



## AVALIAÇÃO DE CARDIOMIOBLASTOS H9c2 EM RESPOSTA AOS EFEITOS DELETÉRIOS DOS FATORES DO TUMOR DE WALKER-256

Maiara Caroline Colombero\*, Gabriela de Matuoka e Chiocchetti, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes.

Laboratório de Nutrição e Câncer, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, UNICAMP.

[colomberamaiara@gmail.com](mailto:colomberamaiara@gmail.com), [gmchiocchetti@gmail.com](mailto:gmchiocchetti@gmail.com), [cintgoma@unicamp.br](mailto:cintgoma@unicamp.br)

**Palavras-chave:** Caquexia, câncer, cardiomioblastos

### Resumo

Durante o câncer, o mecanismo de catabolismo proteico no músculo esquelético induzido pelo fator de indução de proteólise (PIF; ou também Fator Walker), produzido por tumores humanos e de animais experimentais, tem sido amplamente estudado quanto aos processos de sinalização celular e vias metabólicas envolvidas no processo de caquexia. As vias de degradação também podem ser ativadas pelas citocinas inflamatórias séricas, presentes devido à inflamação sistêmica característica deste quadro. Alterações cardíacas em pacientes com câncer-caquexia, denominada como “caquexia cardíaca”, vêm sendo amplamente observadas, porém frequentemente subestimada e pouco estudada. Assim, considerando as vias de sinalização e alterações do metabolismo celular, a investigação da proliferação/morte celular e viabilidade celular produzidos na vigência do câncer é de suma importância para elucidar pontos-chaves do processo de caquexia, principalmente no tecido cardíaco. Desse modo, o presente estudo visou avaliar em modelo *in vitro* (cardiomioblastos H9c2), os efeitos do líquido ascítico e do soro de ratos caquéticos portadores do tumor de Walker-256, os quais contêm fatores tumorais como Fator Walker e citocinas inflamatórias, mimetizando assim os efeitos do tumor de Walker-256, na proliferação/morte e viabilidade celular dos cardiomioblastos.

### Introdução

A síndrome de caquexia pode levar à atrofia cardíaca (Von Haehling *et al.*, 2010), proporcionando o estado de caquexia cardíaca, que é uma síndrome de prevalência metabólica que têm recebido devida atenção nos últimos anos. Está diretamente associada com a falha cardíaca, e é geralmente, associada ao diagnóstico pouco favorável (Anker *et al.*, 2002, Springer *et al.*, 2013).

Proteólise instalada no estado de caquexia, no caso do tecido cardíaco pode, portanto, promover a perda da função do coração (Torres *et al.*, 2003, Tian *et al.*, 2010), e com isso gerar a insuficiência cardíaca crônica. Em diferentes modelos experimentais de caquexia, foi evidenciada redução no peso do coração e diminuição na espessura da parede ventricular, na fração de ejeção cardíaca e na contratilidade ventricular (Springer *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2014). O tamanho do coração dos animais portadores de tumor é regido pelo balanço entre síntese e degradação de proteínas. A degradação das proteínas cardíacas é promovida pelas vias ubiquitina-proteossoma e pelas vias autofagia-lisossomal (catepsinas) e dependente de cálcio (Costelli *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2014; Cospér *et al.*, 2011), além da reduzida síntese de proteínas, que está associada à diminuição da fosforilação da mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) (Manne *et al.*, 2013). As vias ubiquitina-proteossoma, autofagia-lisossomal (catepsinas) e dependente de cálcio (calpaína) podem ser ativadas pelo fator indutor de proteólise (PIF) (Todorov *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2009), e

também pelo Fator Walker (FW), uma proteína de peso molecular de 24 kDa, imunologicamente análoga ao PIF, isolada a partir do líquido ascítico de ratos portadores do carcinossarcoma de Walker-256 (Yano *et al.*, 2008). Em estudos anteriores, foi observado que o FW apresentou efeitos *in vitro* semelhantes à atuação do PIF, em células de músculo esquelético C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, diminuindo a proliferação celular e induzindo o aumento da degradação proteica (Yano *et al.*, 2008, Gonçalves *et al.*, 2013).

