



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

e Imunologia

**Cardiomiócitos humanos derivados de células tronco
pluripotentes induzidas: aspectos morfológicos e funcionais**

Rebeca Peres Moreno Maia Joca

Belo Horizonte – 2017

Rebeca Peres Moreno Maia Joca

**Cardiomiócitos humanos derivados de células tronco
pluripotentes induzidas: aspectos morfológicos e
funcionais**

Tese de Doutorado apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz

Co-Orientadores: Dr. Gordon F Tomaselli

Dr. Brian O'Rourke

Belo Horizonte – 2017

DEDICATÓRIA

A Deus e a minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por tudo. Aos meus pais Alberto (papai) e Antonia (mamãe), que me deram suporte, me encorajaram e colaboraram cada uma de sua forma particular. Ao Ricardo por todo o carinho, apoio e alegrias nos momentos estressantes.

A meu marido Humberto, que com amor e dedicação me ajuda, apoia e colabora com minhas ideias, sejam elas profissionais ou não. Aos caríssimos Zairton (sogrão) e Edneide (sogra), por sua generosidade, confiança, compreensão e acolhimento quando mais precisava. A todos os meus amigos por incontáveis e inesquecíveis horas de diversão, confiança e afeto.

Aos coordenadores, professores e aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, pela paciência e esforço para transmitir seus conhecimentos e manter o funcionamento e organização desse maravilhoso programa.

Aos meus colegas do Laboratório de Membranas Excitáveis, Flávio Henrique Pequeno, Leidiane Pinho, Felipe Pinho, José Narciso Fernandes, Daiana Cardoso, Paula Maia, Tatiane Barreto, Juliana Figueiredo, Rodrigo, Daniel Lobo e Daniele por todo esse tempo de amizade e conhecimento compartilhado.

Aos sábios conselhos, orientações e a amizade de Dra. Sílvia Guatimosim, Dra. Carolina Moreira, Dr. Boheler, Dr. Dan Reich, Dr. Manu Ben Johny e Dr. Chris Ward.

As alunas de iniciação científica, Roberta, Marye e Mariana, as quais me ensinaram mais do que eu as ensinei e que trabalharam duro, assim tornando possível a realização dos experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório do Dr. Brian O'Rourke e Gordon Tomaselli, Agnes Sidor, Deborah DiSilvester (Debbie), An Chi Wei, Deepthi, Swati, Soroosh, Ting Liu, Nat Apaijai, Federica Farinelli, Andrew Nashed, Ijala Wilson, Chin Siang Ong and Chen Yu for your valuable friendship and priceless help to accomplish this thesis. Thank you.

A Dra Chen Yu e Dr. Dan Reich, que gentilmente cederam sua expertise e seu tempo para realização dos experimentos com microtecidos cardíacos (CMT's) que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos Ms. Artur Miranda e Julliane Joviano por ter me ajudado a compreender muitos dos aspectos de natureza eletrofisiológica de diversos tipos celulares, pelo companheirismo para comigo e meu marido nas horas mais difíceis, agradeço também aos valiosos conselhos no patch-clamp, cultura celular e risadas compartilhadas nos momentos de estresse.

As meus co-orientadores Brian O'Rourke e Gordon Tomaselli por sua compreensão, apoio, pelos conselhos e por ter me guiado em muitos momentos experimentais e na vida.

Ao meu orientador Dr. Jader Cruz, por ter acreditado em minha capacidade, força de vontade, pelo apoio, paciência e pelos muitos ensinamentos.

A universidade Johns Hopkins, em especial ao departamento de cardiologia da escola de medicina (SOM), e ao National Institutes of Health (NIH) pelo apoio e suporte financeiro das pesquisas executadas nos Laboratórios do Dr. Brian O'Rourke e Dr. Gordon Tomaselli.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro das pesquisas do Laboratório de membranas excitáveis e a pela bolsa de estudos que permitiu minha total exclusividade a esse trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Organização simplificada do sistema circulatório</i>	15
Figura 2 - Organização dos miofilamentos no miocárdio	18
Figura 3 – Filamentos contrateis e pontes cruzadas	21
Figura 4 - Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes	26
Figura 5 – Acoplamento excitação contração	27
Figura 6 – Exemplos de métodos de maturação empregados em cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas.....	33
Figura 7 – Análise do tamanho do sarcômero	43
Figura 8 - Micrografias de iPSC's CM's de pacientes saudáveis controle (WT-CTR)	49
Figura 9 - Circularidade, área e aspect ratio de iPSC's CM's de pacientes saudáveis.....	51
Figura 10 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes saudáveis controle (WT-CTR) com 22 dias após o processo de diferenciação	53
Figura 11 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes saudáveis (WT) com 22 dias após o processo de diferenciação e maturação (TDI)	53
Figura 12 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes com síndrome do QT-longo, subtipo 3(LQT3) com 22 dias após o processo de diferenciação	53
Figura 13 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes com síndrome do QT-longo, subtipo 3(LQT3) com 22 dias após o processo de diferenciação e maturação (TDI).....	54
Figura 14 - Comprimento e organização do sarcômero calculados a partir de imagens adquiridas da imunofluorescência de células derivadas de pacientes saudáveis tratadas (WT-TDI) ou não (WT-Controle) com TDI.....	55
Figura 15 - Expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR: Os níveis de mRNA relacionado as proteínas estruturais	56

Figura 16 - Traçados representativos do transiente de cálcio em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI	59
Figura 17 - Valores do transiente de cálcio em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI	60
Figura 18 - Expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR: Os níveis da mRNA para proteínas chave para a remoção do cálcio intracelular	61
Figura 19 - Traçados representativos do transiente de cálcio induzido por cafeína [10 mM] em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI	62
Figura 20 – Amplitude do transiente de cálcio induzido por cafeína [10 mM] em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI	63
Figura 21 - Níveis de expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR para proteínas cinases importantes para o CICR	64
Figura 22 - Traçados representativos do PA espontâneo através da técnica de mapeamento ótico em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) tratadas ou não com TDI	65
Figura 23 - Dados do PA espontâneo através da técnica de mapeamento ótico em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) tratadas ou não com TDI	67
Figura 24 - Micrografia de microtecidos cardíacos (CMTs) não tratadas (Controle) e tratadas com TDI (TDI), demonstrando o aumento na compactação das células ao formar as CMTs.....	68
Figura 25 - Visão superior de imagem da imunofluorescência de microtecidos (CMT's)	69
Figura 26 – Propriedade contrátil das CMT's tratadas ou não com TDI.....	70

Listra de Abreviaturas

[Ca⁺²]_i - concentração de cálcio intracelular

ACTN2 - α -actinina 2

ADP - adenosina bifosfato

AEC - acoplamento excitação-contração

APD30 - tempo para 30% da repolarização

APD80 - tempo para 80% da repolarização

ATP - adenosina trifosfato

BMP - do inglês, bone morphogenetic protein

Ca⁺² - íon cálcio

CAMKII – proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina II

Ca_v - canais para cálcio dependentes de voltagem

Ca_v 1.2 - canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L específicos de cardiomiócitos

Ca_{vL} - canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L

CICR - do inglês, calcium induced calcium release

CMT's - microtecidos cardíacos 3D

cTnC - Troponina C cardíaca

cTnI - troponina I cardíaca

cTnT - troponina T cardíaca

CTR – Controle

DAVD - cardiomiopatia ventricular direita arritmogênica

dd16 - décimo sexto dia após diferenciação

dd20 – vigésimo dia após diferenciação

dd21 - 21 dias após diferenciação

dd22 - 22 dias após diferenciação

FGF's - do inglês, fibroblast growth factors

FKBP5 - co-chaperona proteína 51 ligada a FK506

GSK3 - glicogênio sintase cinase 3

hESC-CM's - cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias

hiPSC's ou iPSC's - células-tronco humanas pluripotentes induzidas

If – corrente de entrada ativada por hiperpolarização ou corrente “funny”

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

I_{K1} – corrente dos canais para potássio retificadores de entrada

iPSC's-CM's - cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas

I_{to} - corrente transitória de saída de potássio

IWR1 - inibidor da via canônica de Wnt 1

LQT3 - síndromes do QT-Longo tipo3

MCU - do inglês mitochondrial calcium uniporter

MHC- β - cadeia pesada de miosina isoforma β

mRNA – RNA mensageiro

MYH7 – gene que codifica para cadeia pesada de miosina isoforma β

Na_v - canais para sódio dependentes de voltagem

NCX - do inglês sodium calcium exchanger

PA - potencial de ação

PBMCs - células mononucleares de sangue periférico

PDMS – polidimetilsiloxano

Pi - fosfato inorgânico

PKA – proteína cinase A

PLB – fosfolambano

PMCA - do inglês plasma membrane calcium ATPase

PPAR α - alfa receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RS - retículo sarcoplasmático

RYR - receptores de rianodina

SERCA - do inglês Sarco-Endoplasmic reticulum calcium ATPase

T3 – hormônio tireoidiano

TDI - T3, dexametasona e IGF-1

TNI – troponina I

Wnts - do inglês, proteínas wntless/INT

WT – células derivadas de pacientes saudáveis

Δ KPQ – células derivadas de pacientes com síndrome do QT-Longo tipo 3

μ TUG - do inglês - microfabricated tissue gauge

Resumo

O advento das células-tronco humanas pluripotentes induzidas (hiPSC ou iPSC's) causou uma grande expectativa no campo científico e clínico, pois são derivadas de células somáticas, crescem indefinidamente *in vitro* sem perder sua "pluripotencialidade" e tem enorme potencial de diferenciação, podendo produzir diversos tipos celulares tais como miócitos cardíacos. Apesar dos imensos esforços para desenvolver uma terapia baseada em células tronco, os cardiomiócitos derivados de iPSC's (iPSC's-CM's) possuem função basal ainda aquém de células adultas do tecido cardíaco. Nesse trabalho propomos que o protocolo de maturação que consiste da simples suplementação do meio de cultura com hormônio triiodotironina (T3), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e dexametasona, aqui chamado de TDI seja suficiente para o amadurecimento celular. O tratamento com TDI induziu um aumento na área celular, alongamento das células e melhor organização dos sarcômeros. Além disso, foi observado um aumento na expressão de mRNA para alguns marcadores de maturação como MYH7, FKBP5 e PPAR α . Quando comparadas com células sem o tratamento, as células expostas ao TDI tinham um transiente de cálcio de maior amplitude e um decaimento mais rápido do mesmo, além de um potencial de ação mais prolongado. Foi observado que essas células também tinham maior carga de cálcio no retículo sarcoplasmático. Isso pode estar associado ao aumento nos níveis de mRNA para a SERCA2A que foi observado nas iPSC's-CM's tratadas com o TDI. Essas células expostas ao TDI foram usadas para construção de microtecidos cardíaco, junto com células endoteliais e fibroblastos. Esses tecidos apresentaram maior força passiva e também maior força durante a contração desse tecido, corroborando com os dados obtidos da morfologia celular e manejo de cálcio. Em conclusão, o uso do TDI se provou um simples e robusto método de maturação de iPSC's-CM's e pode ser uma alternativa para obtenção de tecidos *in vitro* com maiores chances de integração funcional após sua enxertia em coração de pacientes.

Palavras-Chave: Acoplamento excitação-contração; Cardiomiócitos; Células-tronco humanas pluripotentes induzidas; Manejo de cálcio; Maturação.

Abstract

The advent of induced pluripotent human stem cells (hiPSC or iPSCs) has caused great expectations in the scientific and clinical field. Since they are derived from somatic cells, they can grow indefinitely *in vitro* without losing their pluripotency and have enormous potential of differentiation, being able to differentiate in many cell types such as cardiac myocytes. Despite the vast efforts to develop therapies based in stem cells, iPSC-derived cardiomyocytes (iPSCs-CMs) have impaired basal function compared with the adult cells in cardiac tissue. In this work, we propose a maturation protocol consisting of the simple supplementation of the culture medium with triiodothyronine (T3) hormone, insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and dexamethasone, here called TDI, is sufficient for cell maturation. Treatment with TDI induced an increase in cell area, cell elongation and better sarcomere organization. In addition, was observed an increase in mRNA expression for some maturation markers such as MYH7, FKBP5 and PPAR α . When compared to non-treated cells, the cells exposed to TDI had a calcium transient larger in amplitude and with faster decay kinetics, with prolonged action potential as well. Also, these cells had larger calcium content on the sarcoplasmic reticulum. This may be associated with the increase in mRNA levels for SERCA2A that was observed in iPSC's-CM's treated with TDI. Furthermore, TDI-treated cells were used to mount cardiac microtissues (CMT), along with endothelial cells and fibroblasts. These tissues had enhanced static force and increase in dynamic force during the contraction of this tissue, corroborating with the data obtained from their cellular morphology and calcium handling. In conclusion, use of TDI has proved a simple and robust method of maturation of iPSC's-CM's and may be an alternative to obtaining cardiac tissues *in vitro* with better chance to successful engraftment in patients' hearts.

Keywords: Calcium handling; Cardiomyocytes; Excitation-contraction coupling; Induced pluripotent human stem cells; Maturation.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Sistema Circulatório	14
1.2	Estrutura e funcionamento celular do miócitos	17
1.3	Ciclo de pontes cruzadas.....	21
1.4	Acoplamento excitação-contração cardíaco	23
1.5	Células humanas pluripotentes induzidas (hiPSC'S).....	30
2	Justificativa	35
3	Objetivos.....	37
3.1	Objetivos Específicos	37
4	Materiais e Métodos.....	39
4.1	Pacientes	39
4.2	Geração de iPSC's.....	39
4.3	Cultura Celular.....	39
4.4	Imageamento.....	41
4.5	Microscopia Confocal e Imunofluorescência.....	41
4.6	Transiente de Cálcio	43
4.7	Registro do Potencial de Ação Ótico celular	44
4.8	Microtecidos cardíacos 3D (CMTs)	46
4.9	Experimentos de PCR em tempo real – transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR).....	47
4.10	Análise dos dados	48
5	Resultados.....	49
6	Discussão	71
7	Conclusão.....	81
	Referências	82

1 Introdução

O coração é um órgão único, que para Aristóteles era definido como o abrigo da alma ou o centro do homem. Esse conceito filosófico evoluiu com o passar dos anos com o avançar do conhecimento da anatomia e fisiologia desse órgão, entretanto seu papel central para o funcionamento do corpo continua indiscutível.

Definido como bomba, esse nobre órgão que desde a terceira semana de vida do indivíduo começa sua função normalmente sem nunca falhar, bombeia o sangue através do corpo distribuindo nutrientes e oxigênio necessários para os diversos órgãos e sistemas do corpo. O coração pode ser dividido em quatro cavidades, dois átrios (direito e esquerdo) e dois ventrículos (direito e esquerdo), que por sua vez são alocados em lados, sendo assim: átrio e ventrículo direitos, e átrio e ventrículo esquerdos. Cada um dos lados do coração possui suas particularidades e se evidenciam na circulação sanguínea (Opie, 2003; Klabunde, 2005).

1.1 Sistema Circulatório

O sistema cardiovascular é composto majoritariamente pelo coração e vasos sanguíneos, percurso pelo qual o sangue deve percorrer para nutrir todo o corpo (denominado de circulação sanguínea). A circulação sanguínea é dividida em dois segmentos: pulmonar e sistêmica. Sumariamente, a circulação pulmonar é o percurso em que o sangue sai do lado direito do coração e é impulsionado em direção aos pulmões onde será oxigenado (Figura 1).

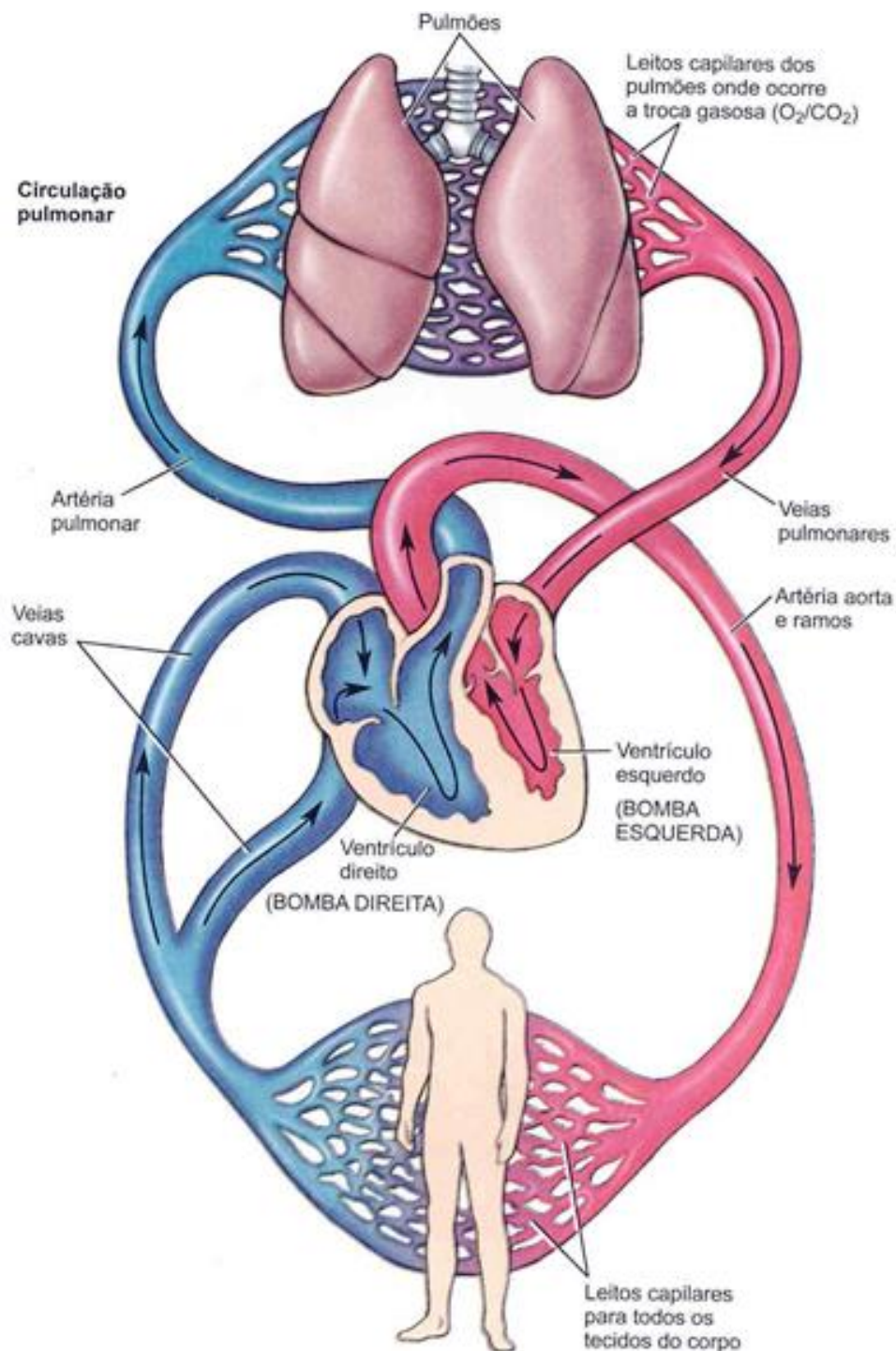


Figura 1 - Organização simplificada do sistema circulatório. Parte superior representando a circulação pulmonar enquanto a parte inferior representa a circulação sistêmica.

O sangue recebido pelo lado direito do coração é um sangue desoxigenado (baixa pressão parcial de oxigênio) advindo do sistema venoso, o qual penetra no átrio direito, flui para o ventrículo direito através da valva

tricúspide e é impulsionado em direção aos pulmões, para reoxigenação. Apesar de o ventrículo direito possuir paredes mais finas que o ventrículo esquerdo, ele gera pressão suficiente para o sangue venoso entrar na árvore vascular pulmonar (Opie, 2003; Klabunde, 2005).

Quando o sangue é finalmente oxigenado na árvore pulmonar, ele retorna através das veias pulmonares para o átrio esquerdo e flui para o ventrículo esquerdo através da valva mitral. O ventrículo esquerdo possui parede espessa, o que permite a câmara gerar uma força de contração suficiente para bombear o sangue para a aorta e irrigar todo o corpo, sendo está conhecida como circulação sistêmica (El Bardai *et al.*, 2003).

Para cumprir sua função, o coração possui propriedades intrínsecas, sendo estas mecânicas e elétricas, que quando bem orquestradas confere a este um movimento sincronizado que promove melhor eficiência em propelar o sangue. Para que haja uma integração entre a circulação pulmonar e sistêmica o coração trabalha de forma cíclica e ininterrupta para prover um fluxo sanguíneo contínuo. O ciclo cardíaco se divide entre duas principais fases: sístole e diástole.

A sístole é a fase que compreende a sucessão de eventos elétricos, de sinalização intracelular e mecânicos que ocasionam a contração do miocárdio. Seguido da sístole ocorre a diástole, que envolve os diversos fenômenos que desencadeiam o relaxamento das câmaras cardíacas. Apesar da característica repetitiva da função cardíaca, o coração depende de um controle rígido a cada ciclo para atender a diferentes demandas do corpo em situações distintas. Esse mecanismo de controle fino pode ser tanto intrínseco como extrínseco, e pode ser de natureza mecânica, elétrica ou neuroendócrina (Opie, 2003).

1.2 Estrutura e funcionamento celular do miócitos

O coração é composto de vários tipos celulares, porém é majoritariamente constituído por células contráteis específicas, cardiomiócitos, que ocupam 75% do volume total do miocárdio. Os cardiomiócitos são delimitados por uma membrana externa chamada sarcolema, e é preenchida por miofibrilas, responsáveis pela contratilidade. O sarcolema possui uma característica especial, ele se invagina formando estruturas tubulares, túbulos T, que expandem o espaço extracelular para o interior da célula (Bers, 2001; Bers, D. M., 2002; Bers, Donald M., 2002; Bers, 2008).

Os cardiomiócitos geralmente possuem núcleo centralizado e algumas vezes podem apresentar mais de um. Seu citoesqueleto é altamente organizado e guia algumas moléculas mensageiras aos seus respectivos alvos, além disso sua característica ordenada confere uma íntima relação com as miofibrilas. O conjunto de miofibrilas compõem uma unidade básica, chamada sarcômero. Este tem padrão empilhado conferindo o aspecto estriado encontrado nas células musculares e cardíacas. Os sarcômeros por sua vez proporcionam uma melhor geração de força, que reflete no desempenho cardíaco (Bers, D. M., 2002).

