

Thayane Antonioli Crestani

**O estímulo elétrico aplicado durante a diferenciação das hiPSCs
direciona os hiPSC-CMs a células do tipo de condução cardíaca
maduras**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2020

Thayane Antonioli Crestani

**O estímulo elétrico aplicado durante a diferenciação das hiPSCs
direciona os hiPSC-CMs a células do tipo de condução cardíaca
maduras**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Crestani, Thayane Antonioli

O estímulo elétrico aplicado durante a diferenciação das hiPSCs direciona os hiPSC-CMs a células do tipo de condução cardíaca maduras / Thayane Antonioli Crestani. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Jose Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Células-tronco pluripotentes induzidas 2.Eletrochoque 3.Miócitos cardíacos 4.Diferenciação celular 5.Sistema de condução cardíaco 6.Arritmias cardíacas 7.Técnicas eletrofisiológicas cardíacas

USP/FM/DBD-172/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e exemplos de vida, **Levino e Ademildes**, pelo apoio incondicional e constante, contribuindo para eu me tornar uma pessoa cada vez melhor. E a todos os pesquisadores que incansavelmente dedicam-se a desvendar os mistérios da Ciência.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, pela oportunidade e orientação. Pela confiança depositada em mim para conduzir este trabalho com autonomia e por todos os ensinamentos. Por me receber no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) e oferecer todo o apoio e estrutura necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço à **Prof. Dra. Elisabeth Ehler** pelo generoso acolhimento em seu laboratório na Universidade de *Kings College London* (KCL) durante um ano. Obrigada por todo o apoio na realização desse trabalho, pela orientação, pelo aprendizado e por ser sempre tão receptiva quando eu necessitei esclarecer dúvidas.

À minha querida amiga, **Dra. Clara Steichen**, por ter me ensinado todas as técnicas relacionadas ao cultivo das hiPSCs e ter vivenciado comigo cada minuto dessa conquista. Pela parceria nos experimentos, pela amizade e pelo ombro amigo quando precisei. Por toda a sua ajuda desde a elaboração do projeto desse estudo, sem você possivelmente este trabalho não teria nem começado. Obrigada por acreditar tanto no meu potencial, incentivar meu aprendizado e por ser um exemplo de profissionalismo.

À **Dra. Elida Neri** pela ajuda durante os diversos experimentos deste trabalho. Tua iniciativa e participação na busca de respostas frente às dúvidas que surgiram no desenvolvimento deste trabalho foi uma contribuição muito importante. Obrigada por todo o teu apoio.

À **Dra. Miriam Alaniz** pela ajuda nos experimentos de *Western Blot* e à **Dra. Mariliza Rodrigues** pela realização dos experimentos de RT-PCR.

Ao **Dr. Mark Holt** pelo tempo dedicado no estabelecimento do equipamento de estímulo elétrico em KCL, pelas análises dos testes funcionais e pelos ensinamentos desta “outra ciência”. À **Beth Ormd** pela amizade, pela ajuda nos experimentos e pelas trocas de conhecimento.

À **Prof. Dra. Sian Harding** por ter aberto as portas de seu laboratório na *Imperial College London* e por fornecer a estrutura necessária para a execução dos testes funcionais deste trabalho e ao seu aluno de Doutorado, **Pragati Pandey**, pela ajuda indispensável nesses experimentos.

A todos os amigos e colegas que já passaram no grupo “Grupo das hiPSCs”, **Fanny** e **Juliana** pela amizade, companheirismo e por ajudarem a cuidar das minhas células em todos os momentos que precisei. Ao **Thiago e Agatha**, pela ajuda na padronização dos experimentos de transientes de cálcio e pelas discussões científicas. Ao **Santiago** pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo e a **Marília** pela ajuda na padronização dos experimentos de *Western Blot*. Ao **Rafael, Juan, Vinícius, Aline, Graça e Theo** por todo suporte durante a execução deste trabalho e amizade.

A todos os amigos e colegas do LGCM, lab geral, grupo renal, vascular e bioinformática. Um agradecimento especial ao **Renato Crajoinas** e **Silvestre Modestia** pela amizade e disponibilidade em ajudar em todos os meus questionamentos burocráticos principalmente relacionados ao estágio no exterior. Ao **João Carlos, Thais, Pamela e Iguaracy**, pela companhia nos almoços, pelas risadas trocadas e pelo ótimo convívio no laboratório. Obrigada por compreenderem meus momentos de nervosismo e me proporcionarem tantos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório em KCL, **Amy, Mihai e Tom**, por terem me recebido tão bem, pela ajuda constante e por serem sempre tão atenciosos comigo quando eu

precisava encontrar algum reagente no laboratório. Obrigada pelo apoio, acolhimento de vocês no meu dia-a-dia e por tornarem minha experiência em Londres tão agradável e inesquecível.

A todos os colaboradores, pesquisadores e funcionários do LGCM que de alguma forma também contribuíram para que este trabalho “saísse do papel” e se concretiza-se. Agradeço especialmente à **Renata Carmona, Maúde, Marcelly, Silvana, Priscila, Ana Maria e Edinalva** por me auxiliarem em diversas questões durante o doutorado e estarem presentes em todos os momentos que precisei. Aos técnicos de laboratório, **Brendo, Andrea, Sileide, Jean e Mariana**, por manterem sempre a limpeza e organização do ambiente e fornecerem os materiais de laboratório, contribuindo para a realização dos experimentos.

Aos meus pais, **Levino e Ademildes**, por todo o amor incondicional e esforço que fizeram para eu realizar esta etapa da minha formação. Obrigada pelo apoio em todos os momentos de inseguranças e medo e por estarem sempre ao meu lado, mesmo que à distância. Se não fosse o suporte e incentivo de vocês eu não teria tido coragem para me mudar para São Paulo e encarar mais esse desafio da minha vida. Obrigada por me darem “asas” para eu buscar a realização dos meus sonhos e por serem o meu porto seguro onde eu sempre irei querer voltar. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, **Thayse e Thales**, os quais eu tenho muito orgulho. Obrigada pelo contínuo estímulo e por não medirem esforços em me ajudar, seja de longe ou de perto. Vocês são meus parceiros de vida que estão sempre apoiando as minhas escolhas e presenciando os momentos mais especiais da minha vida. Sou muito grata por ter vocês em minha vida e ter a certeza que eu sempre posso contar com vocês!

Ao meu querido marido, **João Henrique**, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio diário e imensurável. Obrigada por compreender a minha ausência, por incentivar meu desenvolvimento profissional e pessoal e por apoiar as minhas decisões. Agradeço também pela contribuição na correção deste trabalho e diversos textos em inglês. Não tenho palavras para te agradecer suficientemente e expressar o que você significa na minha vida.

À **Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo** e ao **Programa de Pós-Graduação em Cardiologia** desta Universidade pela excelência científica em ensino.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, processo nº 2016/11321-0 (Bolsa de Doutorado) e processo nº 2018/16860-2 (Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE).

A **Deus**, por colocar pessoas tão maravilhosas em meu caminho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada!

“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them”.

Walt Disney

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vihena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Células-tronco pluripotentes induzidas.....	1
1.2. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos	2
1.3. A influência do estímulo elétrico na diferenciação e maturação dos hiPSC-CMs	5
1.4. Sistema de condução ventricular	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1. Aspectos éticos	12
3.2. Obtenção e cultivo das células progenitoras de urina (UPCs).....	12
3.3. Reprogramação das UPCs em hiPSCs.....	13
3.4. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos	14
3.5. PCR e RT-PCR	17
3.6. Citometria de Fluxo	19
3.7. Imunofluorescência.....	20
3.8. Extração de proteínas.....	23
3.9. Eletroforese e Western Blotting.....	23

3.10. Capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas	24
3.11. Integridade cromossômica	25
3.12. Análise funcionais dos hiPSC-CMs.....	25
3.13. Análises estatísticas	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Obtenção e cultivo das UPCs.....	27
4.2. Reprogramação das UPCs em hiPSCs e caracterização das hiPSCs	27
4.3. Padronização da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs)....	35
4.4. Padronização da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES	40
4.5. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES.....	42
5. DISCUSSÃO	52
5.1. Geração e caracterização das hiPSCs e dos hiPSC-CMs.....	52
5.2. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES.....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7. REFERÊNCIAS	61
8. ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do método de geração das hiPSCs e suas possíveis aplicações.....	2
Figura 2: Etapas da diferenciação das hiPSCs em CMs.....	3
Figura 3: Modelo esquemático do fator de transcrição Irx3 interagindo com o Nkx2.5 e Tbx5 no desenvolvimento e maturação do VCS.	8
Figura 4: Desenho experimental do trabalho proposto.....	17
Figura 5: Morfologia das UPCs.....	27
Figura 6: Reprogramação e caracterização morfológica das hiPSCs.....	29
Figura 7: Caracterização molecular das hiPSCs.....	30
Figura 8: Imagem representativa da expressão de marcadores proteicos de pluripotência das hiPSCs (200x).	31
Figura 9: Imagens representativas da caracterização das hiPSC por citometria de fluxo	34
Figura 10: Análises histológicas de teratoma obtido após injeção intra-muscular das hiPSCs em camundongos imunodeficientes.....	35
Figura 11: Cariótipo do clone U4MP3 normal (esquerda) e mostrando mosaicismos com algumas células portadoras de trissomia do cromossomo 1 (direita, seta).....	35
Figura 12: Caracterização molecular dos hiPSC-CMs por qPCR no dia 15 da diferenciação.....	37
Figura 13: Imagem representativa da expressão de marcadores proteicos de células progenitoras cardíacas e cardiomiócitos dos hiPSC-CMs no dia 15 da diferenciação (100x).	38
Figura 14: Expressão de marcadores proteicos de células progenitoras e cardíacas por Western-Blot no dia 15 da diferenciação.	39
Figura 15: Imagens representativas da caracterização da diferenciação das hiPSCs em hiPSC-CMs por citometria de fluxo.	40
Figura 16: Morfologia dos hiPSC-CMs CTL e ES durante o processo de diferenciação (200x).	43
Figura 17: O ES regula positivamente a expressão de genes relacionados ao VCS durante a diferenciação cardíaca das hiPSCs.	45

Figura 18: Aumento da expressão de proteínas presentes no VCS e discos intercalados nos hiPSC-CMs ES.....	47
Figura 19: Imagens de microscopia confocal dos hiPSC-CMs CTL e ES imunomarcados para as proteínas das junções gap conexina 40 e conexina 43.	48
Figura 20: Influência do ES nos transientes intracelulares de cálcio (CaT) e no potencial de ação (AP) nos hiPSCs-CMs.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais marcadores do VCS.	9
Tabela 2: Lista com a sequência dos primers utilizados	18
Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados.	21
Tabela 4: Porcentagem de eventos positivos obtidos por citometria de fluxo de marcadores proteicos de pluripotência das hiPSCs.	32

LISTA DE ABREVIACOES

7ADD – 7-Amino-actinomicina D

AP – do inglês, *Action potential*

APD90 – do inglês, *Action potential duration at 90% repolarization*

BMP4 – do inglês, *Bone morphogenetic protein 4*

BSA – do inglês, *Bovine serum albumin*

CALM3 – do inglês, *Calmodulin 3*

CaT – do inglês, *Calcium transients*

CDM5 – meio de cultura composto por RB+, albumina, ácido ascórbico, aminoácidos não essenciais e antioxidante

cDNA – DNA complementar

CM – cardiomiócitos

CO₂ – dióxido de carbono

CS – do inglês, *Conduction system*

CTL – controle

CTM – célula-tronco mesenquimal

Cx40 – conexina 40

Cx43 – conexina 43

DAPI – 4',6'-dimino-2-fenil-indol

DEPC – dietil pirocarbonato

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

E6 – Meio de cultura *Essencial 6*

E8 – Meio de cultura *Essencial 8*

EDTA – do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESC – do inglês, *Embrionic stem cell*

ES – do inglês, *Electrical stimulation*

FGF2 – do inglês, *Fibroblast growth factor 2*

FM-USP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GAPDH – do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GATA4 – do inglês, *GATA binding protein 4*

GJA1 – do inglês, *Gap junction protein, alpha 1*

GJA5 – do inglês, *Gap junction protein, alpha 5*

HCFMUSP – Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HCN4 – do inglês, *Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*

hiPSC – do inglês, *Human induced pluripotent stem cells*

hiPSC-CMs – do inglês, *Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*

HRP – do inglês, *Horseradish peroxidase*

I_{Na} – corrente de íons de sódio

IRX3 – do inglês, *Iroquois homeobox 3*

ISL1 – do inglês, *Islet 1*

KCL – do inglês, *King's College London*

KY – composto químico KY21111

KCNJ3 – do inglês, *Potassium voltage-gated channel subfamily j member 3*

LGCM – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

MEF2C – do inglês, *Myocyte-specific enhancer factor 2C*

Mesp1 – do inglês, *Mesoderm posterior bHLH transcription factor 1*

MyBP-C – do inglês, *Myomesin binding protein C*

MYL2 – do inglês, *Myosin light chain 2*

NANOG – do inglês, *Nanog homeobox*

Nav1.5 – subunidade do canal de sódio dependente de voltagem

NKX2.5 – do inglês, *NK2 homeobox 5*

Nrap – do inglês, *Nebulin related anchoring protein*

OCT4 – do inglês, *Octamer-binding transcription factor 4*

PBS – tampão fosfato salino

PCR – do inglês, *Polymerase chain reaction*

PFA – paraformaldeído

POU5F1 – gene codificador do fator de transcrição OCT4

REGM – do inglês, *Renal Epithelial Cell Growth Medium*

REX1 – do inglês, *ZFP42 zinc finger protein*

Ri – do inglês, *Rock inhibitor*

RB+ – meio RPMI suplementado com B27

RB- – meio RPMI suplementado com B27 sem insulina

RPMI – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – reação em cadeia de polimerase em tempo real

SCN5a – do inglês, *Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5*

SFB – Soro Fetal Bovino

SOX2 – do inglês, *Sex determining region Y-box2*

SSEA4 – do inglês, *Stage-specific embryonic antigen-4*

TBST – do inglês, *Tris-buffered saline Tween 20*

TNNI1 – do inglês, *Troponin I type 1*

TNNI3 – do inglês, *Troponin I type 3*

TRA-1-60 – epítipo presente em células-tronco pluripotentes

TRA-1-81 – epítipo presente em células-tronco pluripotentes

UPC – do inglês, *Urine progenitors cells*

USP – Universidade de São Paulo

VCS – do inglês, *Ventricular conduction system*

XAV – composto químico XAV939

WNT – do inglês, *Wingless-type MMTV integration site*

RESUMO

Crestani TA. *O estímulo elétrico aplicado durante a diferenciação das hiPSCs direciona os hiPSC-CMs a células do tipo de condução cardíaca maduras* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CMs) se assemelham aos cardiomiócitos fetais e o estímulo elétrico (ES) tem sido explorado para amadurecer as células diferenciadas. Aqui, levantamos a hipótese de que o ES aplicado no início do processo de diferenciação desencadeia tanto a diferenciação dos hiPSC-CMs em um fenótipo especializado do sistema de condução (CS) quanto a maturação celular. Aplicamos o ES por 15 dias a partir do dia 0 do processo de diferenciação e encontramos um aumento da expressão de fatores de transcrição e proteínas associadas ao desenvolvimento e função do CS, incluindo IRX3 e NKX2.5 e SCN5A, Hcn4 e contactina 2, respectivamente. Também encontramos ativação de proteínas de disco intercalares (Nrap e β -catenina). Detectamos a maturação de CMs induzida por ES, conforme indicada pelo aumento da expressão de TNNI1 e TNNI3. Micrografias confocais mostraram uma mudança em direção à expressão da proteína das junções gap, conexina 40, nos hiPSC-CMs com ES em comparação com a expressão mais dominante da conexina 43 nos controles. Finalmente, a análise dos parâmetros funcionais revelou que os hiPSC-CMs com ES exibiram transientes intracelulares de Ca^{2+} mais longos, despolarização do potencial de ação (AP) mais rápida e duração mais lenta do AP em 90% da repolarização, assemelhando-se com as fibras de condução rápida. Em conjunto, fornecemos evidências de que o ES aplicado durante a diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos leva ao desenvolvimento de células do tipo de condução cardíaca com citoarquitetura mais madura. Assim, os hiPSC-CMs expostos ao ES durante a diferenciação podem ser cruciais para o desenvolvimento de células do CS para modelagem de doenças cardíacas, triagem de medicamentos individuais em uma plataforma do tipo medicamento de precisão e apoiar o desenvolvimento de novas terapias para arritmias.

Descritores: Células-tronco pluripotentes induzidas; Eletrochoque; Miócitos cardíacos; Diferenciação celular; Sistema de condução cardíaco; Arritmias cardíacas; Técnicas eletrofisiológicas cardíacas.

ABSTRACT

Crestani TA. *Electrical stimulation applied during hiPSC differentiation drives the hiPSC-CMs towards a mature cardiac conduction-like cells* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) resemble fetal cardiomyocytes and electrical stimulation (ES) has been explored to mature the differentiated cells. Here, we hypothesize that ES applied at the beginning of the differentiation process, triggers both differentiation of the hiPSC-CMs into a specialized conduction system (CS) phenotype and cell maturation. We applied ES for 15 days starting on day 0 of the differentiation process and found an increased expression of transcription factors and proteins associated with the development and function of CS including *IRX3*, *NKX2.5* and contactin 2, *Hcn4* and *SCN5A*, respectively. We also found activation of intercalated disc proteins (Nrap and β -catenin). We detected ES-induced CM maturation as indicated by increased *TNNI1* and *TNNI3* expression. Confocal micrographs showed a shift towards expression of the gap junction protein connexin 40 in ES hiPSC-CMs compared to the more dominant expression of connexin 43 in controls. Finally, analysis of functional parameters revealed that ES hiPSC-CMs exhibited faster action potential (AP) depolarization, longer intracellular Ca^{2+} transients, and slower AP duration at 90% of repolarization, resembling fast conducting fibers. Altogether, we provided evidence that ES during the differentiation of hiPSCs to cardiomyocytes lead to development of cardiac conduction-like cells with more mature cytoarchitecture. Thus, hiPSC-CMs exposed to ES during differentiation can be instrumental to develop CS cells for cardiac disease modelling, screening individual drugs on a precision medicine type platform and support the development of novel therapeutics for arrhythmias.

Descriptors: Induced pluripotent stem cells; Electroshock; Myocytes, cardiac; Cell differentiation; Heart conduction system; Cardiac arrhythmias; Electrophysiologic techniques, cardiac.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco pluripotentes induzidas

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) foram descritas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka em 2006¹ em camundongos e, posteriormente, o mesmo grupo desenvolveu as iPSCs em humanos (hiPSCs, do inglês *human induced pluripotent stem cells*)². Nesta técnica, através do uso de vetores virais, são superexpressos 4 fatores de transcrição (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF-4* e *C-MYC*) nas células somáticas para elas serem reprogramadas (desdiferenciadas) a um estado pluripotente semelhante ao das células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês *embryonic stem cells*) (Figura 1). Dessa forma, as hiPSCs apresentam características de elevada capacidade de auto renovação e proliferação muito similares às ESCs, porém possuem menos problemas éticos quanto à sua utilização^{2,3}.

Os fibroblastos são o tipo celular mais frequentemente utilizado como precursores das hiPSCs, principalmente devido a sua ampla disponibilidade e simples cultivo. No entanto, tendo em vista que os fibroblastos são comumente extraídos por meio de biópsia de pele, tratando-se de uma abordagem minimamente invasiva, outros tipos celulares de fácil obtenção começaram a ser utilizados. Entre eles podemos citar as células sanguíneas, células progenitoras da urina (UPC, do inglês *urine progenitor cells*) e queratinócitos a partir de fios de cabelo^{4,5}. Nesse sentido, escolhemos inicialmente nesse trabalho utilizar as UPCs para gerar as hiPSCs.

Além disso, devido ao fato que as hiPSCs podem ser obtidas do próprio paciente e, posteriormente, serem diferenciadas em diversos tipos celulares, a sua descoberta também possibilitou inúmeras aplicações nas áreas de modelagem de doenças e terapia celular^{2,5} (Figura 1).

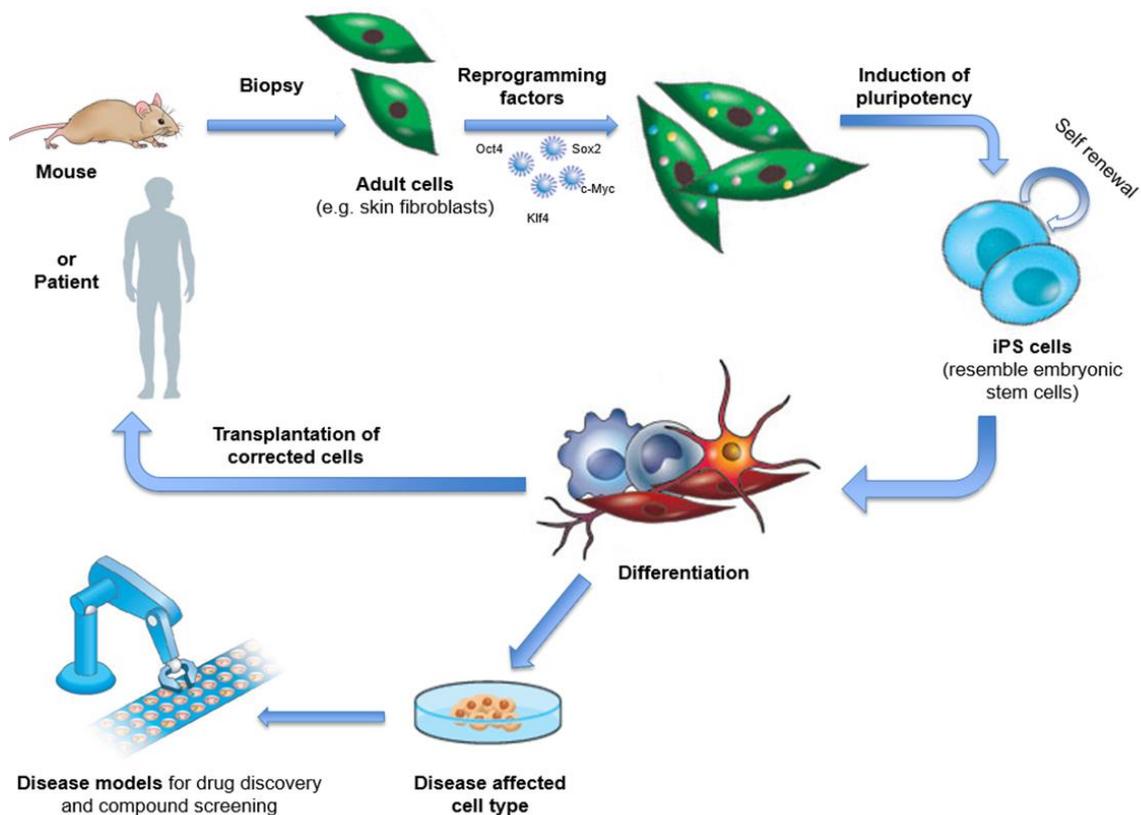


Figura 1: Esquema do método de geração das hiPSCs e suas possíveis aplicações. Modificado de M. Rossbach, 2010⁶.

1.2. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos

Apesar de diferentes protocolos terem sido propostos para diferenciar as hiPSCs em cardiomiócitos (CMs), todos eles ocorrem de um modo similar aos eventos do desenvolvimento embrionário. Existem três fases principais da diferenciação dos cardiomiócitos *in vitro*: indução / diferenciação da mesoderme cardíaca, especificação e proliferação das células progenitoras cardíacas e diferenciação destas células em CMs maduros⁷⁻⁹. Assim, inicialmente, as células pluripotentes passam por uma ativação da via de sinalização da Wnt, por meio da inibição da via glicogênio sintase quinase 3, dando origem à mesendoderme. Nessa etapa do processo, as células são suscetíveis a se tornarem tecidos endodérmicos ou mesodérmicos, dependendo do tempo de ação e concentração da molécula utilizada para a ativação desta via^{7,10,11}. Após a formação da

mesoderme, ocorre a especificação cardíaca através da inativação da via da Wnt. Nessa etapa, acontece a clivagem e fosforilação do complexo de β -catenina no citoplasma. Uma vez livre no citoplasma, ela migra para o núcleo, ativando a expressão de fatores de transcrição que levarão para a especificação cardíaca¹². Durante o processo de formação das células progenitoras cardíacas, há um aumento progressivo da expressão de alguns reguladores do desenvolvimento cardíaco (como *GATA4*, *MEF2C*, *ISL1* e *NKX2.5*). Após 15-20 dias do início da diferenciação, estas células já começam a expressar algumas proteínas cardíacas (como a Troponina I (Tnni3) e Troponina T (Tnnt2)) que aumentam progressivamente conforme o amadurecimento dos CMs¹¹ (Figura 2).

