

Caracterização da função de WFDC1/ps20 no desenvolvimento cardíaco a partir de ensaios funcionais em uma cultura primária de cardiomiócitos de embriões de galinha (*Gallus gallus*)

Palavras-Chave: WFDC1, cultura celular, peptídeos miméticos.

Autores/as:

Bento Silva Bergamaschi, IB, UNICAMP

Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares, IB, UNICAMP

Jórdan Fares Sampar, IB, UNICAMP

Erika Track Martins, IB UNICAMP

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

INTRODUÇÃO:

O gene WFDC1 codifica a proteína estromal da próstata 20 (ps20), que é um membro da família de proteínas ácidas de soro de leite estendida (WAP). Dentre as funções conhecidas dessa molécula, pode-se citar seu envolvimento na organização da matriz extracelular, no controle da angiogênese (SOLÍS-CALERO e CARVALHO, 2019), além de responsável pela migração de células endoteliais e estabilização dos pericitos, necessários para a formação de estruturas vasculares funcionais (MCALHANY et al., 2003). Dados da literatura sugerem que a expressão de WFDC1 é aumentada em cardiomiócitos de camundongos em cultura (DWYER et al., 2008) e no ventrículo esquerdo também de camundongos (LU et al., 2012) induzidos à hipertrofia cardíaca. A partir dessas evidências, surge a hipótese de que este gene, e sua proteína codificada, poderiam estar envolvidos no desenvolvimento do sistema cardiovascular e de suas doenças relacionadas, especialmente no caso da hipertrofia cardíaca. Porém, as funções e mecanismos pelos quais

WFDC1/ps20 atuam nesse contexto permanecem desconhecidos. Desse modo, foi proposto que essas funções e mecanismos fossem elucidados, a partir de uma cultura primária de cardiomiócitos obtidos de embriões de galinha e ensaios funcionais do gene WFDC1 e da proteína ps20 nesse sistema. Para tal, foi feita a diluição de três peptídeos miméticos da proteína ps20 em cultura, em diferentes concentrações, para análise de sua função na área celular e fenótipo dos cardiomiócitos em cultura.

METODOLOGIA:

1. PROTOCOLO DE CULTURA PRIMÁRIA

Os embriões de galinha foram obtidos a partir de ovos fertilizados incubados por 10 dias, em uma chocadeira rotativa J-130 (JMM chocadeiras LTDA, Franca, Brasil), mantida à temperatura de 38,5° C, e com umidade aproximada de 80%. Os embriões são coletados, dissecados em placas de petri em solução salina balanceada de Hank (HBSS), decapitados e têm seus corações removidos. Os corações são, então, lavados, também em HBSS, e faz-se a remoção do pericárdio e trituração dos tecidos remanescentes.

Os tecidos triturados são centrifugados, e dá-se início ao processo de tripsinização dos mesmos. Todos os ciclos de tripsinização são feitos em banho maria, à temperatura de 37° C, e a tripsina à concentração de 10%. São feitos 3-5 ciclos, com 8 minutos cada, e o sobrenadante resultante de cada ciclo é incorporado a 20 mL de meio de plaqueamento gelado. Este, por sua vez, é composto de: 46,5 mL 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. Ao final dos ciclos, a mistura é centrifugada em rotação média por 10-15 minutos, o sobrenadante descartado, e o *pellet* ressuspensão em 4 mL de meio de plaqueamento gelado. A suspensão é filtrada, as células contadas em um hemocitômetro, e plaqueadas em placas de 24 Wells contendo lamínulas de 16 mm², e cultivadas *overnight* em uma incubadora suplementada por 5% de CO₂, com ambiente úmido e à 37° C. No dia seguinte, o meio de plaqueamento é substituído por um meio de crescimento, preparado a partir de: 47 mL de MEM; 1% de Penicilina/Estreptomicina 10.000 U/mL/10.000 mcg/mL; 5% de Soro Fetal Bovino (protocolo elaborado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento - LBD).

2. DILUIÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM CULTURA

Oito peptídeos foram sintetizados pela empresa PEPMIC, a partir do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das proteínas ps20 de humanos, camundongos e galinhas (Clustal 2.1: ferramenta utilizada para alinhamento). Dentre estes oito, três peptídeos foram selecionados para as análises do resumo em mãos: o primeiro, com a sequência

ARCQADSECPRHRRCCYNGCAYACLEA, se sobrepõe ao domínio WAP/WFDC (DRCPPTLPPGACQAARCQADSECPRHRRCCYNGCAYACLEA) de WFDC1; o segundo também se sobrepõe ao domínio WAP/WFDC, mas sua sequência

(RLGCHEYSPARYCRCQNAADACCRCE) está embaralhada, agindo como “controle negativo” e par do primeiro; o terceiro (WLVQPKPRWLGGNGWLLDGPEEVLQAE) compreende uma parte centralizada de ps20, que é 100% conservada entre os 3 animais.

