

1.06.04 - Química/Química Analítica

DOENÇAS CARDIOVASCULARES AGUDAS: ESTUDOS METABOLÔMICOS DE CÉLULAS MAMÍFERAS POR LC-MSIsabela Rocha¹, Alan G. Amaral², Aline M. Santos³, Ana Valéria C. Simionato⁴

1. Estudante do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP)

2. Pós Graduando do IQ-UNICAMP

3. Professora Doutora do Instituto de Biologia da UNICAMP (IB-UNICAMP) - Departamento de Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

4. Professora Doutora do IQ-UNICAMP – Departamento de Química Analítica

Resumo

As doenças cardiovasculares, em conjunto com outras enfermidades que compõe o grupo de doenças não comunicáveis, foram responsáveis por cerca de 70% das mortes no mundo em 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde, sendo que, um dos principais desafios no tratamento dessas doenças é o aparecimento tardio dos seus sintomas. Um dos fatores que se discute estar associado ao aparecimento das doenças cardíacas é o estresse oxidativo (desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes). Desta forma, o trabalho tem como objetivo realizar um estudo endometabolômico utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS, do inglês, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) em 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 (H₂O₂) para realizar sua simulação e baseando-se numa condição patológica aguda (alterações que passam a ocorrer no coração logo após o estresse). Como resultado, foram identificados 36 metabólitos considerados possíveis biomarcadores, sendo analisado também o impacto deles sobre as rotas metabólicas presentes no organismo. Desta forma, a realização de estudos metabolômicos in vitro apresenta um grande potencial para a obtenção de conhecimentos na área da saúde, sendo que estes, agem como estudos preliminares aos realizados em animais ou humanos (trabalhos in vivo), constituindo uma estratégia eficiente de direcionar tais estudos posteriores.

Autorização legal: Não foi necessária uma autorização legal.

Palavras-chave: Células Cardíacas; Metabolômica; Estresse Oxidativo

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Trabalho selecionado para a JNIC: Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

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 (WHO, do inglês *World Health Organization*), em 2020, as CVDs, em conjunto com outras enfermidades que compõe 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, tais processos ocorrem constantemente e são essenciais para sua manutenção.^[3] No entanto, a produção excessiva crônica e aguda de espécies oxidativas, em condições fisiopatológicas que envolvem fatores de risco, como: 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, sendo que, a Metabolômica surge como uma técnica analítica com importante para auxiliar a compreensão e solução de problemas relacionados à saúde pública. 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 ou meio ambiente, o que permite o avanço desta ciência na compreensão dos fundamentos moleculares associados às diversas doenças existentes.^[4,5]

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

O objetivo deste trabalho é investigar o metaboloma global do conteúdo intracelular de células cardíacas da linhagem H9c2, cultivadas *in vitro* (endometaboloma) utilizando a técnica de LC-MS, a fim de mimetizar as alterações causadas ao coração após passar por estresses oxidativos utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para realizar sua simulação e baseando-se numa condição patológica aguda (alterações que passam a ocorrer no coração logo após o estresse).

Metodologia

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 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 para desagregar as células da garrafa, sendo que, 5% delas foram transferidas para um novo recipiente.

As células da linhagem H9c2 se proliferam sem diferenciar, por isso, é necessária uma mudança nas condições de crescimento. Desta forma, a fim de garantir que as células seriam diferenciadas como cardíacas, houve uma redução da porcentagem de FBS de 10% para 1% por 6 dias.^[6,7] Em seguida, com o propósito 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.^[8] 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.^[9,10]

As células foram, então, separadas em placas de 48 poços e tratadas em concentrações crescentes de H_2O_2 (25, 50, 75, 100, 200, 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 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 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 dois grupos de amostras: três saudáveis (controle) e três de células que passaram por 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, uma vez que apenas o endometaboloma seria analisado, 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 (etapa realizada 3 vezes). As amostras foram, então, centrifugadas a 5725 g numa temperatura de 4 °C por 10 minutos e, posteriormente, armazenadas num biofreezer a -80°C até a etapa de análise.