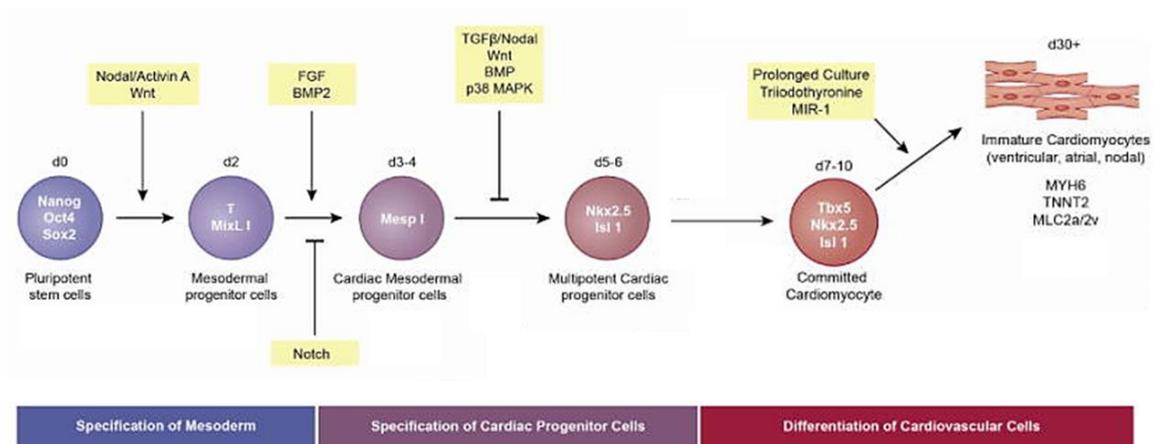


Figura 2: Etapas da diferenciação das hiPSCs em CMs. As moléculas e vias de sinalização estão indicadas nos retângulos amarelos. Os fatores de transcrição (dentro das células) expressos por cada tipo de célula e os genes / proteínas estruturais expressos pelos CMs também são indicados. Modificado de Doyle e colaboradores, 2015⁹.

Dessa forma, as hiPSCs transformaram a abordagem para estudar o desenvolvimento do coração e das doenças cardíacas, pois permitiram, pela primeira vez, o uso de células humanas de pacientes para modelar esses processos *in vitro*^{8,13}.

Além disso, os cardiomiócitos derivados das hiPSCs (hiPSC-CMs) oferecem uma nova alternativa para o desenvolvimento de novas terapias baseadas em células para substituir o tecido cardíaco danificado^{8,14}. Até o momento, os estudos de modelagem demonstraram que é possível recriar os aspectos das doenças cardiovasculares *in vitro* utilizando células “paciente-específicas”, enquanto a terapia com hiPSC-CMs mostrou que essas células podem reparar o músculo cardíaco de regiões infartadas em modelos animais^{15,16}.

No entanto, a imaturidade dos hiPSC-CMs gerados limita suas possíveis aplicações para regeneração cardíaca e modelagem de doenças, pois independente do protocolo de diferenciação cardíaca, os hiPSC-CMs obtidos possuem expressão gênica, propriedades estruturais e funcionais mais semelhantes ao fenótipo de CMs fetais do que com a dos CMs adultos^{13,17}. A grande preocupação com o uso dos hiPSC-CMs com fenótipo relativamente imaturo são as diferenças significativas nas suas propriedades contráteis quando comparado com CMs adultos. Apesar dos hiPSC-CMs expressarem todos os canais de íons naturalmente encontrados no tecido cardíaco adulto, estas células apresentam menor volume e exibem potenciais de ação e correntes de cálcio inferiores aos encontrados em CMs adultos^{13,18}. Além disso, as forças de contração geradas pelos hiPSC-CMs são aproximadamente 10 a 100 vezes menores que as dos CMs adultos¹⁹.

Em recente trabalho onde foi avaliado a injeção de hiPSC-CMs no dia 20 da diferenciação em modelo animal pós-infarto, foi observado que estas células enxertadas foram capazes de proliferar, maturar no tecido e melhorar a função contrátil do miocárdio. No entanto, os animais desenvolveram arritmia severa após a injeção dos hiPSC-CMs²⁰.

Além disso, a diferenciação das hiPSCs em CMs resulta em muitos tipos de CMs: atriais ventriculares, nodais e de condução^{11,21}. Embora evidências preliminares indiquem que os hiPSC-CMs podem enxertar e melhorar a função cardíaca, essa resposta é acompanhada de arritmia, que pode ser uma condição com risco de vida. A arritmia pode ser explicada pelo fraco acoplamento entre as células ou excessivo número de CMs condutores especializados, indicando que precisamos entender melhor o processo que direciona a maturação das células cardíacas a tecidos condutores especializados ou a cardiomiócitos de trabalho.

Nesse sentido, Lee e colaboradores investigaram o desenvolvimento de linhagens atriais e ventriculares a partir das hiPSCs e mostraram que a sinalização de ácido retinóico no estágio de desenvolvimento da mesoderme é necessária para essa especificação²². Esses achados fornecem importantes evidências que o direcionamento da diferenciação, onde posteriormente resultará nos diferentes tipos de CMs é dependente da indução da diferenciação na sua etapa inicial, quando há a formação do mesoderme.

Atualmente, várias abordagens, tanto químicas quanto físicas, têm sido estudadas para desenvolver a maturação dos hiPSC-CMs e direcionar a sua diferenciação. Entre elas decidimos focar no estímulo elétrico (ES, do inglês *electrical stimulation*)²³.

1.3. A influência do estímulo elétrico na diferenciação e maturação dos hiPSC-CMs

Durante o desenvolvimento, o coração é extremamente sensível ao seu ambiente embrionário como, por exemplo, matriz extracelular, fatores solúveis, sinais mecânicos e elétricos. Dessa forma, o ES é essencial para o seu processo de diferenciação e está relacionado com o comprometimento da linhagem cardíaca^{24,25}.

Portanto, visando mimetizar o que acontece na embriogênese, o ES tem sido utilizado para aumentar a eficiência da diferenciação cardíaca de hiPSC-CMs²⁶⁻²⁸.

Em um estudo onde os hiPSC-CMs foram submetidos a 7 dias de ES (do dia 7 ao dia 14 da diferenciação), os autores mostraram que estas células exibiram propriedades compatíveis com a maturação dos cardiomiócitos. Entre as principais alterações encontradas nos hiPSC-CMs com ES podemos citar maior área celular, menor taxas de proliferação, maior alinhamento das células e miofibrilas e aumento na amplitude dos transientes de Ca^{2+} comparados com os hiPSC-CMs sem estímulo²⁷. Em outro estudo que também estimulou eletricamente os hiPSC-CMs por 7 dias (do dia 23 ao dia 30 da diferenciação), foi observado que os hiPSC-CMs com ES apresentaram maior expressão de conexinas e estruturas sarcoméricas e adaptaram sua taxa de batimento à frequência com que foram estimulados²⁹.

Recentemente, Ronaldson-Bouchard e colaboradores avaliaram o efeito do ES em hiPSC-CMs estimulados por 14 dias (do dia 7 ao dia 28 da diferenciação). Os resultados mostraram que estas células apresentaram características semelhantes aos CMs adultos em relação ao seu perfil de expressão gênica, ultraestrutura (aumento no tamanho celular e dos sarcômeros, maior organização dos filamentos de α -actinina e densidade de mitocôndrias e presença de túbulos transversais). Ainda, o metabolismo oxidativo, a relação positiva força-frequência e os parâmetros funcionais de cálcio dos hiPSC-CMs estimulados foram semelhantes com aqueles encontrados em CMs adultos³⁰.

O ES tem sido amplamente utilizado para melhorar a maturação dos hiPSC-CMs. Porém, são raros os trabalhos que avaliam o efeito do ES no início da diferenciação (dia 0) das hiPSCs em CMs. Em um estudo onde as hiPSCs foram submetidas a 30 dias de ES, a partir do dia 0 da diferenciação, os resultados obtidos

mostraram que o ES aumentou a frequência das contrações espontâneas dos hiPSC-CMs. Além disso, estas células apresentaram aumento na expressão de genes progenitores cardíacos (como *NKX2.5* e *GATA4*) quando foram eletricamente estimuladas²⁸

Apesar do ES ter sido usado com sucesso como uma abordagem para desenvolver a maturação dos hiPSC-CMs, esses estudos não avaliaram qual tipo de população dessas células foi gerada²⁸⁻³⁰. Além disso, como a capacidade de gerar tipos específicos de hiPSC-CMs depende de estímulos na etapa de desenvolvimento da mesoderme, sugerimos que o ES deva ser iniciado antes, durante o período inicial da diferenciação das hiPSCs, onde estas células ainda possuem alta plasticidade e não estão comprometida com nenhuma linhagem celular específica. O uso de populações mistas (atrial, ventricular e de condução) é problemático, pois os diferentes subtipos celulares podem influenciar facilmente os resultados da doença *in vitro* e alterar o comportamento dos enxertos cardiovasculares *in vivo*²². Dessa forma, para ser possível estudar e tratar doenças que afetam regiões específicas do coração, é essencial desenvolver estratégias de diferenciação que promovam a geração de cada um desses tipos de cardiomiócitos.

Por isso, neste estudo, queríamos usar o ES antes que a diferenciação fosse alcançada para direcionar o processo de diferenciação celular preferencialmente para um subtipo específico de célula, bem como para um fenótipo mais maduro.

1.4. Sistema de condução ventricular

Vários fatores de transcrição são necessários para estabelecer a cardiogênese e a linhagem cardíaca a partir de células-tronco pluripotentes. Por exemplo, *IRX3*, *NKX2.5* e *TBX5* interagem em um complexo transcricional necessário para o

desenvolvimento e funções apropriadas do sistema de condução ventricular (VCS, do inglês *ventricular conduction system*). Como pode ser observado na figura 3, esses fatores atuam de forma conjunta na regulação do programa gênico de condução e na indução da expressão de conexina 40 e inibição de conexina 43, respectivamente enriquecidas no VCS e nos CMs ventriculares (de trabalho)^{31,32} (Figura 3).

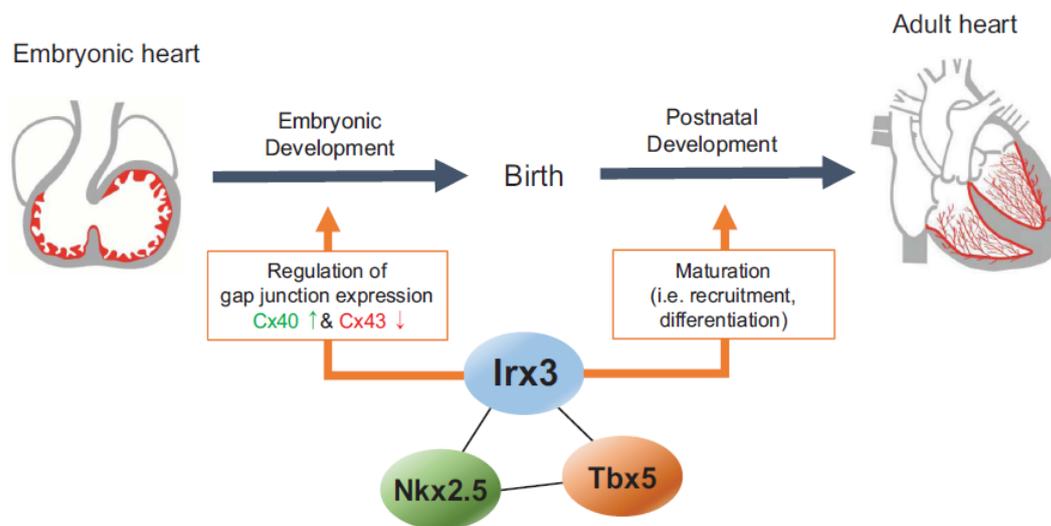


Figura 3: Modelo esquemático do fator de transcrição Irx3 interagindo com o Nkx2.5 e Tbx5 no desenvolvimento e maturação do VCS. Cx40: conexina 40; Cx43: conexina 43. Kim e colaboradores, 2016³¹.

A subunidade do canal de sódio Nav1.5 (codificada pelo gene *SCN5A*) desempenha um papel crucial para garantir que o coração se contraia regularmente como um sincício funcional. O influxo de íons de sódio através dos canais cardíacos de sódio dependentes de voltagem é responsável pelo aumento rápido inicial do potencial de ação cardíaco e pela condução do impulso elétrico em todo o coração^{33,34}. Assim como o Nav1.5, a conexina 40 (codificada pelo gene *GJA5*) também é fundamental para a rápida condução dos impulsos elétricos através dos ventrículos^{31,35}. Além disso, outras proteínas como o Hcn4 (do inglês, *Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*) e contactina 2 também são abundantemente expressas no VCS e,

por isso, consideradas marcadores para o VCS. O Hcn4 é ativado gradualmente no VCS durante o desenvolvimento fetal, enquanto a expressão de contactina 2 é ativada em torno do nascimento, indicando que o VCS passa por uma especialização e maturação adicionais no período perinatal^{34,36}. O Hcn4 é necessário para a atividade de marcapasso e pouco expresso no miocárdio de trabalho^{37,38}. A contactina 2 é expressa em todo o VCS, incluindo a rede distal de fibras de condução rápida (células de Purkinje), e pode estar envolvida na formação da rede do sistema de condução cardíaco e a excitabilidade de suas células componentes³⁶. Na tabela 1 estão descritos os principais marcadores do VCS.

Tabela 1: Principais marcadores do VCS.

Marcador	Definição
<i>NKX2.5</i>	Fator de transcrição
<i>IRX3</i>	Fator de transcrição
<i>TBX5</i>	Fator de transcrição
<i>GJA5</i>	Gene que codifica a proteína conexina 40
<i>HCN4</i>	Gene que codifica o canal de potássio Hcn4
<i>SCN5A</i>	Gene que codifica o canal de sódio Nav1.5
<i>Contactina 2</i>	Gene / proteína presente nas células de Purkinje

Portanto, as células encontradas no VCS são dedicadas à transmissão de impulsos elétricos através dos ventrículos, garantindo que o coração se contraia regularmente como um sincício funcional³⁷. Populações enriquecidas com esse tipo celular são importantes para modelar doenças que afetam regiões específicas do coração, como fibrilação atrial, cardiomiopatia hipertrófica e outros defeitos cardíacos congênitos^{22,39}. Por outro lado, CMs ventriculares (de trabalho), expressam proteínas típicas do aparelho contrátil e são responsáveis pela força de contração cardíaca⁴⁰.

Nesse sentido, populações de células altamente enriquecidas com CMs ventriculares, desprovidas de células marcapasso e atriais contaminantes, seriam uma população candidata ideal para o desenvolvimento de terapias baseadas em células destinadas à remuscularização da parede ventricular em pacientes que sofrem de infarto do miocárdio^{22,40}. A eliminação das células não ventriculares pode reduzir as arritmias observadas em modelos animais após o transplante de populações mistas de hiPSC-CMs¹⁵. Nesse contexto, hiPSC-CMs exibindo propriedades de células do VCS seriam uma população ideal de células candidatas para modelar doenças para elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos relacionados à arritmia.

O controle preciso do direcionamento e desenvolvimento de determinado subtipo celular tem implicações importantes para guiar o potencial uso dos hiPSC-CMs, seja para aplicações terapêuticas, seja para o estudo de doenças cardiovasculares. Apesar de já ter sido mostrado que o ES influencia o processo de maturação dos hiPSC-CMs, a maioria dos estudos publicados aplicaram o ES em hiPSC-CMs já diferenciados e os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo não estão completamente esclarecidos^{23,28}. Dessa forma, ainda não se conhece o efeito do ES no processo de diferenciação das hiPSCs em CMs, bem como os fatores que determinam a maturação destas células em CMs de condução ou de trabalho.

Nesse contexto, os hiPSC-CMs que exibem propriedades das células do VCS podem ser cruciais para modelagem de doenças para elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos relacionados à arritmia, servir como plataforma de medicina de precisão para rastrear medicamentos para pacientes individuais e desenvolver novas terapias. Com base nisso, testamos se o ES, aplicado nas hiPSCs no início do processo de diferenciação, direciona os hiPSC-CMs a um fenótipo do sistema de condução com características mais maduras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Testar a hipótese que o ES aplicado nas hiPSCs no início do processo de diferenciação direciona os hiPSCs-CMs a um fenótipo de células especializadas em condução mais maduras.

2.2. Objetivos específicos

1. Gerar cardiomiócitos a partir de hiPSCs reprogramadas de células obtidas da urina e fibroblastos de indivíduos saudáveis;
2. Utilizar o ES para diferenciar as hiPSCs reprogramadas de fibroblastos em hiPSC-CMs;
3. Caracterizar o fenótipo dos hiPSCs-CMs através de parâmetros moleculares e funcionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Incor/HCFMUSP e pela Comissão de Ética e para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (SDC 4455/16/121) (Anexo A).

Todos os procedimentos estão de acordo com as recomendações e as diretrizes das principais sociedades específicas da área no país e no exterior. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual concordaram com a doação da amostra de urina para o estudo (Anexo B).

3.2. Obtenção e cultivo das células progenitoras de urina (UPCs)

As amostras de urina foram coletadas de indivíduos saudáveis do ambulatório do Instituto do Coração. As UPCs foram obtidas de acordo com protocolo já publicado pelo nosso do laboratório⁴¹. As amostras de urina foram coletadas em potes estéreis e transferidas para tubos estéreis para centrifugação. Os tubos foram então centrifugados e os *pellets* foram ressuspensos com tampão fosfato salino (PBS) (Thermo Fisher - #10010023) contendo 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Thermo Fisher - #15140148). Um segundo passo de centrifugação foi realizado e o *pellet* foi ressuspenso em 1ml de um meio de cultura específico, chamado “UPC mix”. Este meio contém 50% de meio REGM (Lonza - #CC-4127), 50% de meio DMEM, *High Glucose* (Thermo Fisher - #11965092) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Thermo Fisher - #12657029) e 1% de antibióticos e suplementado com *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) (Thermo Fisher - #PHG0314) a 2,5ng/ml. As células obtidas foram semeadas em um poço de placa de cultura de 24 poços revestida com 0,1% de gelatina (Merck -

#G1890). Somente após 72h do isolamento foram iniciadas as trocas de meio. As colônias de UPCs foram observadas entre 3 e 10 dias após o isolamento. As UPCs foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até alcançarem confluência quando foram amplificadas, através do método enzimático com Tryple (Thermo Fisher - #A1217701), criopreservadas e reprogramadas⁴¹.

3.3. Reprogramação das UPCs em hiPSCs

As UPCs foram reprogramadas em hiPSCs utilizando um método não-integrativo pela superexpressão dos fatores de pluripotência com o uso de plasmídeo episomal conforme protocolo amplamente utilizado pelo laboratório⁴¹. As UPCs foram semeadas em um poço de uma placa de 12 poços revestida com Geltrex® (Thermo Fisher - #A1413302) a 10µg/cm² com meio de cultura “UPC mix”. Ao atingirem a confluência de 50 a 80%, as células foram transfectadas utilizando-se o kit de reprogramação Epi5 que contém 5 fatores de reprogramação: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, and *LIN28* (Thermo Fisher - #A15960). Após 24h do início de reprogramação e até 3º dia, o meio foi trocado diariamente com “UPC mix”. A partir do 4º dia e até o início do surgimento das primeiras colônias de hiPSCs, as trocas de meio foram feitas utilizando-se o meio comercial *Essential 6* (Thermo Fisher - #A1516401) suplementado com FGF2 a 10ng/ml. Assim que as colônias de hiPSCs emergiram, o meio *Essential 6* foi substituído pelo meio de cultura *Essential 8* (Thermo Fisher - #A1517001) para promover o crescimento adequado das hiPSCs.

As colônias de hiPSCs que apresentaram morfologia típica (colônias homogêneas e bem delimitadas) foram coletadas manualmente dentro do fluxo laminar utilizando o microscópio *EVOS XL Image System* (Thermo Fisher - #AME3300). No mínimo 12 colônias foram selecionadas. Cada colônia foi plaqueada em um poço de

uma placa de 12 poços revestida com Geltrex® com meio *Essential 8* acrescido de 5µM de *Rock Inhibitor* (Ri) (Merck - #Y0503). As hiPSCs foram mantidas em cultivo em estufa a 37°C e 5% de CO₂, amplificadas utilizando *Versene* (Thermo Fisher - #15040-066), criopreservadas e posteriormente caracterizadas.

As hiPSCs provenientes de fibroblastos utilizadas neste trabalho (clones SS109 e WTD) foram isoladas e reprogramadas em estudos anteriores^{42,43}.

3.4. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos

Os experimentos foram desenvolvidos em dois laboratórios independentes (Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) em São Paulo, Brasil e no Laboratório da Faculdade de Medicina e Ciências da *King's College London* em Londres, Inglaterra) utilizando diferentes clones de hiPSCs e protocolos de diferenciação.

No laboratório do Professor José Eduardo Krieger (LGCM), os clones U4MP1, U4MP5 (reprogramados de UPCs) e SS109 (reprogramados de fibroblastos) foram submetidos à diferenciação em cardiomiócitos segundo protocolo do laboratório⁴² adaptado de Lian e colaboradores⁷. As células foram expandidas até atingirem 70% de confluência, foram dissociadas usando *Versene*, ressuspensas em E8 suplementado com 5µM de Ri e plaqueadas 1,2x10⁵ células por poço (placa de 12 poços) revestido com Geltrex® (20µg/cm²). O meio foi trocado diariamente com 50% de E8 e 50% de mTeSR (StemCell Technologies - #85850) e após 3 dias estas células atingiram 80 a 95% de confluência quando foi iniciado o protocolo de diferenciação (dia 0). Neste dia, foi primeiramente feita uma lavagem com RPMI com L-Glutamina (Thermo Fisher - #11875-119). Posteriormente, foi adicionado o meio RPMI suplementado com 1X de B27 sem insulina (Thermo Fisher - #A1895601) (meio RB-) e 6µM ou 9µM de inibidor

de GSK3 (CHIR99021 - Merck - #361571), dependendo do clone. 24 horas depois, 50% do meio foi removido e foi adicionado novo meio RB- com 6 μ M ou 9 μ M de CHIR e 20ng/mL de BMP4 (R&D Systems - #314-BP-010). A seguir, no dia 2, foi feita uma nova lavagem com RPMI e foi adicionado o meio RB- suplementado com as drogas utilizadas para inativação da via da Wnt, 2.5 μ M de XAV939 (Cayman - #13596) e 2.5 μ M de KY2111 (Cayman - #14315). Este meio permaneceu nas células pelas próximas 48 horas, não havendo troca de meio no dia 3. No dia 4, o meio foi substituído por RPMI suplementado com 1X de B27 com insulina (Thermo Fisher - #17504044) (meio RB+) e 2.5 μ M de XAV e 2.5 μ M de KY. Entre os dias 5 e 7 o meio foi trocado diariamente apenas com RB+ e a partir do dia 8 o meio foi substituído por RB+ suplementado com 500 μ g/mL de Albumina (Merck - #A9576), 213 μ g/mL de ácido ascórbico (Merck - #A4544), 1% de aminoácidos não essenciais (Thermo Fisher - #11140050) e 0,1% de antioxidante (Merck - #A1345) (meio CDM5). Os hiPSC-CMs foram mantidos nesse meio até a coleta das amostras no dia 15.

No laboratório da Professora Elisabeth Ehler (*King's College London*), o clone WTD (reprogramado de fibroblastos) foi diferenciado utilizando o kit de diferenciação de CM (Thermo Fisher - # A2921201) de acordo com as instruções do fabricante. Após 15 dias de diferenciação, os hiPSC-CMs foram dissociados através da tripsina (Sigma Aldrich- #59417C), contados e plaqueados sobre matriz de geltrex na quantidade de 1 x 10⁶ células por poço em placa de 6 poços. Nos dias 20 a 25, os hiPSC-CMs foram selecionados usando meio RPMI-1640 sem adição de glicose (Thermo Fisher - # 11879020) suplementado com 4mM de lactato (Sigma-Aldrich - #L4263) e albumina a 500g/mL. Os hiPSC-CMs foram mantidos em meio de manutenção CM (Thermo Fisher, MA, EUA) até a coleta das amostras.

Os protocolos e dados de diferenciação corroboraram nos dois laboratórios e para os testes com ES apenas os clones reprogramados de fibroblastos, SS109 e WTD, foram utilizados.

As hiPSCs foram plaqueadas nas placas convencionais e um aparato contendo o campo elétrico com eletrodos foi colocado na parte superior da placa no início da diferenciação. As hiPSCs foram diferenciados diretamente nas placas de cultura (grupo controle, CTL) ou com ES. Para a padronização do ES, as hiPSCs foram estimuladas durante 2 horas do dia 0 ao dia 3 da diferenciação através do equipamento *C-Pace EP Cell Culture Stimulator* (IonOptix, MA, USA) e receberam um estímulo com campo de 10V, pulso de 4ms e frequência de 0,5Hz. Após a padronização do ES e análise dos resultados preliminares, as hiPSCs foram diferenciadas com ES durante 2 horas do dia 0 ao dia 15 da diferenciação com os mesmos parâmetros citados acima.

Após 15 dias de diferenciação, os hiPSC-CMs foram dissociados e plaqueados de acordo com o guia do usuário do kit de diferenciação de CM. Dos dias 20 a 25, os hiPSC-CMs foram selecionados utilizando meio RPMI-1640 menos glicose suplementado com lactato 4 mM e albumina a 500 g/mL (Thermo Fisher, MA, EUA). Os hiPSC-CMs foram mantidos em meio de manutenção CM (Thermo Fisher, MA, EUA) até a coleta das amostras. Para ensaios funcionais ou de imunofluorescência, as células foram semeadas em placas de 24 poços revestidas com geltrex (150 µ/ml, GIBCO, Life Technologies) (Ibid - #82401) ou placas de 35 mm (Nunc - #150460), respectivamente, e mantidas em cultura por até 30 dias (60 dias após o início da diferenciação) (Figura 4).