Os peptídeos foram diluídos em água DEPC ou DMSO, a depender de sua composição. A partir dessa solução estoque, os peptídeos são diluídos em meio de cultura e, então, transferidos para as placas de cultura. Foram testadas diferentes concentrações para os três peptídeos, sendo estas: 1 nM, 3.3 nM, 10 nM, 33 nM, 100 nM, 330 nM e 1000 nM (1 µM). Feita a transferência para as placas de cultura, os cardiomiócitos foram incubados por 24h, para ação dos peptídeos. Os efeitos de cada peptídeo no desenvolvimento, fenótipo e diferenciação dos cardiomiócitos foram acompanhados, sendo realizado o registro e caracterização dos mesmos.

3. COLORAÇÃO PAS (ÁCIDO PERIÓDICO-REATIVO DE SCHIFF)

Primeiramente, dilui-se 0,5g de ácido periódico em 100 mL de água destilada e adiciona-se 1 mL dessa diluição a cada poço das placas de cultura- com lamínulas e células fixadas- por 10 minutos. Em seguida, os poços são enxaguados com água destilada e adiciona-se 1 mL do Reativo de Schiff por 15 minutos. Depois, adiciona-se 1 mL de bissulfito de sódio por 9 minutos, à uma diluição de 0,5% (0,5g em 100 mL de água destilada). Os poços são, então, lavados com água destilada por 5 minutos e as lamínulas coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Para a montagem das lâminas, as lamínulas são lavadas com PBS 0.1M, enxugadas delicadamente com papel e posicionadas sobre pequenas gotas de Entellan em lâminas de microscopia (protocolo elaborado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento - LBD). Após a coloração, a área celular dos cardiomiócitos é medida com auxílio do software Image J, realizando

a comparação da média da área celular de cardiomiócitos induzidos à ação de cada concentração de cada peptídeo com um grupo controle (sem ação de peptídeos em cultura). Ainda, a morfologia/fenótipo das células foi analisada, com o registro de qualquer alteração em relação ao grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

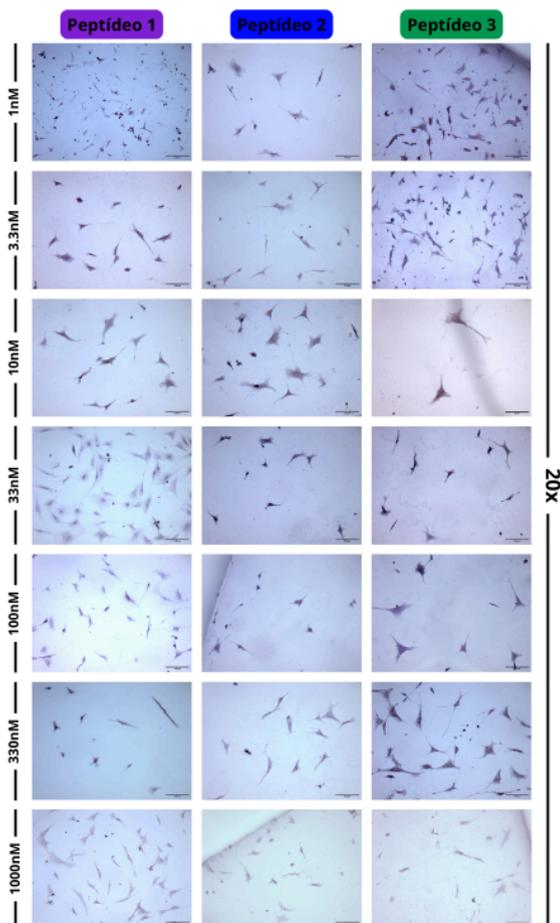
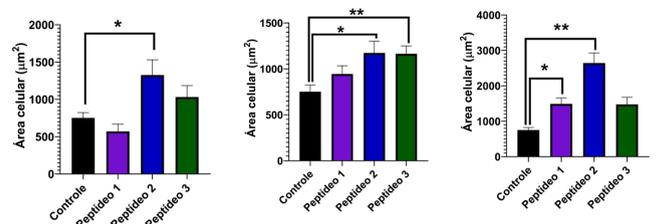


