

INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO DO GENE *WFDC1* E DE SUA PROTEÍNA CODIFICADA (ps20) NO DESENVOLVIMENTO CARDÍACO E DOENÇAS RELACIONADAS A PARTIR DE PROTOCOLOS DE CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS DE EMBRIÕES DE GALINHA (*Gallus gallus*)

Palavras-Chave: “hipertrofia cardíaca”, “cultura celular”, “imunofluorescência”, “caracterização de expressão gênica”.

Autores(as):

Bento Silva Bergamaschi, IB, UNICAMP

Jórdan Fares Sampar, IB, UNICAMP

Thaís Metzker Pinto, IB, UNICAMP

Erika Track Martins, IB, UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Lucia Elvira Alvares, IB, UNICAMP

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (orientador), IB, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A cardiomiopatia hipertrófica é a doença cardíaca mais comum globalmente, com prevalência de 1 a cada 500 indivíduos (BORELLI et al., 2023). Essa patologia leva ao aumento no tamanho do coração, em decorrência do aumento no tamanho de suas células, os cardiomiócitos (BERENJI et al., 2005). Ainda, a hipertrofia cardíaca é caracterizada fisiopatologicamente por: hipertrofia assimétrica do ventrículo esquerdo, disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, obstrução no fluxo de saída dinâmico do ventrículo esquerdo, além do alto risco de arritmia e morte súbita (BORRELLI et al., 2023). Dada sua importância médica, a hipertrofia configura-se como um importante foco de estudos e investigações clínicas, que levaram a descobertas significativas quanto às suas bases genéticas e patogênicas, além da evolução clínica da doença (BORRELLI et al., 2023).

O gene *WFDC1* codifica a proteína estromal da próstata 20 (ps20), membro da família de proteínas ácidas de soro de leite estendida (WAP) (RESSLER & ROWLEY, 2011). A proteína ps20, assim como outras proteínas de sua família, é uma importante moduladora de processos inflamatórios e de reparo tecidual (RESSLER et al., 2014). Ainda, está envolvida na organização da matriz extracelular, no controle da angiogênese, além de outros processos celulares (SOLÍS-CALERO & CARVALHO, 2019).

Dados da literatura sugerem que a expressão do gene *WFDC1* é aumentada em cardiomiócitos de camundongos *in vitro* (DWYER et al., 2008) e no ventrículo esquerdo *in vivo* (LU et al., 2012), quando induzidos à hipertrofia cardíaca. Essas evidências levaram à hipótese de que *WFDC1* é importante para o desenvolvimento do sistema cardiovascular e de doenças relacionadas, especialmente na hipertrofia cardíaca, ainda que haja poucos estudos sobre sua função e mecanismos de atuação na literatura.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo de cultura primária de cardiomiócitos obtidos de embriões de galinha para a realização de estudos funcionais e a investigação do envolvimento e função do gene *WFDC1* na hipertrofia cardíaca.

METODOLOGIA:

Os cardiomiócitos foram extraídos de embriões de galinha incubados por 7-10 dias. Os embriões são decapitados, dissecados e retira-se os corações. O órgão é lavado, seguido pela remoção do pericárdio e dos vasos de grande influência e, posteriormente, triturado. Os fragmentos de tecido são tripsinizados (3-5 vezes de 8 minutos/cada), centrifugados (5 minutos a 200g) e faz-se o plaqueamento das células em placas de cultura de 35/60/100 mm² (expansão das células), garrafas de cultura (colorações), ou ainda em placas de 24 wells contendo lamínulas de 16 mm² (colorações/imunofluorescência). Os cardiomiócitos são incubados a 37°C, com suplementação de 5% de CO₂, em meio de plaqueamento: MEM (*Minimum Essential Medium*); 1% de L-glutamina; 1% de Penicilina/Estreptomicina 10.000 U/mL/10.000 mcg/mL; 5% de Soro Fetal Bovino). Após 24h, este é substituído pelo meio de crescimento, sem L-glutamina (MEM; 1% de Penicilina/Estreptomicina 10.000 U/mL/10.000 mcg/mL; 5% de Soro Fetal Bovino).