Além de fatores tumorais, como o PIF e o FW, a inflamação sistêmica, característica do quadro de caquexia, acompanhada do aumento nos níveis de citocinas pro-inflamatórias séricas, pode ativar as vias de degradação proteica no músculo cardíaco, além de induzir também outras alterações (Murphy, 2016). Em nossos trabalhos prévios constatou-se em experimento *in vivo* que o câncer de fato causa, também, intenso prejuízo do músculo cardíaco (Toneto *et al.*, 2016).

Sabendo-se que o tumor de Walker-256 é um modelo experimental de caquexia, e que o soro dos animais caquéticos também contém FW, além de várias citocinas pro-inflamatórias, o presente estudo propôs avaliar os efeitos desses fatores sobre a proliferação e viabilidade de cardiomioblastos, mimetizando o estudo *in vivo*, partindo-se do pressuposto que a evolução tumoral causa prejuízos a diferentes tecidos/órgãos e principalmente ao coração.

## **Materiais e métodos**

Células H9c2, correspondentes a mioblastos isolados de músculo cardíaco de rato (*Rattus norvegicus*) foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino acrescido com antibióticos (100 U/mL de penicilina e 0.1 mg/mL estreptomicina), piruvato de sódio (1mM) e glutamina (2mM), sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 95% de umidade relativa.

Para a realização dos experimentos, as células H9c2 foram cultivadas em placas de 96 poços à densidade inicial de 1,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>.

Antes de atingir o estado de confluência, as células H9c2 (cardiomioblastos) foram tratadas com 5% de soro de animais portadores de tumor de Walker-256 (SW) e 5% de líquido ascítico de animais portadores de tumor de Walker-256 (A), no meio de cultura (DMEM com 1% penicilina, 1% glutamina e 1% piruvato, em 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>) por 48hs e, então, comparadas com o grupo controle padrão com 5% de soro fetal bovino (Controle), com o grupo exposto a 5% soro de animais saudáveis (SR), servindo de controle para o grupo SW, e com o grupo exposto a 5% de líquido ascítico inativado à 80°C durante 10 minutos (AI), que serviu de controle para o grupo A.

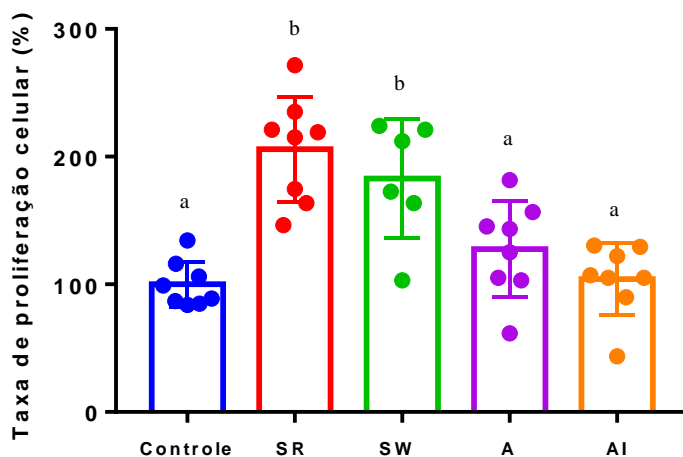
Para análise da proliferação foi realizado o ensaio de Cristal Violeta, técnica que consiste na coloração de proteínas celulares, principalmente nucleares. O resultado foi obtido através da absorbância (570nm), conforme metodologia descrita por Feoktistova, *et al.* (2016).

Para análise da viabilidade celular, foi realizado o ensaio de MTT, técnica que consiste em detectar as células metabolicamente ativas com base na atividade mitocondrial, o resultado foi obtido através da absorbância (570nm), conforme metodologia descrita por Cruz, *et al.* (2020). Para esta análise, foi acrescentado o grupo exposto ao Fator Walker na concentração de 10% (FW). O FW foi isolado a partir do líquido ascítico de animais portadores de tumor de Walker-256, conforme protocolo descrito por Yano *et al.* (2008).

