

DOENÇAS CARDIOVASCULARES AGUDAS: ESTUDOS METABOLÔMICOS DE CÉLULAS MAMÍFERAS POR GC-MS

Palavras-Chave: Doenças Cardiovasculares, Metabolômica, Estresse Oxidativo

Autores/as:

Isabela Rocha (autora) (Universidade Estadual de Campinas)

Alan Gonçalves Amaral (co-autor) (Universidade Estadual de Campinas)

Prof.^a Dr.^a Aline Mara dos Santos (co-autora) (Universidade Estadual de Campinas)

Prof.^a Dr.^a Ana Valéria Colnaghi Simionato (orientadora) (Universidade Estadual de Campinas)

INTRODUÇÃO:

As doenças cardiovasculares (CVDs, do inglês *cardiovascular diseases*) têm sido uma das causas mais comuns de morte no mundo, sendo que, de acordo com um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, as CVDs, em conjunto com outras enfermidades que compõem o grupo de doenças não comunicáveis (NCDs, do inglês, *Non-Communicable Diseases*), foram responsáveis por cerca de 70% das mortes no mundo (41 milhões de óbitos).^[1,2]

A oxidação é um processo natural e consiste na transferência de elétrons de uma espécie para outra, sendo que, no organismo dos seres vivos, esses processos oxidativos ocorrem constantemente e muitos deles são essenciais para a manutenção do mesmo.^[3] No entanto, a produção excessiva crônica e aguda dessas espécies oxidantes reativas, em certas condições fisiopatológicas que envolvem fatores de risco, como por exemplo: tabagismo, hipertensão, diabetes, obesidade, entre outros, tem papel crítico no desenvolvimento de CVDs^[2].

Um dos principais problemas para o diagnóstico clínico deste tipo de doença é o aparecimento tardio de seus sintomas. Desta forma, a Associação Americana do Coração divulgou uma declaração em 2017, abordando

o impacto potencial da metabolômica na saúde e os desafios atuais de suas aplicações clínicas.^[4]

O termo metabolômica, introduzido em 2001 por Oliver Fiehn, é definido como uma análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico, tornando-se uma ferramenta poderosa para avaliar o fenótipo e correlacioná-lo com genes, estilo de vida, meio ambiente, fisiologia ou patologia, o que permite o avanço desta ciência na compreensão dos fundamentos moleculares associados às doenças^[4,5]. Entretanto, a mesma encara um grande desafio devido às inúmeras limitações, essencialmente ligadas a alta variabilidade de fatores biológicos (ou seja, sexo, idade e genética antecedentes, etnia, epigenética, microbioma e fatores ambientais) e metodológicos.^[4,6]

Novas tecnologias, tais como a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), surgem, portanto, como uma forma de expandir a capacidade de descrever o metaboloma e quantificar o fluxo metabólico através de suas vias a fim de rastrear o destino dos respectivos substratos.^[4] Entretanto, a cromatografia gasosa requer que os

componentes da amostra sejam voláteis e termicamente estáveis, mas como a maior parte dos metabólitos presentes em amostras biológicas não atende tais requisitos, é necessário realizar uma derivatização química dos mesmos. Desta forma, como em qualquer outro processo adicional, podem ocorrer perdas de metabólitos, como por volatilização, ou baixo rendimento de reação, o que limita o número de amostras a serem utilizadas. Por outro lado, em metabolômica, a técnica de GC-MS confere importantes vantagens, como alta eficiência de separação e existência de bibliotecas de espectros, atribuindo alta credibilidade na identificação dos metabólitos. [7]

METODOLOGIA:

O objetivo deste trabalho é realizar um estudo endometabolômico por CG-MS de células cardíacas da linhagem H9c2 cultivadas *in vitro* a fim de mimetizar as alterações causadas ao coração após passar por estresses oxidativos, utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para simular esse estresse. Esse estudo baseou-se numa condição patológica aguda, ou seja, as alterações que passam a ocorrer no coração logo após o estresse.

Inicialmente, a fim de proporcionar seu crescimento, as células foram transferidas para garrafas contendo meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com L-glutamina 2 mmol L^{-1} , piruvato de sódio 1 mmol L^{-1} , bicarbonato de sódio 1500 mg L^{-1} , glicose $1,0\text{ g L}^{-1}$, 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) e 1% (v/v) de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A linhagem foi mantida em uma estufa durante todo o processo de crescimento, com renovação do meio de cultivo a cada dois dias até atingir uma confluência de aproximadamente 70%. Posteriormente, foi realizada a adição de tripsina e 5% das células foram transferidas para uma nova garrafa.