As miofibrilas são compostas de dois filamentos de grande importância na contratilidade, os filamentos grossos de miosina e os filamentos finos de actina (Figura 2B). Cada sarcômero é limitado por uma linha Z onde estão ancorados os filamentos de actina, já os filamentos de miosina se estendem do centro do sarcômero em direção a linha Z sem jamais tocá-la. Porém, uma terceira molécula, chamada titina (Figura 2B, em verde), conecta os filamentos de

miosina à linha Z, esta molécula possui a capacidade de expandir e contribui com a capacidade mecânica de extensão do miocárdio (Bers, D. M., 2002).

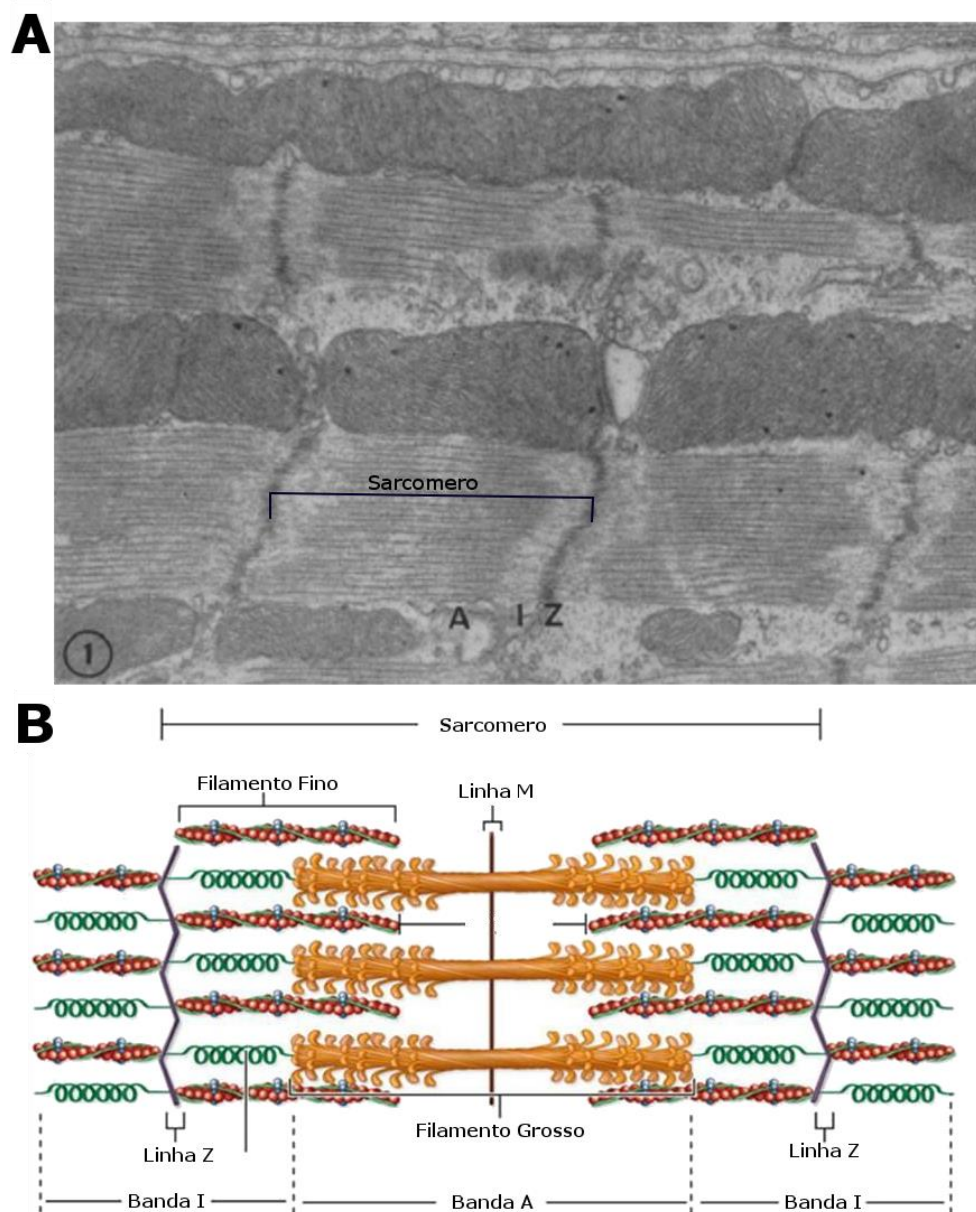


Figura 2 - Organização dos miofilamentos no miocárdio. (A) Imagem de microscopia eletrônica do miocárdio evidenciando a organização “estriada” dos sarcômero e as respectivas bandas A e I juntamente com a linha Z; Modificado de (Stenger e Spiro, 1961). (B) Esquema demonstrando a organização básica dos filamentos no sarcômero dos miócitos cardíacos.

Para que ocorra a contração do cardiomiócito, os filamentos de actina e miosina deslizam um sobre o outro, e o local onde ocorre a sobreposição destes

é chamado de banda A (de anisotrópico) que é visualizada através da microscopia eletrônica como uma zona escura. Em contraste a banda A está a banda I que é visualizada como uma zona mais clara, na qual contém apenas filamentos de actina (Figura 2A). O deslizamento dos filamentos de actina e miosina aproxima as duas linhas Z o que ocasiona o encurtamento do sarcômero. Devido a esse padrão repetitivo e bem organizado dos sarcômeros ao longo de toda miofibrila, esse encurtamento dessas pequenas unidades leva, inevitavelmente, a contração do miócito como um todo.

No centro da banda A há uma região relativamente mais clara, a zona H, e cada uma delas possui uma região central de tom mais escuro a linha M, que se estende através dos filamentos para mantê-los na posição anatômica correta.

Os filamentos finos são compostos por filamentos de actina, α -actinina, complexo troponinas e tropomiosina. A actina é formada por uma cadeia de monômeros globulares (actina G) torcidas umas sobre as outras em formato de dupla hélice, cada uma dessas cadeias está ancorada à linha Z, nas quais estão localizadas regiões que interagem com a miosina. A α -actinina é a responsável pela ancoragem dos filamentos de actina F aos discos Z, e além disso outras proteínas estão associadas a ela, a tropomiosina e o complexo de troponinas, essenciais para a ativação e regulação dos miofilamentos contráteis (Eisenberg e Hill, 1985).

A troponina é composta por três proteínas distintas: Troponina C cardíaca (cTnC), onde se localiza o sítio de ligação para o íon cálcio (Ca^{+2}), a troponina I cardíaca (cTnI) cobre o sítio de interação da actina com a miosina, inibindo a ligação actina-miosina, e troponina T cardíaca (cTnT), proteína que se liga

fortemente a tropomiosina e está envolvida na distribuição do efeito inibidor do complexo troponina, por exemplo na ausência de Ca^{+2} (Figura 3).

Os filamentos grossos são formados majoritariamente por uma associação de moléculas de miosina. A hidrólise por meio do uso de enzima (tripsina) a divide em duas cadeias: a leve (140 kDa) que corresponde a porção da cauda e a pesada (340 kDa) que apresenta uma região globular, a qual se divide em duas subunidades, conforme a hidrólise se prolongue, S1 que corresponde à região globular propriamente dita e possui atividade ATPásica, a S2 é mais leve que a S1, são fosforiláveis e estão alinhadas ao longo da base alongada ou “pescoço” de cada cabeça de miosina. Os filamentos de miosina projetam-se para fora do tronco do filamento, assemelhando-se a cabeça de uma flecha, e correspondem às projeções dos filamentos grossos em direção aos filamentos finos (Frearson e Perry, 1975; Eisenberg e Hill, 1985).

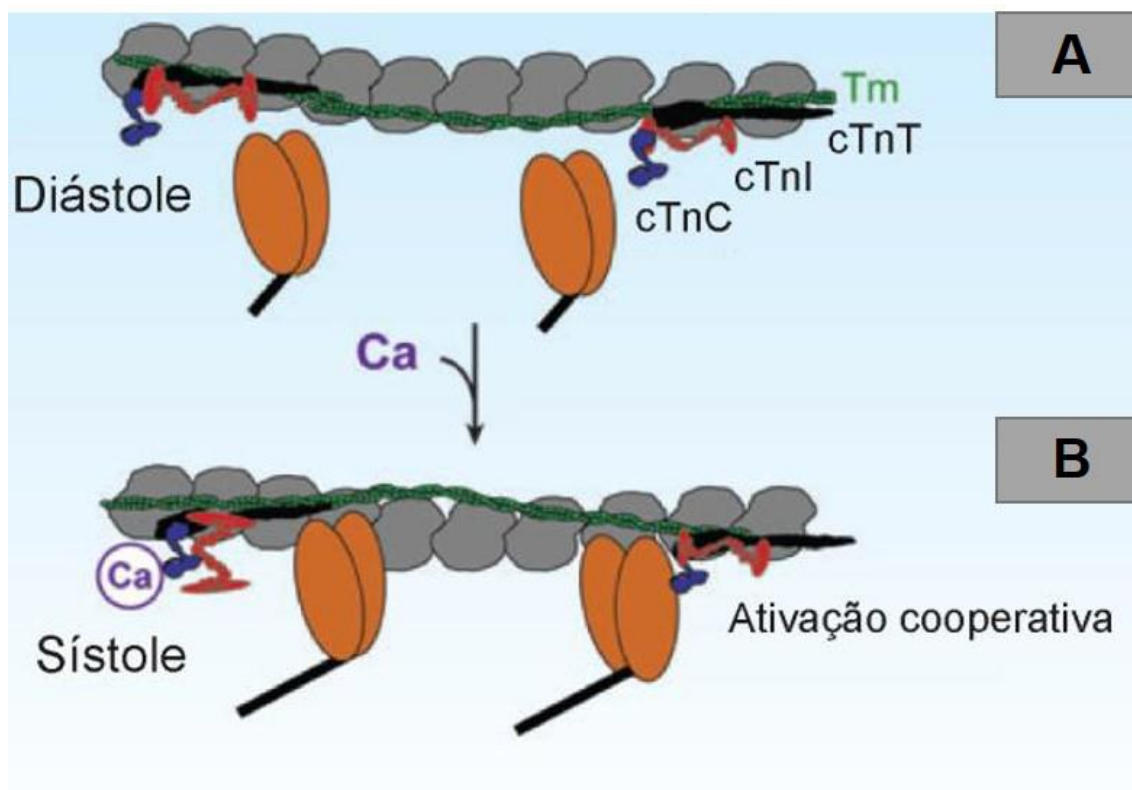


Figura 3 – Filamentos contráteis e pontes cruzadas. (A) Os filamentos finos de actina (em cinza) são mostrados com as proteínas reguladoras tropomiosina (Tm) em verde e a troponina com a unidade de ligação ao Ca^{+2} (cTnC) mostrado em roxo, a unidade de ligação à Tm (cTnT), em preto, e a unidade inibitória (cTnI) em vermelho. (B) As pontes cruzadas são formadas pela interação dos filamentos finos e filamentos grossos, mostrados com a cabeça da cadeia pesada destacada em laranja, quando há um aumento na concentração de cálcio no citosol. Modificado de Bers, 2008.

1.3 Ciclo de pontes cruzadas

A ativação dos filamentos contráteis, mencionados anteriormente, consiste na repetitiva ligação e desligamento das cabeças de miosina com e para os filamentos de actina, que resulta na contração celular, esse fenômeno é conhecido como ciclo de pontes cruzadas (Hynes *et al.*, 1987).

Inicialmente durante a diástole, os filamentos de miosina e actina, ou pontes cruzadas, estão fracamente associadas em um estado de repouso que não gera força (Figura 3A), neste estado a concentração de cálcio intracelular

($[Ca^{+2}]_i$) é baixa (em torno de 10^{-7} M). Ainda nesse estado, os sítios de ligação na cTnC ficam livres e assim a cTnI forma um complexo com ambos actina e cTnT. Isso reduz a afinidade da actina para miosina e a mantém a tropomiosina em uma posição que bloqueia a sítios de ligação na actina para as pontes cruzadas. O desencadeamento da geração de força e contração é iniciada por um estímulo elétrico que desencadeia o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ e sua ligação com a cTnC, processo esse denominado acoplamento excitação contração (Bers, D. M., 2002) e será discutido a seguir.

O aumento da $[Ca^{+2}]_i$ faz com que as pontes cruzadas e filamentos finos possam entrar em um estado de transição determinado pelas taxas de ligação e desligamento do Ca^{+2} com a cTnC. Este estado de "transição" envolve um aumento na ligação de cTnI para cTnC, o que alivia a inibição sobre a actina, e deslocamento da tropomiosina (causado pela cTnT) que desbloqueia os sítios de ligação do filamento fino. Estas alterações no filamento fino permitem a formação das pontes cruzadas (ligação actina-miosina), entrando assim em novo estado ativo, onde os filamentos estão fortemente ligados e grande potencial para gerar força (Bers, D. M., 2002)(Figura 3B).

Um aspecto importante é que no estado ativo, as pontes cruzadas fortemente ligadas também induzem uma ativação cooperativa do filamento fino que aumenta a afinidade do cTnC ao Ca^{+2} . Este mecanismo de ativação parece ser particularmente importante no miócitos cardíaco em comparação com o músculo esquelético, onde mudanças relativamente pequenas na relação da ligação das pontes cruzadas com a sensibilidade ao Ca^{+2} . Esse mecanismo de cooperação indica que certa parte da população de pontes cruzadas permanece

na ativa, ou seja, gerando força mesmo em níveis relativamente baixos de $[Ca^{+2}]_i$ (Hinken e Solaro, 2007).

Para o retorno desse estado ativo para o estado de repouso se faz necessário que além os níveis de $[Ca^{+2}]_i$ retornem aos valores de repouso, haja também a liberação dos produtos da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) pela cabeça da miosina (adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi)) e sua substituição por uma nova molécula de ATP. Na ausência de ATP, as pontes cruzadas continuam ligadas o que não permite o relaxamento do miócito. Sendo essa a causa do *rigor mortis* observado tanto nos músculos esqueléticos como no miocárdio após a morte, onde parte dos miócitos ficam em um estado contraído até degradação dos mesmos (Hinken e Solaro, 2007; Hanft *et al.*, 2008).

1.4 Acoplamento excitação-contração cardíaco

Para cada contração cardíaca é disparada uma onda elétrica que surge espontaneamente de células especializadas, localizadas no nó sino atrial, o que inicia a propagação do sinal elétrico pelas células do sistema de condução cardíaco e em seguida para o miocárdio. A sincronia desse sistema permite que o miocárdio funcione e contraia como um sincício. As células do nó sino atrial, também conhecidas como células marcapasso, tem a capacidade de gerar espontaneamente potenciais de ação (PA), que são decorrentes do movimento de íons através da membrana plasmática, que permite que ocorram mudanças no potencial de membrana da célula.

As células cardíacas são conectadas entre si eletricamente e fisicamente, isso permite que esses PA's gerados pelas células marcapasso viajem por todo

o órgão, sendo propagado de célula a célula. A consequente despolarização na membrana celular dos miócitos cardíacos, inicia o acoplamento excitação-contracção (AEC). Neste fenômeno, a alteração do potencial de membrana durante o PA é capaz de induzir um aumento de modo transiente nos valores de cálcio no citoplasma que resulta na ativação das pontes cruzadas e contracção. Os detalhes serão discutidos a seguir. Este acoplamento é o mecanismo responsável pelo funcionamento adequado da contratilidade cardíaca (Bers, D. M., 2002).

A despolarização iniciada nas células marcapasso propaga-se para os miócitos, isso desencadeia a abertura principalmente de canais para sódio dependentes de voltagem (Na_v). A abertura desses canais gera uma entrada de cargas positivas através do sarcolema, que desencadeia uma rápida despolarização da membrana. Essa “subida” do PA é denominada de fase 0 ou fase de despolarização do PA em miócitos cardíacos. Essa despolarização durante a fase 0 também induz a ativação do componente rápido da corrente transitória de saída de potássio (I_{to_f}) entretanto, sua contribuição é maior durante a fase 1. Nessa fase, os canais para sódio iniciam seu processo de inativação e em conjunto com saída de potássio promovida pela ativação da I_{to_f} repolariza parcialmente o potencial de membrana (Grant, 2009).

A despolarização durante a fase 0 também leva a abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) que é mantida até o final da fase 2. A manutenção da ativação dos Ca_v e concomitante inativação de I_{to_f} produz um platô na fase 2 onde as correntes despolarizantes (I_{Ca_v}) e repolarizantes (corrente de potássio ultra rápida - $I_{K_{ur}}$) estão balanceadas, assim mantendo a despolarização do potencial transmembrana. Na repolarização ou fase 3 do PA,

ocorre um aumento na condutância ao potássio pelas correntes de potássio lentas e inativação dos Ca_v . O conjunto desses eventos contribui para a repolarização celular. Após a repolarização os canais para potássio retificadores de entrada (I_{K1}), canais para potássio ativados por acetilcolina e os canais para potássio sensíveis a ATP passam a contribuir ativamente para a manutenção do potencial de repouso (Grant, 2009).

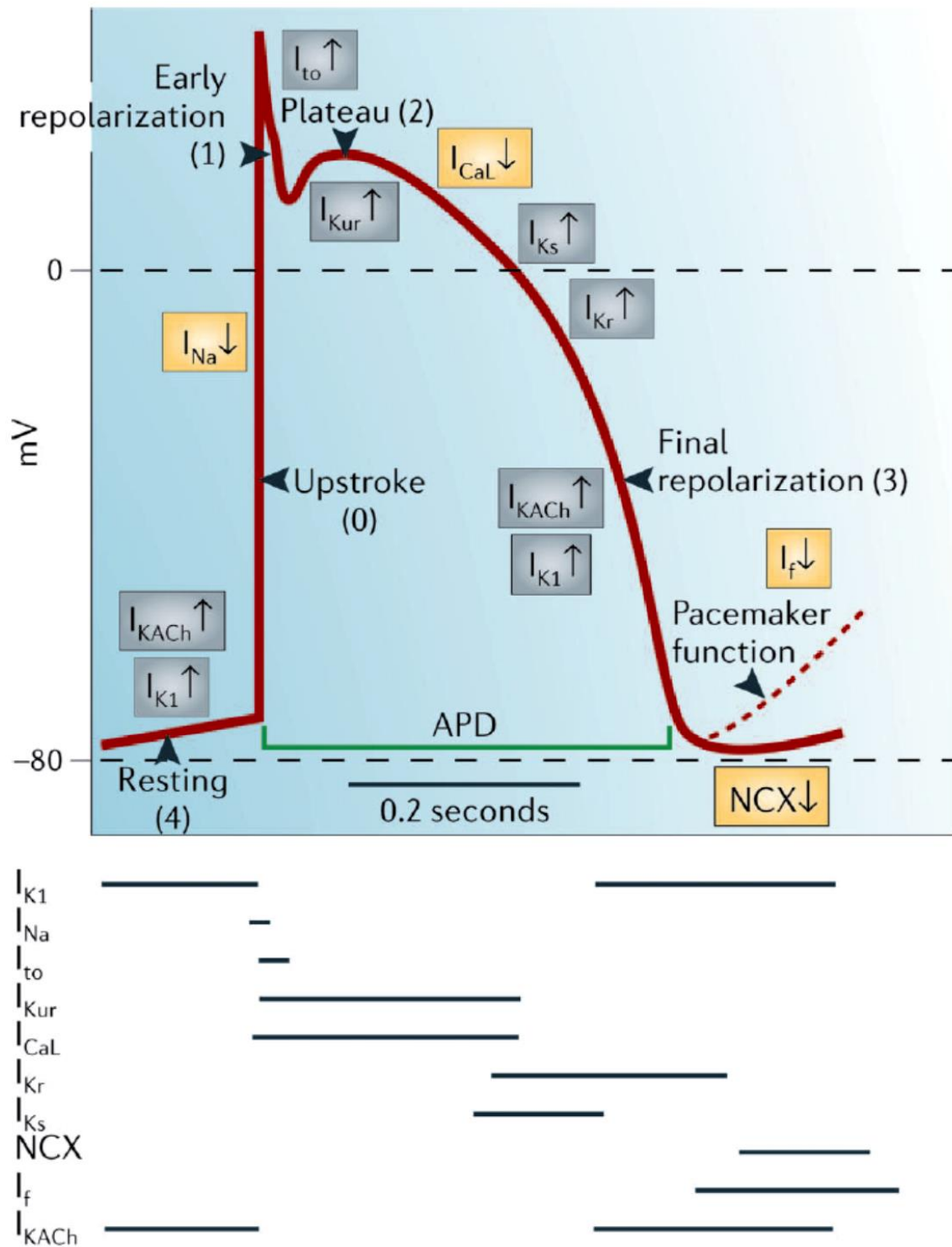


Figura 4 - Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes. Fases do potencial de ação cardíaco e as principais correntes envolvidas (traços inferiores) em cada fase (Grant, 2009). APD = Duração do Potencial de Ação.

Uma organela essencial para o AEC é o retículo sarcoplasmático (RS), onde não apenas armazena Ca^{+2} , mas também regula de forma fina os níveis de Ca^{+2} no citosol através da liberação e captação desse íon. O preciso controle do movimento de Ca^{+2} proporciona uma modulação sobre a contração e o relaxamento cardíaco (Bers, D. M., 2002).