Após o descongelamento, foram retirados 200 μL de cada uma das amostras e, então, juntaram-se esses volumes para fazer um pool das amostras. Em seguida, estes, foram separados em volumes iguais para compor cada QC (controle de qualidade, do inglês, *Quality Control*) para posterior realização das análises metabolômicas. Foram feitas análises por RPLC-ESI-MS (do inglês, *Reversed Phase Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry*) e HILIC-ESI-MS (do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry*) no laboratório SEPARARE do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão da Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira, onde utilizou-se um sistema Agilent UHPLC (modelo 1260 Infinity II, *Agilent Technologies*).

As análises cromatográficas foram realizadas com uma coluna Ascentis Express C18 (2,7 μm , 150 mm \times 2,1 mm) para RPLC, uma coluna Atlantis Silica (1,7 μm , 100 mm \times 2,1 mm) para HILIC no modo de ionização positivo, e uma coluna BEH Amide (1,7 μm , 100 mm \times 2,1 mm) para HILIC no modo de ionização negativo, ambas mantidas à 15°C durante a separação. Para RPLC e HILIC no modo de ionização negativo, a fase móvel foi composta por: A – água + 0,1% ácido fórmico e B – acetonitrila + 0,1% ácido fórmico. Para HILIC no modo de ionização positivo, a fase móvel foi composta por: A – formiato de amônio 100 mmol L^{-1} e B – acetonitrila + 0,1% ácido fórmico. Os volumes de injeção utilizados nas análises foram de 2 μL e a vazão da fase móvel foi de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Os cromatogramas obtidos foram pré-processados utilizando o software MZmine versão 2.53.^[11] 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.^[12] Após essas etapas, foram feitas as identificações dos metabólitos destacados com auxílio da ferramenta CEU Mass Mediator^[13] que compila informações dos bancos de dados públicos, como HMDB^[14], KEGG^[15], entre outros.

Resultados e Discussão

Após a realização do teste de MTT, era esperado que conforme as concentrações e tempo de exposição ao H_2O_2 aumentassem, a viabilidade celular diminuiria. Tal tendência ocorreu apenas em 12 e 24 horas. 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 1). Portanto, o tempo de 24 horas foi escolhido como tempo ótimo de exposição para a realização do experimento, sendo utilizada a concentração de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, a qual 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.

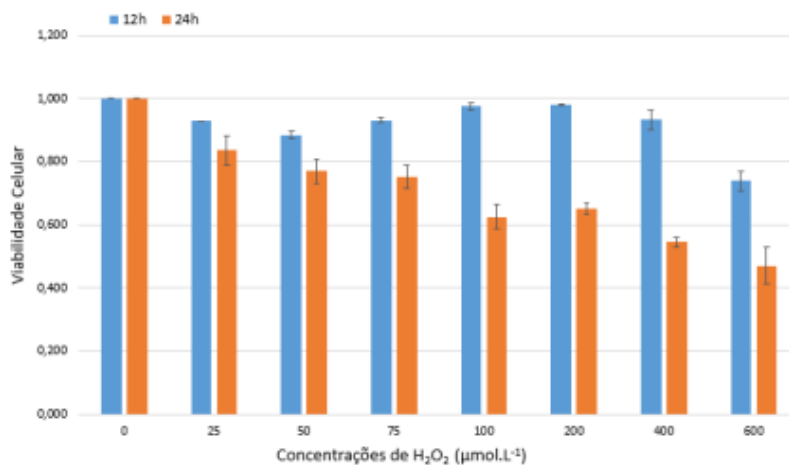


Figura 1. Teste de MTT para avaliar a viabilidade celular em concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 400 e $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 nos tempos de exposição de 12 (azul) e 24 horas (laranja).

Com os dados pré-processados, foi realizada uma filtragem manual baseada no desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) dos QCs, razão de detecção dos picos e contribuição do branco. Os features que apresentaram RSD dos QCs $> 30\%$, razão de detecção dos picos $< 70\%$ e/ou contribuição do branco $> 5\%$ foram removidos. Posteriormente, foram feitas tentativas de normalização e as que obtiveram os melhores resultados foram a normalização por auto-escalamento e \log_{10} para o RPLC-MS (ESI+), RPLC-MS (ESI-) e HILIC-MS (ESI+) e apenas auto-escalamento para o HILIC-MS (ESI-).