As células da linhagem H9c2 se proliferam sem diferenciar, por isso, é necessária uma mudança nas condições de crescimento para que se tornem células cardíacas, ao invés de esqueléticas. Desta

forma, houve uma redução da porcentagem de FBS de 10% para 1% por 6 dias. [8,9]

A fim de determinar quais as concentrações e intervalos de tempo ideais para a realização do estresse com H_2O_2 foi realizado o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio), um teste colorimétrico utilizado para o estudo de citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular. [10] O composto MTT tem coloração amarela e ao reagir com enzimas mitocondriais, gera o Formazan, de coloração azul, cuja produção reflete o estado funcional (viabilidade) da cadeia respiratória celular. [11,12]

As células foram separadas em placas de 48 poços e tratadas em concentrações crescentes de H_2O_2 (25, 50, 75, 100, 200, 400 e $600\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) por intervalos de tempo pré-definidos (1, 4, 8, 12 e 24 horas). O MTT foi adicionado e após 3 horas de secagem em estufa a 37°C , a solução foi removida e os cristais de Formazan gerados foram solubilizados em uma solução de isopropanol acidificada com HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a placa foi transferida para um espectrofotômetro para leitura de absorbância realizada em uma faixa de comprimento de onda de 550 nm.

Para o preparo das amostras, os cardiomioblastos foram transferidos para placas de Petri e divididos em três grupos de amostras: nove saudáveis (controle) (Figura 1) e 18 de células que passaram por estresse oxidativo com H_2O_2 25 e $500\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (nove amostras para cada concentração) (Figura 2).

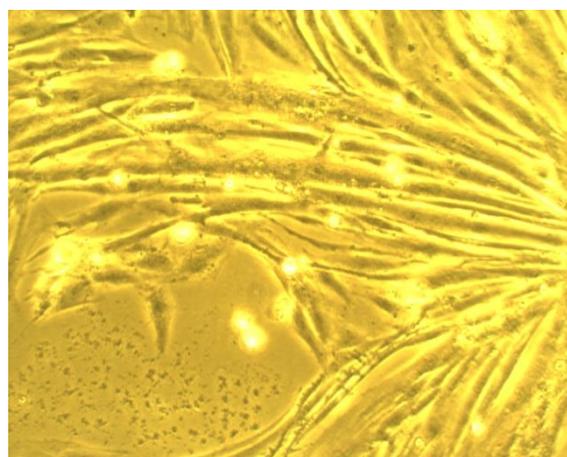


Figura 1. Células H9c2 saudáveis.

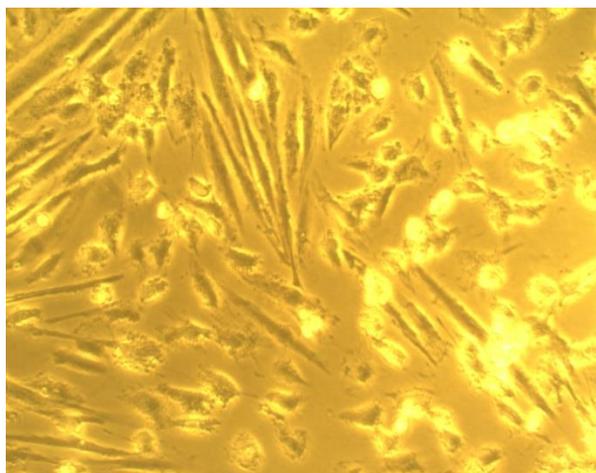


Figura 2. Células H9c2 após estresse oxidativo com H_2O_2 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Em seguida, o meio de cultura de cada uma das placas foi retirado e adicionou-se 1,2 mL de metanol (MeOH) gelado para realização da extração. Desta forma, as células foram levemente raspadas e as soluções contendo as células livres em MeOH foram transferidas para Eppendorfs, colocados em nitrogênio líquido por 10 minutos para um congelamento rápido e levados novamente para um banho de gelo por 10 minutos para um lento descongelamento.

As amostras foram centrifugadas a 5725 g numa temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo para a realização da etapa de secagem, em que as amostras foram concentradas por 2 horas.

A derivatização dos metabólitos para análise por GC-MS foi realizada em duas etapas: Metilação e Sililação, responsáveis por proteger os grupos polares a fim de aumentar a volatilidade dos compostos e sua estabilidade

térmica. As análises por GC-MS foram realizadas com uma coluna HP-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) e fase estacionária de baixa polaridade composta por 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano. Foi injetado $1 \mu\text{L}$ de amostra utilizando um injetor split/splitless operado em modo split (razão 10:1) usando hélio como fase móvel. A temperatura inicial do forno foi $60 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma rampa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir a temperatura final de $325 \text{ }^\circ\text{C}$, e a linha de transferência foi mantida a $290 \text{ }^\circ\text{C}$.