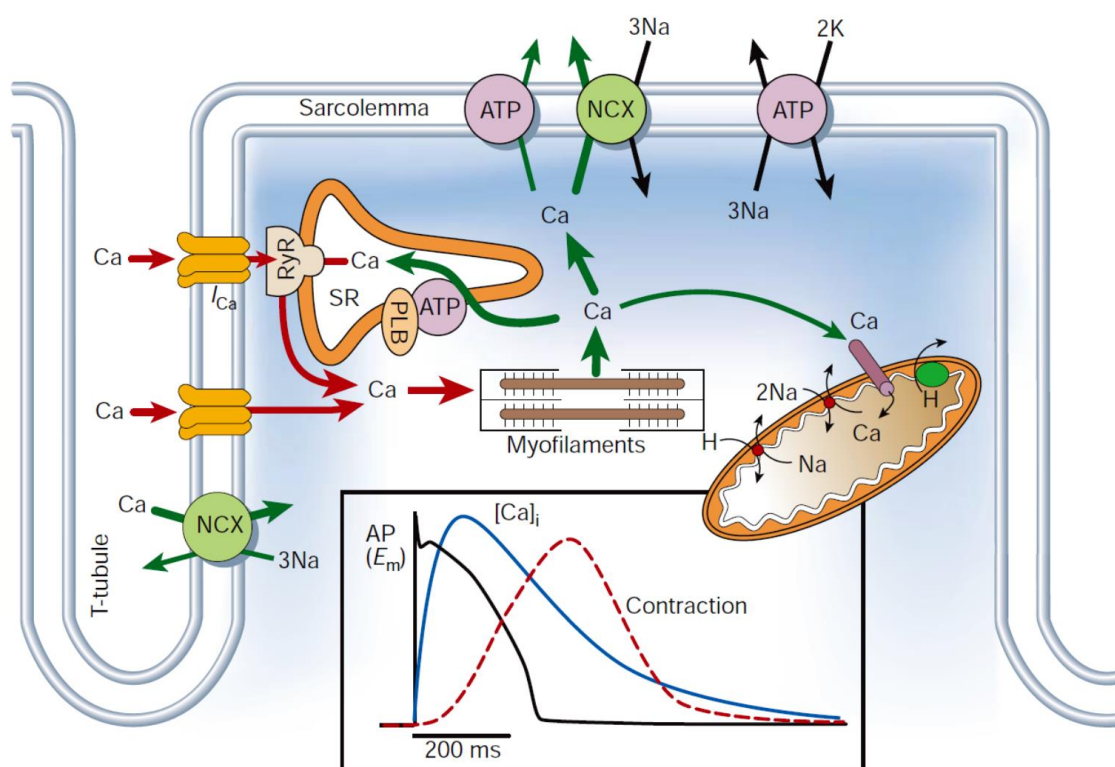


Figura 5 – Acoplamento excitação contração. Com a despolarização durante a fase 0, ocorre ativação da Ca_{vL} que eleva o $[\text{Ca}^{+2}]_i$ localmente que ativam os RYRs que inicia a liberação de Ca^{+2} do lúmen do RS para o sarcoplasma. Esse Ca^{+2} então liga-se a cTnC, ativando os miofilamentos contráteis e promovendo a contração. Para iniciar o relaxamento e necessário a remoção do Ca^{+2} através de quatro principais mecanismos: 1) Trocador Na/Ca (NCX); 2) SERCA2a (em cor rosa na membrana do RS); 3) A bomba de Ca^{+2} sarcolemal (em cor rosa no sarcolema) e 4) O uniporte mitocondrial de Ca^{+2} (MCU). As setas verdes indicam os mecanismos de remoção do Ca^{+2} enquanto as setas vermelhas indicam os mecanismos de entrada desse íon no sarcoplasma (Bers, D. M., 2002).

Durante a fase de platô, os canais para cálcio do tipo L (Ca_{vL}) são ativados por despolarização e, conseqüentemente, permitem o influxo de Ca^{+2} do meio extracelular para o sarcoplasma, essa entrada de cálcio gera um aumento da

concentração de Ca^{+2} local que inicia o processo de liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} que é chamada de CICR (do inglês, calcium induced calcium release). Essa entrada de Ca^{+2} ativa os canais de liberação de cálcio do RS conhecidos como receptores de rianodina (RYR), o que permitem a saída de Ca^{+2} acumulados no lúmen do RS, para o sarcoplasma. Esse processo é bastante eficiente já que os Ca_vL estão situados principalmente no túbulo T, que é uma invaginação do sarcolema justaposta ao RS. Isso permite uma interação bastante próxima dos Ca_vL com os RYR's (Figura 5). Em conjunto, os íons Ca^{+2} provenientes do meio extracelular e os liberados pelo RS contribuem para aumento na concentração sarcoplasmática, culminando na ativação dos miofilamentos contráteis e, conseqüentemente, na sístole cardíaca (Berne *et al.*, 2004; Hinken e Solaro, 2007).

Para que ocorra a diástole, relaxamento, da célula cardíaca, é necessário que a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ retorne a valores similares ao repouso (em torno de 10^{-7} M) para que ocorra o desligamento do Ca^{+2} da cTnC e reduzir as pontes cruzadas (discutido anteriormente). O RS tem papel primordial no relaxamento da maquinaria contrátil, devido a recaptação de Ca^{+2} para restabelecer os estoques, e trabalha em um conjunto com outras proteínas celulares que auxiliam na remoção do Ca^{+2} do sarcoplasma (Figura 5), tais como o trocador de sódio e cálcio (NCX, do inglês sodium calcium exchanger), Ca^{+2} -ATPase sarcolemal (PMCA, do inglês plasma membrane calcium ATPase), ambos localizados no sarcolema e o uniporte mitocondrial de Ca^{+2} (MCU, do inglês mitochondrial calcium uniporter). O NCX participa em com 7 a 29% do fluxo de Ca^{+2} durante o relaxamento, dependendo da espécie estudada, entretanto o fluxo através do RS domina, contribuindo com 70 a 92% do fluxo no relaxamento em miócitos

ventriculares. Os transportadores considerados lentos, PMCA e MCU, contribuem com apenas 1 a 7% desse fluxo (Bers, D. M., 2002).

O principal responsável pela recaptção de Ca^{+2} para o RS é a Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA, do inglês Sarco-Endoplasmic reticulum calcium ATPase). Esse transportador ativo se liga a dois Ca^{+2} e uma molécula de ATP, quando esse ATP é hidrolisado os Ca^{+2} são enviados para dentro do RS contra o seu gradiente. A isoforma SERCA2a é a mais abundante no músculo cardíaco, chegando a representar cerca de 50% das proteínas totais encontradas na membrana do RS (Dally *et al.*, 2010).

Sendo o componente majoritário da remoção de Ca^{+2} e devido a sua abundância na membrana do RS, se faz necessário alguns mecanismos da atividade da SERCA. O principal mecanismo de controle da SERCA é feito através da fosfolambano (PLB). A PLB é encontrada na forma de monômero, que possui atividade fortemente inibitória para a SERCA, e na forma de pentâmero que é tem menor uma menor ação inibitória. Além disso, esta proteína é responsável por reconhecer alterações na concentração de Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) e controlar a afinidade da SERCA ao Ca^{+2} . Quando a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ encontra-se em níveis diastólicos (~150 nM) os monômeros de PLB interagem com a SERCA, reduzindo a afinidade desta enzima pelo Ca^{+2} citosólico. Deste modo, a baixa $[\text{Ca}^{+2}]_i$ somada a uma reduzida afinidade da SERCA pelo Ca^{+2} podem diminuir drasticamente a velocidade de transporte durante a diástole cardíaca. Todavia, após uma CICR é observado um aumento na $[\text{Ca}^{+2}]_i$ suficiente para fazer com que o complexo PLB-SERCA se dissocie, aumentando a atividade de transporte dessa bomba (Bers, D. M., 2002).

1.5 Células humanas pluripotentes induzidas (hiPSC'S).

Na busca de novas terapias que fossem mais eficientes para o estudo de doenças incuráveis, a medicina buscou investir em pesquisas focadas nos estudos celulares. Em 1962 o pesquisador John B. Gurdon (Prêmio Nobel de medicina, 2012) havia comprovado que a especialização celular poderia ser revertida. Em sua pesquisa ele substituiu o núcleo de uma célula imatura (ovócito de sapo) pelo núcleo de uma célula intestinal (madura). Esse óvulo modificado gerou um sapo adulto normal, nos mostrando que, células maduras ainda conservam todas informações necessárias para o desenvolvimento de todos os tipos celulares (Gurdon, 1962).

Com esses resultados Gurdon quebrava o paradigma de que células adultas não poderiam reverter sua especialidade e gerar todos os outros tipos celulares. Esse princípio não poderia ter sido mais concreto depois do nascimento da ovelha Dolly em 1997 (Wilmut *et al.*, 1997; 2007). Em que o mesmo princípio de Gurdon foi utilizado para sua geração, porém o que a tornou irrevogavelmente mais famosa foi a ideia de que células maduras de mamíferos também poderiam ser revertidas em células imaturas (células tronco). A clonagem de Dolly não só foi uma quebra de paradigma como o começo de uma nova era de estudos e terapias de clonagem e células tronco (Yu *et al.*, 2007).

Porém, utilizar células embrionárias aplicadas em terapias, não só levanta a um longo debate ético, como também pode ocasionar rejeições ao portador de tais células. Foi em meio a essas limitações que Shinya Yamanaka (Prêmio Nobel de medicina, 2012), em 2006, descobriu como células maduras de camundongos poderiam ser reprogramadas e tornarem-se células tronco imaturas. Em seu estudo ele descobriu uma forma simples de adquirir tais

células, introduzindo apenas 4 fatores de transcrição gênica (c-Myc, OCT3/4, Sox2 e Klf4) ele induziu células maduras (fibroblastos de camundongos) a se tornarem novamente pluripotentes (Takahashi e Yamanaka, 2006).

Embora o mecanismo preciso da ação desses fatores de transcrição não tenha sido elucidados é sabido que Oct3/4 é um fator de transcrição que controla a manutenção e a diferenciação das células tronco pluripotentes. Sox2 controla a expressão de Oct3/4 e age sinergicamente com Oct3/4 *in vitro* regulando a expressão de genes específicos de células tronco pluripotentes, incluindo Nanog. Ou seja, são fatores de transcrição chaves para a pluripotência (Masui *et al.*, 2007). No caso de c-Myc, ele recruta proteínas modificadoras de cromatina, levando a uma ativação transcricional generalizada e se dispersa após a reprogramação celular (Nakagawa *et al.*, 2008). Klf4 é uma oncoproteína supressora de tumor que age de forma contexto-dependente, seu alvo é um fator “downstream” do fator inibitório da leucemia, e ativa Sox2 (Niwa *et al.*, 2009).

O advento das células-tronco humanas pluripotentes induzidas (hiPSC's ou iPSC's) causou uma grande expectativa no âmbito científico e clínico, pois são derivadas de células somáticas, crescem indefinidamente *in vitro* sem perder sua “pluripotência” e tem enorme potencial de diferenciação, podendo produzir diversos tipos celulares, incluindo aqueles mais difíceis de se obter tais como miócitos cardíacos (Poon *et al.*, 2015; Nakahama e Di Pasquale, 2016).

Sabe-se que os métodos desenvolvidos para diferenciação celular são desenhados para imitar os estágios sequenciais do desenvolvimento embrionário sendo assim, atualmente todos os protocolos utilizados estão concentrados na recapitulação da sinalização embrionária que primeiramente direciona o destino

das células para mesoderma (folheto embrionário que dá origem aos somitos que, por conseguinte, darão origem aos ossos, medula óssea e sistema circulatório) induzindo a um mesoderma cardiogênico (Yang *et al.*, 2008).

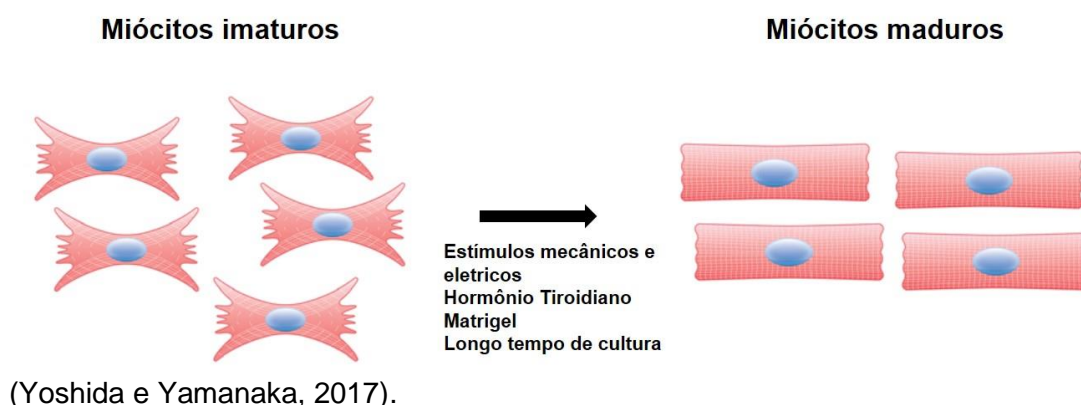
A geração de cardiomiócitos derivadas de iPSC's foi primeiramente relatado utilizando-se de corpos embrióides de iPSC's em meio de cultura contendo soro fetal bovino, porém a eficiência era de apenas 5-10% (Kehat *et al.*, 2001). Desde então, vários grupos de pesquisa vêm desenvolvendo métodos que demonstrem ser mais robustos e eficientes na esperança de se obter um método que possa desenvolver células com morfologia e fisiologia próximas a um cardiomiócito maduro.

Dentre várias moléculas candidatas a induzir células para um mesoderma cardiogênico, tem-se três famílias de fatores de crescimento proteicos: BMP (do inglês, bone morphogenetic protein), Wnts (do inglês, proteínas wingless/INT) e FGF's (do inglês, fibroblast growth factors). BMP promove cardiogênese e Wnts estão envolvidas na especificação cardíaca. Porém, com o avançar das pesquisas em monocamadas celulares, optou-se pelo uso de um ativador da via canônica de Wnt (β -catenina/cinase de glicogênio sintase (GSK3)) através da inibição de GSK3 pela ação de CHIR99021, foi demonstrado que o uso dessa molécula aumenta a especificidade mesodérmica em 90% (Gonzalez *et al.*, 2011).

Além disso, foi descoberto que a cardiogênese pode ser induzida pela inibição da via de sinalização da Wnt usando moléculas pequenas como inibidor da via canônica de Wnt 1 (IWR1), o que aumentou a obtenção de cardiomiócitos para 80-90% (Ren *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Tran e Zheng,

2017). Usando apenas essas duas moléculas (Wnt1 e CHIR99021) foi possível conseguir resultados mais reprodutíveis, redução de custos e melhor difusão dos fatores, por serem pequenas, além disso é possível produzir cardiogênese na ausência de fatores de crescimento exógenos (Lian *et al.*, 2012). Sendo assim, tipicamente suplementa-se o meio de cultura primeiramente com CHIR99021 em hiPSC's para ativar a via canônica de Wnt pela inibição da GSK3, e logo depois o meio é suplementado com IWR1 para inibir a sinalização da via canônica de Wnt (Blazeski *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Figura 6 – Exemplos de métodos de maturação empregados em cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas. Modificado de



Atualmente, não se tem um consenso sobre qual método de maturação é mais eficiente para obtenção de cardiomiócitos derivados de células tronco pluripotentes induzidas. A maioria dos métodos utilizados, atualmente, geram cardiomiócitos imaturos, com características elétricas e mecânicas próxima a cardiomiócitos embriológicos ou mesmo fetais. Além disso, geram população de cardiomiócitos com PA's diferentes, levando a classifica-las de acordo com suas características eletrofisiológicas em: atriais, nodais e ventriculares (Ma *et al.*, 2011; Ben-Ari *et al.*, 2016). Ou seja, os métodos de diferenciações atuais não têm a capacidade de gerar apenas um tipo de cardiomiócito específico (Ma *et*

al., 2011; Barbuti *et al.*, 2016; Jeziorowska *et al.*, 2017). Diversos métodos são empregados para maturação celular, seja eles baseados em adição apenas de substâncias químicas (hormônios, fatores de crescimento ou pequenas moléculas) (Fu *et al.*, 2011; Blazeski *et al.*, 2012; Boheler *et al.*, 2014; Kuppusamy *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Limpitikul *et al.*, 2017), usando estresse mecânico, ou estimulação elétrica (Nunes *et al.*, 2012; Ruan *et al.*, 2016) e mudanças no substrato usado nas culturas (Feaster *et al.*, 2015).

Após o desenvolvimento de métodos de diferenciação de iPSC's em células específicas, como os cardiomiócitos citados aqui, o uso destas ficou mais intenso. Foi possível contornar a dificuldade de se obter células humanas para o estudo de diversas doenças por serem por meio de processos invasivos. Além disso, as iPSC's abriram novas oportunidades de desenvolvimento de novos tratamentos e investigações pré-clínicas na questão de desenvolvimento de modelos de doenças, cardiomiopatias por exemplo, e terapias personalizadas *in vitro* (Zhang *et al.*, 2009; Drawnel *et al.*, 2014).

Dentre as cardiomiopatias estudadas pode-se citar cardiomiopatias de origem genética, como as síndromes do QT-Longo tipo 2, tipo3 (LQT3), a síndrome de Brugada, cardiomiopatia ventricular direita arritmogênica (DAVD) e cardiomiopatia dilatada (Itzhaki *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Malan *et al.*, 2016; Limpitikul *et al.*, 2017).

2 Justificativa

Apesar dos imensos esforços para desenvolver uma terapia baseada em células tronco, os cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) possuem função basal ainda aquém de células adultas do tecido cardíaco (Kochegarov e Lemanski, 2016; Masumoto e Yamashita, 2016).

Essas células apresentam, baixo potencial diastólico máximo (Doss *et al.*, 2012), potencial de repouso de membrana relativamente despolarizado, velocidade da fase de despolarização do PA é geralmente lenta nessas células, atividade espontânea devido a uma pequena densidade dos retificadores de entrada (I_{K1}) que não consegue sobrepor as correntes I_f , tem tamanho pequeno (baixa capacitância), carência de um padrão de sarcômero mais bem desenvolvido (Ma *et al.*, 2011), baixa força de contração (Hazeltine *et al.*, 2012) e uma energética pobre (Veerman *et al.*, 2015).

Considerando esses fatos, faz-se necessário um estudo que aperfeiçoe a obtenção de iPSC's-CM's que tenham um perfil mais próximo de uma célula nativa adulta, ou mais madura. Para isso, já foram publicados vários métodos de diferenciação que como resultado tivessem células mais maduras, porém o melhor método já publicado foi o de uso da ativação e inativação da via de Wnt (Blazeski *et al.*, 2012; Lian *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Porém, ainda assim, não se pode obter uma grande população de cardiomiócitos com características ventriculares ou atriais logo após o procedimento, elas necessitam ser mantidas em cultura por no mínimo 60 dias após diferenciação (Ben-Ari *et al.*, 2016).

Birket e colaboradores argumentam que as células em cultura perdem a comunicação essencial entre elas e outros sistemas, ou seja, sinalização parácrina. Sendo assim, desenvolveram um estudo para identificar que fatores contribuiriam para uma melhor maturação de cardiomiócitos ventriculares. Segundo eles o hormônio tireoidiano (T3), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e dexametasona são fatores suficientes para melhorar a função de iPSC's-CM's para vencer a desvantagem energética e de força apresentado nessas células (Birket *et al.*, 2015).

Apesar desses resultados animadores, ainda resta algumas questões em aberto. Infelizmente não se sabe se esses fatores têm efeito positivo sobre a sinalização de cálcio intracelular, peça chave na função cardíaca. Além disso, ainda é desconhecido se a inclusão desses fatores tem adicional quando as iPSC's-CM já estão associadas com outros tipos celulares que estão presentes no tecido cardíaco nativo, tais como fibroblastos e células endoteliais.

3 Objetivos

Portanto, pretendemos com nosso estudo mostrar quais as influências que o TDI (T3, dexametasona e IGF-1) tem sobre a função das iPSC's-CM's em monocamadas ou em preparações com diferentes tipos celulares. Além disso, avaliar se seu uso é recomendado para amadurecer rapidamente também iPSC's-CM's derivadas de pacientes com doenças genéticas cardíacas, como LQT3.

3.1 *Objetivos Específicos*

1) Descrever as mudanças morfológicas causadas nas iPSCS'-CM's derivadas de pacientes saudáveis e de pacientes com síndrome do QT longo do tipo 3 (LQT3), após o uso de TDI.

Premissa: Como as iPSC's-CM's possuem um tamanho celular pequeno (baixa capacitância) e carência de um padrão de sarcômero mais bem desenvolvido, com o provimento de hormônios que parecem melhorar a condição funcional dessas células, espera-se ver um aumento de tamanho e uma melhor organização do sarcômero.

2) Caracterizar as mudanças ocorridas no manejo de cálcio em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis e de pacientes com LQT3, após o tratamento hormonal com TDI.

Premissa: iPSC's-CM's são células que geralmente possuem uma velocidade da fase de despolarização do PA lenta. Esse retardo pode acarretar numa menor ativação de Ca_{vL} , ocasionando um efeito cascata de menor liberação de cálcio induzida por cálcio do RS e menor concentração de cálcio no citosol,

representado por um menor um transiente de cálcio. Porém, com o uso de TDI o transiente se mostraria mais parecido com o observado em células nativas.

3) Demonstrar as alterações eletrofisiológicas nos PA's de iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis tratadas com TDI.

Premissa: As iPSC's-CM's apresentam uma variedade mista na população de cardiomiócitos (sinusal, atrial e ventricular) logo após o término do processo de diferenciação, com PA variados e com propriedades longe das observadas em células adultas, com o uso do TDI poderia se obter células com perfil mais maduro mais depressa, com 21 ou 22 dias após diferenciação, e PA com potencial de repouso de membrana mais hiperpolarizado se assemelhando ao encontrado em células adultas.

4) Avaliar a produção de força em microtecidos cardíaco derivados de iPSC's-CM's de pacientes saudáveis com o uso do TDI.

Premissa: O tecido cardíaco apresenta uma grande variedade de tipos celulares que pode ter ação sinérgica ou antagônica. Nesse contexto, se faz necessário testar o uso do TDI em preparações que apresentem maior similaridade com o tecido nativo para confirmar o seu uso. Cultivando as iPSC's-CM's em conjunto com fibroblastos e células endoteliais em uma câmara especial podemos avaliar, objetivamente, uma mudança na força produzida por essas células após o tratamento com TDI.

4 Materiais e Métodos

4.1 Pacientes

Pacientes saudáveis e identificados com síndrome do QT-longo (com base em canais para sódio (Na_v)) cederam generosamente para o Hopkins Center for Inherited Heart Disease material sanguíneo para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's) feita pelo centro de células tronco da mesma universidade. Todo o procedimento e consentimento foram institucionais e aprovados pelo Office of human subjects research – institutional review board sob o código: CIR00023577.