A partir das tentativas realizadas, foram construídos modelos de PCA (Figura 2), os quais são utilizados para determinar se houve variação instrumental durante a análise e separação dos grupos. Desta forma, observando-se os resultados obtidos na Figura 2, pode-se afirmar que houve um bom agrupamento dos QCs e uma boa separação dos grupos para RPLC-MS (ESI+), RPLC-MS (ESI-) e HILIC-MS (ESI-). Foi construído modelos 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, descritos na Tabela 1.

O R^2 é o coeficiente de determinação, ou seja, ele expressa a quantidade de variância dos dados (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, ou seja, os valores obtidos no experimento (próximos de 1) mostram que o modelo tem um bom potencial de predição da doença, mesmo com baixo número de amostras por grupo. Para se avaliar a significância estatística de Q^2 foi realizado um teste de permutação, obtendo valores p inferiores a 0,05 (Tabela 1), mostrando que o Q^2 é estatisticamente significativo.

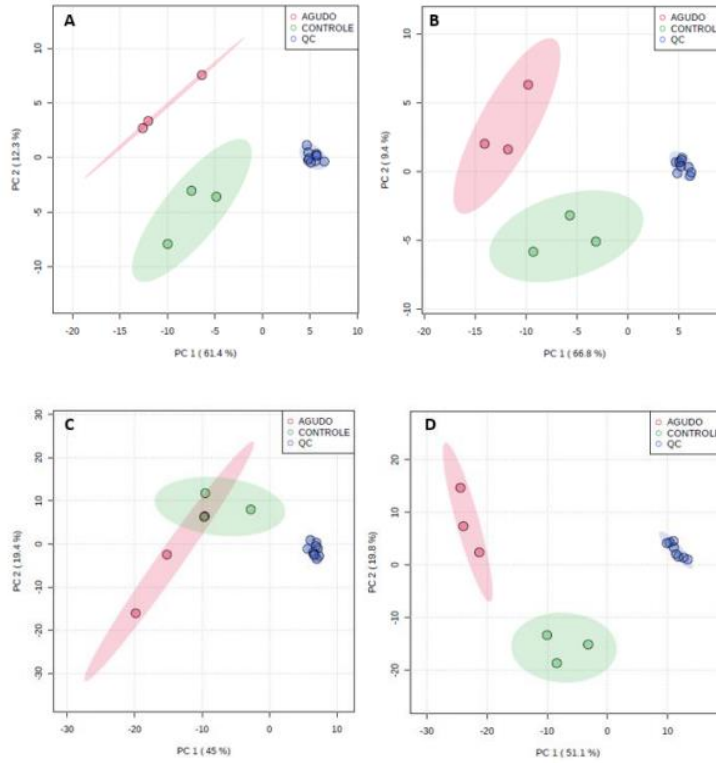


Figura 2. PCA das amostras para A. RPLC-MS (ESI+), B. RPLC-MS (ESI-), C. HILIC-MS (ESI+), D. HILIC-MS (ESI-). Agudo: amostras de células submetidas a tratamento com H_2O_2 ; controle, amostras de células cultivadas sob as mesmas condições que em A, mas sem adição de H_2O_2 ; QC: controle de qualidade.

Tabela 1. Valores de R^2 e Q^2 e de permutação (p) para a avaliação da significância estatística

	R^2Y	Q^2Y	Permutação (p)
RPLC-MS (ESI+)	0.9936	0.5593	<5E-4
RPLC-MS (ESI-)	0.9897	0.7196	<5E-4
HILIC-MS (ESI+)	0.9884	0.7090	0.011
HILIC-MS (ESI-)	1.0000	0.8018	0.0335

Os resultados obtidos puderam, portanto, ser utilizados para realizar uma tentativa de identificação dos possíveis biomarcadores com auxílio da ferramenta CEU Mass Mediator, sendo que, para determinar quais metabólitos poderiam ser considerados possíveis biomarcadores, considerou-se: $FDR < 0,05$, $p\text{-valor} < 0,05$ e $VIP\ score > 1$. Desta forma, utilizando este procedimento, 36 metabólitos foram identificados como possíveis biomarcadores sendo analisado também o impacto deles sobre as rotas metabólicas no sistema biológico em estudo (Figura 3).

