem de células dos tratamentos nessas fases em relação ao controle. Esse aumento foi seguido de uma evidente diminuição da porcentagem de células em G1. O aumento das células em fase S em relação ao controle não pode ser caracterizado por um aumento da proliferação celular já que a mitomicina C é comprovadamente uma droga antiproliferativa. Também, se a MMC não tivesse provocado efeito sobre essas células não teriam diferença em relação ao controle. Desta forma, consideramos que houve um efeito inibitório da MMC parando as células principalmente nas fases S e G2. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos 2, 3, 4 horas. Mas o tempo de 5 horas apareceu com mais células em G1/G0 e menos células em S e G2. Assim pelo fato de haver uma maior quantidade de célula em S do tratamento 2 horas mostra que esse é mais eficiente.

Tabela 1. Comparação das médias das porcentagens de células distribuídas em cada fase do ciclo.

| Tratamentos | Fase G1 | Fase S | Fase G2 |
|-------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Controle | $77,24\% \pm 3,82^A$ | $7,162\% \pm 2,27^C$ | $10,77\% \pm 1,92^C$ |
| 2 horas | $42,42\% \pm 3,29^D$ | $30,64\% \pm 3,05^A$ | $22,91\% \pm 2,59^A$ |
| 3 horas | $44,82\% \pm 4,24^{CD}$ | $30,85\% \pm 4,31^A$ | $20,61\% \pm 3,48^{AB}$ |
| 4 horas | $47,38\% \pm 5,39^C$ | $29,79\% \pm 4,81^A$ | $19,52\% \pm 3,48^B$ |
| 5horas | $51,342\% \pm 3,67^B$ | $22,58\% \pm 3,21^B$ | $21,82\% \pm 1,56^{AB}$ |

Letras diferentes (A, B, C e D) dentro das colunas denotam diferença significativa. (ANOVA, $P < 0,05$)

2. Viabilidade celular

Através da análise dos dados observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de células viáveis em todos os tratamentos 2 ($89,67 \pm 3,78$), 3 ($89,87 \pm 2,07$), 4 ($88,28 \pm 3,82$), 5 ($87,122 \pm 2,52$) horas, em relação ao controle ($93,592 \pm 2,12$). Mas não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). (Tabela 2) A partir dos resultados observamos que a MMC apresentou efeito tóxico. Pois esta diminuiu a viabilidade das células, exibindo maiores quantidades de células em necrose e apoptose nos tratamentos. Mas apesar disso, não houve diferença na viabilidade entre os diferentes tempos de exposição testados. Mostrando que o tempo não teve na influência na toxicidade celular.

Tabela 2. Comparação das médias das porcentagens de células viáveis e não viáveis.

| Tratamentos | Viáveis | Não viáveis |
|-------------|--------------------------|-------------------------|
| Controle | 93,59±2,12 ^A | 6,41±2,12 ^B |
| 2 horas | 89,67±3,78 ^B | 10,3±3,82 ^A |
| 3 horas | 89,87±2,07 ^B | 10,13±2,07 ^A |
| 4 horas | 88,28±3,82 ^B | 11,72±3,82 ^A |
| 5horas | 87,122±2,52 ^B | 12,88±2,52 ^A |

Letras diferentes (A, B, C e D) dentro das colunas denotam diferença significativa. (ANOVA, P < 0,05)

Conclusão

- A mitomicina C inibe o ciclo celular.
- A mitomicina C causa citotoxicidade que independe do tempo de exposição.
- O melhor tempo foi o de 2 horas

Agradecimentos

Fapemig e CNPq

Referências

SAITO,S.; SAWAI,K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YAMAMOTO, Y HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S.; PAN, J.; MURATA, T.; KOBAYASHI, Y.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. K.; Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 309, p. 104–113, 2003.