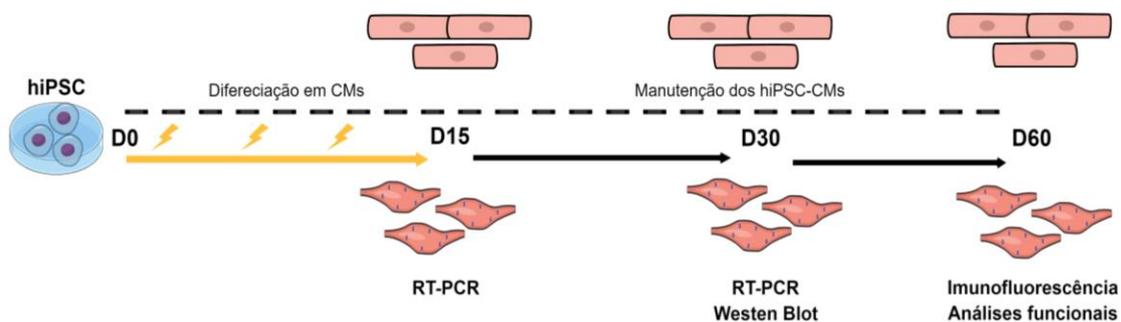


Figura 4: Desenho experimental do trabalho proposto.

3.5. PCR e RT-PCR

O RNA total das hiPSCs e dos hiPSC-CMs (nos dias 15 e 30 da diferenciação) foram extraídos utilizando-se 1mL do reagente Trizol (Thermo Fisher - #15596026) ao poço de cultivo (placa de 12) e homogeneizando o líquido. Esta solução foi mantida a -20°C para consequente extração com clorofórmio, isopropanol e etanol conforme recomendado pelo fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima de transcrição reversa *SuperScript IV* (Thermo Fisher - #18090010) de acordo com o manual do fabricante.

As verificações de presença dos genes a partir dos cDNAs foram realizadas através das reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o kit *GoTaq DNA polymerase* (Promega - #M3001).

A reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) foi realizada através do aparelho Quantistudio (Thermo Fisher). Os *primers* utilizados estão listados na tabela 2.

O protocolo experimental consistiu de reações contendo 1µl de cDNA *template* (2,5ng/µL), 0,16µl de cada *primer* sense e antisense específicos para cada gene em estudo (200nM final), 5µL do 2X *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher) e

3,84 μ L de água DEPC, totalizando um volume final de 10 μ L. O 2X *SYBR Green PCR Master Mix* contém a *AmpliTaq DNA Polymerase*, o *SYBR Green Buffer*, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *SYBR Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX. A amplificação consistiu em: 95°C por 10 minutos para a ativação da *AmpliTaq DNA Polymerase*, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (associação do primer e extensão). A coleta do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo. Os genes *GAPDH*, beta-actina e beta-2 microglobulina foram utilizados como normalizadores e foi realizado um controle negativo para cada gene que consistiu em uma reação com ausência de cDNA.

Os valores médios de Ct para cada gene de interesse foram subtraídos pelos respectivos valores médios de Ct obtidos para o gene normalizador. Os dados foram apresentados em expressão relativa, de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representando quantas vezes cada gene está mais ou menos expresso em relação à amostra controle.

Tabela 2: Lista com a sequência dos primers utilizados. RT-PCR para os genes *Irx3*, *Nkx2.5*, *Hcn4*, *Tnni1* e *Tnni3* foi realizada usando sondas TaqMan.

Gene	Sequência sense	Sequência antisense
Normalizador		
<i>GAPDH</i>	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC
<i>Beta actin</i>	AGCCTCGCCTTTGCCGA	GCGCGGCGATATCATCATC
<i>Beta-2 microglobulin</i>	CTGGAGGCTATCCAGCGTA	GTCAACTTCAATGTCGGATGGA
Pluripotência		
<i>NANOG</i>	ACCTCAGCTACAAACAGGTGA	CCATTGCTATTCTTCGGCCA
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	TCCTGCAGTGCCCGAAA	CACTCGGACCACATCCTTCT
<i>REX1 / ZFP42</i>	CGCGGTAACAGGGACAAATG	CACCTCCAGGCAGTAGTGAT
<i>SOX2</i>	AGGATAAGTACACGCTGCCC	TAACTGTCCATGCGCTGGTT
Cardiomiócitos		
<i>CALM3</i>	CTGACCAGCTGACTGAGGAG	GGAGAAGGCCTCCTTGAACCT
<i>GATA4</i>	AAAACGGAAGCCCAAGAACC	GTTGCTGGAGTTGCTGGAAG
<i>GJA1</i>	AAAGTACCAAACAGCAGCGG	CTCCAGCAGTTGAGTAGGCT
<i>GJA5</i>	AGAAGAAGCAGCCAGAGTGT	AAGAGGACAGTGAGCCAGAC
<i>KCNJ3</i>	AATCTCGGCAGACACCTGA	TCCAGTTCAAGTTGGTCAAGG
<i>MEF2C</i>	ATCTGCCCTCAGTCAGTTGG	GGGTGGTGGTACGGTCTCTA
<i>MYL2</i>	CCGGGTCCAATTAACCTTACTGT	GCCTTCAGGGTCAAACACTTT
<i>SCN5a</i>	GAGCGGCTGTGAAGATTCTG	TAAGGCTGAGACATTGCCCA

3.6. Citometria de Fluxo

As células foram dissociadas utilizando-se *Versene*, ressuspensas em PBS, e contadas em câmara de Neubauer. As células foram incubadas com PBS com 2% de SFB e com o corante de viabilidade celular 7-Amino-actinomicina D (7AAD) (Thermo Fisher - #A1310) por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas e fixadas com 1% de paraformaldeído (PFA). Posteriormente as células foram permeabilizadas em caso de marcação nuclear com PBS com 5% de SFB acrescido de 0,2% de Triton X-100 por 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens, as células foram então incubadas com os anticorpos primários (Tabela 3) diluídos em PBS com 2% de SFB com 0,2% de Triton X-100 por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos secundários (Tabela 3) diluídos na mesma solução que o primário. Após a incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz e sobre refrigeração a 4°C, as células foram lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpos não ligados e fixadas com PFA a 1%. Um total de 20.000 eventos foram

lidos pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisados pelo software *FCS Express 4 Flow Cytometry*.

3.7. Imunofluorescência

As hiPSCs e os hiPSC-CMs (no dia 15 da diferenciação) foram fixados com PFA a 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente. Quando a marcação foi realizada para proteínas nucleares as células foram permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a três lavagens com PBS, as células foram bloqueadas por 30 minutos com tampão de bloqueio contendo PBS com 3% de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Merck - #A7906). As células foram então incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2) diluídos em PBS com 1% de BSA à 4°C durante a noite. Após incubação com os primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Tabela 3) também diluídos em PBS com 1% de BSA por 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz. Os núcleos foram corados com DAPI (Thermo Fisher - # D21490) por 1 minuto e as análises foram realizadas utilizando o microscópio invertido de fluorescência (*Zeiss*). As imagens foram analisadas e tratadas no software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Para análises de microscopia confocal, os hiPSCs-CMs foram semeados em placas individuais de 35mm (Nunc - #150460) revestidas de geltrex. Os hiPSCs-CMs foram fixados nos dias 60 da diferenciação com PFA a 4% por 10 min e permeabilizados com Triton X-100 a 0,2% em PBS por 5 min. Os anticorpos primários e secundários (Tabela 3) foram diluídos com BSA a 1% em TBS e as incubações foram realizadas em temperatura ambiente por 1 hora. Os núcleos foram corados com DAPI (Thermo Fisher - #D21490) e os filamentos de F-actina com Alexa 633 faloidina

(1:100, Thermo Fisher - #A22284). As células foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos e montadas com lamínulas em 0,1 M Tris-HCl (pH 9.5)-glicerol (3:7) com 50 mg/mL de n-propilgalato como reagente anti-desbotamento. As células foram analisadas utilizando um microscópio confocal de laser invertido *TCS SP5 II Leica* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e as imagens foram analisadas e tratadas no *software ImageJ*.

Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados.

Anticorpo	Marca	Catálogo	Hospedeiro	IF	CF	WB
Pluripotência						
Nanog	<i>Cell Signaling</i>	D73GH	Coelho	1/300	1/200	-
Oct4 (POU5F1)	<i>Cell Signaling</i>	C30A3	Coelho	1/300	1/400	-
Sox2	<i>Cell Signaling</i>	3579S	Coelho	1/300	1/300	-
Ssea4	<i>Cell Signaling</i>	4755	Camundongo	1/300	1/300	-
Tra-1-60	<i>Cell Signaling</i>	4746S	Camundongo	1/300	-	-
Tra-1-81	<i>Cell Signaling</i>	4745S	Camundongo	1/300	-	-
Cardiomiócitos						
α actina	<i>Sigma</i>	A7811	Camundongo	1/500	-	-
α actinina	<i>Merck</i>	MAB-1682	Camundongo	1/100	-	1/1000
β catenina	<i>Sigma</i>	C2206	Coelho	-	-	1/2000
β actina	<i>Abcam</i>	Ab8227	Coelho	-	-	1/2000
All actin	<i>Sigma</i>	A2066	Coelho	-	-	1/2000
CD31 (PECAM-1)	<i>Merck</i>	CBL468	Camundongo	-	1/20	-
CD34-488	<i>Biologend</i>	343518	Camundongo	-	1/20	-
Citoqueratina	<i>Dako</i>	Z0622	Coelho	1/200	-	-
Conexina 40	<i>Sigma</i>	36-4900	Coelho	1/50	-	-
Conexina 43	<i>Sigma</i>	71-0700	Coelho	1/50	-	-
Contactina 2	<i>R&D</i>	AF4439	Cabra	-	-	1/1000
Desmina	<i>Dako</i>	M0760	Camundongo	1/200	-	-
Gata4	<i>Santa Cruz</i>	SC1237	Cabra	1/200	1/100	-
Hcn4	<i>Millipore</i>	Ab5808	Coelho	-	-	1/1000
Irx3-G6	<i>Santa Cruz</i>	SC166877	Camundongo	-	1/100	-
Mef2C	<i>LsBio</i>	LS-C381553	Coelho	1/200	-	-
Mesp1	<i>Abcam</i>	Ab77013	Camundongo	1/200	-	-
Miomesina	<i>Sigma</i>	PA5-53143	Coelho	1/100	-	-
MyBP-C	<i>Sigma</i>	SAB3500295	Coelho	1/100	-	-
Nkx2.5	<i>Cell Signaling</i>	8792S	Coelho	1/200	1/300	-
Nkx2.5	<i>SantaCruz</i>	sc-376565	Camundongo	-	-	1/1000
Proteína M	<i>Sigma</i>	MABT94	Camundongo	1/200	-	-
Troponina Cardíaca I	<i>GeneTex</i>	GTX10239	Camundongo	-	-	1/1000
Troponina Cardíaca T	<i>HyTest</i>	4T19-2	Cabra	1/200	1/1000	-
Vimentina	<i>Abcam</i>	Ab8069	Camundongo	1/25	-	-
Secundários fluorescência						
Alexa 488 anti-cabra	<i>Thermo Fisher</i>	A11055	Macaco	1/300	1/1000	-
Alexa 488 anti-coelho	<i>Thermo Fisher</i>	A11008	Cabra	1/300	1/1000	-
Alexa 488 anti-camundongo	<i>Thermo Fisher</i>	A21042	Cabra	1/300	1/1000	-
Alexa 555 anti-coelho	<i>Thermo Fisher</i>	A31572	Macaco	1/300	1/1000	-
Alexa 555 anti-camundongo	<i>Thermo Fisher</i>	A21422	Cabra	1/300	1/1000	-
Alexa 647 anti-cabra	<i>Thermo Fisher</i>	A21447	Macaco	-	1/1000	-
Alexa 647 anti-coelho	<i>Thermo Fisher</i>	A21244	Cabra	-	1/1000	-
Cy2 anti-coelho	<i>Abcam</i>	Ab6940	Cabra	1/100	-	-
Cy3 anti-camundongo	<i>Abcam</i>	Ab97035	Cabra	1/500	-	-
Secundários conjugados com HRP						
Anti IgG de camundongo	<i>R&D Systems</i>	HAF007	Cabra	-	-	1/2000
Anti IgG de rato	<i>R&D Systems</i>	HAF005	Cabra	-	-	1/2000
Anti IgG de coelho	<i>Thermo Fisher</i>	G21234	Cabra	-	-	1/2000

IF: imunofluorescência; CF: citometria de fluxo; WB: western blotting

3.8. Extração de proteínas

Os homogenatos celulares foram obtidos pela lise mecânica das células, previamente lavadas com PBS 1X, em tampão de lise contendo: 50mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, 0,5% de deoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100 e 0,1% de SDS, pH 8,0 (tampão RIPA), acrescido de coquetel de inibidores de fosfatases (C2 e C3) e proteases (1:300, Merck - #539134), seguido da retirada dos debris celulares por centrifugação a 12.000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -20°C até o momento do uso. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de BCA com um kit de ensaio proteico (PIERCE Biotechnology - #23225).

3.9. Eletroforese e Western Blotting

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS onde 25µg de proteína foi diluída em tampão de amostra (50mM de Tris-HCL, pH 6,8; 0,5% de SDS; 10% de glicerol; 0,1% de azul de bromofenol) acrescido de 50mM de ditiotreitol e aquecida a 95°C por 10 min. As amostras e o padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards*, Bio-Rad) foram aplicadas em géis de 8 ou 10%, contendo o tampão de eletroforese (25mM de Tris-base, pH 7,4; 192mM de glicina). A corrida foi realizada inicialmente a 80V e depois se aumentou a 120V até o final. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (0,45µm, *GE Healthcare* - #45-004-110) utilizando o sistema de transferência semi-seco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad), com o tampão de transferência (25mM de Tris-base, 192mM de glicina e metanol a 20%). Fixou-se a voltagem em 12V, e a transferência foi realizada durante 90 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (5% de BSA, 150mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl e Tween 20

a 0,01%) à temperatura ambiente durante 1h para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários (Tabela 3) a 4°C por 16 horas sob leve agitação. O anticorpo policlonal contra Nrap foi previamente utilizado e caracterizado em laboratório⁴⁴. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com TBST a 0,01% e a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em solução de bloqueio à temperatura ambiente por 1 hora. A membrana foi novamente lavada e incubada por 1 minuto com o substrato da enzima peroxidase (100mM de Tris; pH8.9, 1,25mM de Luminol, 200µM de Ácido p-Coumárico e 5,4mM de água oxigenada) e o sinal luminescente foi captado por 2 a 6 minutos no fotodocumentador ImageQuant (*LAS 4000*). A análise da densitometria das bandas foi realizada com o programa *ImageJ*.

3.10. Capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas

As hiPSCs foram cultivadas em placas B60 até atingirem confluência. As colônias foram cortadas em pedaços pequenos e uniformes e foram soltas com o auxílio de um raspador celular. As células foram centrifugadas e os *pellets* foram ressuspendidos em 150µl de Geltrex® a 2mg/ml. Através de uma parceria com pesquisadores do biotério do Incor, a suspensão de células foi enviada para o biotério e injetada em camundongos imunodeficientes, linhagem nude (BALB/c nude). Os tumores começaram a aparecer a partir da oitava semana após a injeção.

Após o surgimento do teratoma, os camundongos foram sacrificados e o tumor foi extraído, cortado e armazenado em solução de PFA a 4% a 4°C durante a noite. No dia seguinte, o tumor foi incluído em parafina, seccionado e corado com hematoxilina e eosina.

3.11. Integridade cromossômica

A análise do cariótipo foi terceirizada. As hiPSCs foram plaqueadas em garrafas, cultivadas até atingirem 70% de confluência e enviadas para o laboratório. Os cromossomos foram obtidos a partir da cultura das hiPSCs com bandeamento G (GTG) e foi realizado um estudo numérico e estrutural dos cromossomos por análise microscopia computadorizada com resolução de 300 a 550 bandas. Um total de 20 metáfases foi analisado.

3.12. Análise funcionais dos hiPSC-CMs

Para as análises funcionais, os hiPSCs-CMs foram semeados em placas de 24 poços (Nunc - #150460) revestidas de geltrex. Os hiPSC-CMs no dia 60 da diferenciação foram incubados com Fuo-4 AM (para análises intracelulares dos transientes de Ca^{2+} (CaT); Molecular Probes - #F14201) ou com di-8-ANEPPS (para análises de potencial de ação (AP); Biotium - #61012) conforme descrito anteriormente⁴⁵. Resumidamente, as células foram incubadas por 20 minutos a 37°C para carregar os indicadores no citosol. Em seguida os hiPSC-CMs foram perfundidos com solução de *Tyrode* (140mM de NaCl, 6mM de KCl, 1mM de $MgCl_2$, 5mM de HEPES, 2mM de $CaCl_2$, e 10mM de glicose com pH 7,4) por 20 minutos para permitir a desesterificação dos indicadores antes dos hiPSC-CMs serem analisados.

Os hiPSC-CMs tanto CTL e ES foram estimulados a 1Hz com 10V de estímulo e 4ms de duração pelo equipamento *MyoPacer EP Cell Stimulator* (IonOptix) e as imagens foram obtidas através do microscópio confocal de laser invertido Axio Observer (Zeiss). As sequências de imagens foram analisadas com um *script* personalizado no *software* MATLAB R2006b (The MathWorks, Inc.).

3.13. Análises estatísticas

Para avaliar a influência do ES no processo de diferenciação e maturação dos hiPSC-CMs, estas células eletricamente estimuladas foram comparadas com os hiPSC-CMs que foram diferenciados nas placas de cultivo convencionais (grupo controle).

Para cada grupo de resultados, testes estatísticos apropriados foram utilizados para avaliar o nível de significância alcançado. As análises foram realizadas no programa estatístico *GraphPad Prism 8* e os resultados encontrados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os valores foram analisados quanto à sua normalidade de distribuição pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*. Dependendo do experimento em questão, as comparações entre os grupos foram realizadas através do teste *t de Student*, ANOVA (1 e 2 vias) e post hoc teste de *Tukey* e/ou *Bonferroni*. Em caso de não normalidade, foi aplicado o teste de *Friedman* (não paramétrico). O nível de significância adotado no estudo foi de 5% ($\alpha < 0,05$). Todos os experimentos foram realizados independentemente pelo menos três vezes, ou seja, três grupos de hiPSC-CMs foram gerados em 3 rodadas diferentes de diferenciações com o intuito de se excluir qualquer viés decorrente da análise de uma única diferenciação.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e cultivo das UPCs

As amostras de urina foram coletadas de 3 indivíduos saudáveis denominados UPC4, UPC50 e UPC63. O volume de urina coletado foi de 200ml para o indivíduo UPC4 (sexo masculino), 210ml para o UPC50 (sexo feminino) e 340ml para o UPC63 (sexo feminino). As células de urina destes 3 indivíduos foram isoladas com sucesso, com obtenção das primeiras colônias a partir de 3 a 10 dias do isolamento (Figura 5A). As células obtidas apresentaram morfologia típica de UPCs, células alongadas com formato de grão de arroz (Figura 5B). As células foram mantidas em cultura e amplificadas até atingirem a passagem 3, quando foram reprogramadas e congeladas para criopreservação.

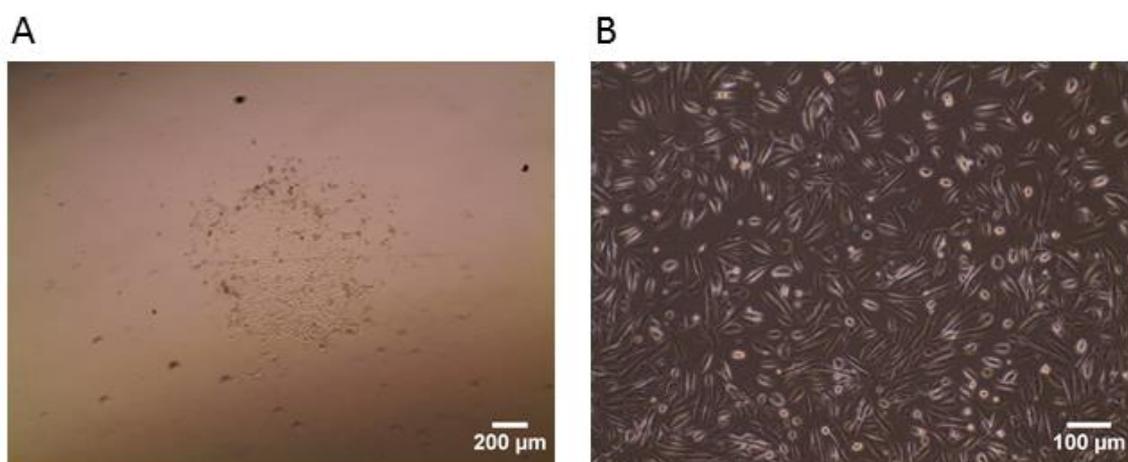


Figura 5: Morfologia das UPCs. (A) Colônia de UPCs 9 dias após o isolamento (40x); (B) Morfologia das UPCs (100x). Barra de escala: 200μm e 100μm.

4.2. Reprogramação das UPCs em hiPSCs e caracterização das hiPSCs

As colônias de UPCs dos 3 clones foram reprogramadas em hiPSCs. No período entre 15 e 20 dias após o início da reprogramação as colônias individuais foram

coletadas e passadas isoladamente para novos poços (Figura 6A). As colônias que melhor se adaptaram com as condições de cultivo apresentando morfologia equivalente às das células-tronco embrionárias e baixa taxa de diferenciação espontânea foram selecionadas para expansão e caracterização para serem utilizadas na diferenciação em cardiomiócitos. Foram selecionados para esse processo os clones U4MP1, U4MP3, U4MP5, U4MP6 e U4MV1 do indivíduo UPC4. Os clones dos demais indivíduos não se enquadraram nos critérios citados acima e foram excluídos desse estudo.

Os 5 clones das hiPSCs geradas (U4MP1, U4MP3, U4MP5, U4MP6 e U4MV1) e o clone de hiPSCs obtido a partir de fibroblasto (SS109) foram caracterizados conforme sua morfologia, presença de marcadores moleculares e proteicos, capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas e integridade cromossômica.

A morfologia das células foi analisada e os clones apresentaram células pequenas, justapostas, em monocamada e com margem bem definida. Conforme mostra a Figura 6, também podemos observar a composição nuclear dessas células abrangendo quase todo o citoplasma, presença de nucleossomos e ausência de diferenciação espontânea anormal. Além disso, são células que podem ser facilmente amplificadas e que apresentam alta taxa de proliferação celular e forte aderência às placas de cultivo de plástico revestidas com Geltrex®. Importante ressaltar que estas características são comuns de hiPSCs.

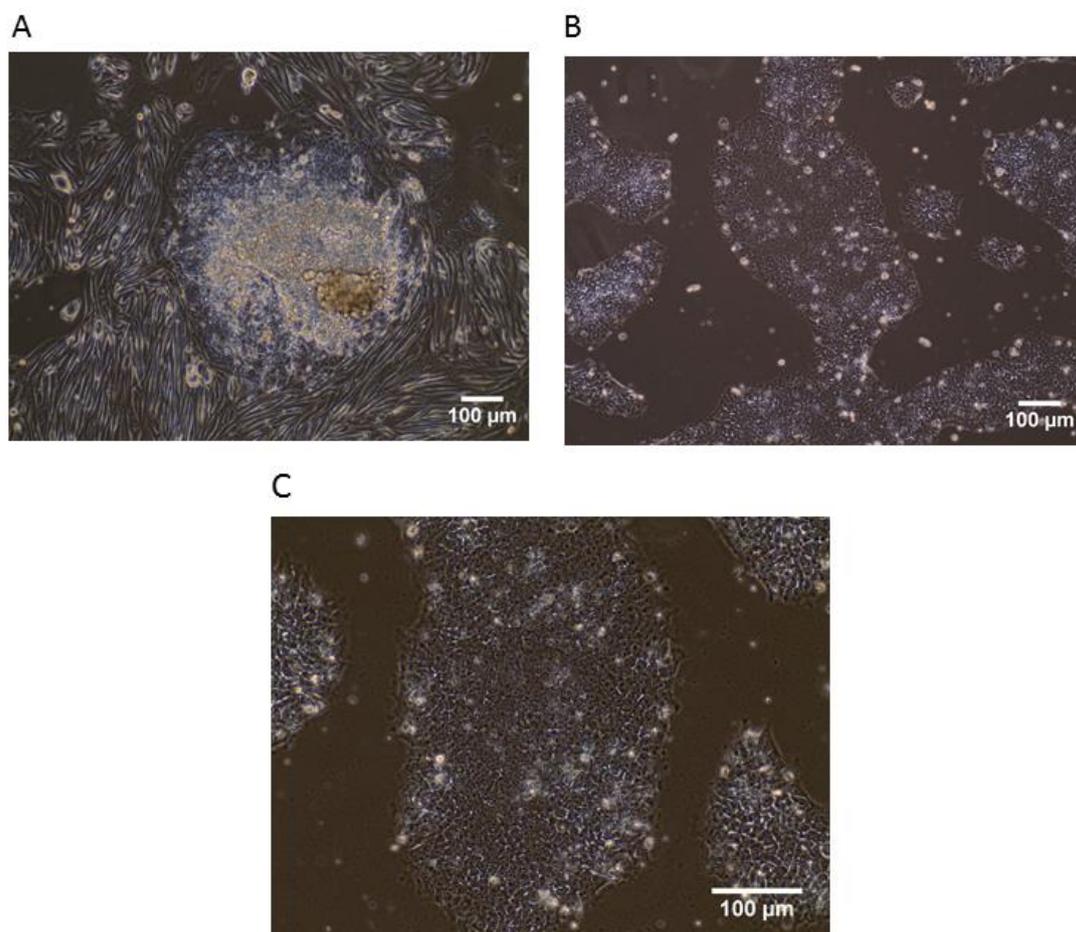


Figura 6: Reprogramação e caracterização morfológica das hiPSCs. (A) Colônia de hiPSC emergindo 25 dias após o início da reprogramação (100x); (B e C) Morfologia das hiPSCs em 100x e 200x, respectivamente. Barra de escala: 100μm

Os clones de hiPSCs expressaram os marcadores moleculares de pluripotência analisados (*SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG* e *REX1*) assim como o controle positivo (Figura 7).