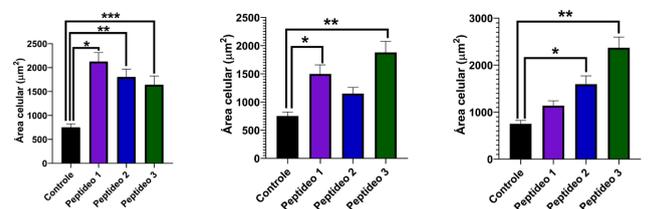
Figura 1. Painel 1: Coloração de Ácido Periódico- Reativo de Schiff (PAS) em cardiomiócitos de 10 dias de incubação em cultura, sob efeito dos peptídeos 1, 2 e 3. Cada linha representa uma concentração (1nM, 3.3nM, 10nM, 33nM, 100nM, 330nM e 1000nM) dos peptídeos administrada sobre a cultura. Todas as fotos foram obtidas com lente objetiva no aumento de 20x. Ainda, barras de escalas de 100µm foram representadas em todas as imagens.

Nos protocolos de coloração PAS (**Figura 1**), os cardiomiócitos são as células em cultura positivas à técnica, ao passo que os fibroblastos são negativos. Isso deve-se ao fato de que há a deposição de grânulos de glicogênio no citoplasma dessas células que, na presença dos reagentes

utilizados na técnica, adquirem uma coloração magenta/arroxada (MILUTINOVIĆ e ZORC-PLESKOVIĆ, 2012). Assim, essa técnica é utilizada para averiguação da eficiência dos protocolos de cultura celular, além de auxiliar nas medições de área celular dos cardiomiócitos. Na **Figura 1**, tem-se a prancha com os resultados da coloração PAS, na qual cada coluna representa cardiomiócitos induzidos à ação de cada peptídeo, e cada linha representa uma concentração utilizada para a diluição dos mesmos. Todas as imagens foram obtidas em um microscópio de campo claro convencional, com aumento de 20x na lente objetiva.



Figuras 2, 3 e 4: Gráficos de barra das áreas celulares (em µm²) de cardiomiócitos de 10 dias sob efeito da administração dos peptídeos 1, 2 e 3 em cultura, em comparação ao grupo controle (sem administração de qualquer peptídeo). As figuras referem-se, respectivamente, às concentrações de 1nM, 3.3nM e 10nM dos peptídeos na cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também foram representados. Ainda, os símbolos * e ** indicam uma diferença estatisticamente significativa (p<0.05) entre a média das áreas celulares dos cardiomiócitos sob ação de certo peptídeo e a média do grupo controle.



Figuras 5, 6 e 7: Gráficos de barra das áreas celulares (em µm²) de cardiomiócitos de 10 dias sob efeito da administração dos peptídeos 1, 2 e 3 em cultura, em comparação ao grupo controle (sem administração de qualquer peptídeo), referentes à concentração de 1000nM dos peptídeos na cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também foram representados. Ainda, os símbolos * e ** indicam uma diferença estatisticamente significativa (p<0.05) entre a média das áreas celulares dos cardiomiócitos sob ação de certo peptídeo e a média do grupo controle.

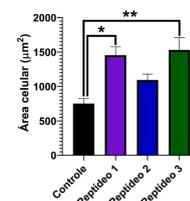
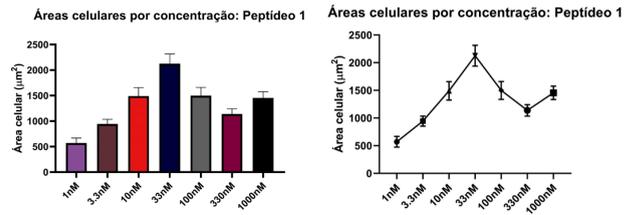


Figura 8: Gráficos de barra das áreas celulares (em µm²) de cardiomiócitos de 10 dias sob efeito da administração dos peptídeos 1, 2 e 3 em cultura, em comparação ao grupo controle (sem administração de qualquer peptídeo), referentes à concentração de 1000nM dos peptídeos na cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também foram representados. Ainda, os símbolos * e ** indicam uma diferença estatisticamente significativa (p<0.05) entre a média das áreas celulares dos cardiomiócitos sob ação de certo peptídeo e a média do grupo controle.