A eficiência dos protocolos de cultura celular é determinada pela proporção de cardiomiócitos em cultura, atestada por meio de duas técnicas distintas: 1) PAS e 2) Imunofluorescência. A primeira é a coloração por meio de Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS). Nela, 0,5g de ácido periódico são diluídos em 100 mL de água destilada, sendo adicionados 1 mL aos poços das placas por 10 minutos. Em seguida, faz-se a lavagem dos poços com água destilada e adiciona-se 1 mL do Reativo de Schiff por 15 minutos. Depois, os poços são novamente lavados com água destilada, e as lamínulas coradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos. Por fim, as lamínulas são lavadas mais uma vez. Os cardiomiócitos, dada a presença de grânulos de glicogênio, são as células coradas em cultura pela técnica, e adquirem uma cor roxa/violeta, ao passo que os fibroblastos, pela ausência do polissacarídeo, não são responsivos e, portanto, não adquirem coloração. A segunda técnica consiste em uma imunofluorescência utilizando anticorpos anti-desmina, uma proteína marcadora de fibras musculares. Os cardiomiócitos são as únicas células em cultura que expressam desmina, em comparação aos fibroblastos, sendo uma maneira adicional de confirmarmos a eficiência de nossos protocolos.

Após a confirmação da eficiência da cultura celular, os cardiomiócitos foram induzidos à hipertrofia por meio da adição do peptídeo vasoconstrictor endotelina-1 aos poços das placas de 24 wells. No frasco da endotelina-1, são adicionados 20 µL de ácido acético, e 1,5 µL dessa solução estoque é homogeneizada com 3 mL do meio de plaqueamento. Por fim, faz-se a adição de 400 µL da solução homogeneizada em cada poço da placa, a fim de que a concentração final da endotelina-1 seja de 100 nM por poço. A confirmação da hipertrofia é feita pela imunofluorescência e as imagens são analisadas no software Image J. É feita a comparação das médias das áreas celulares dos grupos de cardiomiócitos hipertrofiados e não hipertrofiados e, caso ocorra aumento significativo na média da área celular do primeiro, pode-se concluir que a indução ocorreu adequadamente.

Para as análises funcionais de *WFDC1*, foram realizados experimentos de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-*WFDC1*. As lamínulas são umedecidas com PBS 0,1M por 5 minutos, seguida pela adição da solução de bloqueio (BSA 0,1%, Triton 100x 0,1%, glicina a 50 mM e PBS a 0,1 mM) por 1h. Depois, são realizadas 3 lavagens de 3 minutos cada com a solução de trabalho (solução bloqueio/PBS 0,1 mM, 1:5), seguida pela incubação *overnight* de 10 µL (em cada poço) do anticorpo primário anti-*WFDC1* (*rabbit*) na proporção 1:300 diluídos em solução de trabalho, a 4°C. No dia seguinte, faz-se a incubação de 10 µL do anticorpo secundário (Alexa Fluor anti-*rabbit*) na proporção 1:400 em solução de trabalho, além da contramarcagem do núcleo utilizando

10 µL de DAPI, e de fibras de actina com 10 µL de Faloidina Alexa Fluor 647. O imageamento foi realizado em um microscópio confocal de fluorescência com alta resolução (Airyscan), localizado no Instituto Nacional voltado à aplicação da fotônica à Biologia Celular (INFABiC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na Figura 1, nota-se, em aumentos de 10x, 20x e 40x, que a maioria das células foi corada após a coloração PAS. As setas pretas em D, E, F, H e I na Figura 1 evidenciam a coloração ideal adquirida pelos cardiomiócitos. A Figura 2 indica os resultados obtidos na imunofluorescência, destacando a marcação celular com a proteína desmina. Desse modo, podemos concluir que a maioria das células em cultura são cardiomiócitos e que nosso protocolo de cultura celular primária é eficiente. Ainda, observamos que o protocolo foi facilitado e se demonstrou mais eficiente ao utilizarmos embriões com 10 dias de desenvolvimento para a extração dos corações.