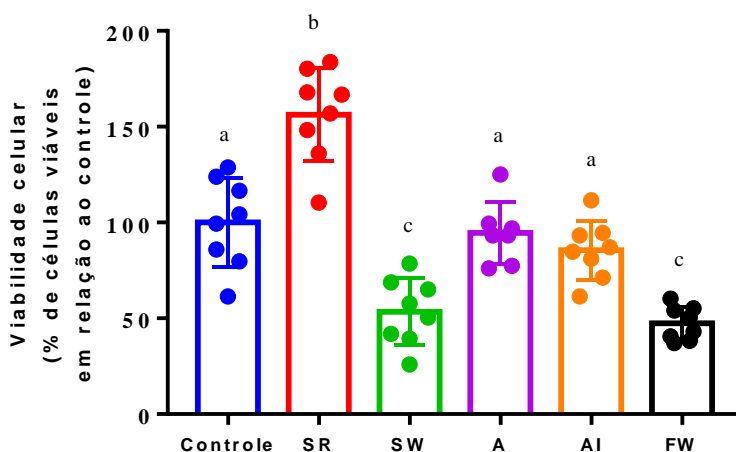
Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. As comparações estatísticas foram realizadas com a utilização do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni (Graph Pad Prism software, v 5.00 para Windows 2008, USA). A significância estatística foi considerada quando P < 0,05.

## Resultados e Discussão

Como mencionado, o quadro de caquexia cardíaca em decorrência do câncer é acompanhado do aumento nos níveis de citocinas inflamatórias séricas, além do que em ratos portadores de carcinossarcoma de Walker-256, os soros também contêm o FW. A escolha do uso do soro de ratos caquéticos, portadores de carcinossarcoma de Walker-256, e também do líquido ascítico, que também contém o FW, *in vitro*, foi pautada pelas respostas globais do hospedeiro em função dos resultados prévios do laboratório que mostram que a evolução tumoral não se restringe a um único fator, mas sim ao conjunto de atuação de vários fatores como o FW, citocinas pró-inflamatórias, fatores humorais e outros possíveis fatores tumorais, causando prejuízos a diferentes tecidos/órgãos e principalmente ao coração.



**Figura 1. Proliferação celular de cardioblastos H9c2 tratados por 48hrs.** Porcentagem de aumento (%) das células tratadas com SR (soro de rato saudável, 5%), SW (soro de rato portador de tumor de Walker-256, 5%), A (líquido ascítico, 5%) e AI (líquido ascítico inativado, 5%) em relação às células controle (Soro fetal bovino, 5%). Média  $\pm$  desvio padrão (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P < 0,05).



**Figura 2. Viabilidade celular de cardioblastos H9c2 tratados por 48hrs.** Porcentagem de aumento (%) da viabilidade das células tratadas com FW (Fator Walker, 10%), SR (soro de rato saudável, 5%), SW (soro de rato portador de tumor de Walker-256, 5%), A (líquido ascítico, 5%) e AI (líquido ascítico inativado, 5%) em relação às células do grupo Controle (Soro fetal bovino, 5%). Média  $\pm$  desvio padrão (n = 8). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05).

Assim, células H9c2 expostas ao SR e ao SW apresentaram maior proliferação, em relação às células dos grupos controle, A e AI (Figura 1). As células H9c2 incubadas com líquido ascítico (A ou AI) não apresentaram mudanças na viabilidade celular em relação às células controle, porém apresentaram diminuição da viabilidade em relação às células tratadas com SR (Figura 2). A incubação com FW promoveu diminuição da quantidade de células viáveis

(Figura 2). Agora, como proposta de análise, embora tenhamos observado proliferação celular, a incubação com SW reduziu drasticamente a viabilidade celular, quando comparado com as células controle e principalmente comparado as células incubadas com SR ( $P < 0,0001$ ), alcançando níveis de viabilidade celular semelhante ao FW ( $P = 0,6691$ ). Desse modo, embora o SW e SR aumentem, de maneira semelhante, a proliferação celular, o soro de rato caquético (SW) causou efeitos adversos à viabilidade celular.