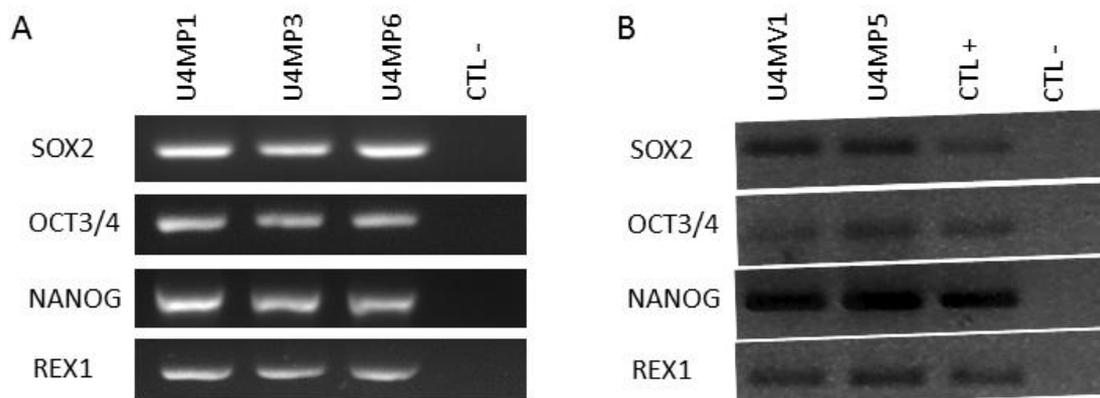


Figura 7: Caracterização molecular das hiPSCs. Amplificação de genes marcadores de células pluripotentes, *SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG* e *REX1* nos clones de hiPSCs U4MP1, U4MP3 e U4MP6 (A) e U4MV1 e U4MP5 (B). CTL-: controle negativo; CTL+: controle positivo.

As hiPSCs geradas também foram avaliadas quanto a sua expressão de proteínas marcadoras de células-tronco pluripotentes. Primeiramente, foi verificada a expressão destas proteínas através da técnica de imunofluorescência. Observou-se a presença de seis marcadores de pluripotência, sendo três marcadores nucleares (*Sox2*, *Nanog*, *Oct3/4*) e três marcadores de membrana (*Ssea-4*, *Tra-1-60*, *Tra-1-81*) para todos os clones avaliados. Ainda, conforme a Figura 8 pode-se observar através da intercalação com DAPI (marcador inespecífico de DNA) que a maioria das células expressa as proteínas marcadas e sua correta localização (fatores de transcrição no núcleo e proteínas de membrana na membrana celular).

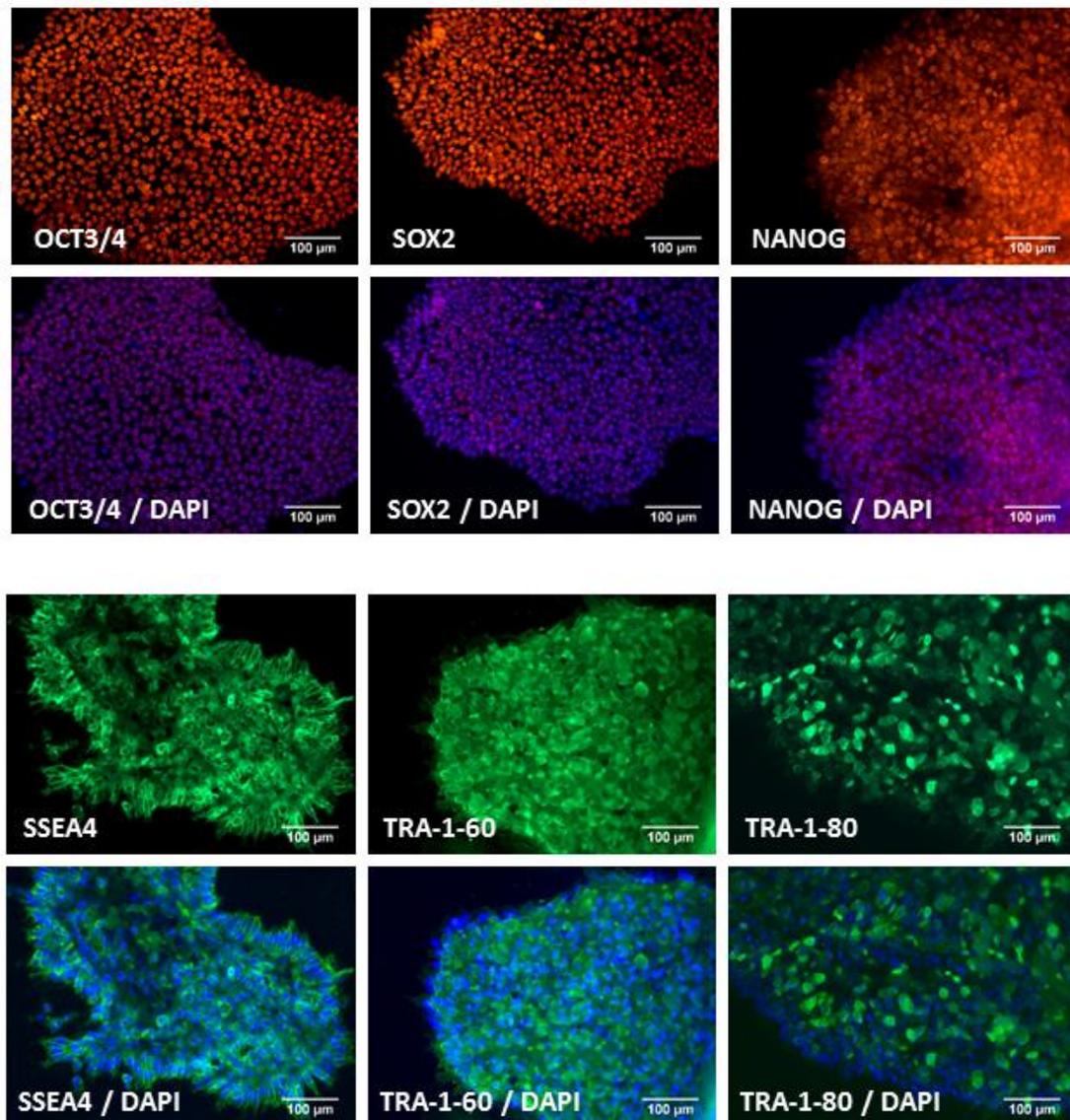


Figura 8: Imagem representativa da expressão de marcadores proteicos de pluripotência das hiPSCs (200x). Marcadores nucleares (Oct 3/4, Sox2 e Nanog) em vermelho e de membrana (Ssea-4, Tra-1-60, Tra-1-81) em verde. Sobreposição: co-expressão do marcador de pluripotência e do marcador nuclear, DAPI (em azul). Barra de escala: 100µm.

Os clones de hiPSCs avaliados por citometria de fluxo apresentaram mais de 50% de células positivas para os 4 marcadores testados (Ssea-4, Nanog, Sox2 e Oct 4), com exceção do clone U4MV1 para os marcadores Ssea-4 e Oct 4 (Tabela 4). Além disso, os resultados obtidos mostram mais de 77% de células positivas para a marcação

dos anticorpos Nanog e Sox2 em todos os clones de hiPSCs analisados. Ainda, conforme a Figura 9, também é possível observar a homogeneidade da população de hiPSCs, onde a área delimitada (denominada “gate”) demarca os eventos (células) com perfil considerado positivo para as análises (células negativas para o marcador 7AAD).

Tabela 4: Porcentagem de eventos positivos obtidos por citometria de fluxo de marcadores proteicos de pluripotência das hiPSCs.

Clone	Marcadores			
	Ssea 4	Nanog	Sox2	Oct4
U4MP1	87,10	82,24	81,96	52,64
U4MP5	63,13	98,74	97,71	67,10
U4MP6	-	97,80	90,10	80,40
U4MV1	14,55	77,59	98,01	11,34
SS109	96,86	86,18	85,04	85,04

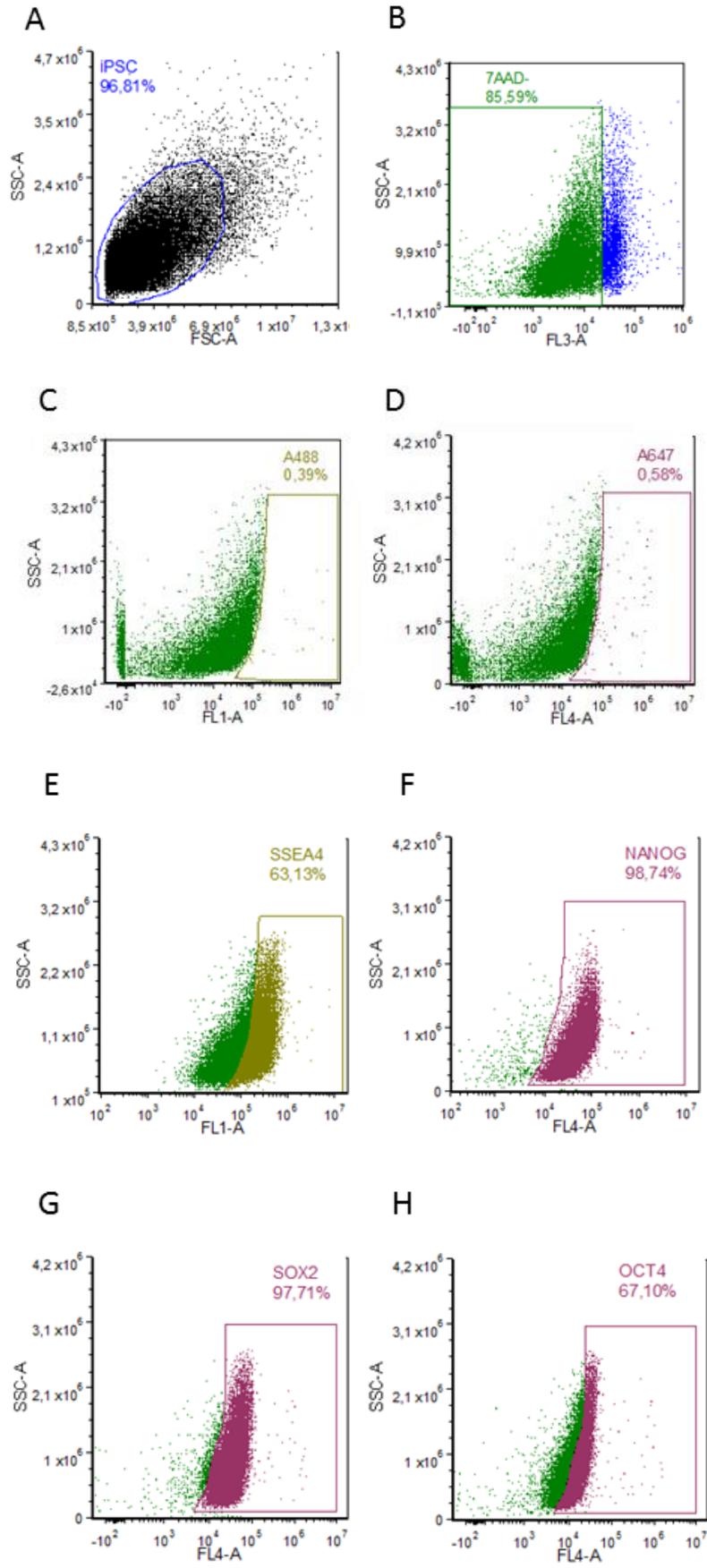
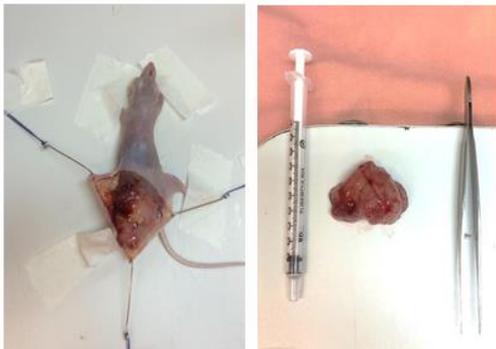


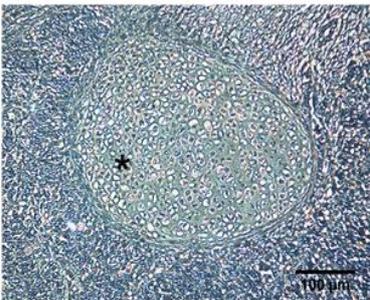
Figura 9: Imagens representativas da caracterização das hiPSC por citometria de fluxo. (A) Estratégia de “gate”; (B) Viabilidade celular (7AAD); (C e D) Marcação das células somente com anticorpo secundário; (E, F, G e H) Expressão dos anticorpos SSEA4, NANOG, SOX2 e OCT4, respectivamente, nas hiPSCs.

Quanto aos ensaios de verificação da pluripotência *in vivo*, as hiPSCs dos clones U4MP1, U4MP3 e U4MP6 foram injetadas em camundongos imunodeficientes. No entanto, apenas as hiPSCs do clone U4MP3 levaram à formação de um teratoma 8 semanas após a injeção (Figura 10A). Através de análises histológicas foi possível verificar a presença das 3 camadas germinativas: cartilagem com condrócitos (derivado da mesoderme), epitélio glandular provavelmente derivado do tecido gastrointestinal (derivado da endoderme) e estruturas semelhantes a rosetas imaturas (derivadas da ectoderme) (Figura 10B). Os camundongos que receberam injeção das hiPSCs dos outros clones foram mantidos durante 16 semanas no biotério, mas não houve a formação de teratoma.

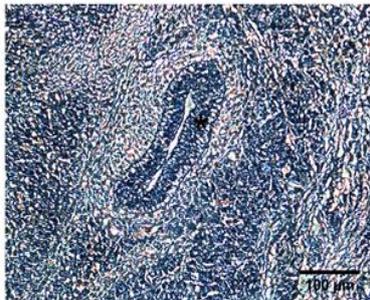
A



B



C



D

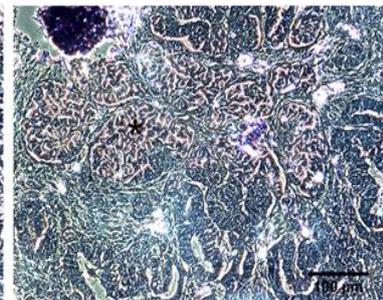


Figura 10: Análises histológicas de teratoma obtido após injeção intra-muscular das hiPSCs em camundongos imunodeficientes. (A) Tumor sendo extraído do camundongo (B) Cartilagem com condrócitos (derivado da mesoderme); (C) Epitélio glandular provavelmente derivado do tecido gastrointestinal (derivado da endoderme); (D) Estruturas semelhantes a rosetas imaturas (derivadas da ectoderme). Barra de escala: 100µm

Finalmente, foi verificada a estabilidade cromossômica dos clones de hiPSCs gerados pela análise do cariótipo. Os resultados mostraram que os clones SS109, U4MV1 e U4MP5 apresentaram cariótipo normal conforme o esperado. No entanto, os clones U4MP1 e U4MP3 apresentaram duas linhagens celulares, com a presença de trissomia do cromossomo 1 em, respectivamente, 50% e 22% das metáfases analisadas e as demais células apresentaram cariótipo normal (46,X,Y) (Figura 11). O clone U4MP6 apresentou cariótipo com trissomia do cromossomo 1 em todas as 20 metáfases analisadas.

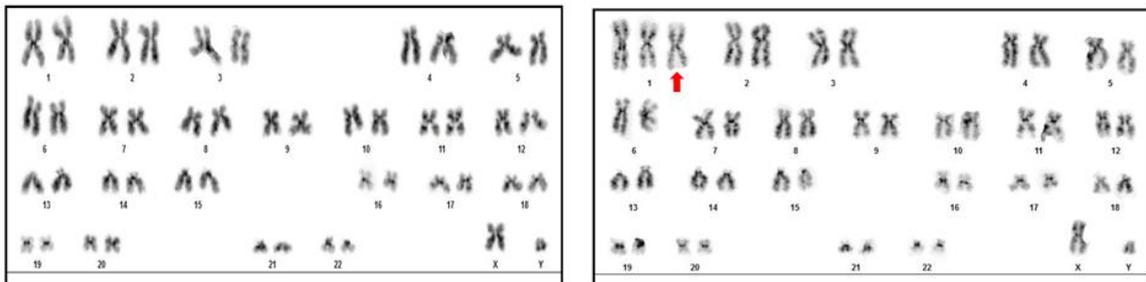


Figura 11: Cariótipo do clone U4MP3 normal (esquerda) e mostrando mosaicismos com algumas células portadoras de trissomia do cromossomo 1 (direita, seta).

4.3. Padronização da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs)

Com base nos resultados de caracterização das hiPSCs os clones U4MP5 e U4MP1 (reprogramados de UPCs) foram utilizados para serem submetidos à diferenciação em cardiomiócitos. Estes clones foram inicialmente diferenciados conforme o protocolo utilizado no laboratório, no entanto, após algumas tentativas, esse protocolo não foi capaz de resultar em células contráteis. Com isso, fez-se necessária a

adaptação desse protocolo e, após algumas variações, os primeiros hiPSC-CMs foram morfológicamente identificados e começaram a bater entre os dias 8 a 10 da diferenciação (dados não mostrados). A padronização deste protocolo foi inicialmente verificada de maneira relativa, por visualização no microscópio, considerando a eficiência da diferenciação da porcentagem de áreas contráteis no poço da placa de cultura. A eficiência deste protocolo estabelecido foi de 90% para o clone U4MP5 e 80% para o clone U4MP1.

Após a determinação desse protocolo com alta eficiência relativa, foram realizados ensaios para caracterizar a diferenciação cardíaca e avaliar o fenótipo dos hiPSC-CMs. A caracterização foi realizada em hiPSC-CMs dos clones SS109, U4MP1 e U4MP5 com 15 dias de diferenciação pela presença de marcadores moleculares e proteicos. As hiPSCs dos seus respectivos clones foram usadas como controle.

A Figura 12 mostra um aumento significativo da expressão de genes marcadores de células progenitoras cardíacas, *GATA4* e *MEF2C*, dos hiPSC-CMs com 15 dias de diferenciação. Além disso, observa-se um aumento significativo da expressão de genes marcadores de células cardíacas (*KCNJ3*, *MYL2*, *HCN4* e *TNNI3*). Os resultados mostram a média dos 3 clones (SS109, U4MP1 e U4MP5) para cada gene.

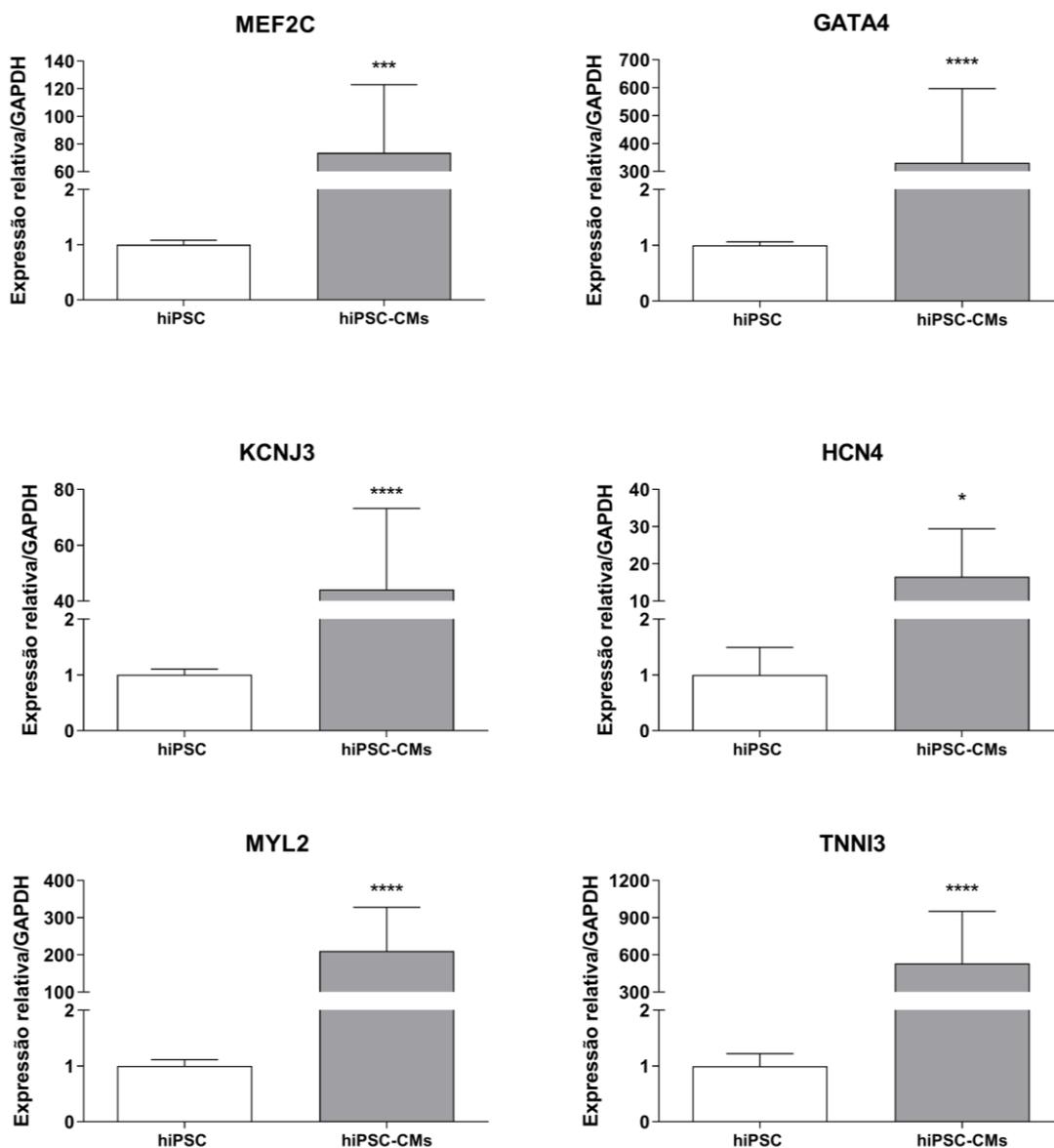


Figura 12: Caracterização molecular do *pool* dos hiPSC-CMs por qPCR no dia 15 da diferenciação. Resultados expressos como média \pm DP. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$ vs. hiPSCs.

Através da técnica de imunofluorescência observou-se a presença das proteínas estruturais de células progenitoras cardíacas, Mef2c, Gata4, Mesp1 e Nkx2.5, e da proteína contráctil dos cardiomiócitos adultos, Troponina T (cTnt) (Figura 13).

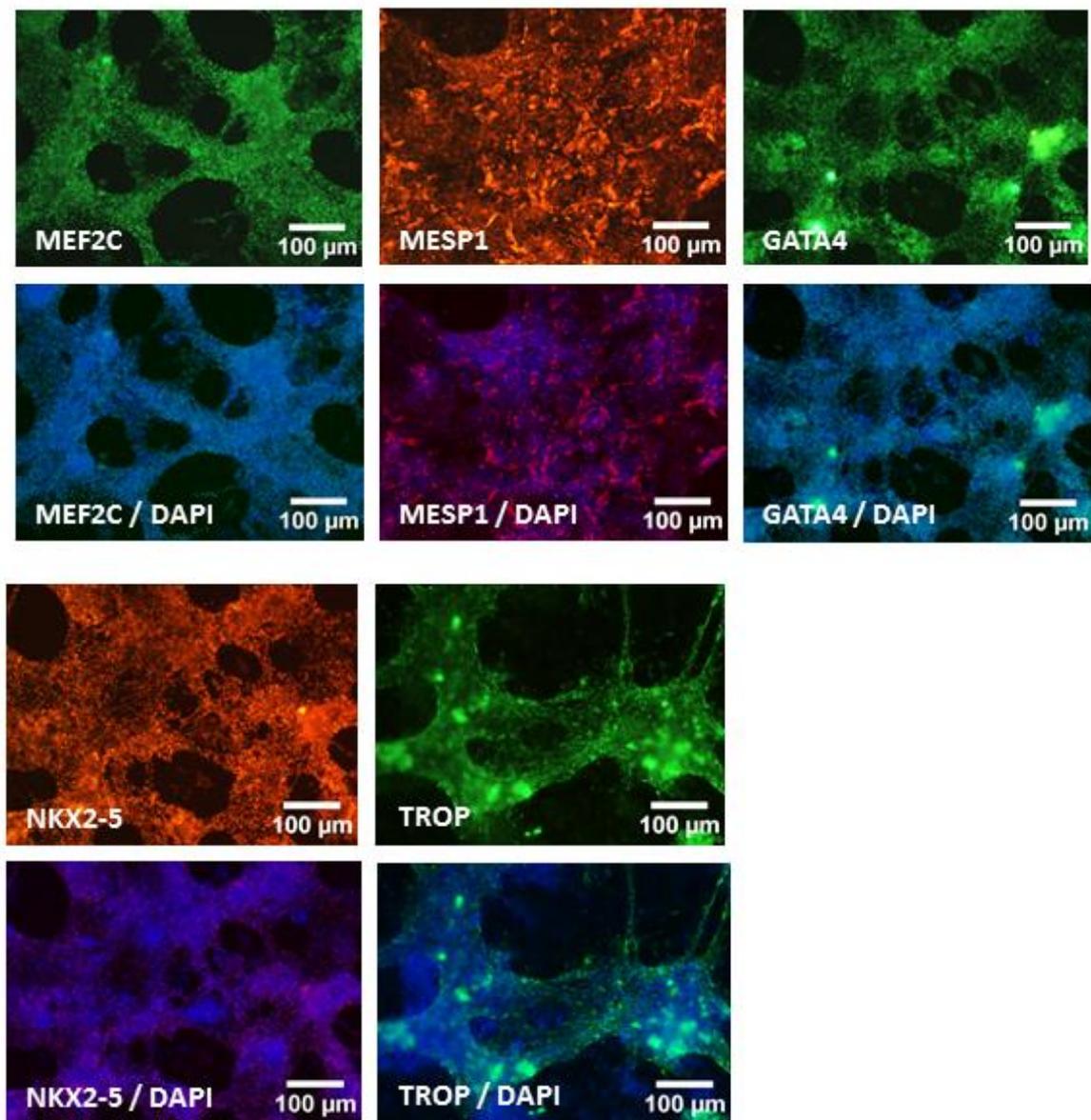


Figura 13: Imagem representativa da expressão de marcadores proteicos de células progenitoras cardíacas e cardiomiócitos dos hiPSC-CMs no dia 15 da diferenciação (100x). Células progenitoras cardíacas (Mef2c, Gata4, Mesp1 e Nkx2.5) e cardiomiócitos adultos (TROP). Sobreposição: co-expressão dos marcadores cardíacos e do marcador nuclear, DAPI (em azul). Barra de escala: 100µm.