4.2 Geração de iPSC's

As iPSC's usadas no atual estudo foram derivadas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e geradas pelo centro de células tronco da Johns Hopkins University usando vírus Sendai episomal sob condições “feeder-free”, método previamente descrito por (Dowey *et al.*, 2012). Clones de iPSC's putativas foram avaliadas quanto a presença de fatores de transcrição de reprogramação celular e marcadores de superfície celular por PCR e imunofluorescência, respectivamente.

4.3 Cultura Celular

Manutenção

Após obtenção das células pluripotentes, estas foram mantidas em placas de 6 poços previamente tratadas com um substrato de adesão (Geltrex[®], Invitrogen) e alimentadas diariamente com meio de crescimento Essencial 8 (Essential 8, Gibco). Quando estas atingiram uma confluência de 80% essas

células foram submetidas ao protocolo de diferenciação (Boheler *et al.*, 2014; Nakahama e Di Pasquale, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Diferenciação

Para diferenciar iPSC's em iPSC's cardiomiócitos (iPSC's-CM's) as células foram submetidas a um processo de troca de meios suplementados com diferentes substâncias (Boheler *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Inicialmente as células foram alimentadas com meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com B27 sem insulina (B27-)(Gibco) e CHIR99021 [6µmol/L] (Tocris), um inibidor da GSK3 para ativar a via de sinalização de Wnt por 48 horas. O primeiro dia de diferenciação foi marcado como dia 0, no dia 2 as células passaram a ser alimentadas com B27-, porém adicionado de IWR-1 [5 µmol/L] (Sigma), inibidor da via de sinalização de Wnt, por mais 48 horas. A partir do dia 4 as células são alimentadas apenas por B27- até que fosse detectado a olho nu contratilidade espontânea.

Maturação

Após as iPSC's serem diferenciadas em cardiomiócitos esperamos 13 dias após diferenciação para verificarmos atividade espontânea, requerimento básico para viabilidade celular. No décimo terceiro dia as células saudáveis, ou seja, viáveis, foram replaqueadas em lamínulas de vidro tratadas previamente com Geltrex[®], numa densidade de 1×10^5 células/mL. As células permaneceram em B27- até o décimo sexto dia após diferenciação, onde neste dia o meio é suplementado com hormônio triiodotironina (T3) [100 nM] (Cayman), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) [100 ng/ml] (Sigma), dexametasona [1 µM] (Sigma). Esse coquetel de fatores denominamos de TDI.

No vigésimo dia após diferenciação as iPSC's-CM's recebem novamente meio B27- com TDI e mantido por 24 horas. Os experimentos foram executados nos dias 21 e 22 após diferenciação (Birket *et al.*, 2015).

4.4 Imageamento

As imagens das iPSC'S-CM's foram obtidas utilizando-se um microscópio de epifluorescência, EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific), com objetivas de 20x do mesmo fabricante. As imagens adquiridas foram feitas em áreas selecionadas aleatoriamente para avaliação de circularidade, área e “aspect ratio” em células tratadas ou não com TDI, usando rotinas pré-programadas do software ImageJ (Fiji).

4.5 Microscopia Confocal e Imunofluorescência

Para visualizarmos e avaliarmos a eficiência do tratamento de iPSC's-CM's com TDI, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, seguidas de lavagem com PBS, as células foram então permeabilizadas por 15 min com 0,1% Triton X-100 e bloqueadas com soro de cabra 10%. Os anticorpos primários foram selecionados para marcar proteínas específicas de cardiomiócitos, sendo esses: α -actinina (camundongo monoclonal, A7811, Sigma) e troponina I (camundongo monoclonal, 10R-T123e, Fitzgerald, Acton, MA), ambos diluídos 1:200 em SuperBlockPBS (Thermo Fisher) e incubadas overnight 4°C. As iPSC's-CM's foram então lavadas com PBS e depois incubadas com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor IgG 488 e Alexa Fluor IgG2a 568 (Invitrogen) e DAPI, diluído 1:300 (Life Technologies) por 1 hora. Em seguida, foram lavadas com PBS, montadas em lamina de vidro com ProLong Gold (Life Technologies) e mantidas ao abrigo da luz overnight, $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

As imagens foram adquiridas na Microscope Facility do Institute for Basic Biomedical Sciences, através de microscopia confocal, usando o sistema confocal Zeiss Axiovert 200 com módulo confocal 510-META (Zeiss, Peabody, MA), as imagens captadas foram processadas pelo software ImageJ (Fiji). As células fixadas foram excitadas por um laser de argônio no comprimento de 488 nm e a emissão captada em 550 ± 49 nm quando o anticorpo Alexa Fluor IgG 488 foi utilizado, ou excitadas com um laser de comprimento 561 nm e emissão de 550 ± 49 nm quando utilizado o anticorpo Alexa Fluor IgG2a 568. Para observar o núcleo celular, as células foram excitadas por um laser diodo no comprimento 405 nm e as imagens eram captadas a 475 ± 28 nm. Todas as imagens foram adquiridas usando lentes objetivas PlanNeoFluar 40x (Oil, NA 1.3, WD 0.21) e PlanApo 63x (Oil, NA 1.4, WD 0.19).

Para medida do comprimento de sarcômero, foram utilizadas imagens obtidas usando o anticorpo para α -actinina sarcomérica. Com essas imagens, foram traçadas 2 linhas de 15 μm de comprimento ao longo de cada célula. De cada linha foi gerado um perfil da intensidade da fluorescência ao longo da mesma (Figura 7A e B), então cada perfil foi analisado em rotinas personalizadas em Matlab. Essa rotina se utiliza de uma transformada rápida de Fourier para obter um espectro de frequência espacial do sinal (Figura 7C), com isso a rotina calcula e entrega os valores do tamanho médio do sarcômero e um valor de amplitude do pico encontrado no espectro (Figura 7C, círculo vermelho), este que se relaciona com a organização do sinal de fluorescência já que a amplitude

do mesmo tem relação inversa com a variabilidade do comprimento de sarcômero.

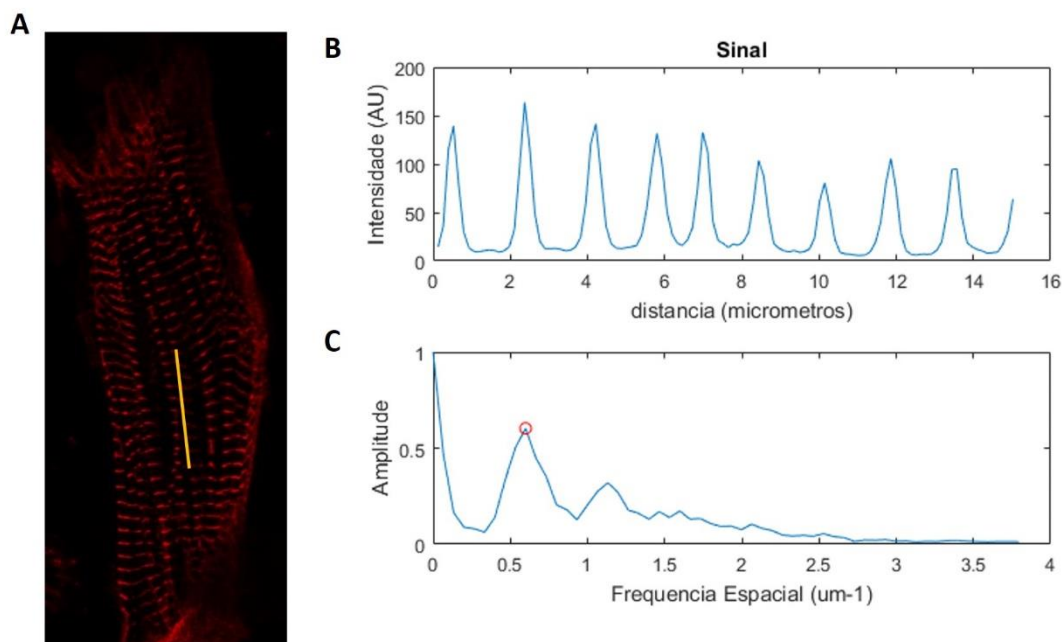


Figura 7 – Análise do tamanho do sarcômero. (A) É traçada uma linha de 15 µm de comprimento ao longo da célula. (B) A partir dessa linha é obtido um perfil da intensidade da fluorescência que é posteriormente convertido em um espectro de frequência espacial (C) por uma rotina personalizada do Matlab. (C) O pico entre 0,4 e 0,7 (que representa comprimentos entre 2,5 e 1,4 µm, respectivamente) é considerado o valor médio do comprimento do sarcômero.

4.6 Transiente de Cálcio

Para o registro do transiente de cálcio, as células foram carregadas utilizando a sonda Indo-1 (TefLabs Inc, Austin, TX, USA) na sua forma acetoximetil (AM) éster por 30 minutos ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) na concentração de 5 µM em solução de Tyrode. Após o período de carregamento as células foram então lavadas com Tyrode, onde permaneceram por mais 10 minutos para desesterificação. O registro dos transientes de cálcio foi realizado em um sistema de detecção de fluorescência em tempo real (IonOptix, Milton, USA). As células ficaram em uma câmara de perfusão preenchida com solução Tyrode, e a sonda foi excitada a 360 nm, e a luz emitida foi separada utilizando o espelho dicróico

com comprimento de corte de 455 nm, e posteriormente filtrada em dois comprimentos de onda distintos: 405 e 485 nm. A luz emitida em cada um desses comprimentos então foi coletada por dois tubos fotomultiplicadores. Os sinais de fluorescência são mostrados como variação da razão entre o sinal em 405 nm (numerador) e 485 (denominador). A amplitude de cada transiente foi calculada como variação dessa razão em relação ao pico do transiente e o valor da linha de base. Para o tempo para decaimento, foi calculado do tempo do pico até a fluorescência cair em 50% de amplitude.

Para os registros de transientes de cálcio induzidos por cafeína, as células foram preparadas e montadas como mencionado anteriormente, porém estas foram perfundidas por solução de Tyrode por 30s e em seguida perfundidas por solução de Tyrode suplementada com Cafeína [10 mM] por 20s, e finalmente, após a aquisição as células eram lavadas novamente com Tyrode.

4.7 Registro do Potencial de Ação por mapeamento ótico

Para registrar os potenciais de ação de iPSC's-CM's foi utilizada a técnica de mapeamento ótico, ou optical mapping. Esta técnica já é bem estabelecida para o estudo de potenciais transmembrana em várias preparações inclusive de células tronco derivadas de embriões (Weinberg *et al.*, 2010; Burridge *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2011), e proporciona registros multicelulares em alta resolução espacial, como também é possível registrar o curso temporal do potencial transmembrana preservando a morfologia do PA (Blazeski *et al.*, 2012).

Partindo desta premissa, os registros do PA foram baseados no método previamente descrito por Burridge e colaboradores. Sumariamente, as células foram plaqueadas em placas de petri de 35 mm, cobertas previamente com um

substrato de adesão (Geltrex, Invitrogen), na concentração de aproximadamente 2×10^6 células por ml. Quando era observada uma monocamada com atividade espontânea estas eram carregadas com 10 μM de uma sonda sensível a voltagem, di-4-ANEPPS (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) diluída em Tyrode (135 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,33 mM NaH_2PO_4 , 5 mM HEPES, and 5 mM glucose - Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) suplementada com Blebbistatina 20 μM para inibir o AEC prevenindo distorções no sinal devido ao movimento espontâneo, além disso aumentar a viabilidade celular, por 10 min a 37 °C (Burrige *et al.*, 2011).

Passado o tempo de carregamento, as células eram lavadas com Tyrode suplementado com Blebbistatina e mantidas na mesma solução para aquisição das imagens. Todos os experimentos foram conduzidos a 37 °C. Para o imageamento do potencial transmembrana foi usado uma câmera MiCam Ultima-L CMOS (MiCAM Ultima-L, SciMedia, Costa Mesa, CA) com resolução de 100x100 pixels com taxa de aquisição de 500 quadros/seg.

A partir de rotinas personalizadas em Matlab (Little e Jones, 2010; Blazeski *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016) os vídeos capturados com a câmera foram recuperados, e a análise foi feita utilizando-se de 2 áreas de 3x3 pixels por vídeo, as áreas eram escolhidas conforme a atividade elétrica era observada, pela mudança de intensidade da fluorescência, a qual se traduz no perfil do traçado do PA. Esses dados foram exportados e analisados o tempo para 30 (APD30) e 80% (APD80) da repolarização.

4.8 Microtecidos cardíacos 3D (CMTs)

Em colaboração com o laboratório do Dr. Dan Reich da Johns Hopkins University, foram executados os experimentos de registro de força em microtecidos cardíacos 3D (CMT's). Sumariamente, uma suspensão celular de iPSC's-CM's providas por nosso laboratório em conjunto com fibroblastos cardíacos e células endoteliais humanas mantidas pelo laboratório do Dr. Reich foram postas nos poços foram adicionadas em uma razão fixa numa solução contendo (2,25 mg/mL) de colágeno e fibrinogênio (0,75 mg/mL) dentro dos microwells de polidimetilsiloxano (PDMS Sylgard 184, Dow-Corning) em dispositivos μ TUG (do inglês - microfabricated tissue gauge). A compactação celular gerada produz CMTs com células suspensas entre pilares flexíveis em μ TUG, as deflexões dos pilares reportam as forças dinâmicas e estáticas das CMT's (Zhao *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015).

As CMT's são fabricadas com base em PDMS, eles consistem em um par de hastes flexíveis de 115 μ m de comprimento e uma cross section de 140 x 35 μ m em suas secções flexíveis, separados por 500 μ m num poço com profundidade de 800 x 400 x 170 μ m em PDMS. Raias de 10 x 13 de CMT's foram fabricadas em uma placa de petri de 35 mm como previamente descrito (Zhao *et al.*, 2013; 2014; Xu *et al.*, 2015). Os PDMS usados possuem um módulo elástico de 1,6 MPa, os quais dobram os pilares com elasticidade constante, sendo $k = 0,90 \text{ uN}/\mu\text{m}$ para pequenas deflexões (Zhao *et al.*, 2013).

A co-cultura celular foi posta nos poços como descrito previamente (Zhao *et al.*, 2013) e mantidas em cultura até o dia do experimento, correspondendo a 21 ou 22 dias após a diferenciação das iPSC's-CM's, em meio B27(-) suplementado ou não com TDI. A força de contração é dada por $F' = k\delta'$ gerada

pelo microtecido, e foi determinada pela média da deflexão δ' dos dois pilares. Foram calculadas a frequência de contração espontânea, a força dinâmica e estática exercida pelo microtecido, ou seja, com ou sem estimulação, respectivamente, onde a estimulação era feita através de estimulação de campo a 1Hz (40V) (Zhao *et al.*, 2013; 2014; Xu *et al.*, 2015).

4.9 Experimentos de PCR em tempo real – transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR)

Para avaliar a expressão de mRNA, foi utilizado o método de PCR em tempo real com primers específicos, tendo o RNA total das células extraído utilizando o kit RNeasy Mini kit (Qiagen®). O RNA foi quantificado por espectrofotometria pelo aparelho NanoDrop 1000™ (Thermo Scientific™) e em seguida armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi estimada por absorbância ótica pela fórmula: $[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{A}260 \times 75/1000)$, onde f é o fator de diluição e 75 é o fator de conversão.

As amostras em seguida foram submetidas a transcriptase reversa utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific™) em que converterá quantitativamente 1000 ng de RNA em cDNA gerando de fita simples adequadas para PCR quantitativo. Após a obtenção de cDNA as amostras foram pipetadas em placas de 96 poços com a mistura cDNA e uma solução contendo uma DNA polimerase, deoxinucleotídeos, uma sonda fluorescente (ROX™) e os primers de escolha a serem avaliados. Essa placa foi centrifugada e acoplada a um leitor de PCR (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) onde a fluorescência da sonda é iluminada e detectada em cada poço para cada amplificação, gerando um gráfico com valores de ciclos em relação a sua fluorescência relativa, estes valores são posteriormente tratados e

convertidos em exponencial e normalizados pelo gene 18S ribossomal, o qual mantinha seus níveis estáveis apesar dos processos de maturação, a média desses valores foi plotada como média e desvio padrão da média em box plot (Limpitikul *et al.*, 2017).

4.10 Análise dos dados

Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. (n), onde E.P.M. é o erro padrão da média e n representará o número de experimentos. As médias foram consideradas diferindo significativamente entre si se o valor de P para a rejeição da hipótese nula foi ajustado como sendo $\leq 0,05$. Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t de Student ou teste de Mann-Whitney como teste não paramétrico, para comparação de mais de dois grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguido de um pós-teste de comparação múltipla entre pares, quando apropriado.

5 Resultados

Para avaliar o impacto do tratamento de maturação com TDI sobre o desenvolvimento das iPSC's em cardiomiócitos foi utilizado o microscópio de luz transmitida para acompanhamento e captura de imagens antes da exposição ao TDI (décimo sexto dia após diferenciação, dd16) e após a exposição (vigésimo dia após diferenciação, dd20).

Após a administração de TDI sobre os cardiomiócitos derivados de iPSC's pode-se observar uma mudança dramática na morfologia celular tanto a olho nu, quanto analisadas com o auxílio do software ImageJ, com apenas 21 dias após diferenciação (dd21) (Figura 8).

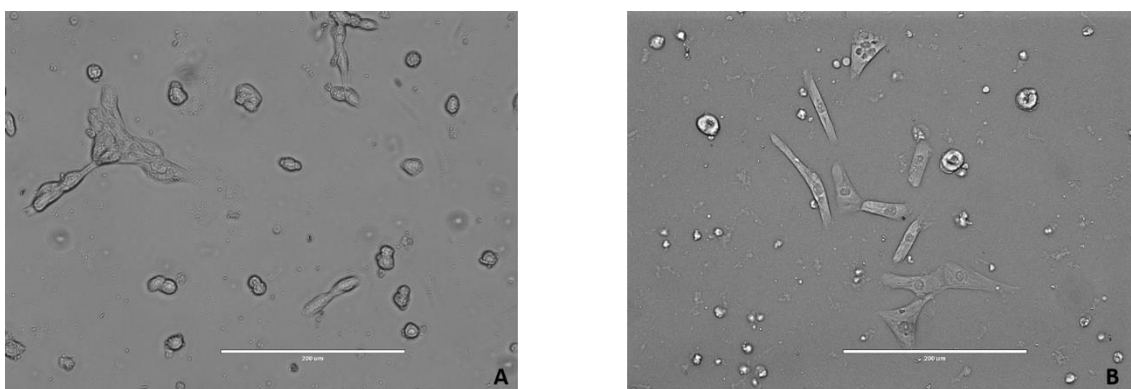


Figura 8 - Micrografias de iPSC's CM's de pacientes saudáveis controle (WT-CTR). Adquiridas 16 dias após diferenciação, *antes da exposição à B27(-)TDI* (painel A) e 20 dias após a diferenciação, e exposição à B27(-)TDI (painel B), em microscópio com luz transmitida (EVOS), objetiva de 20X (barra de calibração - 200 µm).

Com as imagens obtidas foi possível analisar os parâmetros de área e circularidade celular. Com relação a área das iPSC's-CM's, as células tratadas com TDI no dd20 já exibiam um aumento significativa entre elas e seus controles, diferença está se tornou ainda maior com a progressão do tratamento TDI (dd22). Não apenas observou-se diferença entre o tratamento e seus respectivos controles, mas também foi identificada diferença entre os dias após

diferenciação com relação ao grupo tratado com TDI, ou seja, houve um aumento esperado na área celular com a progressão dos dias após diferenciação (Figura 9).

Em relação ao parâmetro de circularidade foi possível calcular a diferença entre as células tratadas com TDI e as células controle. As células que se aproximam mais do valor 1,0 são mais circulares que as que se distanciam dele. Sendo assim, as células TDI com dd 20 apresentaram morfologia menos circular que as células controle, e essa diferença se mantém ao longo do tratamento com TDI (dd 22). A circularidade, assim como a área, exibiu diferenças significativas com a progressão dos dias após diferenciação (Figura 9). Não apenas pode-se observar uma diferença significativa nestes dois aspectos analisados, a taxa de proporção, ou “aspect ratio”, dessas células também se mostrou bastante diferenciada ao longo do tratamento (Figura 9).

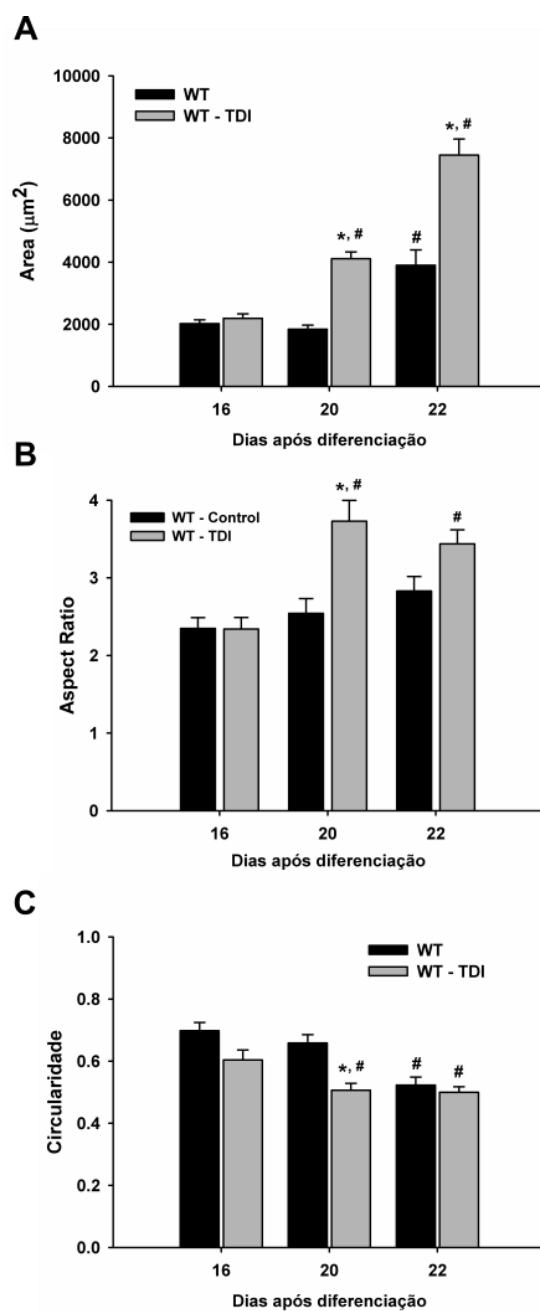


Figura 9 - Circularidade, área e aspect ratio de iPSC's CM's de pacientes saudáveis. Adquiridas 16 dias após diferenciação, antes da exposição à B27(-)TDI, 20 dias após a diferenciação, e exposição à B27(-)TDI e 22 dias após diferenciação e exposição à B27(-)TDI, onde * indica diferença significativa entre células com tratamento TDI em relação ao seu controle, e # indica diferença significativa entre as células do mesmo grupo com 20 e 22 dias após diferenciação em relação ao dia 16.

iPSC's-CM's, logo após o processo de diferenciação, são células imaturas e com população heterogênea de células cardíacas dentre elas: nodais, atriais e ventriculares (Ben-Ari *et al.*, 2016; Pipilas *et al.*, 2016; Moreau *et al.*, 2017). Para

demonstrarem características morfológicas e eletrofisiológicas semelhantes à cardiomiócitos ventriculares estas células precisam ser mantidas em cultura por pelo menos 70 a 95 dias após diferenciação (Ben-Ari *et al.*, 2016) seguindo o protocolo regular de diferenciação, descrito anteriormente no tópico de manutenção.