## Conclusões

Embora o soro de ratos caquéticos portadores de tumor induzam à proliferação celular das células H9c2 de maneira semelhante ao respectivo controle, a viabilidade dessas células foi drasticamente reduzida, de maneira semelhante às células expostas ao Fator Walker em alta concentração, indicando que no soro de ratos caquéticos portadores de tumor contêm fatores somados ao FW que potencializam os efeitos adversos às células cardíacas.

## Agradecimentos



(2017/02739-4) e (2019/19779-4)

- 
- Anker, S. D., & Sharma, R. (2002). The syndrome of cardiac cachexia. *International journal of cardiology*, 85(1), 51-66.
- Borges, F. H., Marinello, P. C., Cecchini, A. L., Blegniski, F. P., Guarnier, F. A., & Cecchini, R. (2014). Oxidative and proteolytic profiles of the right and left heart in a model of cancer-induced cardiac cachexia. *Pathophysiology*, 21(4), 257-265.
- Cosper, P. F., & Leinwand, L. A. (2011). Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer research*, 71(5), 1710-1720.
- Costelli, P., De Tullio, R., Baccino, F. M., & Melloni, E. (2001). Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *British Journal of Cancer*, 84(7), 946-950.
- Cruz, B., Oliveira, A., Viana, L. R., Lopes-Aguiar, L., Canevarolo, R., Colomera, M. C., ... & Consonni, S. R. (2020). Leucine-Rich Diet Modulates the Metabolomic and Proteomic Profile of Skeletal Muscle during Cancer Cachexia. *Cancers*, 12(7), 1880.
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb-prot087379.
- Gonçalves, E. M., Salomão, E. M., & Gomes-Marcondes, M. C. C. (2013). Leucine modulates the effect of Walker factor, a proteolysis-inducing factor-like protein from Walker tumours, on gene expression and cellular activity in C2C12 myotubes. *Cytokine*, 64(1), 343-350.
- Manne, N. D., Lima, M., Enos, R. T., Wehner, P., Carson, J. A., & Blough, E. (2013). Altered cardiac muscle mTOR regulation during the progression of cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *International journal of oncology*, 42(6), 2134-2140.
- Murphy, K. T. (2016). The pathogenesis and treatment of cardiac atrophy in cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(4), H466-H477.
- Springer, J., Tschirner, A., Haghikia, A., Von Haehling, S., Lal, H., Grzesiak, A., ... & Hoher, B. (2014). Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *European heart journal*, 35(14), 932-941.
- Springer, J., Tschirner, A., Haghikia, A., Von Haehling, S., Lal, H., Grzesiak, A., ... & Hoher, B. (2014). Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *European heart journal*, 35(14), 932-941.
- Tian, M., Nishijima, Y., Asp, M. L., Stout, M. B., Reiser, P. J., & Belury, M. A. (2010). Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *International journal of oncology*, 37(2), 347-353.
- Todorov, P., Cariuk, P., McDevitt, T., Coles, B., Fearon, K., & Tisdale, M. (1996). Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*, 379(6567), 739-742.
- Toneto, A. T., Ferreira Ramos, L. A., Salomão, E. M., Tomasin, R., Aereas, M. A., & Gomes-Marcondes, M. C. C. (2016). Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 7(5), 577-586.
- Torres, M., & Forman, H. J. (2003). Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, 17(1-4), 287-296.
- von Haehling, S., & Anker, S. D. (2010). Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers.
- Wang, Q., Lu, J. B., Wu, B., & Hao, L. Y. (2010). Expression and Clinicopathologic Significance of Proteolysis-Inducing Factor in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Immunohistochemical Analysis. *Clinical lung cancer*, 11(5), 346-351.
- Yano, C. L., Ventrucci, G., Field, W. N., Tisdale, M. J., & Gomes-Marcondes, M. C. C. (2008). Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. *BMC cancer*, 8(1), 24.