A expressão das proteínas troponina e Nkx2.5 foi confirmada por western-blot onde também se observa a ausência dessas proteínas nas hiPSCs. Também foi observada a expressão da proteína específica cardíaca, α -actinina (Figura 14).

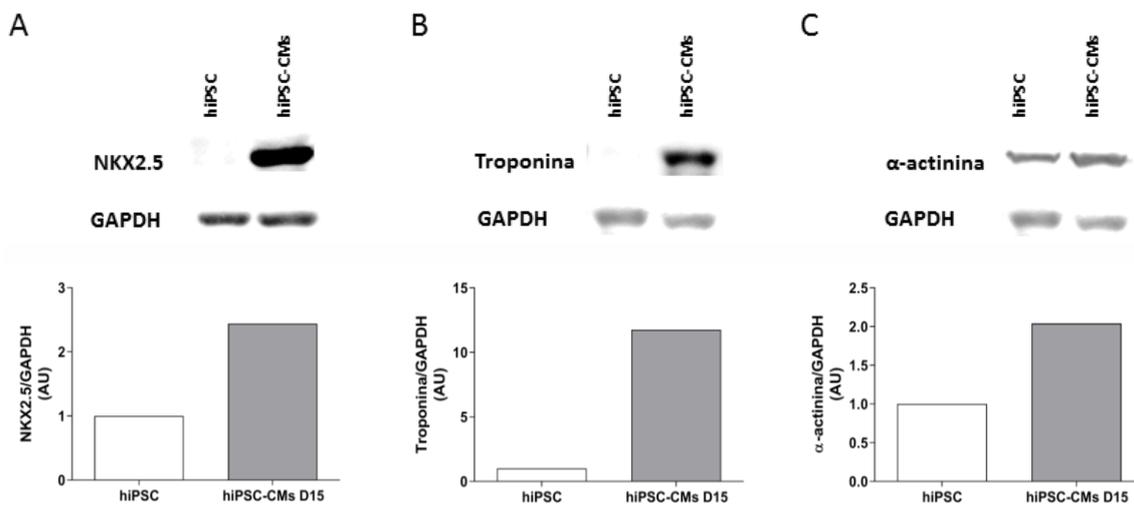


Figura 14: Expressão de marcadores proteicos de células progenitoras e cardíacas por Western-Blot no dia 15 da diferenciação. Imagem representativa de um dos clones.

Além disso, os resultados da caracterização dessas células por citometria de fluxo mostraram uma pequena porcentagem de células positivas para os marcadores CD34 (precursor endotelial) e CD31 (marcador de célula endotelial). Os resultados também mostraram que 33,78% das células são positivas para a marcação do anticorpo precursor de células progenitoras cardíacas, Nkx2.5. Por fim, quase todos os hiPSC-CMs gerados (99,37%) são positivos para o principal marcador cardíaco de proteínas contráteis, Troponina-T (cTNT) (Figura 15).

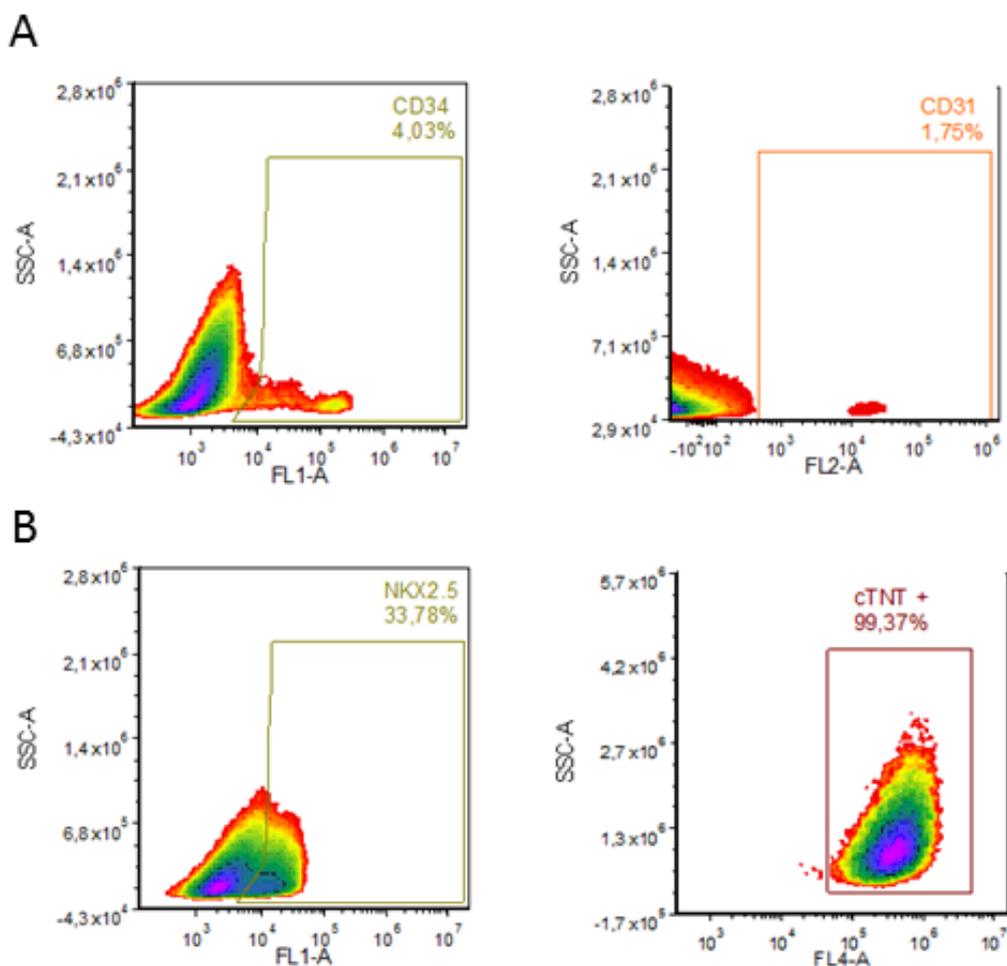


Figura 15: Imagens representativas da caracterização da diferenciação das hiPSCs em hiPSC-CMs por citometria de fluxo. (A) Marcadores endoteliais; (B) Precursor de células progenitoras cardíacas e marcador cardíaco.

4.4. Padronização da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES

Para estes testes foi utilizado o clone SS109 (reprogramado de fibroblastos) onde o estímulo foi primeiramente aplicado a partir do dia 0 da diferenciação intermitentemente. No entanto, após 3 dias quase todas as células soltaram e não conseguiram se diferenciar em hiPSC-CMs (dados não mostrados).

Posteriormente, foram feitos testes com duração menor do estímulo para avaliar se as hiPSCs conseguiriam se diferenciar em hiPSC-CMs na presença do estímulo. A padronização deste protocolo foi inicialmente verificada de maneira relativa,

da mesma forma que a padronização inicial do protocolo de diferenciação das hiPSCs em CMs, onde a eficiência da diferenciação foi considerada a porcentagem de áreas contráteis no poço da placa de cultura. Foram comparadas diversas combinações de tempos de estímulo, mas sempre iniciando no dia 0 e finalizando no dia 3 (dados não mostrados). Ao final das comparações realizadas a condição que gerou os resultados com maior eficiência (80 a 90%) no dia 15 da diferenciação, semelhante ao grupo controle, foi o estímulo por aplicado por 2h durante o dia 0 ao dia 3 da diferenciação (ANEXO C - Figura 1).

Após a definição do tempo de ES foi realizada a padronização desse protocolo inicialmente por expressão molecular. Os resultados mostraram que o gene *IRX3* foi super-regulado nos hiPSCs-CMs com ES após 6 e 15 dias da diferenciação (ANEXO C - Figura 2). Além disso, o grupo ES apresentou maior expressão de *GATA4*, *GJA5*, *CALM3* e *TNNI3* no dia 15. Ainda, em relação à expressão do gene *IRX3* ao longo do processo de diferenciação, foi observado que há um pico de expressão de *IRX3* no dia 4 de diferenciação para ambos os grupos (ANEXO C - Figura 3).

Além disso, essas células foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram um aumento na porcentagem de eventos positivos a partir do dia 4 da diferenciação cardíaca para os marcadores *Irx3*, *Gata4* e *Nkx2.5* para ambos os grupos e, através das imagens representativas, observou-se um aumento na granularidade dos hiPSC-CMs com ES no dia 6 da diferenciação (ANEXO C – Figuras 4 e 5).

Com relação aos parâmetros funcionais, observou-se uma diminuição da frequência dos batimentos dos hiPSC-CMs com ES em relação ao controle. Ainda, os parâmetros típicos de CaT, como a amplitude transitória do CaT, o tempo até o pico e a

taxa de decaimento do CaT, foram significativamente maiores nos hiPSC-CMs com ES em comparação com o controle (ANEXO C – Figura 6).

4.5. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES

Após a padronização inicial do ES, as hiPSCs provenientes do clone SS109 e WTD, gerados a partir de fibroblastos, foram diferenciadas em CMs com ES que foi aplicado por 2h durante o dia 0 a 15 da diferenciação. A morfologia destas células foi analisada e registrada ao longo do processo de diferenciação. Ao final dos 15 dias de diferenciação os dois grupos apresentaram semelhante eficiência relativa de diferenciação com 80 a 90% de áreas contráteis no poço de placa de cultura (Figura 16).

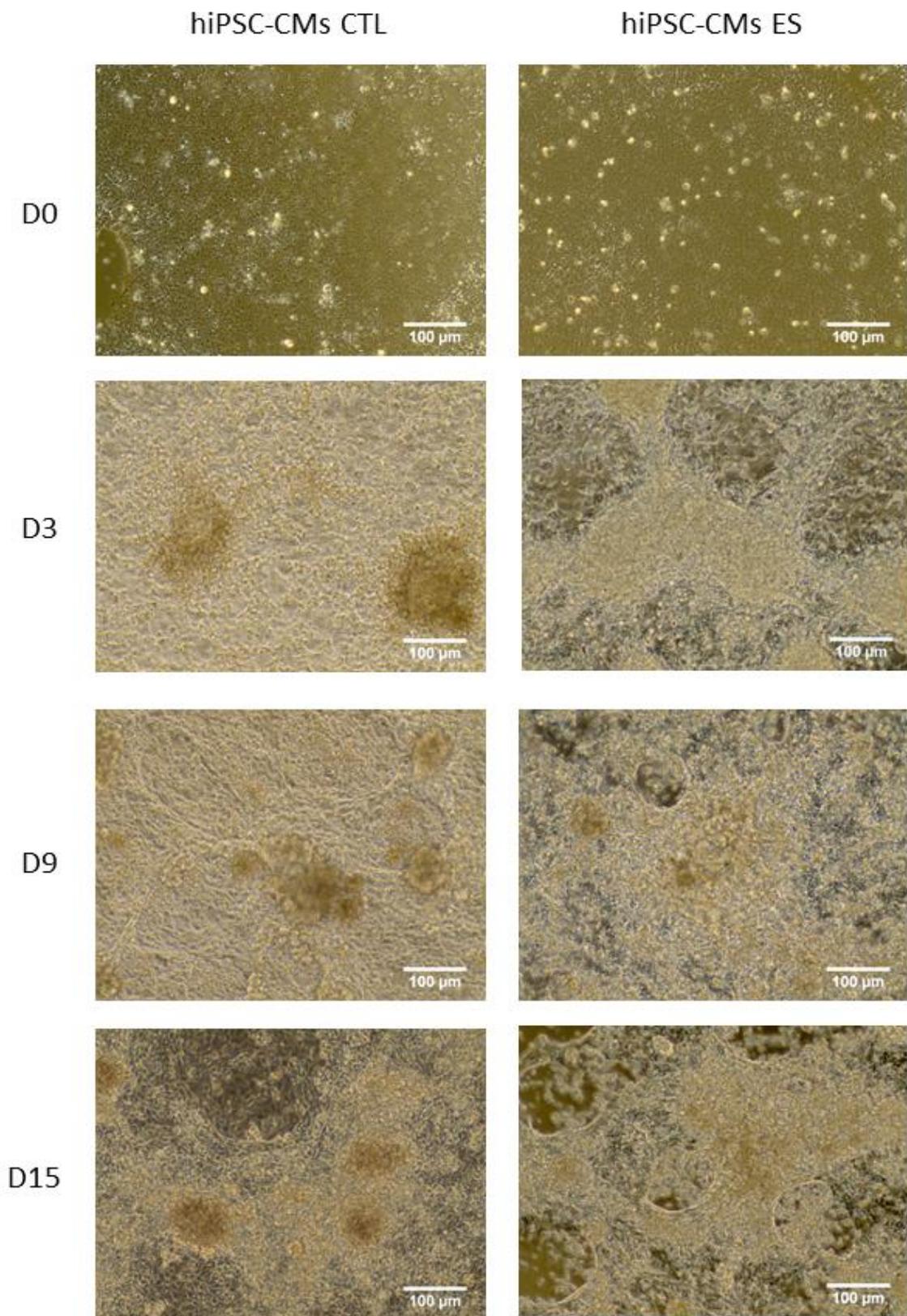


Figura 16: Morfologia dos hiPSC-CMs CTL e ES durante o processo de diferenciação (200x). Barra de escala: 100µm.

Para testar nossa hipótese de que o ES poderia diferenciar as hiPSCs em um tipo cardíaco específico, primeiro avaliamos a expressão dos fatores de transcrição *IRX3* e *NKX2.5* que estão associados ao desenvolvimento do VCS³¹ após 15 dias de diferenciação com ES utilizando RT-PCR. A expressão de *IRX3* e *NKX2.5* aumentou pelo ES ($1,00 \pm 0,09$ vs $29,75 \pm 9,65$; $p = 0,010$ e $1,00 \pm 0,11$ vs $92,86 \pm 31,83$; $p = 0,012$, respectivamente) (Figura 17A). Da mesma forma, a exposição ao ES aumentou a expressão dos genes associados à função do VCS (*HCN4* e *SCN5A*)³⁴ 2 semanas após o ES ter cessado, indicando que as características adquiridas hiPSCs-CMs foram mantidas ao longo do tempo ($1,00 \pm 0,05$ vs $3,95 \pm 0,48$; $p = 0,0040$ e $1,00 \pm 0,05$ vs $3,17 \pm 0,76$; $p = 0,0476$, respectivamente). Além disso, o gene que codifica a proteína conexina 43 (*GJA1*), expresso principalmente em CMs de trabalho, teve sua expressão diminuída nos hiPSCs-CM ES ($1,00 \pm 0,19$ vs $0,39 \pm 0,02$; $p = 0,0023$), enquanto a expressão do gene que codifica a proteína conexina 40 (*GJA5*) permaneceu inalterado ($1,00 \pm 0,05$ vs $1,02 \pm 0,13$; $p = 0,9190$) (Figura 17B).

Avaliamos a expressão de *TNNI1* e de *TNNI3* como indicadores de maturação e observamos que a expressão dos dois marcadores aumentou após 15 dias de exposição ao ES durante a diferenciação e permaneceu elevada até o dia 30 (*TNNI1*: $1,00 \pm 0,20$ vs $6,02 \pm 1,80$; $p = 0,0151$ no dia 15 e $1,00 \pm 0,45$ vs $6,93 \pm 0,63$; $p = 0,0005$ no dia 30; e *TNNI3*: $1,00 \pm 0,12$ vs $171,50 \pm 45,86$; $p = 0,0023$ no dia 15 e $1,00 \pm 0,15$ vs $18,72 \pm 2,58$; $p = 0,0023$ no dia 30) indicando que os hiPSCs-CM ES estão mais maduros em comparação com os controles (Figura 17C).

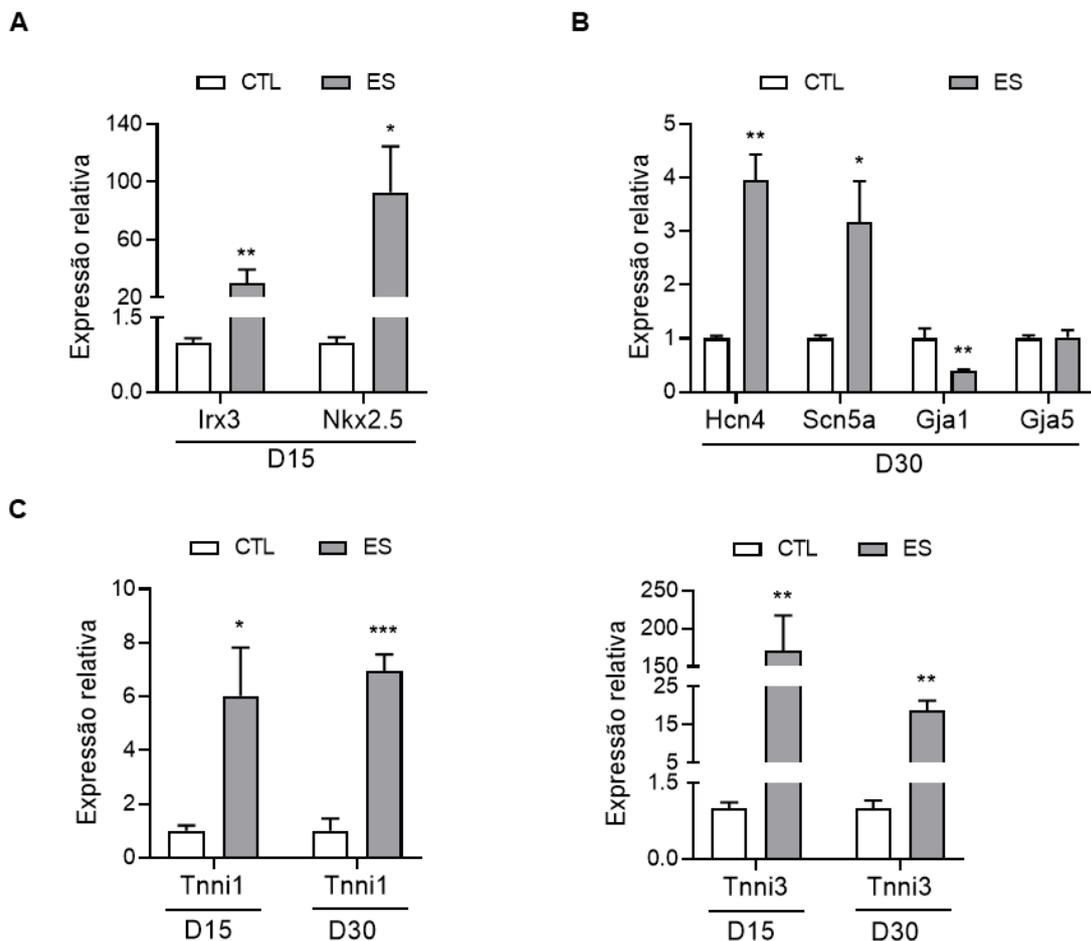


Figura 17: O ES regula positivamente a expressão de genes relacionados ao VCS durante a diferenciação cardíaca das hiPSCs. A) Expressão relativa dos fatores de transcrição *IRX3* e *NKX2.5* no dia 15 da diferenciação. B) Expressão relativa dos genes cardíacos *HCN4*, *SCN5A*, *GJA1* e *GJA5* no dia 30 da diferenciação. C) RT-PCR mostrando a expressão dos genes de cardiomiócitos maduros, *TNNI1* e *TNNI3*, nos dias 15 e 30 de diferenciação. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. hiPSC-CM CTL.

Para investigar mais a influência do ES na diferenciação dos hiPSC-CMs em relação ao destino do sistema de condução, avaliamos os níveis de proteína por Western Blot. Os níveis de proteína dos marcadores do VSC (contatina-2 e *Hcn4*)^{34,45} aumentaram significativamente nos hiPSC-CMs expostos ao ES em comparação com as células não estimuladas ($1,00 \pm 0,14$ vs $4,19 \pm 0,64$; $p = 0,0082$ e $1,00 \pm 0,09$ vs $3,45 \pm 0,35$; $p = 0,0026$, respectivamente) (Figura 18A).

Da mesma forma, o ES aumentou a expressão de proteínas que servem como marcadores de maturação, como a proteína troponina I, nos hiPSC-CMs ES em comparação com os hiPSC-CMs CTL ($1,00 \pm 0,87$ vs $19,19 \pm 1,86$; $p = 0,0009$) (Figura 18A).

Além das miofibrilas no citoesqueleto, analisamos as proteínas dos discos intercalares, proteína de ancoragem relacionada à nebulina (Nrap), uma proteína estriada específica do músculo cardíaco que está concentrada nos discos intercalares⁴⁶ e β -catenina, uma proteína das junções de adesão que ancora as miofibrilas⁴⁷. Os resultados mostraram que o ES aumentou a expressão de Nrap ($1,00 \pm 0,37$ vs $4,69 \pm 1,08$; $p = 0,0317$) e β -catenina ($1,00 \pm 0,06$ vs $1,59 \pm 0,19$; $p = 0,0456$) em comparação com as células não estimuladas (Figura 18B)

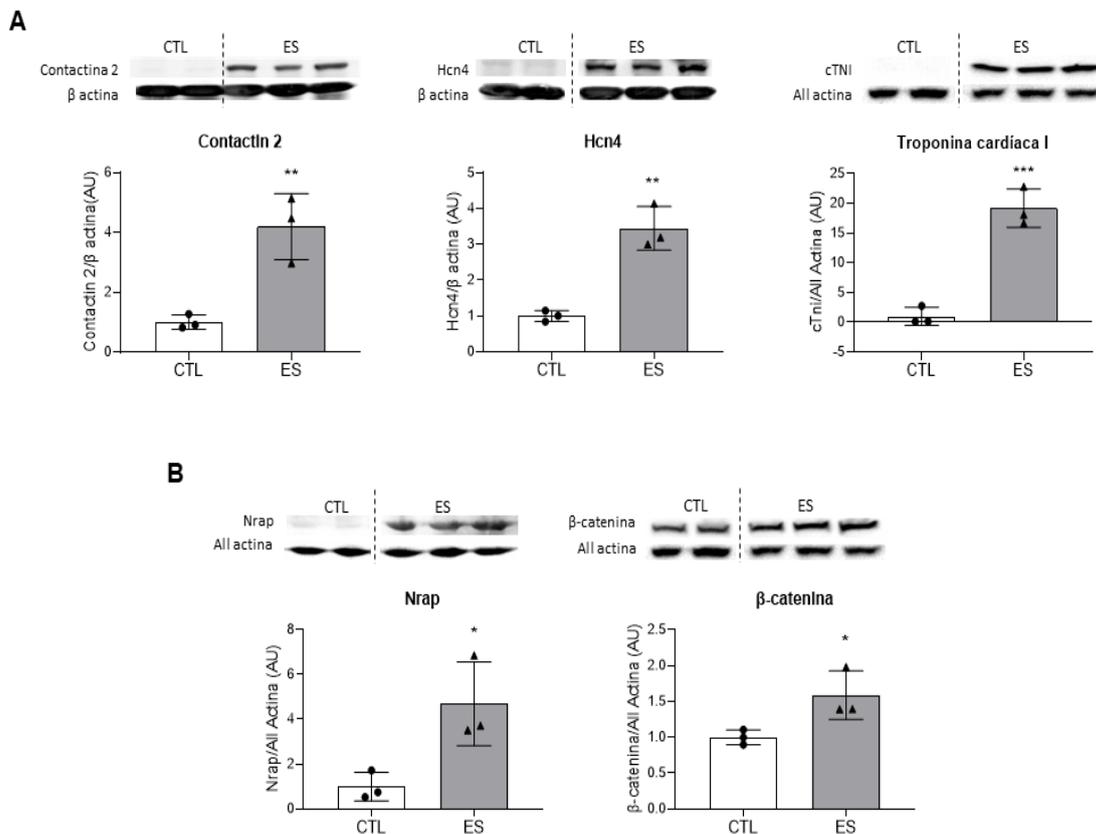


Figura 18: Aumento da expressão de proteínas presentes no VCS e discos intercalados nos hiPSC-CMs ES. A) Níveis proteicos de marcadores cardíacos *connatina2*, *Hcn4* e *troponina cardíaca I*. B) Níveis proteicos de marcadores de discos intercalares, *Nrap* e β *catenina*. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ vs. hiPSC-CM CTL.