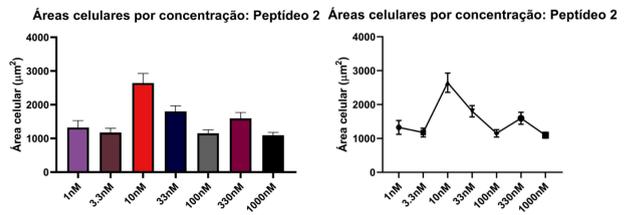
Figuras 2-8. Gráficos de barra das áreas celulares (em µm²) de cardiomiócitos de 10 dias sob efeito da administração dos peptídeos 1, 2 e 3 em cultura, em comparação ao grupo controle (sem administração de qualquer peptídeo), referentes às concentrações de 1, 3.3, 10, 33, 100, 330 e 1000nM dos peptídeos na cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também foram representados. Ainda, os símbolos *, ** e *** indicam uma diferença estatisticamente significativa (p<0.05) entre a média das áreas celulares dos cardiomiócitos sob ação de certo peptídeo e a média do grupo controle.

As medidas das áreas celulares (em μm^2) dos cardiomiócitos sob ação dos 3 peptídeos foram feitas a partir das imagens presentes na **Figura 1**, com o software ImageJ, e os dados plotados e analisados com auxílio do software GraphPad Prism 8. A primeira análise consiste em comparar a média das áreas celulares de cardiomiócitos induzidos à ação de cada peptídeo com a média do grupo controle, para confirmação de que os peptídeos são capazes de induzir as células em cultura à hipertrofia cardíaca. O teste estatístico escolhido foi a análise de variância unidirecional (one way-ANOVA), na qual a média de cada grupo foi comparada, individualmente, com a média do grupo controle. A segunda consistiu em agrupar e compilar as médias das áreas celulares de todas as concentrações utilizadas na diluição de cada peptídeo em três gráficos, comparando os efeitos de tais concentrações para cada peptídeo, a fim de observar a presença de um padrão na ação de cada peptídeo.

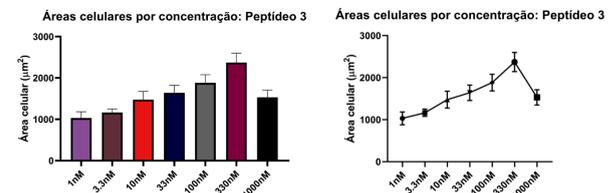
Nas **Figuras 2-8.**, temos os resultados da primeira análise comparativa entre as áreas celulares de cardiomiócitos induzidos à ação dos peptídeos e o grupo controle. Para todas as concentrações observadas, ao menos um peptídeo teve influência significativa sob a área celular dos cardiomiócitos, isto é, sempre houve ao menos um grupo que apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0.05$) em relação à média do grupo controle. Surge, então, a hipótese de que os 3 peptídeos selecionados são bioativos e são capazes de induzir os cardiomiócitos à hipertrofia. Porém, teoricamente, o peptídeo 2 seria o controle “negativo” do experimento, uma vez que apresenta a sequência do domínio WAP/WFDC embaralhada e, assim, não deveria induzir as células à hipertrofia. Contrariamente, foi observado que este, sim, é capaz de induzir a hipertrofia em cultura, o que torna necessário um aumento no número amostral e repetições destes experimentos.



Figuras 9 e 10: Gráficos, respectivamente, de barra e das médias com desvio padrão conectadas, com as áreas celulares (em μm^2) de cardiomiócitos de 10 dias de incubação em cultura, em resposta a cada concentração (1nM, 3.3nM, 10nM, 33nM, 100nM, 330nM e 1000nM) do peptídeo 1 administrada sobre a cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também estão representados.



Figuras 11 e 12: Gráficos, respectivamente, de barra e das médias com desvio padrão conectadas, com as áreas celulares (em μm^2) de cardiomiócitos de 10 dias de incubação em cultura, em resposta a cada concentração (1nM, 3.3nM, 10nM, 33nM, 100nM, 330nM e 1000nM) do peptídeo 2 administrada sobre a cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também estão representados.

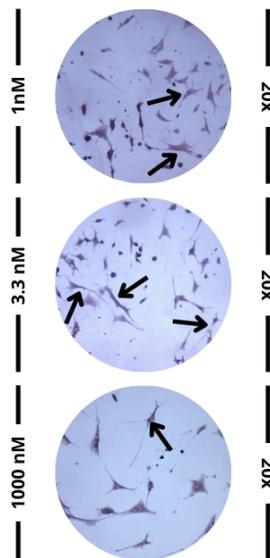


Figuras 13 e 14: Gráficos, respectivamente, de barra e das médias com desvio padrão conectadas, com as áreas celulares (em μm^2) de cardiomiócitos de 10 dias de incubação em cultura, em resposta a cada concentração (1nM, 3.3nM, 10nM, 33nM, 100nM, 330nM e 1000nM) do peptídeo 3 administrada sobre a cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também estão representados.