O scan no espectrômetro de massas foi realizado de 50,0 a 600,0 Da, e posteriormente, os cromatogramas obtidos foram tratados utilizando o software MSDial versão 4.38 (RIKEN PRIME) [13]. Os dados tratados foram submetidos às análises estatísticas PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) e PLS-DA (do inglês, *Partial Least Square Regression – Discriminant Analysis*), realizadas na plataforma MetaboAnalyst 5.0. [14]

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após a realização do teste de MTT, era esperado que conforme as concentrações de H_2O_2 , assim como o tempo de exposição, aumentassem, a viabilidade celular diminuiria. Tal tendência ocorreu apenas em 12 e 24 horas (Figura 3). No entanto, nota-se que em 24 horas, a redução da viabilidade ocorreu de forma gradual, chegando a 50% na concentração de $600 \mu\text{mol L}^{-1}$.

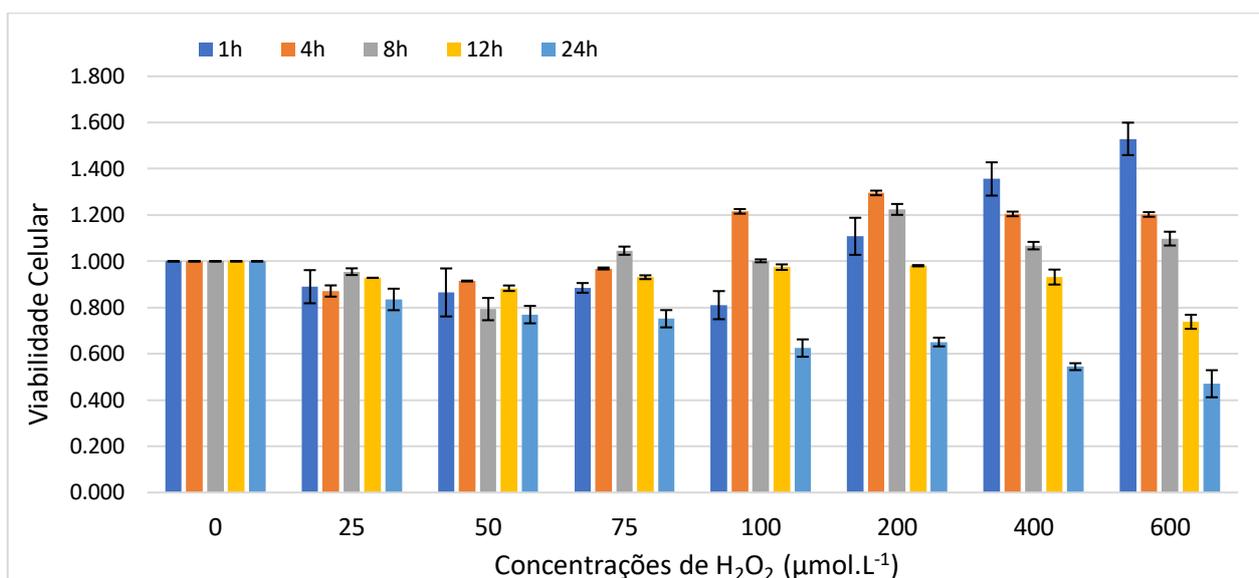


Figura 3. Resultados dos testes de MTT para avaliar a viabilidade celular nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 200, 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 nos tempos de 1, 4, 8, 12 e 24 horas de exposição.

Portanto, o tempo de 24 horas foi escolhido como tempo ótimo de exposição para a realização do experimento, sendo utilizadas as concentrações de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a fim de se obter um estresse em baixa e alta concentração, respectivamente. A concentração de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi escolhida por ser um valor intermediário entre os resultados obtidos com 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que se mostraram similares ao analisar os desvios padrão.

A análise por GC-MS do metaboloma intracelular foi realizada após finalização das etapas de crescimento e estresse das células. Desta forma, a fim de proceder com o tratamento dos dados, primeiramente foi feito um pré-processamento utilizando o software MSDial, onde foi realizada a suavização dos dados pelo método de Savitzky-Golay, assim como, filtragem dos dados do branco e alinhamento dos picos dos cromatogramas.