A administração de TDI nessas células, método proposto por Birket e colaboradores (2015) aparentemente mudariam as suas características de forma a obter células com perfil mais maduro, semelhantes a cardiomiócitos ventriculares ou atriais. O que obtivemos em nosso estudo foi uma marcante diferença nos parâmetros de área, “aspect ratio” e circularidade em menos de 30 dias após diferenciação, ou seja, muito mais cedo que qualquer protocolo utilizado regularmente na obtenção de iPSC’s-CM’s.

Depois de observadas tais características nas células após o uso de TDI, investigou-se também a influência desses hormônios sobre a organização celular. Para tanto, as células controle e tratadas com TDI, tanto derivadas de pacientes saudáveis (WT) como de pacientes com síndrome do QT-Longo tipo 3 (LQT3), foram fixadas e processadas usando a técnica de imunofluorescência com marcadores cardíaco-específicos e avaliadas por microscopia confocal. Das imagens obtidas, pode-se observar uma surpreendente mudança na organização dos microfilamentos de α -actinina e troponina I (Figura 10, 11, 12 e 13).

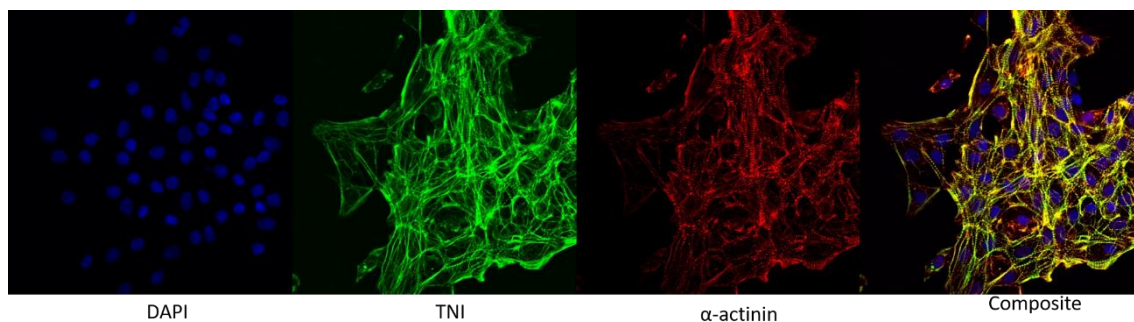


Figura 10 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes saudáveis controle (WT-CTR) com 22 dias após o processo de diferenciação. Foram utilizados marcadores de cardiomiócitos: Troponina I (verde) e alfa actinina (vermelho), ambas expressas nas células WT. Núcleo celular marcado com DAPI (azul).

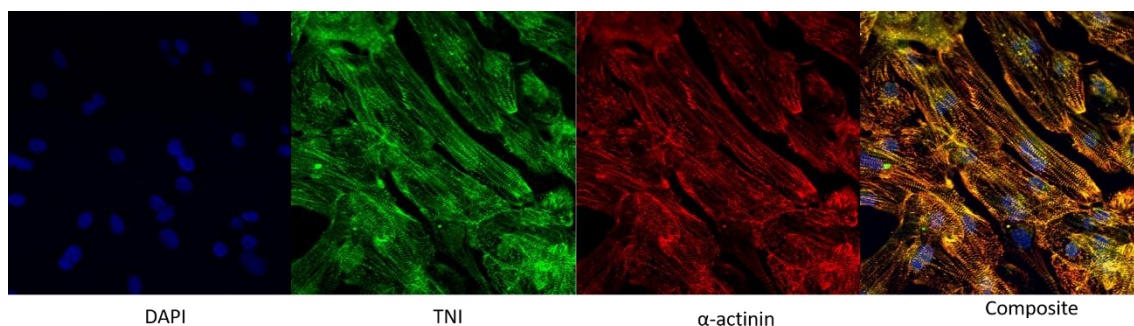


Figura 11 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes saudáveis (WT) com 22 dias após o processo de diferenciação e maturação (TDI). Foram utilizados marcadores de cardiomiócitos: Troponina I (verde) e alfa actinina (vermelho), ambas expressas nas células WT-TDI. Núcleo celular marcado com DAPI (azul).

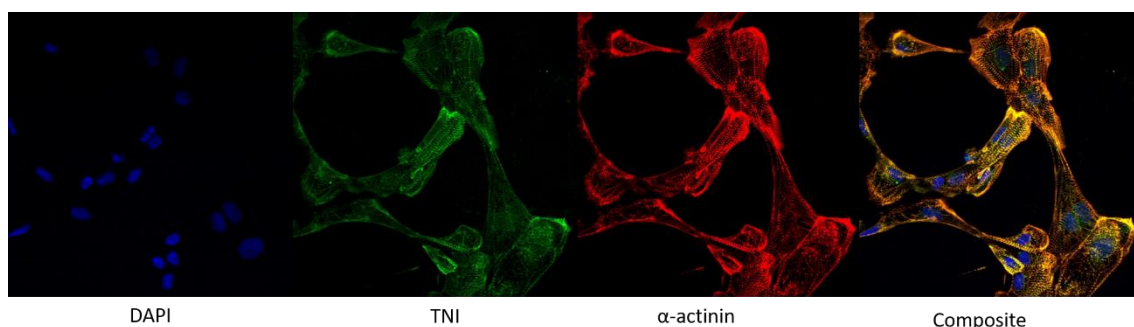


Figura 12 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes com síndrome do QT-longo, subtipo 3(LQT3) com 22 dias após o processo de diferenciação. Foram utilizados marcadores de cardiomiócitos: Troponina I (verde) e alfa actinina (vermelho), ambas expressas nas células LQT3-CTR. Núcleo celular marcado com DAPI (azul).

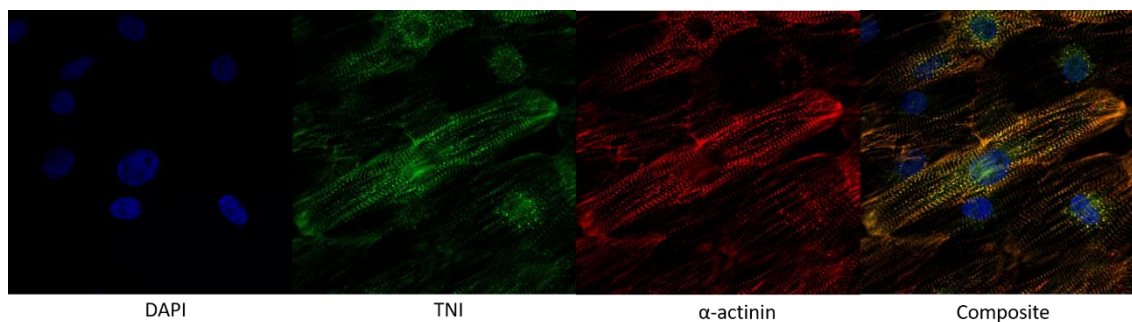


Figura 13 - Imunofluorescência de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's) de pacientes com síndrome do QT-longo, subtipo 3(LQT3) com 22 dias após o processo de diferenciação e maturação (TDI). Foram utilizados marcadores de cardiomiócitos: Troponina I (verde) e alfa actinina (vermelho), ambas expressas nas células LQT3-TDI. Núcleo celular marcado com DAPI (azul).

Esse resultado mostra que o tratamento com TDI não apenas modificou os parâmetros de área, circularidade e aspect ratio, ele também causa uma significativa mudança na organização dos microfilamentos celulares, de tal forma que o fenótipo delas se aproxima ao de um cardiomiócito maduro nativo, evidenciado na figura 11. Como as iPSC's-CM's possuem uma característica funcional imatura o seu uso se torna restrito, pois não reflete com perfeição uma performance de um tecido cardíaco adulto. Portanto, pouco eficiente no estudo da fisiologia ou fisiopatologia de doenças humanas.

Uma das características de imaturidade observada nas iPSC's-CM's assinalada por Ma e colaboradores, 2011 diz respeito ao padrão do sarcômero, que invariavelmente se apresenta desorganizado (Figura 10). Ao calcularmos o tamanho do sarcômero em células saudáveis não foi observado diferença entre as células tratadas (WT-TDI: 1.83 ± 0.2 ; $n = 28$) quando comparadas com as que não receberam o TDI (WT-CTR: 1.84 ± 0.18 ; $n = 56$). Entretanto, houve diferença significativa na amplitude do pico observado no espectro de frequência espacial (WT-Controle: 0.45 ± 0.03 ; $n = 56$, e WT-TDI: $0.62 \pm 0.04 \mu\text{m}$; $n = 28$), o que

pode indicar uma maior organização do sarcômero em células WT-TDI (Figura 14).

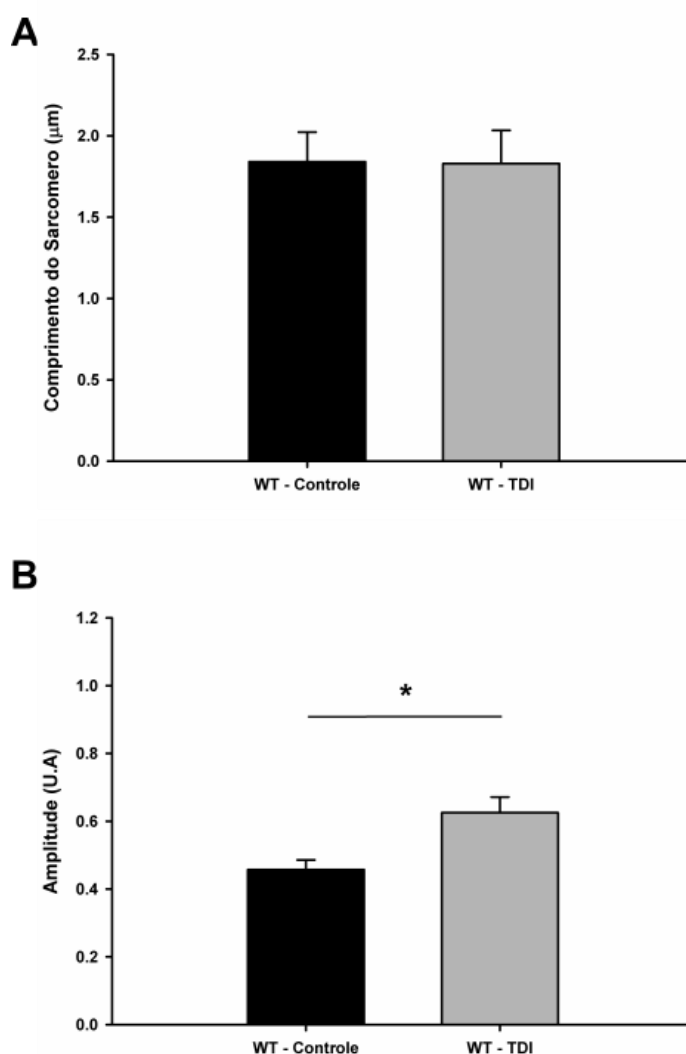


Figura 14 - Comprimento e organização do sarcômero calculados a partir de imagens adquiridas da imunofluorescência de células derivadas de pacientes saudáveis tratadas (WT-TDI) ou não (WT-Controle) com TDI. A – Não foi observada diferença significativa entre os grupos WT-Controle ($1.84 \pm 0.18 \mu\text{m}$; $n = 56$) e WT-TDI ($1.83 \pm 0.2 \mu\text{m}$; $n = 28$). B – A amplitude do pico da frequência espacial encontra-se maior em WT-TDI ($0.62 \pm 0.04 \mu\text{m}$; $n = 28$) em vez do grupo WT-Controle (0.45 ± 0.03 ; $n = 56$). * representa a diferença estatística entre controle e tratado $p < 0.005$, Mann-Whitney.

Além disso, foi averiguado o perfil de expressão de mRNA's de proteínas relacionadas a organização estrutural tais como a α -actinina 2 (ACTN2) e cadeia pesada de miosina isoforma β (MYH7) (Figura 15A, $n=6$, $p < 0,01$). O mais

interessante em relação a MYH7 é que além dessa isoforma ser predominante em cardiomiócito humanos ventriculares adultos (Yang, Pabon, *et al.*, 2014), é essencial para a eficiência na geração de força em cardiomiócitos (Yoshida e Yamanaka, 2017), e ambas estão com a sua expressão aumentada em células TDI, indicando aqui uma tendência de maturidade celular.

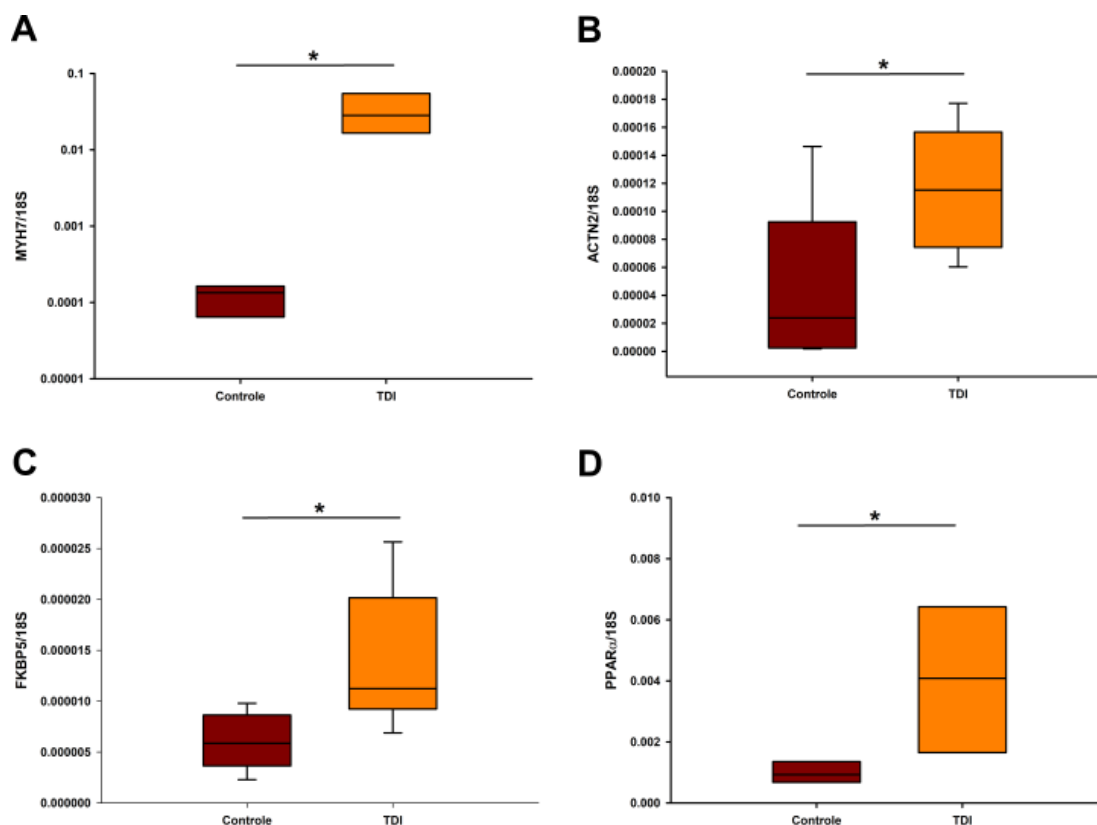


Figura 15 - Expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR: Os níveis de mRNA relacionado as proteínas estruturais α -actinina 2 (ACTN2) e cadeia pesada de miosina (MYH7) em células de iPSC's-CM's advindas de pacientes saudáveis, exibiram diferença significativa após tratamento com TDI. (ambas, $n = 6$, $p < 0,01$). Assim como os níveis de mRNA's para a co-chaperona proteína 51 ligada a FK506 (FKBP5) e os alfa receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α) ($n = 6$, $p < 0,01$), proteínas estas indicativas de uma maior maturidade celular.

Outros mRNA's indicativos de maturidade celular são a co-chaperona proteína 51 ligada a FK506 (FKBP5) e os alfa receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α). No caso de FKBP5 essa proteína é moduladora do receptor de glicorticóide e tem relação com uma maior

maturidade celular (Rog-Zielinska *et al.*, 2015), já o PPAR α é um modulador chave para o metabolismo lipídico, sendo assim ambos são fortes indicadores de maior maturidade celular. Uma vez que estes estão aumentados em células tratadas com TDI, é possível correlacionar com os dados morfológicos obtidos e assim demonstrando maior maturidade celular (Figura 15, $n = 6$, $p < 0,01$).

Portanto, este conjunto de dados indica a aproximação do fenótipo entre as células diferenciadas *in vitro* com as nativas, uma característica almejada para que se possam estudar doenças humanas em sistemas *in vitro* com maior acurácia. Logo, nosso estudo confirma que o TDI é um coquetel hormonal eficiente para promover o amadurecimento de iPSC's-CM's derivadas tanto de pacientes saudáveis, quanto de pacientes acometidos por doenças genéticas que afetam o tecido cardíaco, como uma das mutações que geram a síndrome do QT-Longo tipo 3 aqui usada como exemplificação.

Por outro lado, não se podem desprezar os aspectos fisiológicos dessas células, já que morfologicamente estas se mostram semelhantes a um aspecto mais maduro. Portanto, vale ressaltar aqui a seguinte consideração, as iPSC's-CM's possuem uma característica bastante peculiar aos olhos: contratilidade espontânea, também chamada de batimento espontâneo. O batimento espontâneo ocorre em geral 10 dias após diferenciação, e é utilizado como critério para designar a saúde dessas células. Quando as iPSC's-CM's se diferenciam em ventriculares ou atriais, fenômeno dependente de tempo, essas cessam sua atividade espontânea. Em nosso estudo a parada de contratilidade espontânea não foi observada no 21º ou 22º dia após diferenciação, tanto em células controle, como em células tratadas com TDI. Sendo assim, foi possível

aferir os aspectos do transiente de cálcio apenas com a sua atividade espontânea (Figura 16).

Para tanto, foram utilizadas novamente células derivadas de pacientes saudáveis (WT) e de pacientes com síndrome do QT-Longo tipo 3 (Δ KPQ), o a amplitude do transiente em células WT tratadas com TDI, ($0,31 \pm 0,01$, n=9) é maior que em seu respectivo controle ($0,23 \pm 0,02$, n=10) (Figura 17). Apesar de também apresentarem aumento, a amplitude do transiente nas células Δ KPQ tratadas com TDI ($0,32 \pm 0,01$; n = 9) não diferiu das células controles desse mesmo grupo ($0,25 \pm 0,02$; n = 10) (Figura 17).

Também foi observada uma diminuição no tempo para 50% de decaimento da fluorescência nas células tratadas com TDI, tanto WT (WT-Controle: $853,9 \pm 59$ ms; WT-TDI: $494,14 \pm 37,1$ ms) quanto Δ KPQ (Δ KPQ-Controle: $449,1 \pm 41,3$ ms; Δ KPQ-TDI: $310,5 \pm 39$ ms) (Figura 17). Esse aumento na amplitude e no tempo para o decaimento do transiente de cálcio são indicativos que essas células podem ter maior força de contração e um relaxamento mais eficiente, respectivamente.

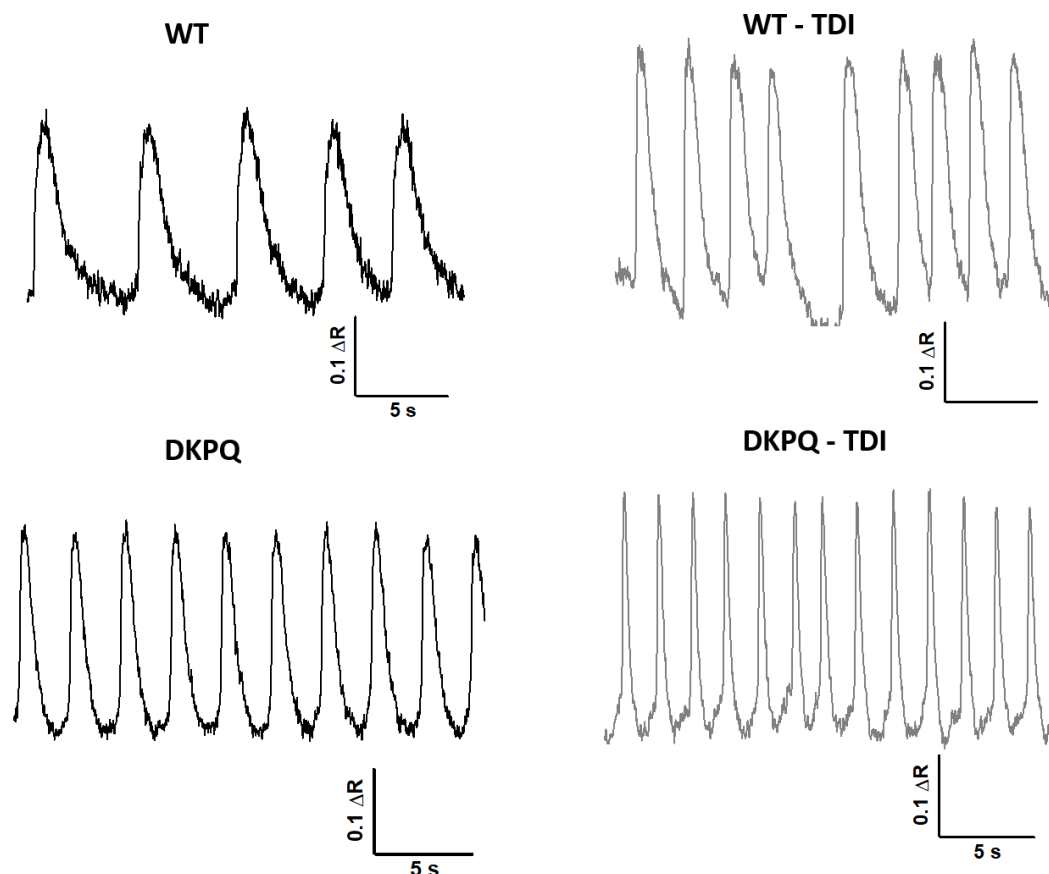


Figura 16 - Traçados representativos do transiente de cálcio em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI. Demonstrando o aumento na amplitude do transiente quando estas são submetidas ao tratamento com TDI e mostrando o efeito do aumento da velocidade de decaimento do transiente.