Por microscopia confocal, investigamos a presença de conexinas encontradas principalmente em CMs responsáveis pelo sistema de geração e condução de impulsos (*conexina 40*) e em CMs que realizam contrações poderosas (*conexina 43*). Os resultados apresentados na figura 19A sugerem aumento da expressão e intensidade do sinal da *conexina 40* (sinal verde na sobreposição) nos hiPSC-CMs ES comparado ao grupo controle. Na figura 19B, enquanto os hiPSC-CMs CTL mostram marcações proeminentes para a *conexina 43* (sinal verde na sobreposição), nenhuma expressão detectável foi observada nos hiPSC-CMs ES.

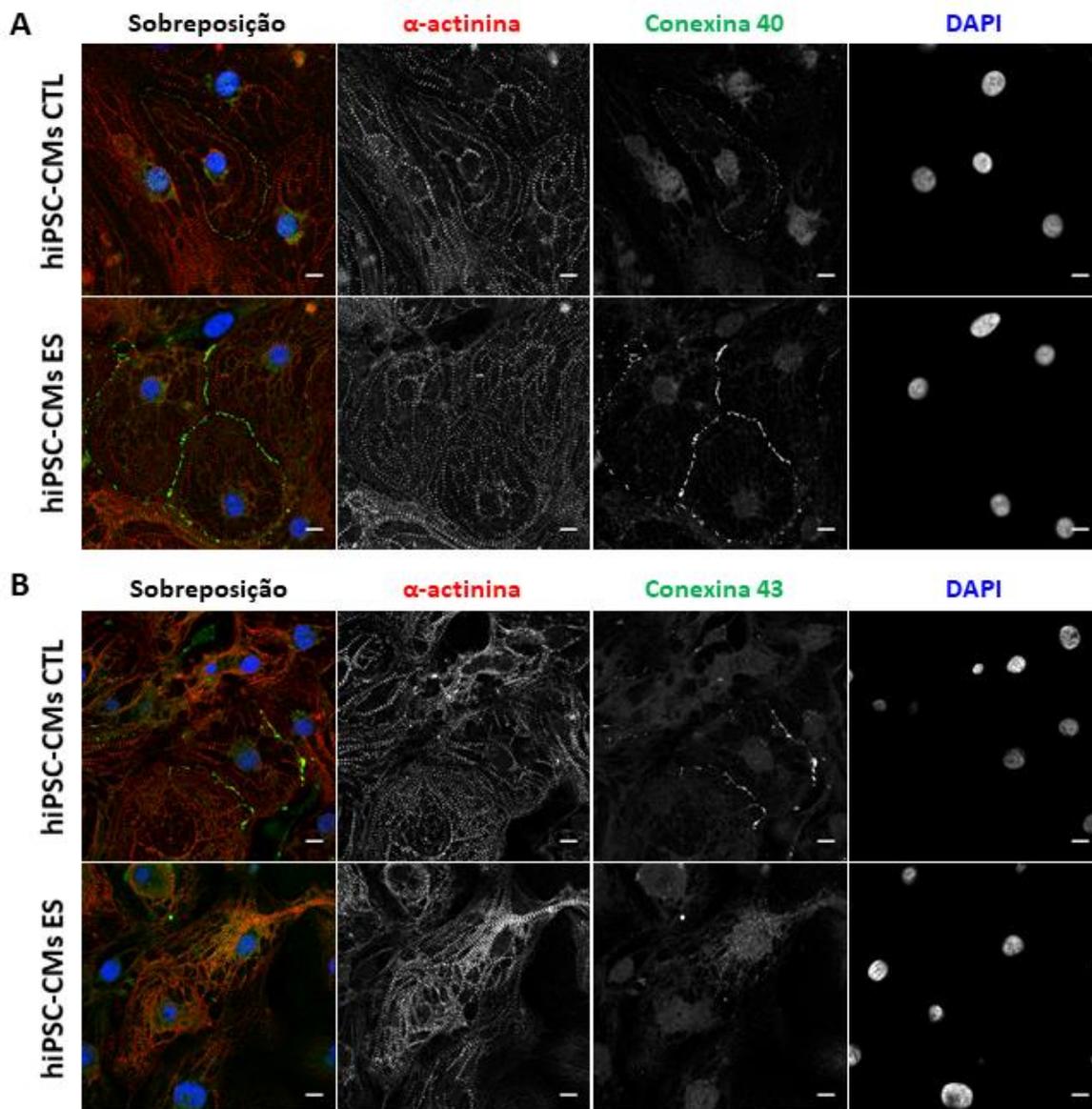


Figura 19: Imagens de microscopia confocal dos hiPSC-CMs CTL e ES imunomarcados para as proteínas das junções gap conexina 40 e conexina 43. A) Aumento da expressão de conexina 40 (sinal verde na sobreposição) nos hiPSC-CMs ES. B). Diminuição da expressão de conexina 43 (sinal verde na sobreposição) nos hiPSC-CMs ES. Miofibrilas (vistas como estrias vermelhas) visualizadas por imunomarcagem com um anticorpo contra α -actinina (um componente das bandas Z da miofibrila) e os núcleos por DAPI (sinal azul na sobreposição). Barra de escala: 10 μ m.

A presença de proteínas que contribuem para o controle da contração nos níveis de filamentos finos e grossos, troponina cardíaca I e proteína C de ligação à

miosina (MyBP-C), respectivamente, e a proteína crosslinker de actina, α -actinina (um marcador clássico para o disco Z) é mostrada na figura 1A do anexo D. Observa-se um aumento no número de células positivas e no sinal de intensidade para troponina cardíaca I (sinal vermelho na sobreposição) nos hiPSC-CMs ES. No entanto, a expressão de MyBP-C e α -actinina foram semelhantes nos dois grupos (Figura 1B e C – Anexo D).

Além disso, para investigar mais detalhadamente a influência do ES na maquinaria contrátil dos hiPSC-CMs, analisamos uma região específica dos sarcômeros, a banda M. Na figura 2 do anexo D, observamos a principal proteína marcadora da banda M, a miomesina, e o marcador maduro da banda M, a proteína M, expressas de forma semelhante nos dois grupos. Ainda, é possível observar que a forma e a estrutura miofibrilar dos hiPSC-CMs CTL e ES parecem semelhantes, apresentando estrias claramente visíveis, distintas, discos Z discretos e bom alinhamento das miofibrilas.

A presença de filamentos intermediários que são expressos em células mesenquimais ou CMs imaturos (citoqueratina e vimentina) e em CMs (desmina) é mostrada na figura 3A do anexo D. Observa-se colocalização de α -actinina (marcador de disco Z) e citoqueratina nos hiPSC-CMs CTL (sinal vermelho e verde, respectivamente, em sobreposição), mas nenhuma expressão detectável foi observada nos hiPSC-CMs ES. Enquanto apenas poucas células foram positivas para vimentina sem colocalização com MyBP-C (marcador de miofibrilas) (Figura 3B), foram encontradas células positivas para desmina co-localizadas com MyBP-C para ambos os grupos (Figura 3C). A imunofluorescência indicando locais de colocalização de α -actinina e citoqueratina revela que ainda existem hiPSC-CMs imaturos no grupo controle, o que não é observado nos hiPSC-CMs ES.

Por fim, analisamos as propriedades elétricas dos hiPSCs-CM expostos ao ES durante a diferenciação para avaliar se as alterações moleculares relatadas foram acompanhadas pelas características funcionais esperadas.

Nossos resultados mostraram que o tempo necessário para atingir o pico de CaT foi aproximadamente 82% mais lento nos hiPSC-CMs ES do que o controle ($74,45 \pm 11,85\text{ms}$ vs $209,80 \pm 18,08\text{ms}$; $p < 0,0001$) e o tempo para atingir 90% do decaimento do CaT foi aproximadamente 78% maior nos hiPSC-CMs expostos ao ES comparado ao controle ($375,30 \pm 12,49\text{ms}$ vs $669,20 \pm 112,50\text{ms}$; $p = 0,0071$) (Figura 20A). Finalmente, os hiPSC-CMs expostos ao ES exibiram velocidade máxima de condução 60% mais rápida ($0,48 \pm 0,06\Delta\text{F}/\text{ms}$ vs $0,76 \pm 0,07\Delta\text{F}/\text{ms}$; $p = 0,014$) e duração do AP 24% maior em 90% da repolarização ($224,0 \pm 7,71\text{ms}$ vs $277,50 \pm 17,45\text{ms}$; $p = 0,0075$) em comparação com as células não estimuladas (Figura 20B). Em conjunto, essas são características típicas das células cardíacas especializadas em condução.

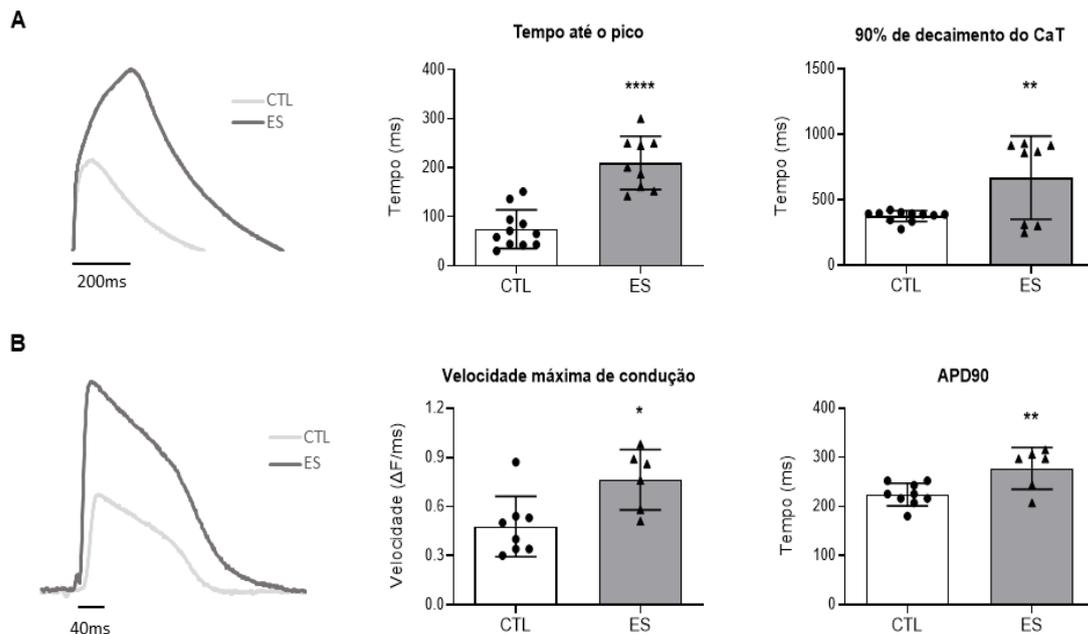


Figura 20: Influência do ES nos transientes intracelulares de cálcio (CaT) e no potencial de ação (AP) nos hiPSCs-CMs. A) O tempo para atingir o pico é mais lento e o tempo para atingir 90% de decaimento de cálcio é maior nos hiPSC-CMs ES em comparação com os hiPSC-CMs CTL. B) Maior velocidade máxima de condução e maior duração do AP em 90% da repolarização nos hiPSC-CMs ES em comparação com hiPSC-CMs CTL. Símbolos ● e ▲ significam medições individuais para mostrar alcance e distribuição de resultados expressos em média \pm desvio padrão. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, **** $P \leq 0,0001$ vs. hiPSC-CMs CTL. ms = milissegundos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Geração e caracterização das hiPSCs e dos hiPSC-CMs

O projeto de pesquisa iniciou com a novidade de utilizar UPCs como substrato para a reprogramação em hiPSCs e posterior diferenciação em hiPSC-CMs. A utilização das UPCs possui a grande vantagem de serem facilmente obtidas a partir de uma amostra de urina que é coletada pelo próprio indivíduo através de um procedimento de rotina não-invasivo, facilitando a doação de amostras. Além disso, estudos demonstraram que as UPCs possuem uma alta propensão a serem reprogramadas, pois são células multipotentes e já expressam alguns marcadores de pluripotência⁵. A técnica para geração de hiPSCs a partir de UPCs já havia sido descrita na literatura^{49,50}, porém nós estabelecemos um novo protocolo no laboratório que foi publicado no início de 2017 na revista *Current Protocols in Human Genetics*.

Nesse estudo, foram geradas hiPSCs reprogramadas de UPCs do indivíduo UPC4 através do método de reprogramação não-integrativo episomal. Esse método foi escolhido, pois os plasmídeos episomais não apresentam capacidade de se integrar ao genoma. Por outro lado, o método de integração viral está cada vez sendo menos utilizado, pois possui grande desvantagem ao apresentar riscos de mutagênese causados pela integração de uma ou mais sequências virais no genoma, podendo interferir na posterior capacidade de diferenciação⁵¹.

Os clones de hiPSCs foram caracterizados quanto ao seu potencial de pluripotência a partir de ensaios padrões da literatura onde essas células são avaliadas conforme sua morfologia, presença de marcadores moleculares e proteicos, capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas e integridade cromossômica.

Os clones de hiPSCs caracterizados expressaram os marcadores moleculares de pluripotência e também apresentaram positividade na expressão de marcadores proteicos relacionados ao potencial de pluripotência das hiPSCs, conforme esperado para este tipo celular. No entanto, apesar do clone U4MV1 expressar genes de pluripotência, apenas uma pequena quantidade de células foi positiva para o fator de transcrição Oct4 e marcador de membrana Ssea4 (menos de 15% de eventos positivos) (Tabela 4). Além disso, através da técnica de imunofluorescência foi possível observar que apenas uma parte das hiPSCs deste clone expressaram as proteínas marcadoras células-tronco pluripotentes (dados não mostrados).

A avaliação de pluripotência também foi verificada *in vivo* com o ensaio de formação de teratoma e sua capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas. A formação de teratoma foi observada em apenas um dos três clones analisados. Isso possivelmente deve ter ocorrido devido ao fato que os camundongos imunodeficientes não terem sido mantidos de forma adequada em nosso biotério para esta condição. No entanto, como todos os outros testes aplicados para verificação de pluripotência nos clones de hiPSCs foram bem sucedidos, nós acreditamos que foram testes suficientes para a caracterização dessas células.

Outro ponto importante que deve ser verificado nas hiPSCs é a integridade cromossômica das células através do teste de cariótipo. Os cariótipos anormais foram encontrados em três dos seis clones analisados, sendo que a alteração evidenciada foi a mesma em todos os clones (trissomia do cromossomo 1). As anormalidades cariotípicas, cromossômicas e genômicas não são raras nas hiPSCs. A reprogramação e o cultivo (ambos de curto e longo prazo de cultura) destas células é um processo estressante porque as hiPSCs sofrem um número muito alto de divisões celulares em um curto período de tempo. Muitas pesquisas estão sendo realizadas para entender o mecanismo

exato e as possíveis soluções para superar esse problema. Esses resultados de cariótipo com anormalidades podem ser atribuídos pelas condições de cultura que utilizamos (passagem das células com *Versene*), que mostrou favorecer a presença rápida de mutações em hiPSCs, em comparação com passagens mecânicas⁵². Outros estudos específicos devem ser realizados para verificar se há realmente uma relação entre o protocolo que utilizamos para a passagem das células e a anormalidade genética que frequentemente observamos, pois esta alteração poderia resultar da seleção de células da população inicialmente reprogramada.

Conforme foi reportado anteriormente, apesar do protocolo de diferenciação cardíaca ser amplamente utilizado no laboratório em hiPSCs provenientes de fibroblastos, quando este mesmo protocolo foi aplicado em hiPSCs provenientes de UPCs não obtivemos sucesso. Porém, não foi possível correlacionar esse fato com a origem das hiPSCs, pois existe uma alta variabilidade genética inerente de cada linhagem celular. Apesar da grande semelhança das hiPSCs provenientes de fibroblastos e UPCs, os clones de hiPSCs apresentam diferenças nas suas taxas de proliferação e diferenciação que são rotineiramente observadas. Ainda, como cada linhagem apresenta padrão de expressão específico para seus fatores de crescimento, as hiPSCs possivelmente demandarão diferentes concentrações de reagentes para a diferenciação.

Com isso, foi feita uma extensa revisão bibliográfica e foram feitas adaptações neste protocolo de diferenciação a fim de resultar em células contráteis. Entre os diversos testes que foram feitos, as modificações que foram testadas que mostraram melhor resultado foram: 1) aumentar a concentração de células antes da diferenciação; 2) diminuir a concentração de uma droga específica da fase inicial desse processo (GSK3, responsável por dirigir as células pluripotentes para o estágio de mesendoderme); 3) aumentar o volume do meio de cultura utilizado em dias específicos

do processo de diferenciação. Após as variações realizadas nesse protocolo foi possível obter hiPSC-CMs contráteis após 8 e 10 dias do início da diferenciação.

O protocolo adaptado desenvolvido neste projeto foi capaz de eficientemente gerar hiPSC-CMs contráteis com alta eficiência relativa. Após a conclusão desta etapa de padronização do protocolo de diferenciação, os hiPSC-CMs gerados a partir de UPCs e fibroblastos foram caracterizados pela presença de marcadores moleculares e proteicos. Como a caracterização destas células foi feita 15 dias após o início do processo de diferenciação é esperado que elas expressem genes e proteínas marcadores de células progenitoras cardíacas (*Gata4*, *Nkx2.5*, *Mef2c* e *Mesp1*), que não são expressos ou possuem baixa expressão em cardiomiócitos adultos. Porém, também foi observada a expressão de genes marcadores de células cardíacas adultas (*KCNJ3*, *MYL2*, *HCN4* e *TNNI3*). Com isso, evidencia-se que neste momento da diferenciação analisada (dia 15) existem populações de células imaturas e maduras ou que estas células estão em processo de maturação.

Interessante também observar a composição da população dos hiPSC-CMs gerados neste protocolo de diferenciação. Cada tipo de CMs possui características específicas em relação a sua morfologia, expressão de marcadores moleculares, parâmetros funcionais e função³⁷. Através da análise PCR, nota-se que há expressão de marcadores de CMs ventriculares (*MYL2*), atriais (*KCNJ3*) e de condução (*HCN4*)^{22,37}. Estes dados sugerem que este protocolo gera uma população mista de cardiomiócitos.

5.2. Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES

Neste estudo, fornecemos evidências que o ES aplicado durante o processo de diferenciação direciona os hiPSC-CMs, gerados a partir de fibroblastos, para as células do tipo de condução cardíaca. Nossas descobertas também mostraram que o ES

influencia a maturação da citoarquitetura dos hiPSC-CMs, não apenas nos níveis de miofibrilas, mas também nos discos intercalares.

O ES tem sido amplamente utilizado para melhorar a maturação dos hiPSC-CMs considerando que essas células exibem um fenótipo fetal. No entanto, a maioria dos estudos publicados relatou a aplicação do ES em hiPSC-CMs diferenciados, mas não durante seu processo de diferenciação^{23,29,30}. Concluímos que, durante o desenvolvimento, as células do coração são particularmente sensíveis ao seu ambiente (incluindo matriz extracelular, fatores solúveis, sinais mecânicos e elétricos), que influenciam o comprometimento da linhagem cardíaca. Estabelecemos um protocolo para aplicar o ES no início da diferenciação das hiPSCs (no dia 0) para testar se o estímulo poderia afetar tanto o destino quanto o status de maturação dos hiPSC-CMs gerados.

Nossos resultados mostraram que, em comparação com as células não estimuladas, a expressão dos fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento e a função do VCS, *IRX3*³¹ e *NKX2.5*, estava aumentada nos hiPSC-CMs ES 15 dias desde o início da diferenciação. O aumento induzido por ES na expressão de *NKX2.5* foi relatado anteriormente em hiPSC-CMs²⁸, mas não na ativação do *IRX3*. O *NKX2.5* exibe uma ampla influência nas vias cardíacas gerais, mas sua interação com o *IRX3* é essencial para o desenvolvimento e amadurecimento do VCS. De fato, esses fatores de transcrição regulam a propagação elétrica do VCS através da modulação negativa da conexina 43 (codificada por *GJA1*) e da modulação positiva da conexina 40, ambos genes que codificam proteínas da junção *gap*^{23,31}. Os resultados de RT-PCR forneceram suporte a essa ideia, pois, no dia 30 de diferenciação, nós observamos expressão semelhante de *GJA5* e menor expressão de *GJA1* nos hiPSC-CMs ES comparado com as células não estimuladas. Dados adicionais foram fornecidos pelas imagens de

microscopia por confocal no dia 60 demonstrando uma intensidade de sinal maior e menor de conexina 40 e 43, em hiPSC-CMs ES *versus* células não estimuladas, respectivamente. É importante enfatizar que o ensaio de imunofluorescência posterior foi fundamental para analisar a morfologia detalhada e a localização correta das conexinas nos hiPSC-CMs, confirmando nossos achados. Portanto, com base no fato que os hiPSC-CMs expostos ao ES aumentaram a expressão da conexina 40 (expressa principalmente em células de condução) enquanto reduziram a conexina 43 (expressa principalmente em CMs de trabalho)³², nossos resultados indicam que o ES induz a diferenciação das hiPSCs em uma população específica de CMs, como os presentes no VCS.

O Nav1.5, codificado por *SCN5A*, desempenha um papel central na excitabilidade dos cardiomiócitos e na condução adequada de impulsos elétricos cardíacos, enquanto o Hcn4 é necessário para a atividade de marcapasso^{34,39}. Nossos achados também mostraram que a expressão desses dois genes foi regulada positivamente no dia 30 nos hiPSCs-CM expostos ao ES por 15 dias durante a diferenciação. Além disso, os níveis de proteína de Hcn4 e contactina-2 foram maiores quando o ES foi aplicado. Existem poucos estudos nos quais os marcadores do VCS foram investigados no hiPSCs-CM com ES, com resultados divergentes. Enquanto um estudo mostrou que o ES aumenta a expressão de *GJA1* e *TBX5*²⁸, outro mostrou aumento de *GJA5* e diminuição de *HCN4*³⁰. Além disso, Eng e colaboradores (2016) observaram a regulação positiva dos genes *GJA5* e *SNC5A* nos hiPSCs-CM expostos ao ES²⁹. Esses dados são consistentes com a ideia de que o ES aplicado em hiPSCs-CM diferenciados, que é uma população celular mista, pode dar origem a uma variedade de fenótipos celulares, enquanto no presente trabalho, o ES foi realizado durante o

processo de diferenciação e pode explicar sua influência sobre o destino e maturação dos hiPSC-CMs expostos ao ES.

Os miócitos encontrados no sistema especializado em condução (especialmente as fibras de Purkinje) possuem CaT mais longos³⁶, despolarização extremamente rápida (produzida por uma corrente robusta de sódio (I_{Na})) e fase de repolarização mais lenta em comparação com os CMs ventriculares / de trabalho³⁷. Como o principal canal de sódio cardíaco que carrega a I_{Na} é o Nav1.5, o influxo de íons de sódio por esse canal é responsável pela rápida elevação inicial do AP cardíaco e pela condução do impulso elétrico em todo o coração^{34,39}. Os dados funcionais combinados com a maior expressão de *SCN5A*, o CaT mais longo, a despolarização mais rápida do AP e menor duração do AP com 90% de repolarização em comparação com células não estimuladas, são consistentes com a ideia de que o ES diferencia as hiPSCs em CMs com características funcionais do VCS. Interessantemente, Nunes et al (2013) observaram dados funcionais semelhantes utilizando um protocolo diferente de ES combinado com o cultivo tridimensional de CMs derivados de células-tronco embrionárias. No entanto, como o ES foi aplicado após 20 dias da diferenciação e os marcadores do VCS não foram avaliados, os autores correlacionam a melhora das propriedades funcionais com a maturação dos CMs²⁷.

Conforme nossos resultados, trabalhos anteriores também observaram maior expressão de troponina cardíaca em hiPSC-CMs expostos ao ES²⁸⁻³⁰. É importante notar que, apesar de esse marcador estar relacionado à organização e maturidade das miofibrilas e ser típico para CM contráteis⁴⁷, analisamos outras proteínas sarcômeras (MyBP-C, miomesina e Proteína M) e sua expressão foi semelhante entre ao grupo com ES e o grupo controle (Anexo D). Além disso, como a Tnni3 é um dos marcadores mais bem descritos de melhor maturação dos cardiomiócitos⁴⁸, o aumento da expressão desse

gene e proteína no grupo com ES aponta para uma população de hiPSC-CMs com fenótipo do tipo mais adulto. Apesar desses achados, os mecanismos moleculares pelos quais o ES afeta a diferenciação e a maturação dos hiPSC-CMs permanecem obscuros^{28,53}.