Figuras 9-14. Gráficos, respectivamente, de barra e das médias com desvio padrão conectadas, com as áreas celulares (em μm^2) de cardiomiócitos de 10 dias de incubação em cultura, em resposta a cada concentração (1nM, 3.3nM, 10nM, 33nM, 100nM, 330nM e 1000nM) do peptídeo 1 (Figuras 9 e 10), peptídeo 2 (Figuras 11 e 12), e peptídeo 3 (Figuras 13 e 14) administrada sobre a cultura. Os desvios padrão da média de cada grupo também estão representados.

Nas **Figuras 9-14**, tem-se os gráficos de barra e das médias com desvio padrão conectadas, com as médias das áreas celulares de cardiomiócitos induzidos à ação de cada peptídeo, com todas as concentrações utilizadas. Pode-se notar que nenhum peptídeo apresentou um padrão quanto à sua ação, isso é, não houve correlação direta entre o aumento da concentração dos peptídeos em cultura e o aumento da área dos cardiomiócitos. Os peptídeos 1 e 3 tinham comportamento semelhante, respectivamente, a uma função de segundo e primeiro grau, mas esses padrões não foram observados para 1000 nM. Novamente, o comportamento do peptídeo 2 é intrigante: além de, aparentemente, apresentar

bioatividade, sua ação em cultura não segue padrão algum.



Figuras 15, 16 e 17. Cardiomiócitos induzidos, respectivamente, à 1, 3.3 e 1000 nM do peptídeo 3 em cultura. As setas em preto indicam aqueles que melhor representam os efeitos sobre o fenótipo das células após ação dos peptídeos.

As **Figuras 15-17** apresentam cardiomiócitos induzidos, respectivamente, à 1, 3.3 e 1000 nM do peptídeo 3 em cultura. As setas em preto indicam as células escolhidas para representar, de maneira generalizada, os efeitos dos peptídeos sobre o fenótipo das células em cultura. Nota-se que, em sua maioria, as células assemelham-se a um cardiomiócito padrão. Porém, em alguns casos, percebe-se uma aparência relativamente “esticada” das células, e, em outras ocasiões, há a presença de um elevado número de ramificações nas células.

CONCLUSÕES

Em conclusão, após a diluição dos três peptídeos em cultura e a análise de sua ação sobre o fenótipo e área celular dos cardiomiócitos, suspeita-se que todos os peptídeos testados apresentam bioatividade, uma vez que alteraram a “aparência”/fenótipo das células em cultura, além de serem capazes de induzir, a depender da concentração, a hipertrofia celular. Porém, há alguns

pontos a serem melhorados até o prazo do relatório final do PIBIC e do XXXIII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP. O número amostral dos experimentos aqui descritos precisa ser maior para confirmar tal bioatividade, além da obtenção de imagens aprimoradas para certas concentrações e certos peptídeos. Ainda, análises adicionais de Western Blotting para averiguar a mudança nos níveis de ps20 após a hipertrofia celular, de imunofluorescência da proteína ps20 após diferentes períodos de indução à hipertrofia, e qRT-PCR de marcadores hipertróficos e do gene WFDC1. Essas análises adicionais têm o objetivo de acrescentar à investigação do envolvimento e função de WFDC1/ps20 no desenvolvimento do sistema cardiovascular e suas doenças correlacionadas, e serão finalizadas até o prazo do relatório final do PIBIC e da realização do XXXIII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP.

BIBLIOGRAFIA

- DWYER, Jeremy P., RITCHIE Matthew E., SMYTH Gordon K et al. **Myocardial Gene Expression Associated with Genetic Cardiac Hypertrophy in the Absence of Hypertension.** *Hypertens Research*, v. 31, p. 941–955, 2008;
- LU, Bo et al. **Identification of hypertrophy- and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models.** *Physiological Genomics*, Volume 44, Issue 8, 2012.
- MCALHANY, Stephanie J. et al. **Promotion of angiogenesis by ps20 in the differential reactive stroma prostate cancer xenograft model.** *Cancer Research*, v. 63, n. 18, p. 5859-5865, 15 set. 2003.
- MILUTINOVIĆ, Aleksandra, ZORC-PLESKOVIĆ, Ruda. **Glycogen accumulation in cardiomyocytes and cardiotoxic effects after 3NPA treatment.** *Biomolecules and Biomedicine*, v. 12, p. 15–19., 2012;
- SOLÍS-CALERO, Christian, CARVALHO, Hernandes Faustino. **Phylogenetic, molecular evolution and structural analyses of the WFDC1/prostate stromal protein 20 (ps20).** *Gene*, v. 686, p. 125–140, 20 fev. 2019.