O que é relevante destacar sobre o aumento na amplitude do transiente pode estar relacionado a um aumento na expressão de proteínas chaves para a liberação de cálcio (RyR e Ca_vL), ou um aumento na carga de cálcio do RS, ou ambos de forma sinérgica. Entretanto quando avaliado a expressão de mRNA para RyR e Ca_vL (Figura 18) não foi observado aumento nas células tratadas com TDI.

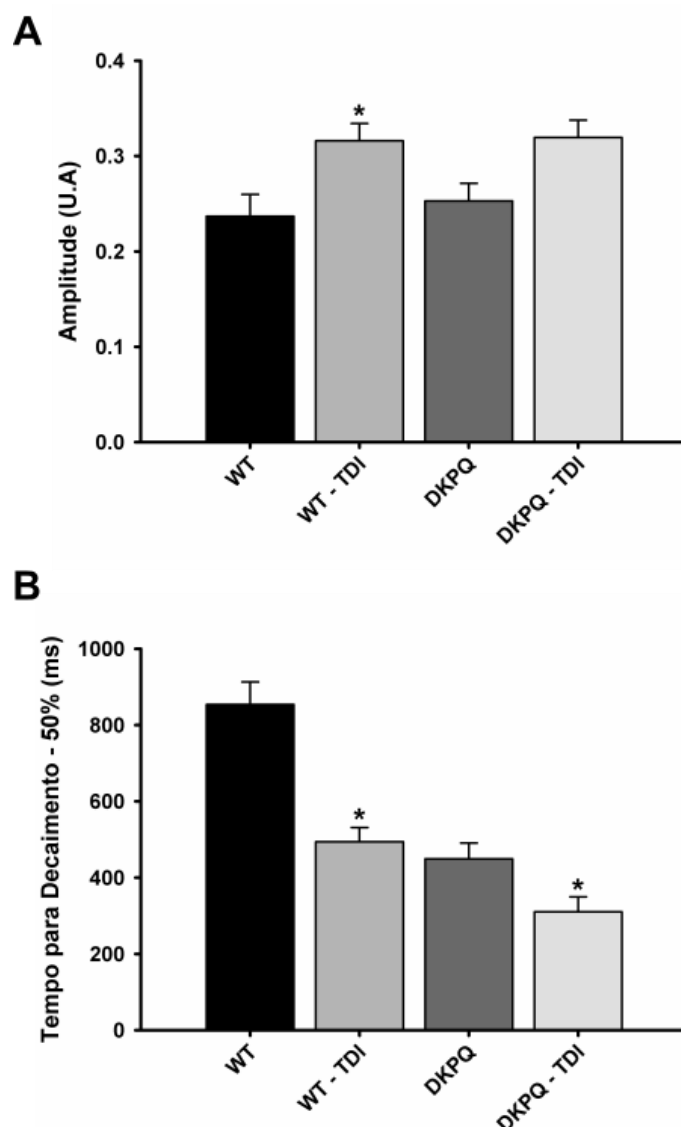


Figura 17 - Valores do transiente de cálcio em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI. Demonstrando que iPSC's-CM's de pacientes saudáveis sem TDI (WT-CTR) possuem um pico de fluorescência menor em relação as tratadas com TDI (WT-TDI) (A), assim como é observada na taxa para 50% de decaimento da fluorescência (B), que é menor em células tratadas com TDI. Em células derivadas de pacientes com síndrome do QT-Longo tipo 3 também é observado uma queda no parâmetro da taxa para 50% de decaimento da fluorescência, porém em relação ao pico da fluorescência não foi constatada diferença estatística entre os valores controle e experimental. * representa a diferença estatística entre controle e tratado $p < 0.005$, Mann-Whitney.

Outro parâmetro observado foi o fenômeno do decaimento do transiente de cálcio (Figura 17B), um aumento na velocidade deste parâmetro é possível por uma mudança na expressão ou atividade de SERCA, fosfolambano do RS e de NCX sarcolemal que são cruciais para um relaxamento eficiente dos

cardiomiócitos. Em nosso estudo pode-se observar que células tratadas com o mix de maturação apresentaram um aumento na expressão de mRNA's de SERCA 2A, a isoforma cardíaca, entretanto, o mRNA para fosfolambano (PLB) e NCX não exibiram diferenças significativas (Figura 18).

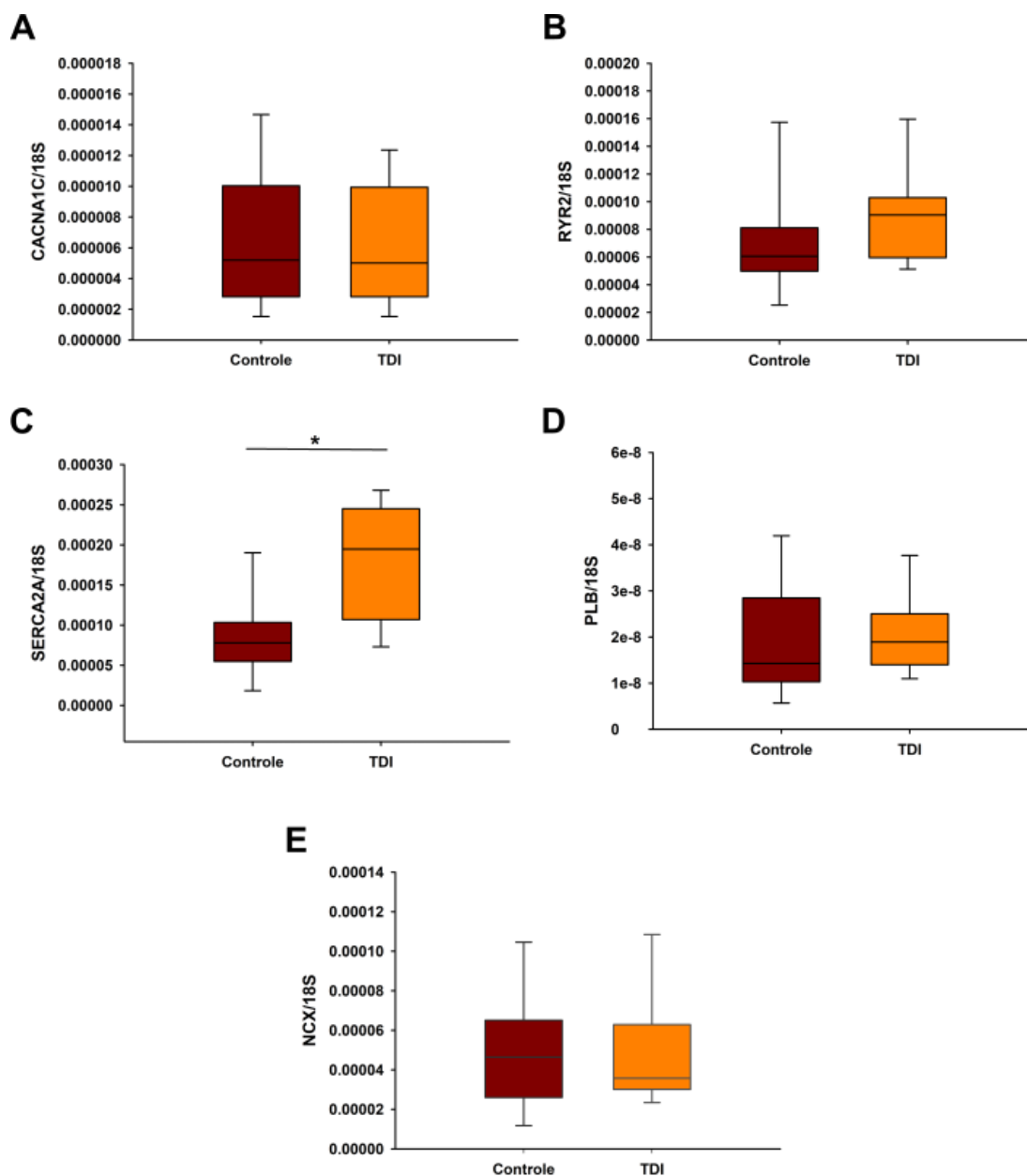


Figura 18 - Expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR: Os níveis da mRNA para proteínas chave para a remoção do cálcio intracelular: SERCA e fosfolamban (PLB) do RS, e de NCX sarcolemal em células de iPSC's-CM's advindas de pacientes saudáveis, apenas SERCA2A exibiu um aumento significativo após tratamento com TDI (n = 12, p < 0,01; Mann-Whitney). Não foram observados um aumento nos níveis de mRNA's para os receptores de rianodina (RYR) e da subunidade alfa dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CACNA1C) (n = 12).

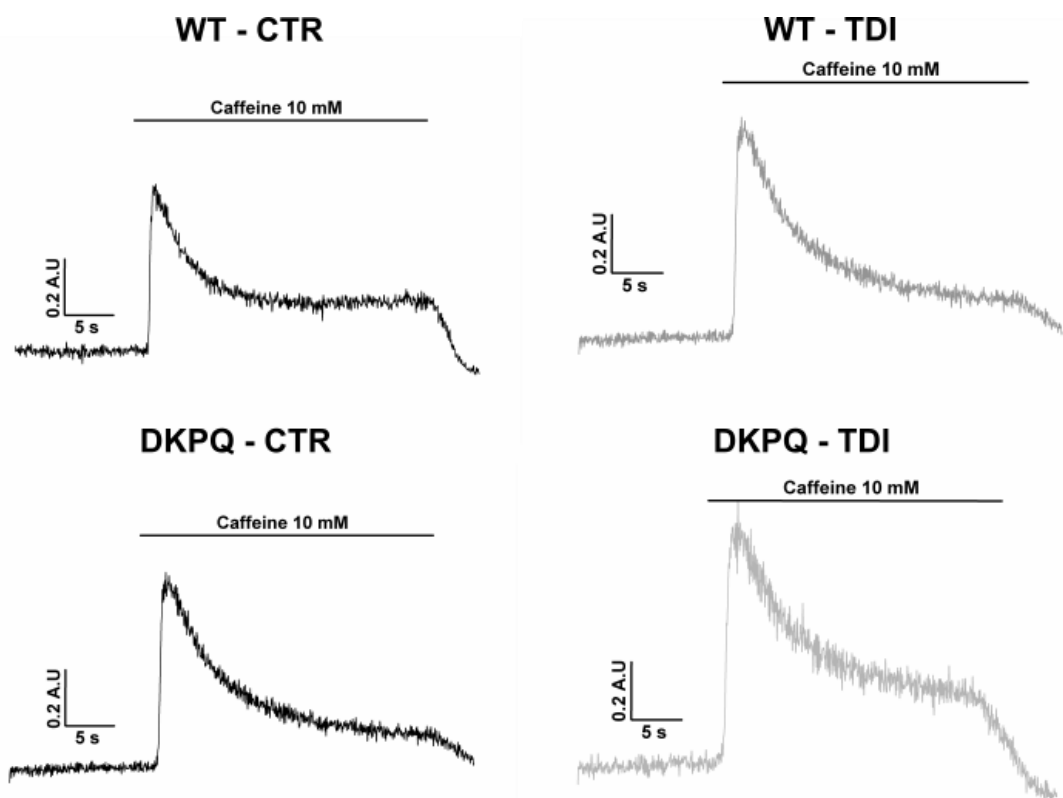


Figura 19 - Traçados representativos do transiente de cálcio induzido por cafeína [10 mM] em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI. As células tratadas com TDI (WT-TDI) possuem um transiente de cálcio induzido por cafeína maior que as células controle (WT-CTR). Em células derivadas de pacientes com síndrome do QT-longo (DKPQ) não foi observada diferença estatística sobre este transiente.

Um aumento na expressão da SERCA, auxilia a explicar o decaimento mais rápido do transiente de cálcio em células com batimento espontâneo tratadas com TDI. Além disso, pode estar associado a uma maior carga de cálcio no RS, que contribui positivamente para o CICR. Para testar se a carga de cálcio do RS estava aumentada nas células tratadas induzimos a liberação massiva de cálcio do RS usando cafeína 10 mM (Figura 19). Nessa série experimental, a amplitude do transiente induzido por cafeína foi significativamente maior (WT-CTR: 0.46 ± 0.03 n = 15 vs WT-TDI: 0.62 ± 0.03 ; n = 17) quando tratadas com TDI (Figura 20), sendo assim, esses dados suportam a hipótese de que TDI pode

ter promovido um aumento na liberação de cálcio nas iPSC's-CM's por um aumento na carga de cálcio do RS.

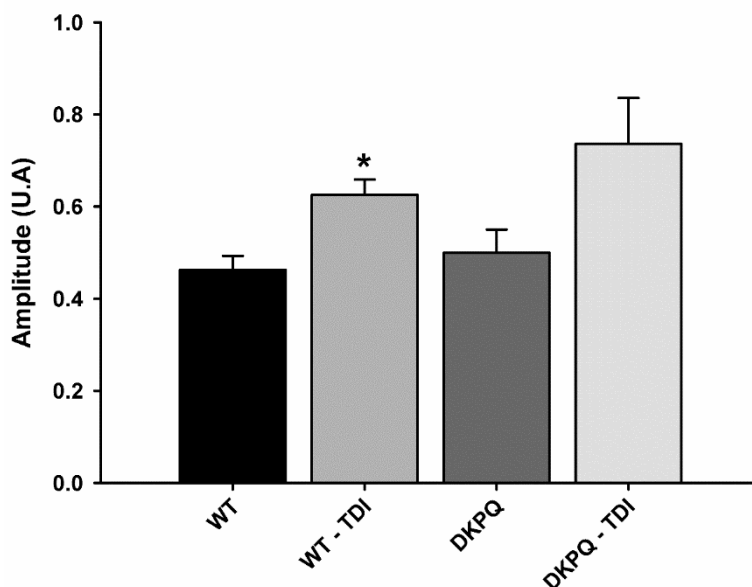


Figura 20 – Amplitude do transiente de cálcio induzido por cafeína [10 mM] em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) e com síndrome do QT-longo (DKPQ), tratadas ou não com TDI. As células tratadas com TDI (WT-TDI) de pacientes saudáveis possuem um transiente de cálcio induzido por cafeína maior que as células controle (WT-CTR) (WT-CTR: 0.46 ± 0.03 n = 15 vs WT-TDI: 0.62 ± 0.03 ; n = 17). O que não foi observado em células derivadas de pacientes com síndrome do QT-longo (DKPQ) (DKPQ-CTR: 0.5 ± 0.05 ; n = 7 vs DKPQ-TDI: 0.72 ± 0.1 ; n = 8). * indica diferença estatística entre controle e tratado com $p < 0.001$, teste T de Student.

Outras proteínas cinases são importantes moduladores do CICR, tais como a proteína cinase A (PKA) e proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina 2 (CAMKII). Em nosso estudo a expressão de mRNA para essas cinases não apresentaram diferenças em células tratadas com TDI (Figura 21), deixando a forte impressão de que o aumento na velocidade do decaimento do transiente de cálcio deve ser principalmente devido a uma maior expressão de SERCA.

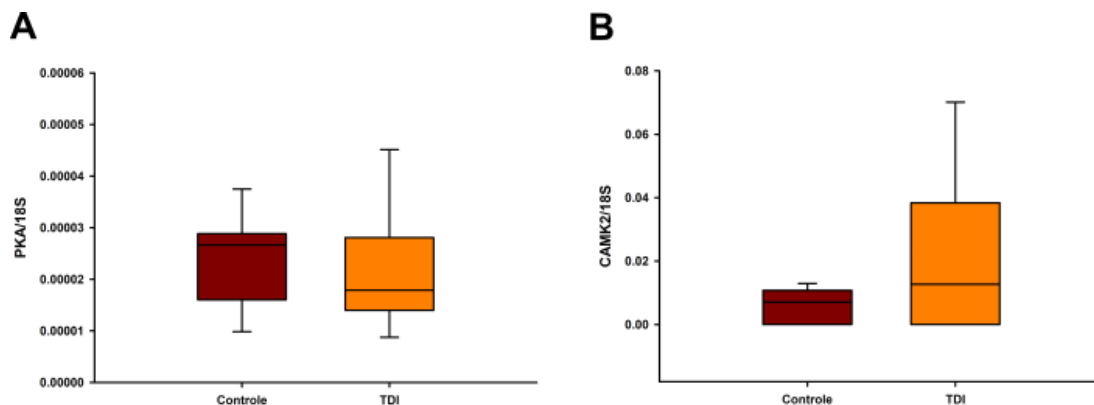


Figura 21 - Níveis de expressão de mRNA através da técnica de qRT-PCR para proteínas cinases importantes para o CICR: Os níveis da expressão para proteína cinase A (PKA) e proteína cinase tipo 2 dependente de cálcio/ calmodulina (CAMKII) não sofreram aumento significativo quando as iPSC's-CM's de pacientes saudáveis eram tratadas com TDI.

Outra limitação do uso de iPSC's-CM's ligado a imaturidade é a eletrofisiologia dessas células. Sendo assim, foi efetuado o estudo do potencial de ação celular, onde as células estudadas, até então células WT com batimento espontâneo com e sem tratamento com TDI, utilizando a técnica de mapeamento ótico ou “optical mapping”. Foi observado que o tempo para repolarização do PA em 80% de células tratadas foi mais prolongado que em células não tratadas (Figura 22 e 23B), isso se aplica tanto em células com frequência de batimento espontâneo abaixo de 0.5 Hz (Controle: 242.29 ± 13.38 ms, vs TDI: 326.73 ± 15.5 ms) como em 1 (Controle: 248.64 ± 18.5 ms, vs TDI: 299.40 ± 13.9 ms) e acima de 1 Hz (Controle: 183.28 ± 10.9 ms, vs TDI: 226.49 ± 19.2 ms), indicando que esses potenciais de ação são mais próximos de células maduras (Mummery *et al.*, 2003).

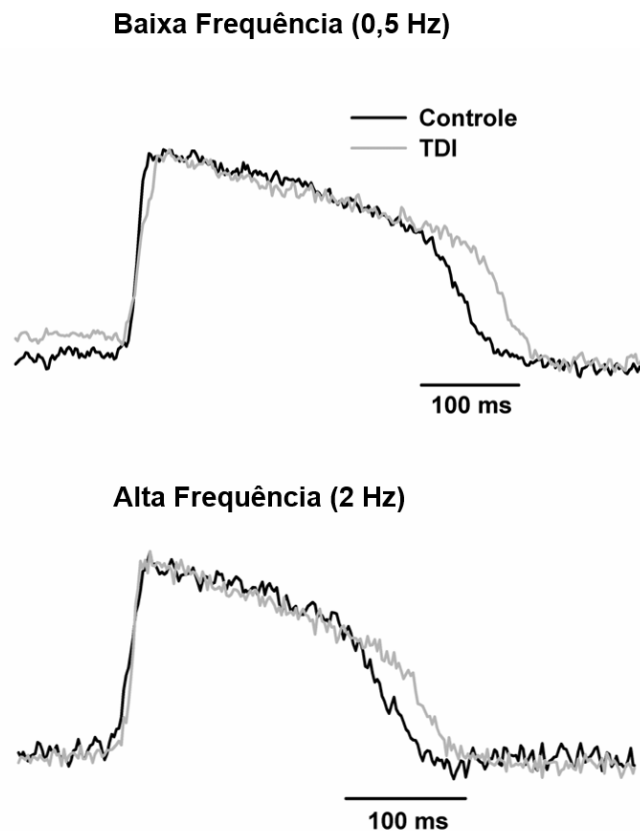


Figura 22 - Traçados representativos do PA espontâneo através da técnica de mapeamento ótico em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) tratadas ou não com TDI. As células tratadas com TDI (WT-TDI) tanto com alta quanto com baixa frequência de batimento possuem uma repolarização mais prolongada que em células não tratadas.

Em relação ao tempo para repolarização do PA em 30% (Figura 23A) apenas nas células com batimento espontâneo acima de 1 Hz apresentam diferenças marcantes (Controle: 99.38 ± 7.04 ms, vs TDI: 129.07 ± 12.3 ms), em que células não tratadas possuem valores mais baixos que os observados com de menor frequência e células tratadas com TDI possuem uma duração mais prolongada. Cada um desses parâmetros indica que as células submetidas ao

tratamento com TDI possuem um perfil eletrofisiológico mais maduro que os normalmente encontrados quando se utiliza o método descrito para o controle.