Os discos intercalares são os principais locais de interconexão entre CMs adjacentes e orquestram as contrações cardíacas coordenadas para conduzir adequadamente os sinais eletroquímicos e mecânicos^{47,48}. Embora a expressão da proteína das junções gap seja comumente analisada em estudos usando hiPSC-CMs²⁸⁻³⁰, existem poucos estudos que examinaram outros componentes dos discos intercalares. Em nosso estudo, a expressão de Nrap e β -catenina aumentou nos hiPSC-CMs expostos ao ES. A modulação da sinalização Wnt / β -catenina desempenha um papel importante na diferenciação dos CMs a partir das hiPSCs e formação das junções gap^{7,48}. A expressão de Nrap está envolvida tanto na miogênese miofibrilar durante o desenvolvimento quanto nas conexões célula-célula no músculo maduro^{36,46} e pode ajudar a explicar porque os hiPSC-CMs expostos ao ES são possivelmente mais maduros que os hiPSC-CMs CTL.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi estabelecido e publicado um protocolo robusto de reprogramação de hiPSCs a partir de UPCs. Posteriormente, foi adaptado um novo protocolo de diferenciação destas células em cardiomiócitos. Nossos dados mostraram que as hiPSCs provenientes de UPCs e fibroblastos se diferenciaram com sucesso em CMs gerando uma população mista destas células. Desta forma, as hiPSCs obtidas a partir de UPCs podem ser uma fonte alternativa para gerar hiPSC-CMs.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que o ES aplicado durante a diferenciação das hiPSCs reprogramadas de fibroblastos direciona esses cardiomiócitos a desenvolverem um fenótipo de células do tipo de condução cardíaca com citoarquitetura mais madura. Assim, os hiPSC-CMs expostos ao ES durante a diferenciação podem ser cruciais para o desenvolvimento de células especializadas de condução para modelagem de doenças cardíacas, triagem de medicamentos individuais em uma plataforma do tipo medicamento de precisão e apoiar o desenvolvimento de novas terapias para arritmias.

7. REFERÊNCIAS

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
2. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
3. Jacob Marks. Yale Scientific. *Face Lifts for Skin Cells: Fast Cell Cycles Lead to Efficient Reprogramming* (2014).
4. Raab, S., Klingenstein, M., Liebau, S. & Linta, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* **2014**, 768391 (2014).
5. Zhang, D., Wei, G., Li, P., Zhou, X. & Zhang, Y. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis.* **1**, 8–17 (2014).
6. M. Rossbach. Factsheet EuroStemCell. (2010).
7. Lian, X. *et al.* Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* **8**, 162–175 (2013).
8. Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D. & Wu, J. C. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* **10**, 16–28 (2012).
9. Doyle, M. J. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model for Heart Development and Congenital Heart Disease. *Stem Cell Rev. Rep.* **11**, 710–727 (2015).

10. Tan, K. Y., Eminli, S., Hettmer, S., Hochedlinger, K. & Wagers, A. J. Efficient Generation of iPS Cells from Skeletal Muscle Stem Cells. *PLoS ONE* **6**, e26406 (2011).
11. Spater, D., Hansson, E. M., Zangi, L. & Chien, K. R. How to make a cardiomyocyte. *Development* **141**, 4418–4431 (2014).
12. Zanella, F., Lyon, R. C. & Sheikh, F. Modeling heart disease in a dish: From somatic cells to disease-relevant cardiomyocytes. *Trends Cardiovasc. Med.* **24**, 32–44 (2014).
13. Hwang, H. S. *et al.* Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **85**, 79–88 (2015).
14. Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* **23**, 845–856 (2005).
15. Shiba, Y. *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* **538**, 388–391 (2016).
16. Tanaka, A., Yuasa, S., Node, K. & Fukuda, K. Cardiovascular Disease Modeling Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18894–18922 (2015).
17. Keung, W., Boheler, K. R. & Li, R. A. Developmental cues for the maturation of metabolic, electrophysiological and calcium handling properties of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 17 (2014).
18. Itzhaki, I. *et al.* Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *PloS One* **6**, e18037 (2011).

19. Lundy, S. D., Gantz, J. A., Pagan, C. M., Filice, D. & Laflamme, M. A. Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **16**, 319 (2014).
20. Funakoshi, S. *et al.* Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **6**, 19111 (2016).
21. Churko, J. M. *et al.* Defining human cardiac transcription factor hierarchies using integrated single-cell heterogeneity analysis. *Nat. Commun.* **9**, 4906 (2018).
22. Lee, J. H., Protze, S. I., Laksman, Z., Backx, P. H. & Keller, G. M. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell* **21**, 179-194.e4 (2017).
23. Sun, X. & Nunes, S. S. Bioengineering Approaches to Mature Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
24. Hsieh, P. C. H., Davis, M. E., Lisowski, L. K. & Lee, R. T. Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 51–66 (2006).
25. Abu-Issa, R. & Kirby, M. L. Heart Field: From Mesoderm to Heart Tube. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 45–68 (2007).
26. Stoppel, W. L., Kaplan, D. L. & Black, L. D. Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **96**, 135–155 (2016).
27. Nunes, S. S. *et al.* Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat. Methods* **10**, 781–787 (2013).

28. Ma, R. *et al.* Electrical Stimulation Enhances Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Myocardial Infarction Therapy. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 371–384 (2018).
29. Eng, G. *et al.* Autonomous beating rate adaptation in human stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat. Commun.* **7**, 10312 (2016).
30. Ronaldson-Bouchard, K. *et al.* Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* **556**, 239–243 (2018).
31. Kim, K.-H. *et al.* *Irx3* is required for postnatal maturation of the mouse ventricular conduction system. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
32. Zhang, S.-S. *et al.* Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13576–13581 (2011).
33. Catterall, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* **590**, 2577–2589 (2012).
34. van Eif, V. W. W., Devalla, H. D., Boink, G. J. J. & Christoffels, V. M. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 617–630 (2018).
35. Arnolds, D. E. *et al.* TBX5 drives *Scn5a* expression to regulate cardiac conduction system function. *J. Clin. Invest.* **122**, 2509–2518 (2012).
36. Pallante, B. A. *et al.* Contactin-2 Expression in the Cardiac Purkinje Fiber Network. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **3**, 186–194 (2010).
37. Kane, C. & Terracciano, C. M. N. Concise Review: Criteria for Chamber-Specific Categorization of Human Cardiac Myocytes Derived from Pluripotent Stem Cells: Criteria for Chamber-Specific Categorization of Myocytes. *STEM CELLS* **35**, 1881–1897 (2017).

38. Liang, X. *et al.* HCN4 Dynamically Marks the First Heart Field and Conduction System Precursors. *Circ. Res.* **113**, 399–407 (2013).
39. Garg, P. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes as Models for Cardiac Channelopathies: A Primer for Non-Electrophysiologists. *Circ. Res.* **123**, 224–243 (2018).
40. Foo, K. S. *et al.* Human ISL1 + Ventricular Progenitors Self-Assemble into an In Vivo Functional Heart Patch and Preserve Cardiac Function Post Infarction. *Mol. Ther.* **26**, 1644–1659 (2018).
41. Steichen, C. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells from Urine Samples: A Non-Integrative and Feeder-Free Reprogramming Strategy: Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells from Urine Samples. in *Current Protocols in Human Genetics* (eds. Haines, J. L. *et al.*) 21.7.1-21.7.22 (John Wiley & Sons, Inc., 2017). doi:10.1002/cphg.26.
42. Santos, Diogo Gonçalves Biagi dos. Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base-genética. (Universidade de São Paulo, 2015).
43. Streckfuss-Bömeke, K. *et al.* Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur. Heart J.* **34**, 2618–2629 (2013).
44. Ehler, E. *et al.* Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J. Cell Biol.* **153**, 763–772 (2001).
45. Hellen, N. *et al.* Proteomic Analysis Reveals Temporal Changes in Protein Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes In Vitro. *Stem Cells Dev.* **28**, 565–578 (2019).

46. Lu, S. *et al.* Cardiac-specific NRAP overexpression causes right ventricular dysfunction in mice. *Exp. Cell Res.* **317**, 1226–1237 (2011).
47. Ehler, E. Cardiac cytoarchitecture — why the “hardware” is important for heart function! *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1863**, 1857–1863 (2016).
48. Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, S. M., Mi-Mi, L. & Gregorio, C. C. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr. Physiol.* **7**, 891–944 (2017).
49. Zhou, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat. Protoc.* **7**, 2080–2089 (2012).
50. Zhou, T. *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Urine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1221–1228 (2011).
51. Buta, C. *et al.* Reconsidering pluripotency tests: Do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res.* **11**, 552–562 (2013).
52. Bai, Q. *et al.* Temporal Analysis of Genome Alterations Induced by Single-Cell Passaging in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **24**, 653–662 (2015).
53. Liu, Y.-W. *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat. Biotechnol.* **36**, 597–605 (2018).

8. ANEXOS

Anexo A – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

4455/16/121

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Estímulo mecânico como componente chave para a maturação e caracterização de cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas.		
Pesquisador: Jose Eduardo Krieger		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 61256316.0.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.788.282		
Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto intitulado "Estímulo mecânico como componente chave para a maturação e caracterização de cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas"		
Objetivo da Pesquisa: Trata-se de projeto com células tronco pluripotentes coletadas de urina humana, e induzidas a cardiomiócitos. Serão analisadas in vitro com vistas ao papel do estímulo mecânico em sua caracterização e maturação		
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são modestos e os benefícios poderão ser importantes, dada a prevalência de infarto e outras afecções com destruição miocárdica.		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto está corretamente elaborado e traz conceitos atualizados e clinicamente relevantes		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE é adequado.		
Recomendações: Não há		
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar		
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010		
UF: SP Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br		



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.788.282

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_808887.pdf	21/10/2016 12:28:30		Aceito
Outros	ON_LINE_ASSINADO.pdf	21/10/2016 12:27:53	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Folha de Rosto	FR_ASSINADA.pdf	21/10/2016 12:27:31	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Declaracao_de_doutorado_Thayane.pdf	11/10/2016 17:42:28	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Aditivo_ao_termo_de_outorga_2015_50216_5.pdf	11/10/2016 17:37:08	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Avaliacao_Antecipada.pdf	11/10/2016 17:33:17	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	ParecerParte_I_Thayane.pdf	11/10/2016 17:31:10	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	PARECER_PCAR_SDC_4455_16_121_anonimizado.docx	11/10/2016 17:30:15	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Analise_Orcamentaria_SDC_4455_16_121.pdf	11/10/2016 17:29:12	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Carta.pdf	11/10/2016 17:28:42	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Orcamento_Thayane.pdf	11/10/2016 17:27:35	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	11/10/2016 17:26:07	Jose Eduardo Krieger	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_projeto_Thayane.pdf	11/10/2016 17:25:02	Jose Eduardo Krieger	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.788.282

Ausência	TCLE_projeto_Thayane.pdf	11/10/2016 17:25:02	Jose Eduardo Krieger	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Thayane.pdf	11/10/2016 17:24:29	Jose Eduardo Krieger	Aceito

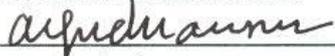
Situação do Parecer:

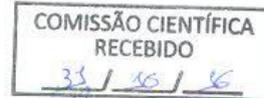
Aprovado

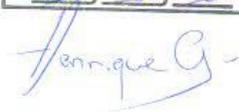
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Outubro de 2016


Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)





Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 03 de 03



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados da pesquisa:

Título da pesquisa: Estímulo mecânico como componente chave para a maturação e caracterização de cardiomiócitos humanos derivados de células-troncos pluripotentes induzidas

Pesquisador principal: Prof. José Eduardo Krieger

Departamento/Instituto: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP

De acordo com a resolução [466/2012](#), os seguintes conteúdos devem fazer parte das explicações sobre a pesquisa.

II. Descrição e objetivo da pesquisa:

Você é convidado a participar como voluntário do projeto: Estímulo mecânico como componente chave para a maturação e caracterização de cardiomiócitos humanos derivados de células-troncos pluripotentes induzidas

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Antes de decidir a respeito de sua participação, você receberá algumas informações para compreender este estudo e fazer sua escolha. Este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), contém todas as informações sobre o estudo, seus objetivos, benefícios, riscos, desconfortos e seu direito de sair do mesmo a qualquer momento sem haver qualquer prejuízo em seu tratamento ou na relação com os médicos e a equipe de saúde responsável pelo seu cuidado.

As informações abaixo deverão ser lidas, e você poderá esclarecer todas as dúvidas que tiver. Apenas quando entender e quando decidir participar do estudo deverá rubricar e assinar as duas vias deste documento. Uma via ficará com o você e a outra com o pesquisador responsável pelo estudo.

Este estudo envolve informações contidas em seu prontuário e doação de uma amostra de sua urina para que sejam isoladas células muito raras, que as vezes não são encontradas, e que tem potencial de se transformar em outros tipos de células. O laboratório tem o interesse em estudar e aprimorar esse processo que é pouco conhecido.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:
Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE versão 19/26/08/2016

Serão avaliadas as amostras de urina de participantes saudáveis (controle) e diagnosticados com problemas cardiovasculares (no coração), para entender esse potencial de transformação dessas células raras. As amostras de urina serão armazenadas em biorepositório (local apropriado para guardar as amostras de urina).

III. Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados:

Coleta de urina:

Será coletada uma quantidade entre 30 ml e 400 ml de urina em frascos coletores estéreis.

IV. Riscos e benefícios esperados:

Riscos: Risco mínimo.

Os riscos relativos à coleta de urina são mínimos, mas pode ocorrer contaminação do material biológico, para evitar que isso aconteça, um profissional irá orientá-lo como proceder para realizar a coleta, desde a higienização do local até a entrega do frasco coletor com urina. Outro desconforto pode ser o tempo para que a sua bexiga se encha e consiga coletar uma amostra, no entanto há uma sala de espera para utilizar.

Benefícios esperados para o participante:

O paciente não terá benefícios diretos em participar da pesquisa, mas a doação da sua urina ajudará na realização de pesquisas científicas e avaliação do perfil de algumas doenças.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:
Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE versão 19/26/08/2016

V. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa consignado

1. Você terá acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas;
2. Você tem plena liberdade de não autorizar a sua participação utilização da coleta da sua urina para ser usada nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material para essa pesquisa só será feito após sua leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.
3. Você pode, a qualquer momento, fazer a retirada do consentimento, ou seja, você pode desistir do estudo em qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo.
4. Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, será fornecido um número de registro à sua amostra, não sendo divulgada a identificação de nenhuma pessoa, ou seja, sua identidade será sempre preservada. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
5. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
6. O participante da pesquisa terá direito a indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.
7. Os participantes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Instituto do Coração/HCFMUSP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
8. Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre esclarecido de igual teor e receberá por direito uma das vias para controle pessoal.
9. A amostra coletada será processada e armazenada em banco/repositório no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.
10. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. José Eduardo Krieger que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº 44, 10 andar. Telefone: 11 2661-5579. Se o Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585 / 2661-1548 / 2661-1549 – E-mail: ceppesq.adm@ho.fm.usp.br

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:
Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE versão 19/26/08/2016

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com a equipe do Prof. José Eduardo Krieger sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:
Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE versão 19/26/08/2016

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estímulo mecânico como componente chave para a maturação e caracterização de cardiomiócitos humanos derivados de células-troncos pluripotentes induzidas

2. PESQUISADOR: Prof. José Eduardo Krieger

NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 61539

CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE versão 19/26/08/2016

Anexo C - Resultados suplementares da padronização da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES.

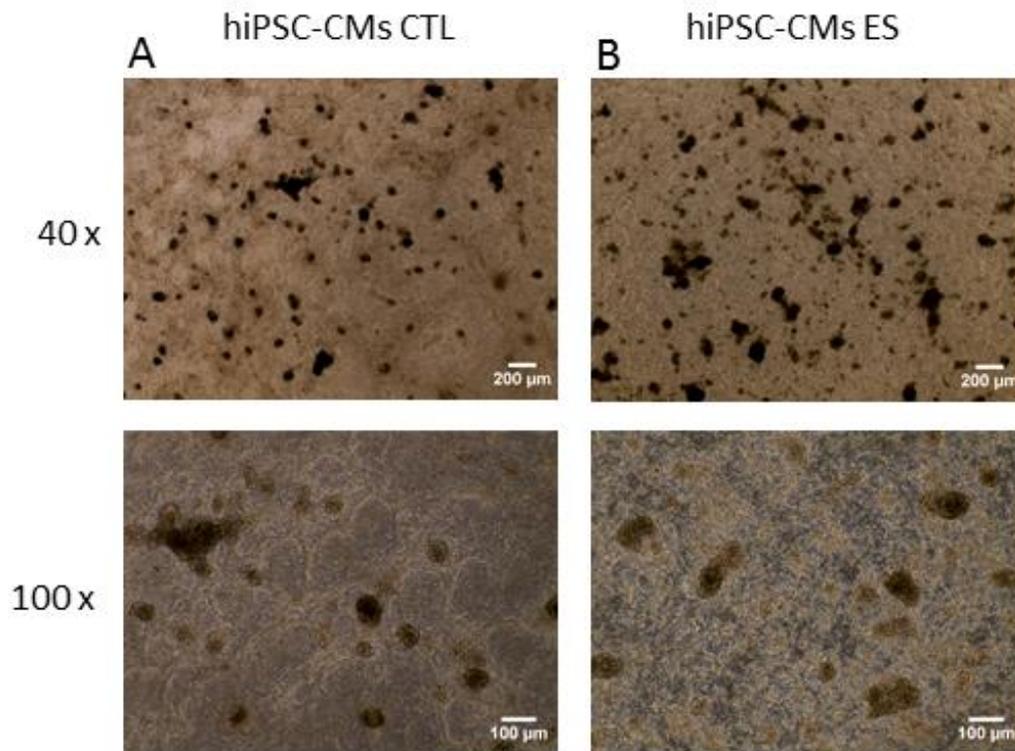


Figura 1: Morfologia dos hiPSC-CMs CTL e ES após 15 dias de diferenciação (40 e 100x). Barra de escala: 100 e 200μm

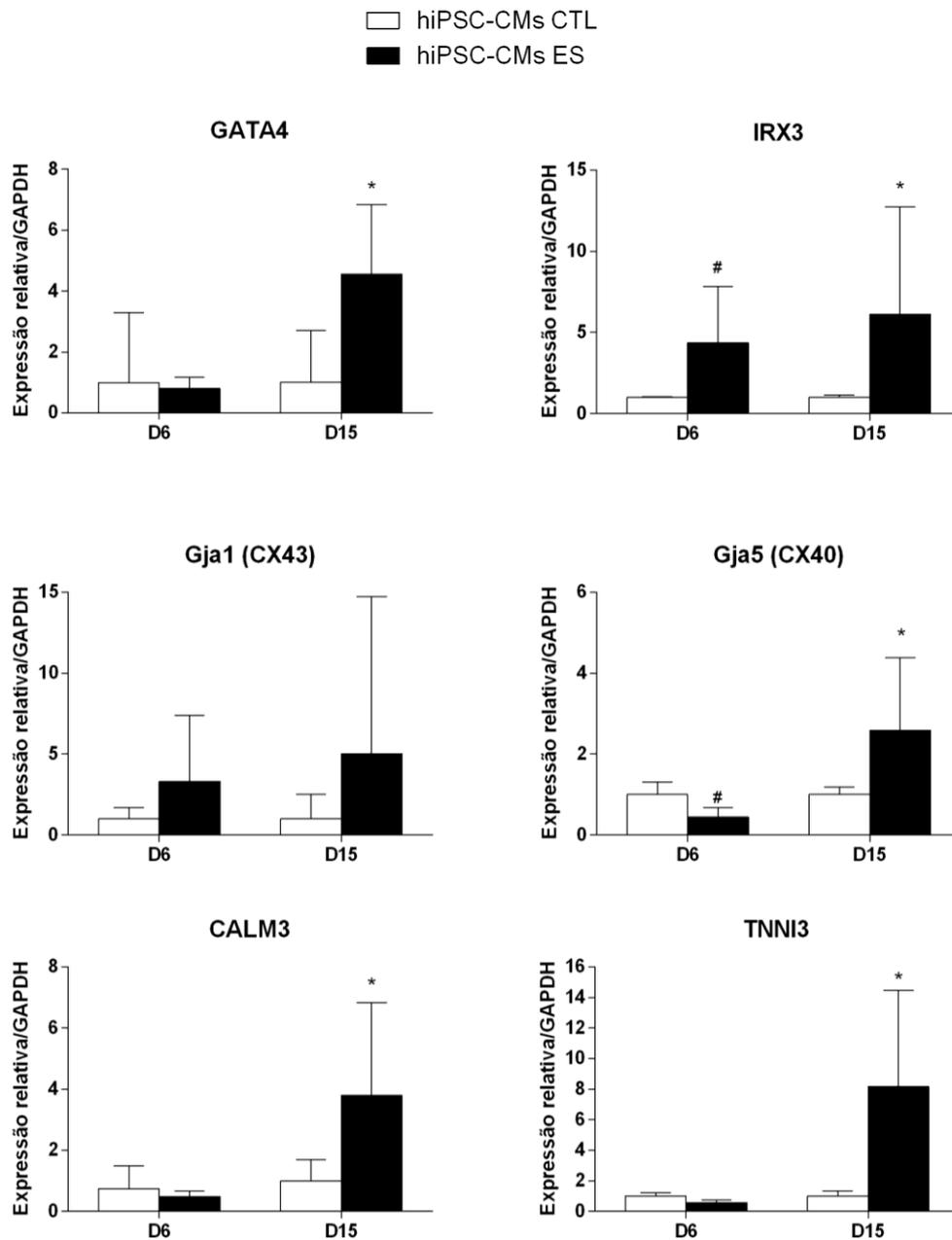


Figura 2: Expressão molecular dos hiPSC-CMs controle (CTL) e com ES por qPCR no dia 6 e 15 da diferenciação (D6 e D15, respectivamente). Resultados expressos como média ± DP. # $P \leq 0.05$; ## $P \leq 0.01$, vs. hiPSC-CMs CTL D6; * $P \leq 0.05$, vs. hiPSC-CMs D15.