Em seguida, os dados foram inseridos no software online MetaboAnalyst 5.0 onde se estimou os valores faltantes utilizando kNN (*k-Nearest Neighbours*). Posteriormente, foram feitas tentativas de normalização e a que obteve melhor resultado foi a normalização pela

média e auto-escalamento. Para definir o melhor resultado, foi avaliado o comportamento dos QCs, que apresentaram um bom agrupamento com essa normalização (Figura 4). Entretanto, não foi obtido um bom agrupamento das amostras de cada grupo.

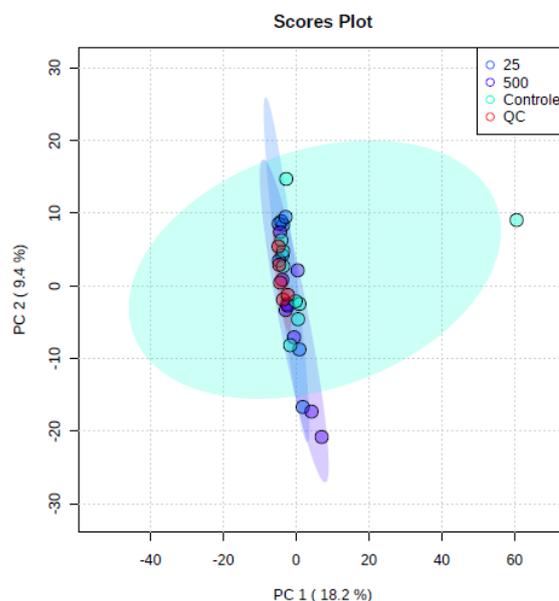


Figura 4. PCA a partir das componentes principais 1 e 2 das amostras.

Foi construído um modelo de PLS-DA, com os mesmos parâmetros descritos anteriormente, para determinar se os dados foram estatisticamente significativos a partir

dos valores de Q^2 e R^2 , sendo eles, 0,24821 e 0,98958, respectivamente.

O R^2 é o coeficiente de determinação, ou seja, ele expressa a quantidade de variância dos dados. Desta forma, quanto maior o R^2 , mais explicativo é o modelo (melhor se ajusta às amostras). Por outro lado, o Q^2 representa o potencial de predição, desta forma, o baixo valor de Q^2 obtido mostra que o modelo tem um baixo potencial de predição. Para se avaliar a significância estatística de Q^2 foi realizado um teste de permutação, obtendo um valor de $p = 0,965$. O elevado valor de p (superior a 0,05) mostra que o Q^2 não é estatisticamente significativo.

CONCLUSÕES:

Foram obtidos resultados promissores do uso de H_2O_2 para o estudo de células cardíacas, como os resultados do teste do MTT. No entanto, devido aos percalços ocasionados pela pandemia e o longo tempo sem uso do equipamento de GC-MS, demandando uma série de reparos, ainda não foi possível obter conclusões mais relevantes acerca do estudo.

Sendo assim, serão realizadas novas análises com novas amostras e outras adaptações, caso necessárias, para a finalização do trabalho até o prazo de entrega do relatório final.

BIBLIOGRAFIA:

[1] FATIMA, T. et al. Untargeted metabolomic analysis of coronary artery disease patients with diastolic dysfunction show disturbed oxidative pathway. **Metabolomics**, v. 15, n. 7, p. 1-12, 2019.
[2] AMIRI, M. P. et al. Metabolomics in early detection and prognosis of acute coronary syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 495, p. 43-53, 2019.
[3] PANTH, N.; PAUDEL, K. R.; PARAJULI, K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in Medicine**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

[4] MCGARRAH, R.W. et al. Cardiovascular Metabolomics. **Circulation Research**, v. 122, p. 1238–1258, 2018.
[5] ZUO, L.; ZHOU, T.; PANNELL, B. K.; ZIEGLER, A. C.; BEST, T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly. **Acta Physiologica**, v. 214, n. 3, p. 329-348, 2015.
[6] SCOLA, L. et al. On the road to accurate biomarkers for cardiometabolic diseases by integrating precision and gender medicine approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 6015, 2019.
[7] CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.
[8] PEREIRA, S. L. et al. Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation: Relevance for In Vitro Toxicity Studies. **Cardiovascular Toxicology**, v.11, p. 180-190, 2011.
[9] SUHAERI, M. et al. Cardiomyoblast (H9c2) Differentiation on Tunable Extracellular Matrix Microenvironment. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 11-12, 2015.
[10] FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combiner Targeted and Untargeted Profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, 114: 30.4.1-30.4.32, 2016.
[11] SCHERLIEß, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n.1-2, p. 98-105, 2011.
[12] STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.
[13] LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. **Nature Methods**, v. 15, p. 53-56, 2018.
[14] PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.