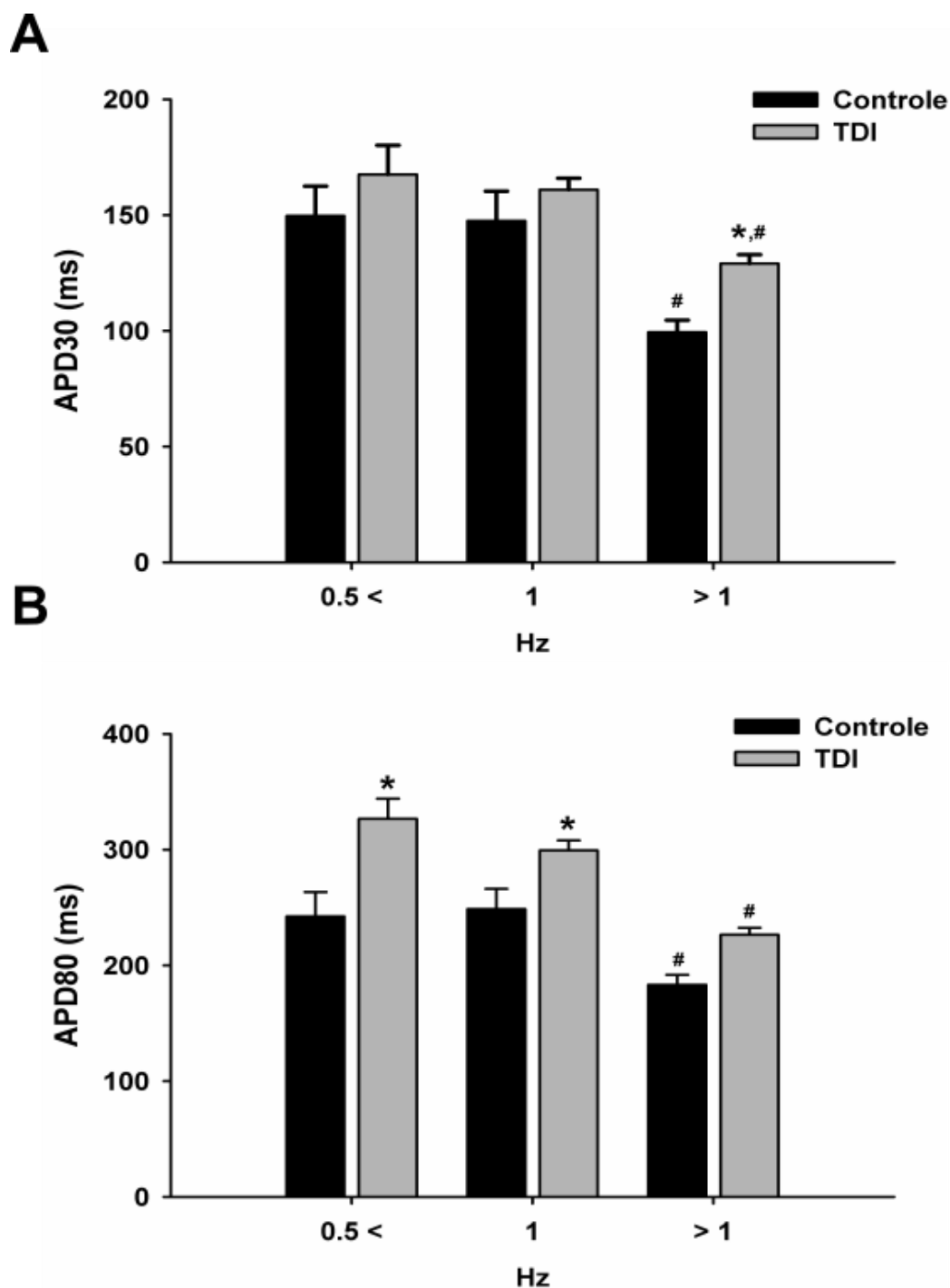


Figura 23 - Dados do PA espontâneo através da técnica de mapeamento ótico em iPSC's-CM's derivadas de pacientes saudáveis (WT) tratadas ou não com TDI. As células tratadas com TDI (WT-TDI) possuem um tempo para repolarização do PA em 30% mais prolongado quando a frequência de estimulação é acima de 1Hz (Controle: 99.38 ± 7.04 vs TDI: 129.07 ± 12.3 ms). Em relação ao tempo para repolarização de PA em 80% as células tratadas com TDI (TDI) é mais prolongado tanto em células com frequência espontânea abaixo de 0.5 Hz (Controle: 242.29 ± 13.38 ms, vs TDI: 326.73 ± 15.5 ms), como em 1 Hz (Controle: 248.64 ± 18.5 ms, vs TDI: 299.40 ± 13.9 ms) e frequências acima de 1 Hz (Controle: 183.28 ± 10.9 ms, vs TDI: 226.49 ± 19.2 ms). * indica diferença significativa entre controle e TDI, # indica diferença estatística entre controle >1 Hz e controle < 0.5 Hz, ambos com $p < 0.05$, Two-way Anova com HolmSidak como pós-teste.

Nosso grupo buscou ainda observar se microtecidos cardíacos construídos com iPSC's-CM's tratadas com TDI manteriam a sua morfologia e qual seria o efeito na função contrátil de células em condições de co-cultura 3D. Através das micrografias observadas na Figura 24, foi possível observar uma maior compactação na formação de CMT's advindas de células tratadas com TDI. Ademais, o deslocamento das hastes flexíveis de PDMS (micropilares), as quais a CMT's foram montadas, eram monitorados, quando as CMT's realizavam uma contração espontânea foi possível observar um pronunciado deslocamento dos micropilares em células tratadas com TDI em comparação com células controle.

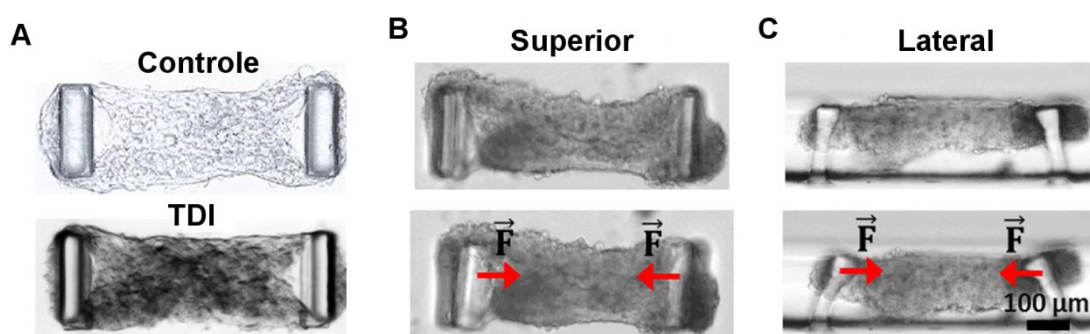


Figura 24 - Micrografia de microtecidos cardíacos (CMTs) não tratadas (Controle) e tratadas com TDI (TDI), demonstrando o aumento na compactação das células ao formar as CMTs. (B e C) Morfologia dos CMTs durante a contração espontânea, em uma visão superior (B) e lateral (C). Pode-se observar um pronunciado deslocamento dos micropilares no tecido tratado com TDI (Painel Inferior) quando comparado com o tecido não-tratado (Painel Superior).

Após a montagem das CMT's, os microtecidos foram submetidos a técnica de imunofluorescência, onde as iPSC's-CM's foram marcadas com um anticorpo anti troponina I cardíaca (cTnI). Esta marcação auxilia na avaliação qualitativa celular em relação a sua disposição no microtecido cardíaco (Figura 25). As CMT's apresentaram uma morfologia mais alongada e alinhada ao longo

do comprimento do microtecido, um maior alinhamento pode promover uma maior eficiência na função contrátil do tecido, característica esta observada em tecidos mais maduros.

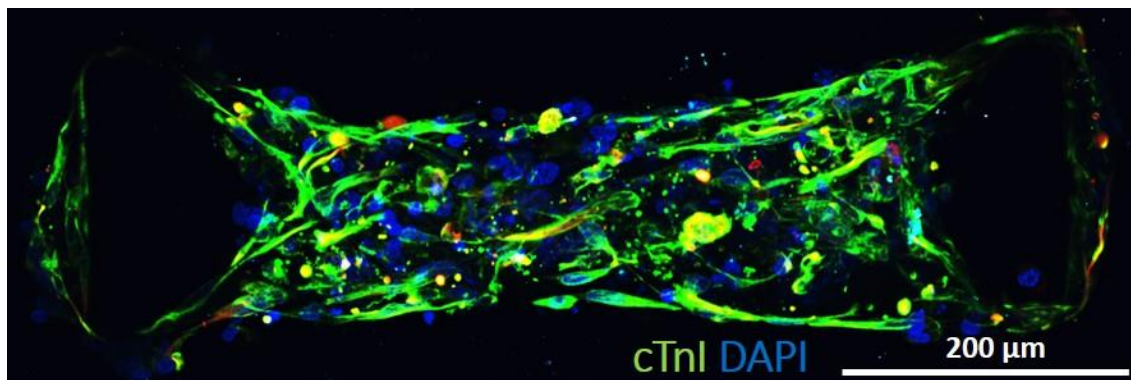


Figura 25 - Visão superior de imagem da imunofluorescência de microtecidos (CMT's). As CMT's foram construídos com cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC's-CM's), fibroblastos cardíacos e células endoteliais humanas de pacientes saudáveis após tratamento com TDI 22 dias após o processo de diferenciação. Foram utilizados marcadores de cardiomiócito: Troponina I (verde) e de núcleo celular DAPI (azul).

Outros fatores avaliados foram aqueles em relação a força de contração, como nos dados feitos em células tratadas com TDI havia um indício de uma maior maturidade celular, e um forte indicativo no melhoramento da força contrátil, foi testada a hipótese de que CMT's construídas com iPSC's-CM's tratadas com TDI gerariam um microtecido com maior capacidade na geração de força contrátil. O que foi averiguado foi tanto um aumento na força estática (Controle $1.6 \mu\text{N} \pm 0.15$ vs TDI $6.67 \pm 1.08 \mu\text{N}$), como na força dinâmica de contração das CMT's quando tratadas com TDI (Controle $2\mu\text{N} \pm 0.2$ vs TDI $3.6 \pm 0.25 \mu\text{N}$) (Figura 26). Além disso, a frequência de contrações espontâneas aumentou, provando que microtecidos contruídos com iPSC's-CM's tratadas com TDI geram mais força de contração que os não tratados (Figura 26). Com isso esses dados reforçam mais uma vez que este novo método de maturação

tem um enorme potencial em gerar iPSC's-CM's mais maduras e indica que estas possuem características mais semelhantes a um tecido nativo.

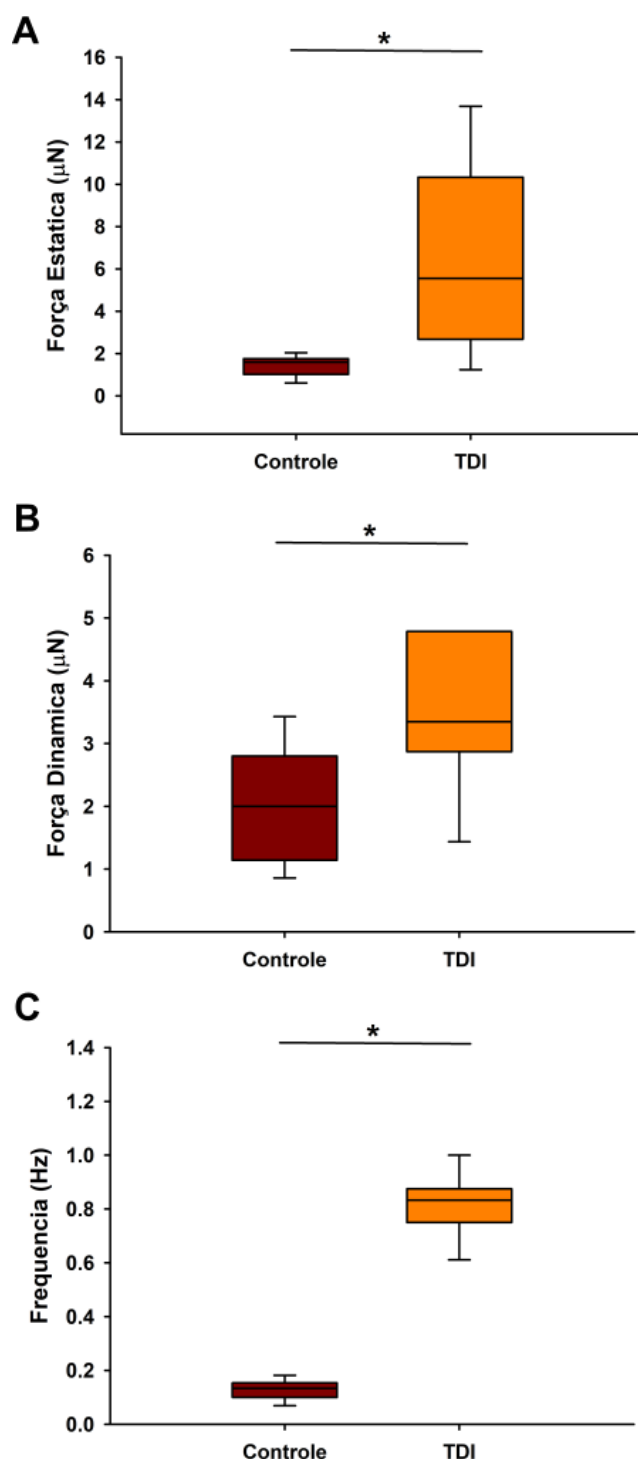


Figura 26 – Propriedade contrátil das CMT's tratadas ou não com TDI. (A) CMTs tratadas com TDI mostram um aumento na força estática (Controle: 1.6 uN vs TDI: 6.67 uN); (B) e também da força dinâmica (Controle: 2uN vs TDI: 3.6 uN (C) Frequência de contrações espontâneas para CMTs não-tratadas (Controle) vs. CMTs tratadas com TDI (Controle 0.13 Hz vs TDI 0.88 Hz), onde a frequência é maior quando tratadas com TDI n=20. * p < 0.001.

6 Discussão

O estudo de doenças cardíacas que acometem o ser humano sempre foi algo perseguido pelo campo da pesquisa, porém, por causa de questões éticas e técnicas, as chances de se obter cardiomiócitos humanos para pesquisa sempre foram bastante escassas, e quando era possível o que se obtinha eram células já bastante comprometidos, portanto já haviam passado por algum tipo de remodelamento dificultando qualquer comparativo entre causa e efeito patológico.

Com isso, muitas vezes a solução foi utilizar animais que tivessem características mais próximas do ser humano, e apesar de não ser o ideal foi possível estudar as características fisiológicas e patológicas de vários órgãos e sistemas, incluindo o coração, e permitiu incríveis avanços na ciência básica e na clínica.

Quando Yamanaka (2006) demonstrou ser possível produzir qualquer tipo celular humano a partir de células somáticas humanas, as iPSC's, isto levou a pesquisa a um outro nível, colocou-se à disposição modelos celulares que refletiam com mais proximidade a condição humana, não apenas isso, modelos que refletiam as condições individuais de pacientes acometidos por doenças genéticas específicas, permitindo geração de modelos poderosos para o melhor entendimento da patologia e uma triagem de drogas de forma personalizada.

Como foi apontado anteriormente, as iPSC's foram submetidas a vários tratamentos para que fossem diferenciadas em cardiomiócitos e hoje se consegue uma taxa de sucesso de 80-90% de cardiomiócitos diferenciados em

cultura (Burrige *et al.*, 2011). Porém a maior parte desses métodos ainda enfrentam um desafio crucial, o estado de maturação.

O desenvolvimento dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento embrionário é finamente regulado através de sinais e moléculas repressoras e indutoras, além disso o tempo em que esses sinais são disparados ou inibidos são cruciais na hora da diferenciação (Brade *et al.*, 2013). O que os métodos atuais tentam é mimetizar as condições embrionárias de forma que se possa obter os cardiomiócitos com a maior taxa de sucesso possível, fácil reprodutibilidade, rápido e economicamente viável.

Entretanto, as populações desses cardiomiócitos são amplamente variada, com características morfológicas, organizacionais e funcionais imaturas (Ma *et al.*, 2011; Doss *et al.*, 2012; Hazeltine *et al.*, 2012; Yang, Pabon, *et al.*, 2014; Veerman *et al.*, 2015; Ben-Ari *et al.*, 2016). Entretanto, em meio a tantas tentativas, Birket e colaboradores (2015) desenvolveram um método inovador que com apenas adição de três hormônios (T3, IGF-1 e dexametasona) na composição do meio de cultura induz os cardiomiócitos com metabolismo energético mais ativo, melhor morfologia e capacidade de gerar tensão.

Lançando mão desse método inovador, pudemos observar que células derivadas de pacientes saudáveis (WT) tratadas (TDI) com o mix de maturação apresentaram uma melhora na morfologia, obtendo células mais alongadas e de maior tamanho, haja visto os dados de área, circularidade e “aspect ratio”. Não apenas isso, as células exibiam essas características com apenas 21 ou 22 dias após diferenciação, algo que apenas era possível com cerca de 70 dias ou mais

após diferenciação (Ben-Ari *et al.*, 2016), ou seja, muito mais cedo que qualquer protocolo utilizado para gerar iPSC's-CM's.

Além dessa observação morfológica, foram demonstradas que essas células submetidas ao tratamento com TDI possuíam uma melhor organização dos microfilamentos observados pela marcação utilizando α -actinina além de um aumento nos níveis de mRNA para esta proteína. O que é tipicamente relatado na literatura é a imaturidade nas proteínas de citoesqueleto (sarcômero), principalmente em iPSC's-CM's jovens (Yang, Pabon, *et al.*, 2014) exibindo formatos irregulares e sem alinhamento em culturas 2D (Zhang *et al.*, 2009). Geralmente para monitorar a capacidade de contração celular se avalia o estado das proteínas do sarcômero, uma vez que o sarcômero é a unidade fundamental da contração cardíaca.

Ao observarmos as imagens obtidas usando a técnica de imunofluorescência ficou claro que o tratamento ministrado com TDI induz as iPSC's-CM's a um padrão bem mais condizente com o encontrado em cardiomiócito adulto, com células mais alongadas e com uma tendência maior de alinhamento em culturas 2D que as não tratadas (CTR). O mais surpreendente é que esse tratamento também se mostrou efetivo mesmo em células derivadas de pacientes com síndrome do QT-Longo tipo 3, pois pode-se observar uma melhor organização do sarcômero dessas células e também um melhor alinhamento entre as mesmas.

Outro fator importante que verificamos em nosso estudo foi o aumento na expressão de mRNA para MYH7, gene que codifica a cadeia pesada da miosina, mais precisamente da sua isoforma β (MHC- β). Miócitos ventriculares de

humanos no seu estágio fetal apresentam baixa expressão dessa isoforma e tem elevada expressão da isoforma α . Após o nascimento, os níveis da expressão da isoforma β aumenta ao passo que ocorre uma redução da isoforma α (Xu *et al.*, 2009). De forma semelhante em iPSC's-CM's, a MHC- β funciona como um marcador importante para maturidade já que quando imaturas, essas células apresentam baixa expressão desta isoforma e ao longo do processo de maturação a sua expressão aumenta (Yang, Rodriguez, *et al.*, 2014). Em nosso estudo verificamos um aumento na expressão mRNA para essa isoforma em células tratadas com TDI, isso corrobora com os dados obtidos sobre a morfologia celular e reforçam a ideia que o TDI acelere o processo de maturação nessas células.

O metabolismo dos miócitos cardíacos adultos é suprido principalmente pela oxidação de ácidos graxos, exceto no estado fetal, ou estados patológicos tais como a insuficiência cardíaca, onde a fonte de energia primaria advém da glicólise (Kim *et al.*, 2013). O que se obtém após o uso do protocolo regular de diferenciação das iPSC's-CM's são células com um metabolismo deficitário e dependente majoritariamente da glicólise, o que se remete a uma característica fetal. Em nosso estudo, o tratamento com TDI aumentou a expressão mRNA para PPAR α , este é um amplo mediador na troca da preferência energética de glicose para ácidos graxos que acontece da fase fetal para a pós-natal (Duncan e Finck, 2008; Lopaschuk e Jaswal, 2010). Em concordância com o observado anteriormente, onde o tratamento com TDI promove uma melhora no metabolismo energético de iPSC's-CM's (Birket *et al.*, 2015). Essa potencial melhora no perfil metabólico dá suporte adicional a hipótese do nosso trabalho.

Um aspecto de extrema importância no funcionamento de cardiomiócitos é o acoplamento-excitação contração. Primeiramente, as iPSC's-CM's jovens geralmente possuem uma maquinaria de manejo Ca^{+2} desorganizada e inapta carecendo de um RS funcional e assim com baixa capacidade de estocar Ca^{+2} . Isso ocasiona numa contração celular que depende primariamente do Ca^{+2} transsarcolemal (Yang, Pabon, *et al.*, 2014). A sua incapacidade de manejo de cálcio intracelular é majoritariamente atribuída pelo seu perfil de expressão de proteínas reguladoras do RS, como SERCA e PLB, e por serem baixos refletem numa baixa concentração de Ca^{+2} dos estoques do RS, e a sua insensibilidade a drogas que interferem na liberação ou recaptção de Ca^{+2} .

Além disso, foi demonstrado a falta de homogeneidade das propriedades temporais do transiente de cálcio ao longo do comprimento de hiPSC's-CM's, contribuindo para uma maior imaturidade no manejo de cálcio intracelular (Dolnikov *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011). Essa imaturidade é evidente mesmo quando comparando as características do manejo de cálcio das hiPSC's-CM's com cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias (hESC-CM's) (Dolnikov *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011).

Nos experimentos conduzidos de transiente de cálcio com atividade espontânea foi possível observar um aumento na amplitude e no tempo para 50% do decaimento da fluorescência nas células que foram expostas ao TDI. O aumento na amplitude de cálcio pode ser devido a um aumento da carga de cálcio do retículo, ou pelo aumento da expressão ou atividade da proteína que libera o cálcio do RS, RyR, ou dos canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L específicos de cardiomiócitos (Ca_v 1.2). No nosso estudo, não

observamos mudanças nos níveis de mRNA de Cav1.2 e RyR, o que não exclui a possibilidade de aumento na atividade ou expressão proteica desses canais.