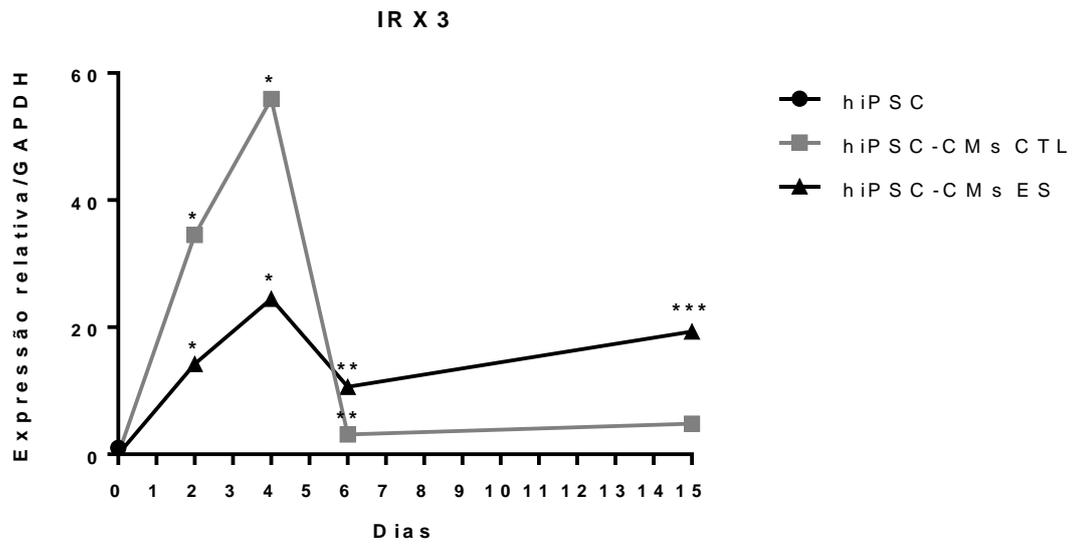


Figura 3: Perfil de expressão do gene *IRX3* durante o processo de diferenciação de hiPSCs em CMs. Dados expressos como média * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.001$ vs. hiPSC (dia 0).**

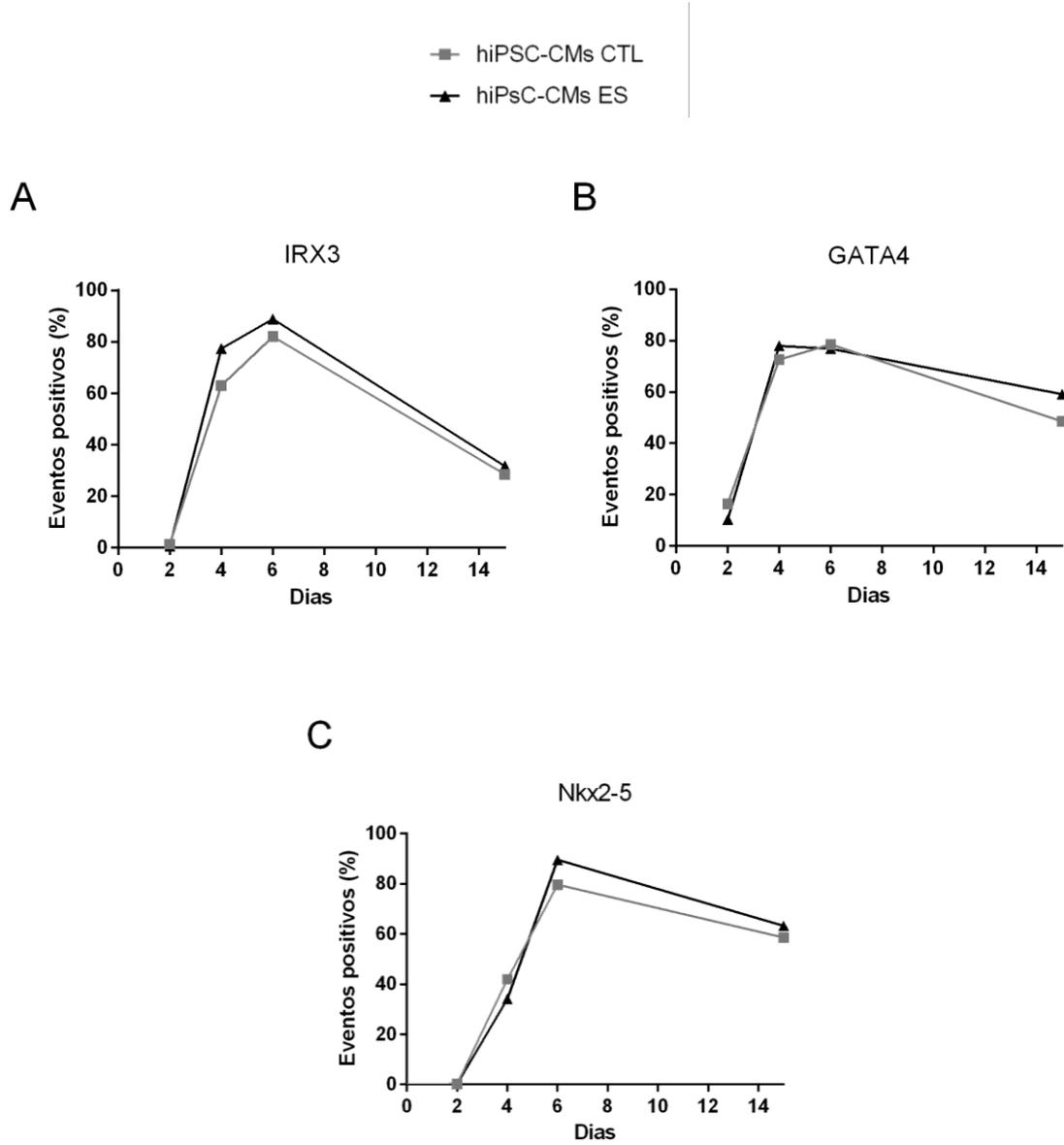
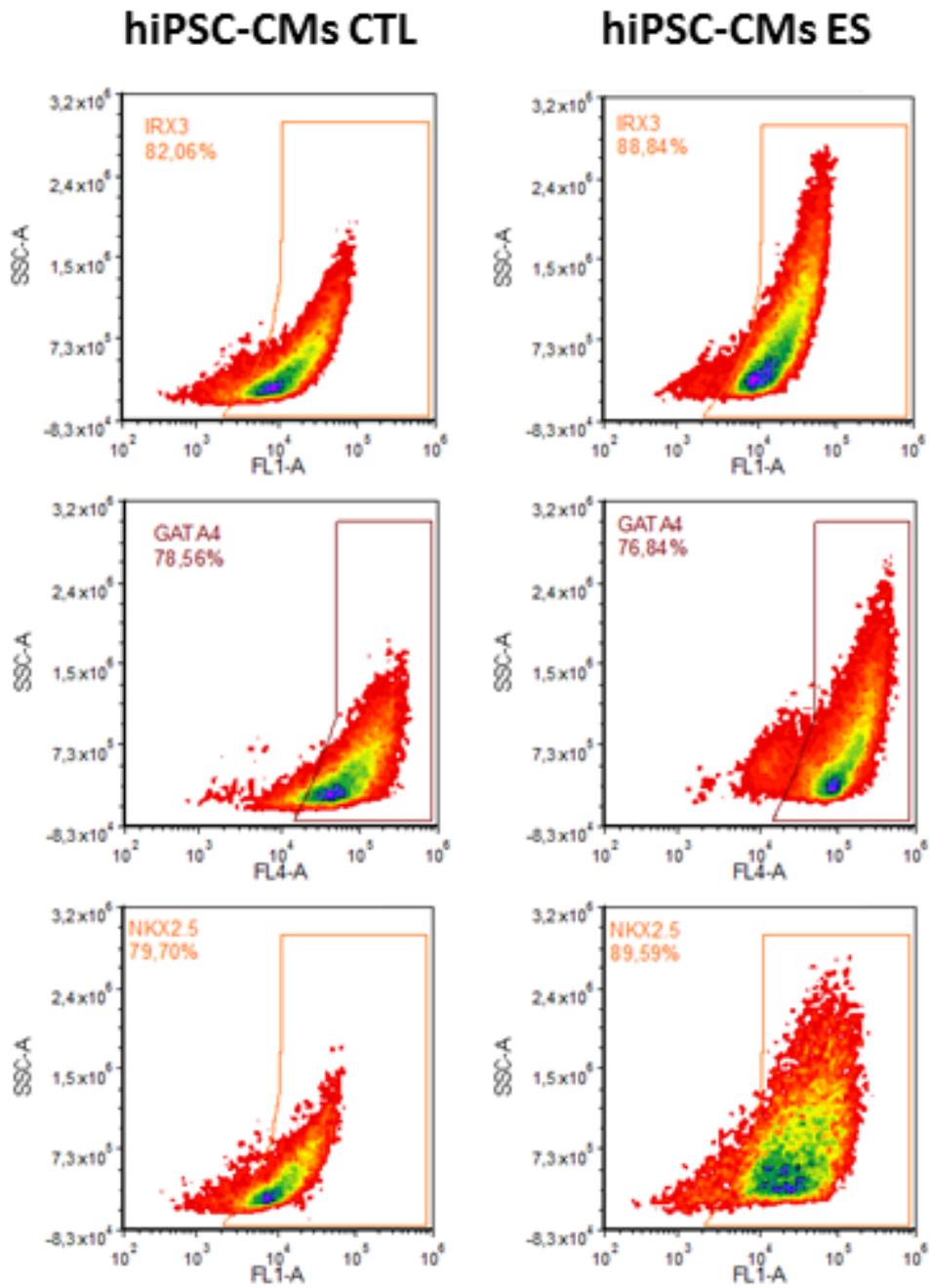


Figura 4: Porcentagem de eventos positivos obtidos por citometria de fluxo dos marcadores progenitores cardíacos Irx3 (A), Gata4 (B) e Nkx2.5 (C) durante o processo de diferenciação de hiPSCs em CMs.

A

D6



B

D15

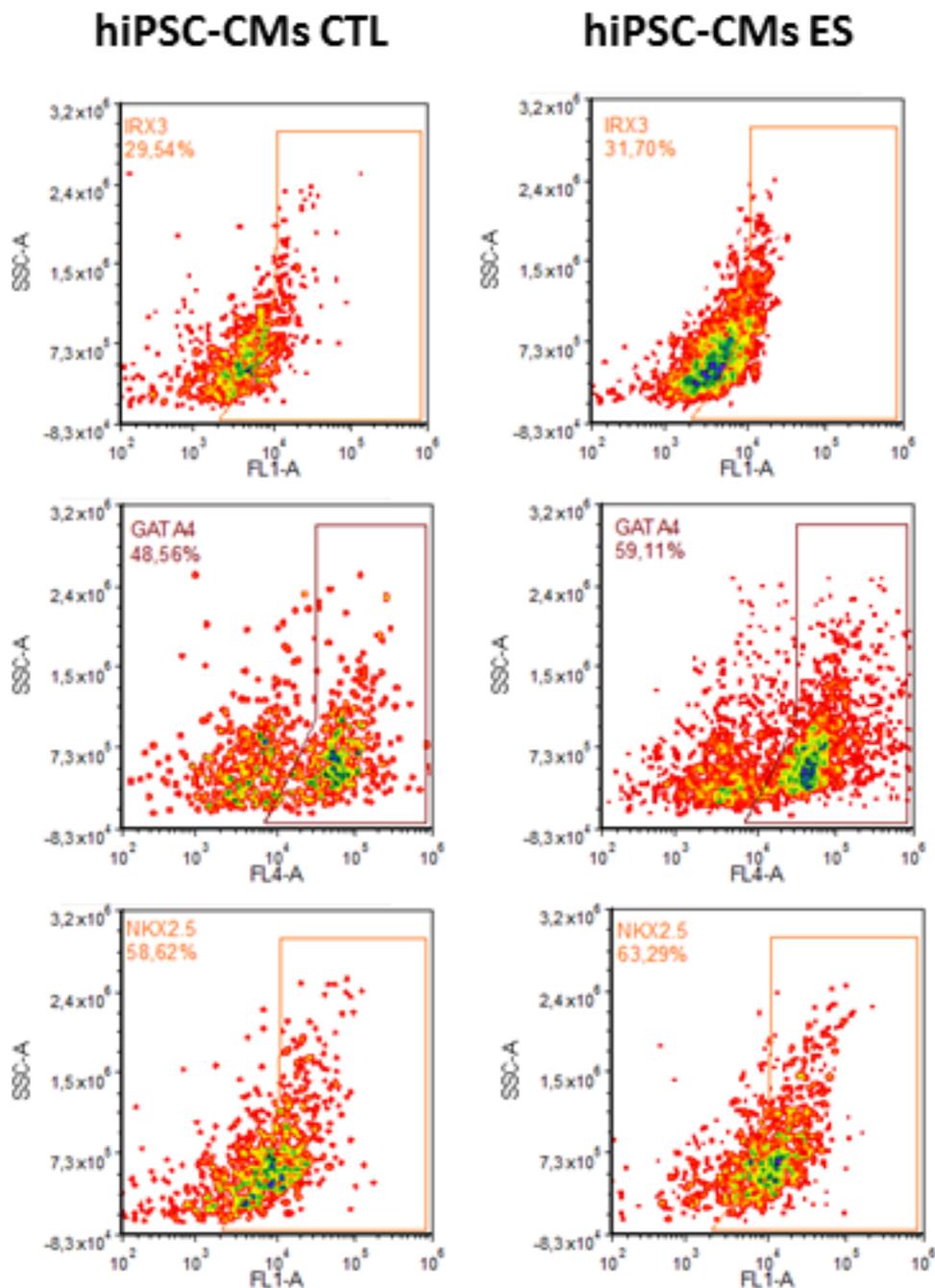


Figura 5: Imagens representativas de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de eventos positivos para Irx3, Gata4 e Nk2.5 no dia 6 (A) e 15 da diferenciação (B).

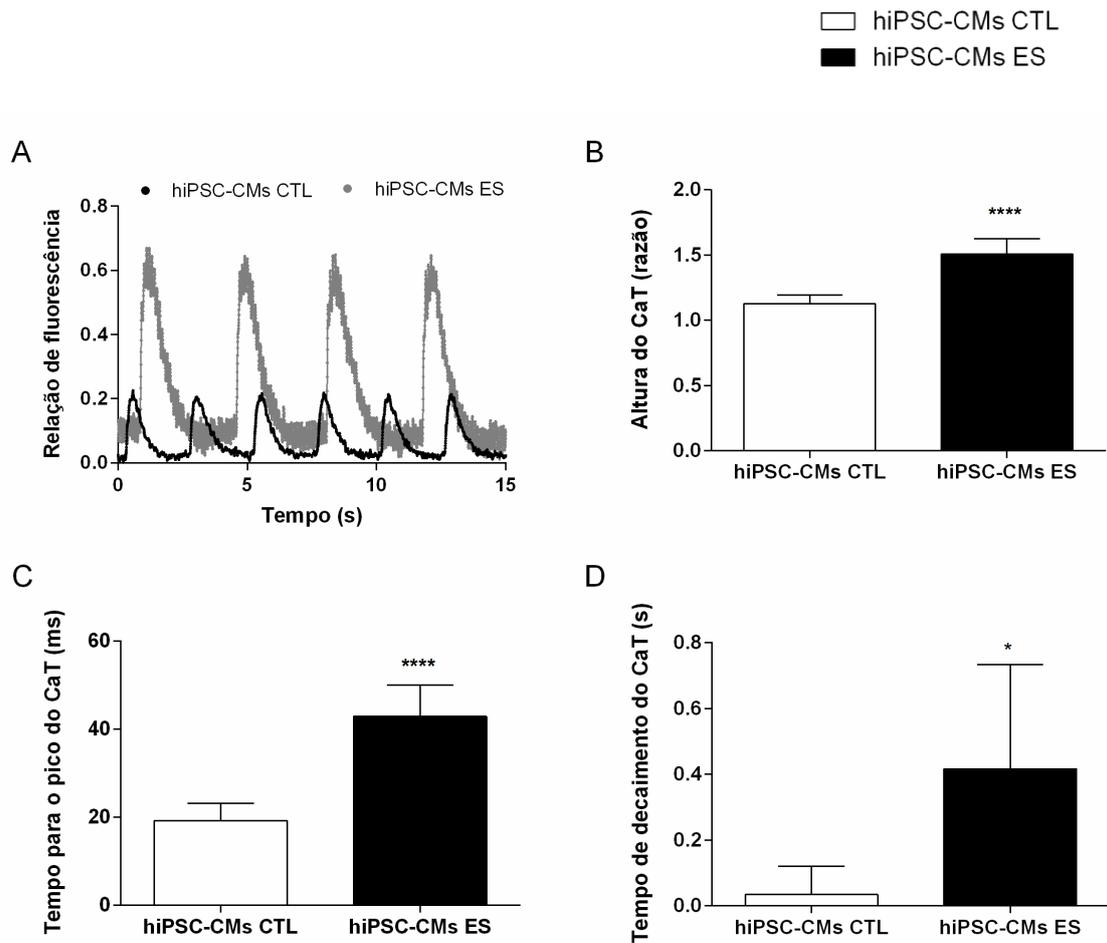


Figura 6: Caracterização funcional dos hiPSCs-CMs CTL e ES analisados no dia 30 da diferenciação. Resultados expressos como média \pm DP. * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.0001$ vs. hiPSC-CM CTL. CaT: transiente de cálcio, ms: milissegundos, s: segundos.

Anexo D - Resultados suplementares da diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos com ES.

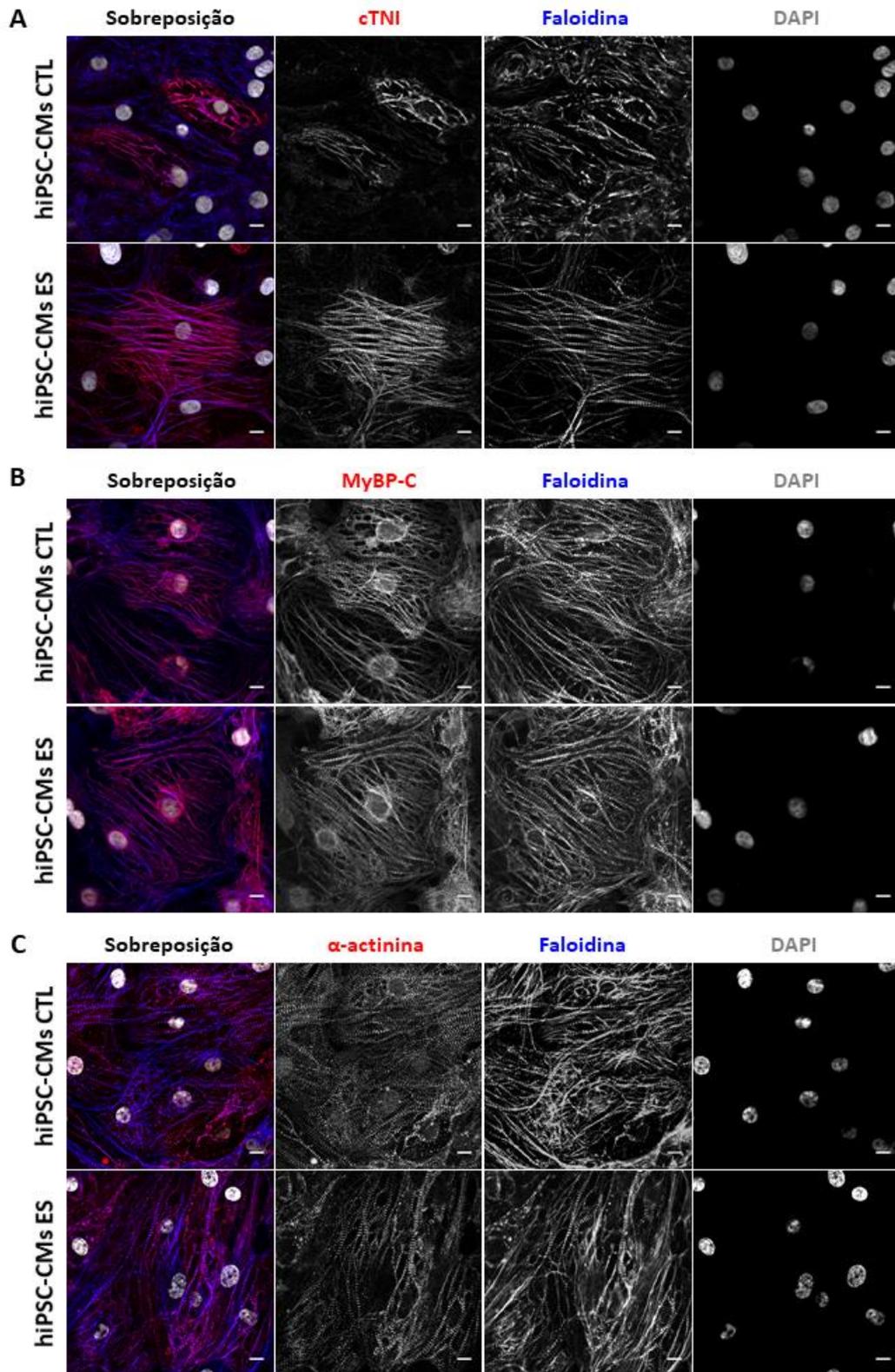


Figura 1: Micrografias de microscopia confocal dos hiPSC-CMs CTL e ES imunomarcados para as miofibrilas troponina cardíaca I (TNI), proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) e α -actinina. A) Maior número de células positivas para cTNI (sinal vermelho na sobreposição) nos hiPSC-CMs ES. B-C) Expressão semelhante de MyBP-C e α -actinina (sinal vermelho na sobreposição), respectivamente. Os filamentos de actina podem ser visualizada por faloidina (sinal azul na sobreposição) e os núcleos por DAPI (sinal cinza na sobreposição). Barra de escala: 10 μ m.

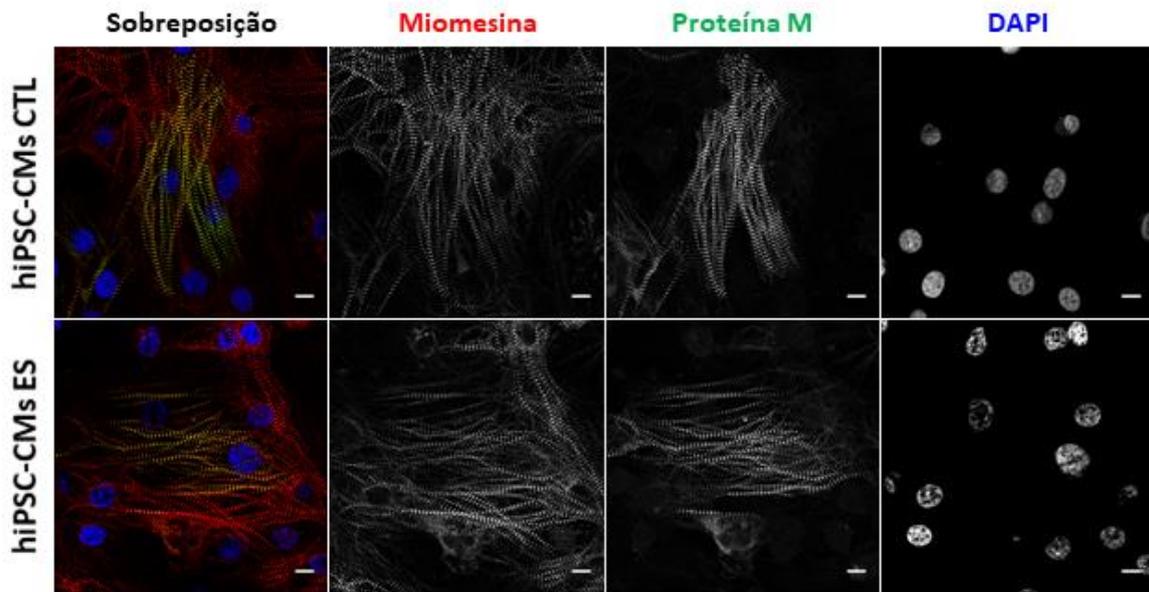


Figura 2: Micrografias de microscopia confocal dos hiPSC-CMs CTL e ES imunomarcados para as miofibrilas. As bandas M foram coradas com anticorpos de camundongo contra miomesina (sinal vermelho na sobreposição) e proteína M (sinal verde na sobreposição) e os núcleos foram visualizados com DAPI (sinal azul na sobreposição). Expressão semelhante de marcadores das bandas M para ambos os grupos. Barra de escala: 10 μ m.

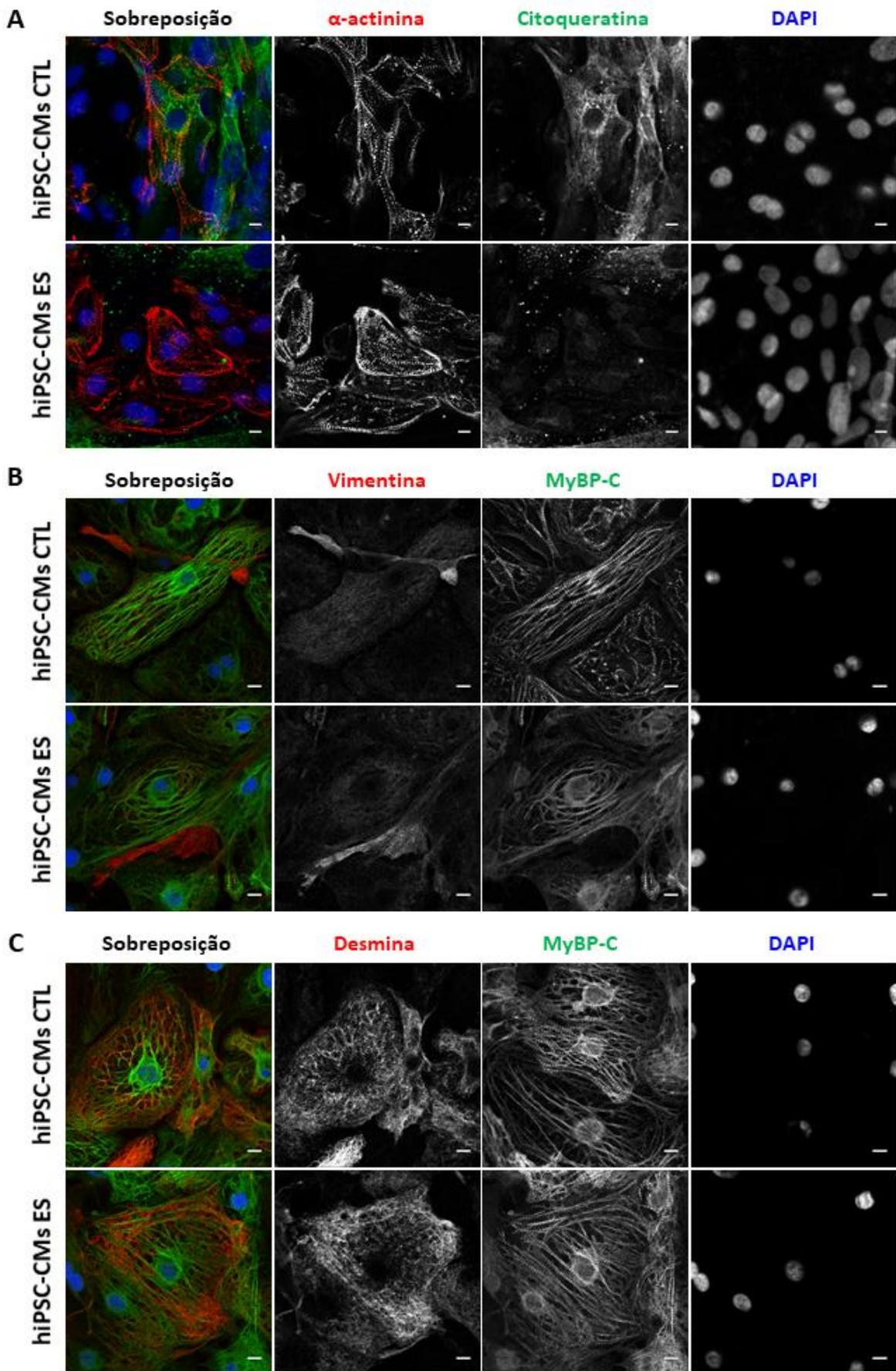


Figura 3: Micrografias de microscopia confocal dos hiPSC-CMs CTL e ES imunomarcados para os filamentos intermediários citoqueratina, vimentina e desmina. A) Indetectável colocalização da marcação de α -actinina e citoqueratina nos hiPSC-CMs ES (sinal vermelho e verde, respectivamente, em sobreposição). B) Poucas células positivas para vimentina sem colocalização com MyBP-C (sinal vermelho e verde, respectivamente, em sobreposição). C) Número semelhante de células positivas para a desmina colocalizadas com MyBP-C (sinal vermelho e verde, respectivamente, em sobreposição) foram observados em ambos os grupos. Os núcleos foram corados com DAPI e são mostrados em azul. Barra de escala: 10 μ m.