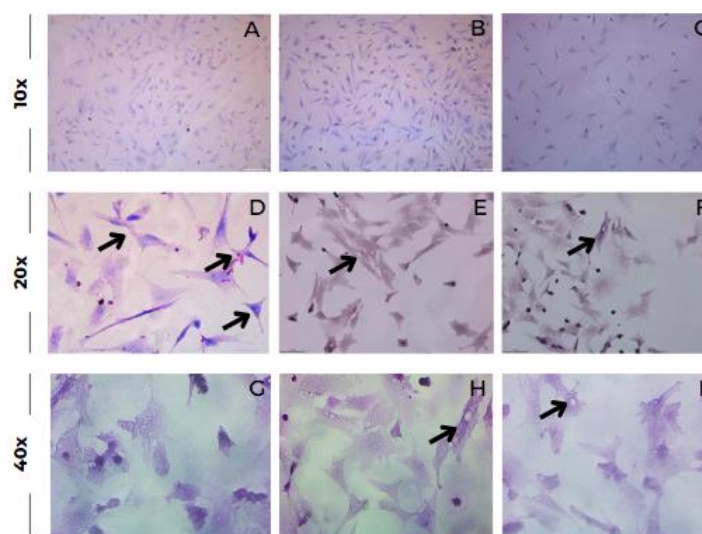


Figura 1: Coloração PAS em cardiomiócitos de embriões de galinha com 10 dias de desenvolvimento. Aumentos de 10x (A-C), 20x (D-F) e 40x (G-I). As setas pretas em D, E, F, H e I indicam a cor roxa/violeta ideal adquirida pelos cardiomiócitos após a técnica.

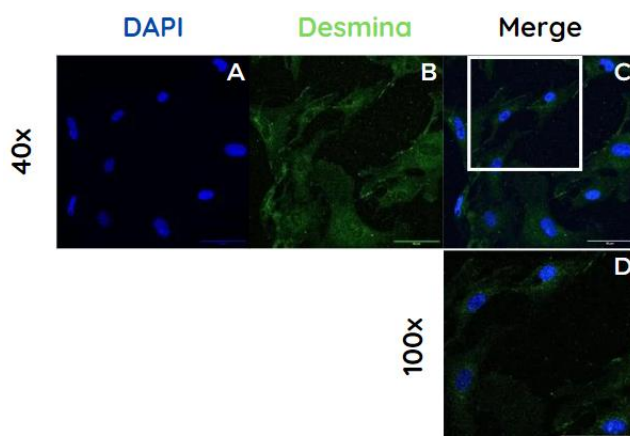


Figura 2: Imunofluorescência da proteína desmina, (B, em verde) em cardiomiócitos de embriões de galinha com 10 dias de desenvolvimento. Os núcleos das células foram contramarcados com DAPI (A, em azul). Aumentos de 40x (A-C) e 100x (D). As imagens mescladas podem ser visualizadas em C e D (aumento de 40x e 100x, respectivamente).

Na Figura 3, temos a imunofluorescência da proteína ps20, codificada pelo gene *WFDC1* (em verde, 3C e 3G), em cardiomiócitos hipertrofiados (3A-3D) e não hipertrofiados (3E-3H) de embriões de galinha com 10 dias de desenvolvimento. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (em azul, 3A e 3E) e os filamentos de

actina pela Faloidina conjugada a Alexa Fluor 647 (em vermelho, 3B e 3F). Em 3D e 3H, as imagens estão com todas as marcações sobrepostas. Pode-se notar um aumento significativo na marcação de ps20 nos cardiomiócitos hipertrofiados (3C) em relação ao grupo controle (3G). Dessa forma, supomos que houve uma maior expressão do gene *WFDC1* em cardiomiócitos hipertrofiados tratados com endotelina, porém uma análise de qRT-PCR necessita ser feita para a confirmação. Ainda, é possível notar que a proteína distribui-se em pequenos grânulos localizados desordenadamente ao longo do citoplasma da célula. Dados da literatura sugerem que essa proteína é secretada intracelularmente e, posteriormente, para a matriz extracelular (ALVAREZ et al., 2008). Porém, não é possível afirmar se, em nossas imagens de imunofluorescência, os grânulos da proteína ps20 estão localizados na matriz extracelular, havendo a oportunidade para investigarmos essa possibilidade.