A respeito do decaimento do transiente de cálcio, a maior rapidez do decaimento observado nas células tratadas com TDI pode ser devido: 1) A um aumento na atividade ou expressão da SERCA; 2) Mudança da expressão das proteínas reguladoras da SERCA tais como PLB e proteínas cinases como a PKA e CaMKII; 3) Mudanças na atividade ou expressão do NCX. Sabendo-se que a SERCA é a principal proteína responsável pela recaptação do Ca^{+2} pelo RS, alterar a sua expressão ou atividade ocasiona num aumento na velocidade da recaptação e nos estoques Ca^{+2} (Bers, 2008). Porém uma mudança na expressão de PLB pode alterar a disponibilidade da bomba acarretando em uma mudança direta na velocidade da recaptação de Ca^{+2} (Bers, 2008). De forma semelhante as cinases PKA e CaMKII tem papel modulador do CICR, pois afetam diversos alvos importante para esse fenômeno, inclusive a atividade da SERCA. A fosforilação da PLB por essas cinases alivia a inibição da mesma sobre a SERCA, o que permite uma recaptação mais rápida, o que acelera o relaxamento, e aumenta a carga de Ca^{+2} do RS, que promove uma maior liberação na sístole subsequente (Bers, D. M., 2002). O aumento da expressão de NCX também pode acarretar um aumento da velocidade do decaimento de Ca^{+2} citoplasmático pela extrusão desse íon para o meio extracelular (Bers, D. M., 2002).

Embora se saiba que essas proteínas desempenham o papel principal sobre o decaimento da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ em cardiomiócitos adultos, em nosso trabalho não observamos alterações na expressão de mRNA para PLB, PKA, CaMKII ou NCX. Contudo, foi observado um aumento significativo nos níveis de mRNA para

SERCA. Isso dá suporte ao que foi observado no decaimento do transiente de Ca^{+2} nas iPSC's-CM's tratadas com TDI. Ademais, esse aumento na expressão da SERCA pode ocasionar um possível aumento nos estoques do RS nessas células. Para testar essa hipótese, foram executados experimentos de liberação da carga máxima do RS induzida por cafeína, neles nós comprovamos que células tratadas com TDI possuem uma maior carga de cálcio do retículo que em iPSC's-CM's controle. Ou seja, para cada contração há uma maior disponibilidade de Ca^{+2} para ser liberado e assim se ligar aos miofilamentos, conseqüentemente gerando mais interações actina – miosina, o que resulta numa maior eficiência do AEC e por fim contribuiria positivamente para geração de força.

Essa recaptação mais eficiente do cálcio observado com o tratamento com TDI também foi observado em estudos anteriores que tinham como objetivo melhorar o nível de maturação de iPSC's-CM's. Quando iPSC's-CM's foram tratadas com T3, estas células apresentavam decaimento mais rápido do transiente cálcio sem alteração da amplitude do mesmo (Yang, Rodriguez, *et al.*, 2014). Já quando foi utilizado uma camada expressa de substrato (Matrigel), também fora constatado um rápido decaimento do transiente quando comparado com células em condições normais de cultura (Feaster *et al.*, 2015). Já em estudos que utilizaram microRNA's para maturação de hESC-CM's, foi observado que o uso do miR1 causa um aumento na amplitude do transiente de cálcio e expressão de mRNA para RYR2, sem mudança no mRNA para SERCA2A (Fu *et al.*, 2011). Enquanto a superexpressão em iPSC's-CM's dos microRNA's da família "let 7" promovem maturação celular que inclui um

aumento na expressão de mRNA da SERCA2A e RYR2 (Kuppusamy *et al.*, 2015).

Um outro aspecto bastante criticado no uso de iPSC's-CM's é a sua eletrofisiologia, que possui características mais parecidas com células fetais. Os potenciais de ação dessas células apresentam potencial de repouso relativamente despolarizado, muito provavelmente por terem uma pequena densidade de retificadores de entrada (I_{K1}) e uma robusta corrente de entrada ativada por hiperpolarização ou corrente "funny" (I_f) (Ma *et al.*, 2011), dando assim ao potencial de ação uma característica mais parecida com o de uma célula do nó sinusal. Entretanto, o potencial de ação muda conforme as células envelhecem em cultura adquirindo propriedades mais próximas de células atriais ou ventriculares (Ben-Ari *et al.*, 2016). Entretanto, o que é observado nos protocolos de obtenção de iPSC's-CM's são PA's de características variáveis, evidenciando uma população celular mista.

Os protocolos para induzir maturação vêm tentando obter células com perfil eletrofisiológico mais robusto já que esses aspectos são de extrema relevância por iniciar e modular o processo de AEC. Nossos dados mostraram um prolongamento do PA em células tratadas com TDI, entretanto não se pode afirmar com precisão se isso é devido a uma diferenciação mais especializada, ou seja, se essas células são mais ventriculares.

Porém, essa alteração no PA pode ser indicativa de maturidade já que PA's fetais tem duração mais curta que adulta (Mummery *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2013). Dado semelhante foi observado no trabalho anterior usando TDI em condições de cultura diferentes (Birket *et al.*, 2015) e quando superexpresso o

microRNA “let 7” em iPSC’s-CM’s (Kuppusamy *et al.*, 2015). Já em hESC-CM’s foi observado que é possível melhorar as características eletrofisiológicas usando estimulação elétrica crônica, que prolonga o PA com concomitante aumento na densidade de I_{K1} (Nunes *et al.*, 2012).

Ao observarmos os resultados do transiente de cálcio também pode explicar uma mudança na geração da força observado anteriormente por essas células após o tratamento com TDI (Birket *et al.*, 2015). Demonstrando que o uso do TDI pode ser uma ferramenta para otimizar não só tempo, como também a fisiologia das células humanas pluripotentes induzidas. Entretanto, um dos grandes desafios e promessas da terapia de células tronco é o tratamento de doenças que acometem o coração, dentre elas a insuficiência cardíaca (Huang *et al.*, 2016). O que tem sido relatado são técnicas baseadas na injeção de células tronco, que não possuem uma grande taxa de sucesso, seja por baixa taxa de sobrevivência celular após injeção (39% após 1 hora de injeção), seja por baixa integração de função ou enxertia (Huang *et al.*, 2016). Novas estratégias têm surgido para superar essas dificuldades sendo uma delas a engenharia de tecidos, onde tecidos funcionais são fabricados *in vitro* antes da sua enxertia, que demonstrou ser particularmente eficiente quando implantadas em ratos com infarto no miocárdio (Zimmermann *et al.*, 2006), o que recapitula ao nosso estudo com CMT’s.

A geração de força está diretamente ligada com a maturidade celular como tem sido debatido ao longo deste trabalho. As iPSC’s-CM’s quando jovens apresentam baixa capacidade de gerar força. Isso se relaciona ao seu subdesenvolvido citoesqueleto, RS e tamanho celular. O aumento da contratilidade celular é o objetivo primário independentemente do método

empregado para maturação dessas células. De fato, procedimentos para o aumento da maturidade celular em iPSC's-CM's tais como o uso de Matrigel[®], microRNAs e a suplementação de T3 causam um aumento na geração de força (Yang, Rodriguez, *et al.*, 2014; Feaster *et al.*, 2015; Kuppusamy *et al.*, 2015).

De forma similar, aqui descrevemos uma melhor organização do citoesqueleto em conjunto com maior capacidade de manejo do Ca⁺² tornariam as células tratadas com TDI fortes candidatas na geração de tecidos com maior geração de força. Aqui demonstramos que quando essas células tratadas eram utilizadas na confecção de microtecidos cardíacos 3D houve um aumento na geração de força do tecido como um todo (maior força ativa e passiva), disponibilizando tecidos com maiores chances de integração funcional após sua enxertia em coração de pacientes que sofreram infarto no miocárdio, por exemplo.

Como foi comprovado pelo nosso grupo (Ong *et al.*, 2017) com experimentos de tecidos 3D construídos por meio de uma bioprinter, ou impressora 3D, é possível utilizar iPSC's-CM's na construção de tecidos mesmo sem auxílio de biomateriais. Usando esta técnica gerou-se um tecido com condução elétrica uniforme e uma formação rudimentar de veias quando implantados em coração de ratos. Aliando essa modalidade inovadora de construção de tecidos 3D com o que foi demonstrado ao longo desse trabalho, onde a exposição de iPSC's-CM's ao TDI aumenta sua capacidade contrátil, nos dá uma perspectiva futura palpável onde é possível a fabricação tecidos com função aprimorada e com maior chance de integração ao miocárdio após a enxertia.

7 Conclusão

Portanto, nosso trabalho demonstra que o uso de hormônios, especificamente o T3, IGF-1 e dexametasona, no meio de cultura se provou um simples e robusto método de maturação, gerando iPSC's-CM's mais alongadas e com citoesqueleto mais organizado, assim como células com aprimorado manejo de Ca^{+2} intracelular e com características eletrofisiológicas mais semelhantes a um perfil mais maduro.

Não apenas isso, mas também mostramos a aplicabilidade das mesmas na formação de microtecidos, gerando CMT's com maior força de contração e assim, disponibilizando tecidos com maiores chances de integração funcional após sua enxertia. Esses resultados em conjunto lançam a promessa de driblar uma das maiores dificuldades após o desenvolvimento de cardiomiócitos derivados de células pluripotentes: construir tecidos que tenham características fisiológicas semelhantes ao tecido adulto humano e que possam ser enxertados com uma alta probabilidade de conexão com o tecido nativo, e de forma personalizada.

Referências

BARBUTI, A. et al. Human derived cardiomyocytes: A decade of knowledge after the discovery of induced pluripotent stem cells. **Dev Dyn**, v. 245, n. 12, p. 1145-1158, Dec 2016. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.24455> >.

BEN-ARI, M. et al. Developmental changes in electrophysiological characteristics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Heart Rhythm**, v. 13, n. 12, p. 2379-2387, Dec 2016. ISSN 1547-5271. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.08.045> >.

BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**. fifth. Rio de Janeiro: Elsevier 2004.

BERS, D. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (Developments in Cardiovascular Medicine)**. Springer, 2001. 427 ISBN 0792371585. Disponível em: < https://www.amazon.com/Excitation-Contraction-Coupling-Contractile-Developments-Cardiovascular/dp/0792371585/ref=la_B000AP86EM_1_1?s=books&ie=UTF8&qid=1491155029&sr=1-1 >.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, Jan 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805843> >.

_____. Cardiac excitation|[ndash]|contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002-01-10 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6868/full/415198a.html> >.

_____. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 23-49, 2008. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455> >.

BIRKET, M. J. et al. Contractile Defect Caused by Mutation in MYBPC3 Revealed under Conditions Optimized for Human PSC-Cardiomyocyte Function. **Cell Rep**, v. 13, n. 4, p. 733-45, Oct 27 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.025> >.

BLAZESKI, A. et al. Electrophysiological and contractile function of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 110, n. 2-3, p. 178-95, Oct-Nov 2012. ISSN 0079-6107. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.07.012> >.

BOHELER, K. R. et al. A human pluripotent stem cell surface N-glycoproteome resource reveals markers, extracellular epitopes, and drug targets. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 185-203, Jul 08 2014. ISSN 2213-6711 (Print)2213-6711. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.002> >.

BRADE, T. et al. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 10, p. a013847, Oct 01 2013. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a013847> >.

BURRIDGE, P. W. et al. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18293, Apr 08 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018293> >.

DALLY, S. et al. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 4, p. 633-44, Apr 2010. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.012> >.

DOLNIKOV, K. et al. Functional properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: intracellular Ca²⁺ handling and the role of sarcoplasmic reticulum in the contraction. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 236-45, Feb 2006. ISSN 1066-5099 (Print)1066-5099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0036> >.

DOSS, M. X. et al. Maximum diastolic potential of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes depends critically on I(Kr). **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40288, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040288> >.

DOWEY, S. N. et al. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. **Nat Protoc**, v. 7, n. 11, p. 2013-21, Nov 2012. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.121> >.

DRAWNEL, F. M. et al. Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. **Cell Rep**, v. 9, n. 3, p. 810-21, Nov 06 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.055> >.

DUNCAN, J. G.; FINCK, B. N. The PPAR α -PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. **PPAR Res**,

v. 2008, p. 253817, 2008. ISSN 1687-4757 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2008/253817> >.

EISENBERG, E.; HILL, T. L. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. **Science**, v. 227, n. 4690, p. 999-1006, Mar 01 1985. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EL BARDAI, S. et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Planta Med**, v. 69, n. 1, p. 75-7, Jan 2003. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567286> >.

FEASTER, T. K. et al. Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 117, n. 12, p. 995-1000, Dec 04 2015. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.115.307580> >.

FREARSON, N.; PERRY, S. V. Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles. **Biochem J**, v. 151, n. 1, p. 99-107, Oct 1975. ISSN 0264-6021 (Print)0264-6021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FU, J. D. et al. Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27417, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027417> >.

GONZALEZ, R.; LEE, J. W.; SCHULTZ, P. G. Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 50, n. 47, p. 11181-5, Nov 18 2011. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GRANT, A. O. Cardiac ion channels. **Circ Arrhythm Electrophysiol**, v. 2, n. 2, p. 185-94, Apr 2009. ISSN 1941-3084. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circep.108.789081> >.

GURDON, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **J Embryol Exp Morphol**, v. 10, p. 622-40, Dec 1962. ISSN 0022-0752 (Print)0022-0752. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HANFT, L. M.; KORTE, F. S.; MCDONALD, K. S. Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 4, p. 627-36, Mar 01 2008. ISSN 0008-6363 (Print)0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvm099> >.

HAZELTINE, L. B. et al. Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells. **Int J Cell Biol**, v. 2012, p. 508294, 2012. ISSN 1687-8876. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/508294> >.

HINKEN, A. C.; SOLARO, R. J. A dominant role of cardiac molecular motors in the intrinsic regulation of ventricular ejection and relaxation. **Physiology (Bethesda)**, v. 22, p. 73-80, Apr 2007. ISSN 1548-9213 (Print)1548-9221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00043.2006> >.

HUANG, P. et al. New strategies for improving stem cell therapy in ischemic heart disease. **Heart Fail Rev**, v. 21, n. 6, p. 737-752, Nov 2016. ISSN 1382-4147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10741-016-9576-1> >.

HYNES, T. R. et al. Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. **Cell**, v. 48, n. 6, p. 953-63, Mar 27 1987. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ITZHAKI, I. et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 225-9, Mar 10 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09747> >.

JEZIOROWSKA, D. et al. Differential Sarcomere and Electrophysiological Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Myocytes in Monolayer vs. Aggregation-Based Differentiation Protocols. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 01 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061173> >.

KEHAT, I. et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. **J Clin Invest**, v. 108, n. 3, p. 407-14, Aug 2001. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci12131> >.

KIM, C. et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. **Nature**, v. 494, n. 7435, p. 105-10, Feb 07 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11799> >.

KLABUNDE, R. **Cardiovascular Physiology Concepts**. Baltimore Lippincott Williams & Wilkins 2005.

KOCHEGAROV, A.; LEMANSKI, L. F. New Trends in Heart Regeneration: A Review. In: (Ed.). **J Stem Cells Regen Med**, v.12, 2016. p.61-8. ISBN 0973-7154 (Electronic).

KUPPUSAMY, K. T. et al. Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 21, p. E2785-94, May 26 2015. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1424042112> >.

LEE, Y. K. et al. Calcium Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. In: (Ed.). **Stem Cell Rev**, v.7, 2011. p.976-86. ISBN 1550-8943 (Print)1558-6804 (Electronic).

LIAN, X. et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 27, p. E1848-57, Jul 03 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200250109> >.

_____. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. **Nat Protoc**, v. 8, n. 1, p. 162-75, Jan 2013. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.150> >.

LIMPITIKUL, W. B. et al. A Precision Medicine Approach to the Rescue of Function on Malignant Calmodulinopathic Long-QT Syndrome. **Circ Res**, v. 120, n. 1, p. 39-48, Jan 06 2017. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.116.309283> >.

LITTLE, M. A.; JONES, N. S. Sparse bayesian step-filtering for high-throughput analysis of molecular machine dynamics. 2010/03/29 2010. Disponível em: < <http://arxiv.org/pdf/1003.5535> >.

LOPASCHUK, G. D.; JASWAL, J. S. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 56, n. 2, p. 130-40, Aug 2010. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181e74a14> >.

MA, D. et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Eur Heart J**, v. 34, n. 15, p. 1122-33, Apr 2013. ISSN 0195-668x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs226> >.

MA, J. et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 5, p. H2006-17, Nov 2011. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00694.2011> >.

MALAN, D. et al. Human iPS cell model of type 3 long QT syndrome recapitulates drug-based phenotype correction. **Basic Res Cardiol**, v. 111, n. 2, p. 14, Mar 2016. ISSN 0300-8428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-016-0530-0> >.

MASUI, S. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 625-35, Jun 2007. ISSN 1465-7392 (Print)1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1589> >.

MASUMOTO, H.; YAMASHITA, J. K. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Sheets: a Platform for Cardiac Regeneration. In: (Ed.). **Curr Treat Options Cardiovasc Med**, v.18, 2016. ISBN 1092-8464 (Print)1534-3189 (Electronic).

MOREAU, A. et al. Biophysical, Molecular, and Pharmacological Characterization of Voltage-Dependent Sodium Channels From Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Can J Cardiol**, v. 33, n. 2, p. 269-278, Feb 2017. ISSN 0828-282x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2016.10.001> >.

MUMMERY, C. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. **Circulation**, v. 107, n. 21, p. 2733-40, Jun 03 2003. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000068356.38592.68> >.

NAKAGAWA, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 1, p. 101-6, Jan 2008. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1374> >.

NAKAHAMA, H.; DI PASQUALE, E. Generation of Cardiomyocytes from Pluripotent Stem Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1353, p. 181-90, 2016. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/7651_2014_173 >.

NIWA, H. et al. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 118-22, Jul 02 2009. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature08113> >.

NUNES, M. C. et al. Mortality prediction in Chagas heart disease. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 10, n. 9, p. 1173-84, Sep 2012. ISSN 1744-8344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098153> >.

ONG, C. S. et al. Biomaterial-Free Three-Dimensional Bioprinting of Cardiac Tissue using Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes. **Sci**

Rep, v. 7, n. 1, p. 4566, Jul 04 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05018-4> >.

OPIE, L. H. **Heart Physiology: From Cell to Circulation**. LWW, 2003. 640 ISBN 0781742781. Disponível em: < https://www.amazon.com/Heart-Physiology-Circulation-Lionel-Opie/dp/0781742781/ref=asap_bc?ie=UTF8 >.

PIPIIAS, D. C. et al. Novel calmodulin mutations associated with congenital long QT syndrome affect calcium current in human cardiomyocytes. **Heart Rhythm**, v. 13, n. 10, p. 2012-9, Oct 2016. ISSN 1547-5271. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.06.038> >.

POON, E. et al. Proteomic Analysis of Human Pluripotent Stem Cell-Derived, Fetal, and Adult Ventricular Cardiomyocytes Reveals Pathways Crucial for Cardiac Metabolism and Maturation. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 8, n. 3, p. 427-36, Jun 2015. ISSN 1942-3268. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circgenetics.114.000918> >.

REN, Y. et al. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 51, n. 3, p. 280-7, Sep 2011. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.04.012> >.

ROBERTSON, C.; TRAN, D. D.; GEORGE, S. C. Concise review: maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cells**, v. 31, n. 5, p. 829-37, May 2013. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1331> >.

ROG-ZIELINSKA, E. A. et al. Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1alpha. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 7, p. 1106-16, Jul 2015. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.181> >.

RUAN, J. L. et al. Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue. **Circulation**, v. 134, n. 20, p. 1557-1567, Nov 15 2016. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.114.014998> >.

SUN, N. et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 130, p. 130ra47, Apr 18 2012. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3003552> >.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024> >.

TRAN, F. H.; ZHENG, J. J. Modulating the wnt signaling pathway with small molecules. **Protein Sci**, v. 26, n. 4, p. 650-661, Apr 2017. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3122> >.

VEERMAN, C. C. et al. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 9, p. 1035-52, May 01 2015. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2014.0533> >.

WANG, Y. et al. Nitric Oxide-cGMP-PKG Pathway Acts on Orai1 to Inhibit the Hypertrophy of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Stem Cells**, v. 33, n. 10, p. 2973-84, Oct 2015. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2118> >.

_____. Nitric Oxide-cGMP-PKG Pathway Acts on Orai1 to Inhibit the Hypertrophy of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **STEM CELLS**, v. 33, n. 10, p. 2973-2984, 2017. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2118/abstract> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2118/full> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2118/pdf> >.

WEINBERG, S.; LIPKE, E. A.; TUNG, L. In vitro electrophysiological mapping of stem cells. **Methods Mol Biol**, v. 660, p. 215-37, 2010. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-705-1_14 >.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-3, Feb 27 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/385810a0> >.

_____. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Cloning Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 3-7, Spring 2007. ISSN 1536-2302 (Print)1536-2302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/clo.2006.0002> >.

WU, Y. et al. CHIR99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 17, p. 2684-99, Oct 15 2013. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.08.027> >.

XU, F. et al. A microfabricated magnetic actuation device for mechanical conditioning of arrays of 3D microtissues. **Lab Chip**, v. 15, n. 11, p. 2496-503, Jun 07 2015. ISSN 1473-0189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/c4lc01395f> >.

XU, X. Q. et al. Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2163-74, Sep 2009. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/stem.166> >.

YANG, L. et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 524-8, May 22 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature06894> >.

YANG, X.; PABON, L.; MURRY, C. E. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 114, n. 3, p. 511-23, Jan 31 2014. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.114.300558> >.

YANG, X. et al. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 72, p. 296-304, Jul 2014. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.005> >.

YOSHIDA, Y.; YAMANAKA, S. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. **Circ Res**, v. 120, n. 12, p. 1958-1968, Jun 09 2017. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.311080> >.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917-20, Dec 21 2007. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1151526> >.

ZHANG, J. et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. **Circ Res**, v. 104, n. 4, p. e30-41, Feb 27 2009. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.108.192237> >.

ZHAO, R. et al. Decoupling cell and matrix mechanics in engineered microtissues using magnetically actuated microcantilevers. **Adv Mater**, v. 25, n. 12, p. 1699-705, Mar 25 2013. ISSN 0935-9648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/adma.201203585> >.

_____. Magnetic approaches to study collective three-dimensional cell mechanics in long-term cultures (invited). **J Appl Phys**, v. 115, n. 17, p. 172616, May 07 2014. ISSN 0021-8979 (Print)0021-8979. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1063/1.4870918> >.

ZHU, R. et al. Variability of Action Potentials Within and Among Cardiac Cell Clusters Derived from Human Embryonic Stem Cells. In: (Ed.). **Sci Rep**, v.6, 2016. ISBN 2045-2322 (Electronic).

ZIMMERMANN, W. H. et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. **Nat Med**, v. 12, n. 4, p. 452-8, Apr 2006. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1394> >.