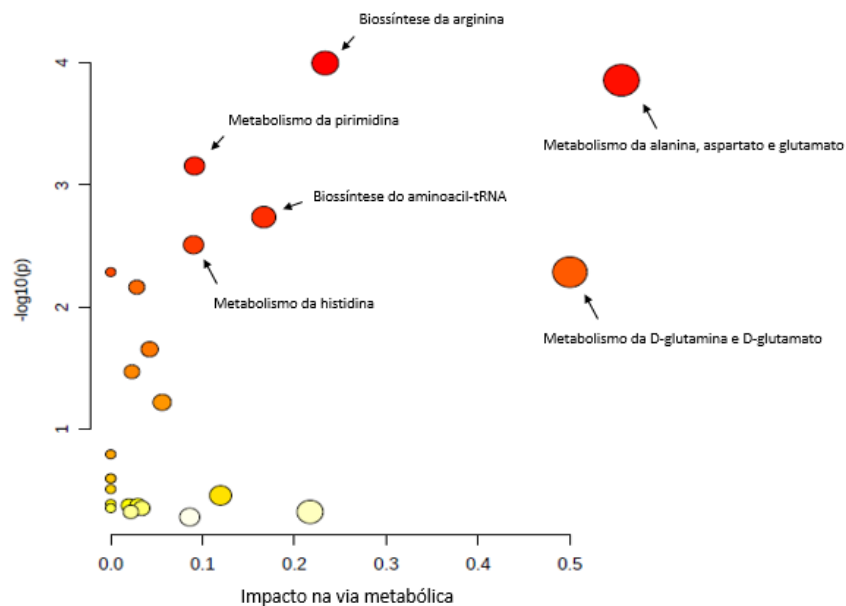


Figura 3. Principais rotas / ciclos metabólicos impactados pelo estresse agudo das células cardíacas.

Conclusões

A realização de estudos metabômicos *in vitro* apresenta um grande potencial para a obtenção de conhecimentos na área da saúde. Além disso, estes estudos podem ser realizados previamente aos estudos em animais ou humanos (sistemas *in vivo*). No entanto, é necessário cuidado e atenção com os parâmetros utilizados no crescimento celular, preparo de amostra e análise instrumental, garantindo um bom funcionamento dos equipamentos.

Tendo em vista as dificuldades geradas pela pandemia do COVID-19, assim como o longo tempo sem uso dos equipamentos, o estudo, que inicialmente, era para ter sido feito utilizando a cromatografia gasosa, teve de ser realizado utilizando a cromatografia líquida. Entretanto, os resultados obtidos, ainda sim, são bastante promissores, sendo que, estudos futuros podem ser realizados, não apenas por GC-MS, mas outros métodos de separação a fim de obter informações complementares às obtidas neste projeto com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores associados ao estresse oxidativo agudo em CVDs.

Apesar dos obstáculos, mudanças morfológicas celulares durante o período de diferenciação e estresse puderam ser observadas e a análise instrumental proporcionou bons resultados caracterizados a partir dos modelos de PCA e PLS-DA, sendo analisado o impacto destes metabólitos nas vias metabólicas. A etapa de interpretação biológica, no entanto, não foi discutida no presente trabalho, uma vez que, para maiores conclusões e interpretações acerca dos impactos gerados nestas vias são necessários estudos mais aprofundados.

Referências bibliográficas

- [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] 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.
- [7] SUHAERI, M. et al. Cardiomyoblast (H9c2) Differentiation on Tunable Extracellular Matrix Microenvironment. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 11-12, 2015.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] PLUSKAL, T. et al. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 395, 2010.
- [12] 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.
- [13] GIL-DE-LA-FUENTE, A. et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 2, p. 797-802, 2019.
- [14] WISHART, D. S. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 608-617, 2018.
- [15] KANEHISA, M. et al. New approach for understanding genome variation in KEGG. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. 590-595, 2019.