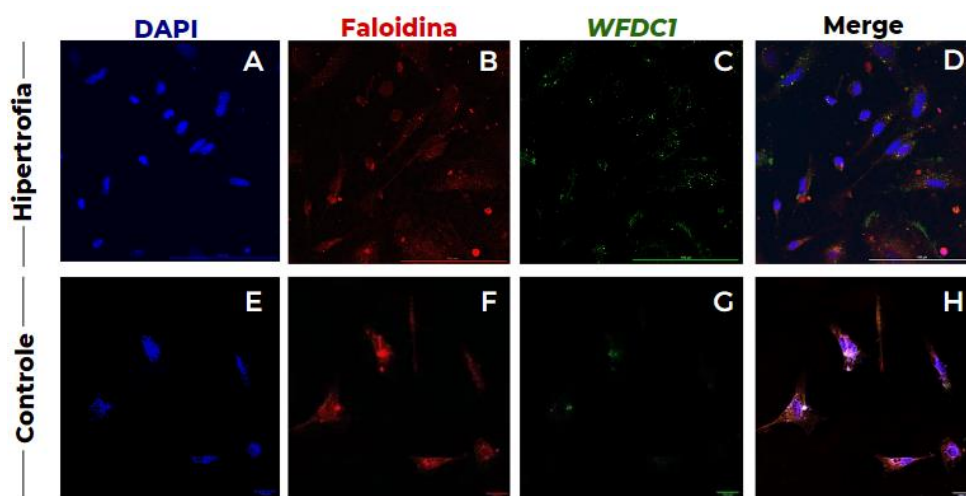


Figura 3: Imunofluorescência de ps20, a proteína codificada pelo gene *WFDC1* (C e G, em verde), em cardiomiócitos hipertrofiados (A-D) e não-hipertrofiados (E-H) de embriões de galinha incubados por 10 dias. A contramarcação dos núcleos das células foi feita com DAPI (A e E, em azul), e os filamentos de actina marcados com Faloidina Alexa Fluor 647 (B e F, em vermelho). As imagens sobrepostas podem ser visualizadas em D e H.

CONCLUSÕES:

O presente trabalho identificou um possível aumento na expressão de *WFDC1* em cardiomiócitos de embriões de galinha de 10 dias de desenvolvimento hipertrofiados. Em concordância com dados da literatura, os resultados sugerem que o gene *WFDC1* e sua proteína codificada (ps20) podem desempenhar um papel no desenvolvimento do sistema cardiovascular e na hipertrofia cardíaca. Porém, os mecanismos pelo qual essa molécula atua nesse contexto permanecem desconhecidos. Desse modo, estudos e experimentos adicionais e complementares aos apresentados são necessários para confirmar o envolvimento de *WFDC1* no desenvolvimento cardíaco e de doenças cardíacas relacionadas.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez R, Reading J, King DF, Hayes M, Easterbrook P, Farzaneh F, Ressler S, Yang F, Rowley D, Vyakarnam A. *WFDC1/ps20* is a novel innate immunomodulatory signature protein of human immunodeficiency virus (HIV)-permissive CD4+ CD45RO+ memory T cells that promotes infection by upregulating CD54 integrin expression and is elevated in HIV type 1 infection. **J Virol.** 2008 Jan;82(1):471-86. doi: 10.1128/JVI.00939-07. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17942534; PMCID: PMC2224370;
- Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2005 Jul;289(1):H8-H16. doi: 10.1152/ajpheart.01303.2004. PMID: 15961379;
- Borrelli F, Losi MA, Canciello G, Todde G, Perillo EF, Ordine L, Frisso G, Esposito G, Lombardi R. Sarcomeric versus Non-Sarcomeric HCM. **Cardiogenetics.** 2023, 13, 92-105. <https://doi.org/10.3390/cardiogenetics13020009>;
- Clark WA. Selective control of fibroblast proliferation and its effect on cardiac muscle differentiation in vitro. **Developmental Biology.** v. 52, n. 2, p. 263–282, set. 1976;
- Dehaan RL. Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. **Developmental Biology.** v. 16, n. 3, p. 216–249, set. 1967;

Dwyer J, Ritchie M, Smyth G et al. Myocardial Gene Expression Associated with Genetic Cardiac Hypertrophy in the Absence of Hypertension. **Hypertens Res.**, Volume 31, p. 941–955 (2008). <https://doi.org/10.1291/hypres.31.941>;

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49–92, jan. 1951;

Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. **Circ Res.** 2004 Mar 5;94(4):453-61. doi: 10.1161/01.RES.0000117070.86556.9F. Epub 2004 Jan 15. PMID: 14726474;

Larsen M, Ressler SJ, Gerdes MJ, Lu B, Byron M, Lawrence JB, Rowley DR. The WFDC1 gene encoding ps20 localizes to 16q24, a region of LOH in multiple cancers. **Mamm Genome.** 2000 Sep;11(9):767-73. doi: 10.1007/s003350010135. PMID: 10967136;

Lu B, Yu H, Zwartbol M., Ruirok WP., van Gilst WH., de Boer RA., Silljé HHW. Identification of hypertrophy- and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models. **Physiological Genomics**, Volume 44, Issue 8, 2012. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00148.2011>;

Martinsen BJ. Reference guide to the stages of chick heart embryology. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 4, p. 1217–1237, 28 jun. 2005;

Namdari M, Eatemadi A, Negahdari B. Natriuretic peptides and their therapeutic potential in heart failure treatment: An updated review. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 2016 Sep 30;62(11):1-7. PMID: 27755944;

Neubauer S, Kolm P, Ho CY, Kwong RY, Desai MY, Dolman SF, Appelbaum E, Desvigne-Nickens P, DiMarco JP, Friedrich MG, Geller N, Harper AR, Jarolim P, Jerosch-Herold M, Kim DY, Maron MS, Schulz-Menger J, Piechnik SK, Thomson K, Zhang C, Watkins H, Weintraub WS, Kramer CM; HCMR Investigators. Distinct Subgroups in Hypertrophic Cardiomyopathy in the NHLBI HCM Registry. **J Am Coll Cardiol.** 2019 Nov 12;74(19):2333-2345. doi: 10.1016/j.jacc.2019.08.1057. PMID: 31699273; PMCID: PMC6905038;

Ressler SJ, Dang TD, Wu SM, Tse DY, Gilbert BE, Vyakarnam A, Yang F, Schauer IG, Barron DA, Rowley DR. WFDC1 is a key modulator of inflammatory and wound repair responses. **Am J Pathol.** 2014 Nov;184(11):2951-64. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.013. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25219356; PMCID: PMC4215025;

Ressler SJ, Rowley DR. The WFDC1 gene: role in wound response and tissue homeostasis. **Biochem Soc Trans.** 2011 Oct;39(5):1455-9. doi: 10.1042/BST0391455. PMID: 21936833;

Solis-Calero C, Carvalho HF, Phylogenetic, molecular evolution and structural analyses of the WFDC1/prostate stromal protein 20 (ps20). **Gene**, Volume 686, 2019, p. 125-140. ISSN 0378-1119. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.046>;

Veiga FCD. **Análise da regulação gênica e expressão de Dact1 no desenvolvimento da musculatura esquelética de amniotos**: Analysis of Dact1 gene regulation and expression in the development of the amniotes skeletal muscle. 2020. 1 recurso online (205 p.) Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. 2020. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/2930>. Acesso em: 2 mai. 2023;

Vilches-Moure JG. Embryonic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a Model of Cardiac Biology and Development. **Comp Med.** 2019 May 1;69(3):184-203. doi: 10.30802/AALAS-CM-18-000061. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31182184; PMCID: PMC6591676;

Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2011 Feb;47(2):125-31. doi: 10.1007/s11626-010-9368-1. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21082279;

Wittig JG., Münsterberg A. The Chicken as a Model Organism to Study Heart Development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a037218, 25 nov. 2019;

Woodcock EA, Matkovich SJ. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 9, p. 1746–1751, set. 2005.