DOUGLAS MARTINS VERONEZ

SISTEMA AUTOMATIZADO PARA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E
AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO CÁLCIO INTRACELULAR EM
CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO
PLURIPOTENTES INDUZIDAS

São Paulo

2018

DOUGLAS MARTINS VERONEZ

SISTEMA AUTOMATIZADO PARA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E
AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO CÁLCIO INTRACELULAR EM
CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO
PLURIPOTENTES INDUZIDAS

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2018

DOUGLAS MARTINS VERONEZ

SISTEMA AUTOMATIZADO PARA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E
AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO CÁLCIO INTRACELULAR EM
CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO
PLURIPOTENTES INDUZIDAS

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração:
Engenharia Biomédica.

Orientadora:
Profa. Dra. Idágene Aparecida Cestari

São Paulo
2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Veronez, Douglas Martins

Sistema Automatizado para Estimulação Elétrica e Avaliação da Dinâmica do Cálcio Intracelular em Cardiomiócitos Derivados de Células-Tronco Pluripotentes Induzidas / D. M. Veronez, I. A. Cestari -- versão corr. --São Paulo, 2018.

125 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle.

1.Bioengenharia 2.Cálcio 3.Estimulação Elétrica 4.Fluorescência
5.Miocárdio I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle II.t.
III.Cestari, Idágene Aparecida

Dedico este trabalho a meus amigos e família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Oscar e Iraci por compreenderem e apoiarem meus esforços sempre fazendo o possível para me ajudar e aos meus avós Arlindo e Maria pelo carinho e pelos conselhos.

À professora Idágene A. Cestari por ter me recebido e inspirado, pela orientação, pelos conselhos, pela paciência e pelo tempo dedicado a este trabalho.

Ao Dr. Ismar N. Cestari pelas sugestões ao projeto e orientação nesse trabalho.

Aos amigos Daniel S. Torres, Gustavo S. Marchini, Adélia A. Y. Kakoi e Pérola M. C. de Brito por estarem ao meu lado e me apoiarem nos momentos difíceis.

A Lígia C. P. dos Santos pelo carinho, companheirismo e incentivo constante.

À equipe da Divisão de Bioengenharia do InCor, em especial ao João R. Sampel, à Helena T. T. Oyama pelos conselhos pessoais, profissionais e apoio com o trabalho.

À Escola Politécnica da USP pela formação robusta e pelas experiências vividas durante a graduação e pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro – Processo nº 2013/24544-0.

A todos os demais amigos, colegas e familiares que torceram pelo meu sucesso e apoiaram meus estudos.

Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited,
whereas imagination embraces the entire world,
stimulating progress, giving birth to evolution.

(Albert Einstein)

RESUMO

Este estudo apresenta o desenvolvimento e validação de uma nova abordagem para a avaliação do cálcio intracelular em culturas de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CM – do inglês *human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*) que pode ser aplicada para avaliar o efeito de drogas no acoplamento excitação-contração. O método consiste na estimulação elétrica e medição conjunta da fluorescência de forma automatizada e foi viabilizado a partir da inclusão de um sistema de estimulação elétrica em um leitor de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Um estimulador eletrônico compacto foi projetado para operar junto a um leitor de placas gerando pulsos quadrados monofásicos com duração de 5 ms e campo elétrico de 8 Vcm^{-1} aplicados por microeletrodos metálicos de platina-irídio em células em cultura. Uma placa de cultura normalmente utilizada em leitor de placas foi modificada para permitir a colocação do estimulador e dos eletrodos. A intensidade de fluorescência do cálcio intracelular foi avaliada utilizando um leitor de ELISA durante a estimulação elétrica em culturas de células marcadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo-4 AM. A estimulação elétrica das células resultou em contrações regulares nas frequências de 0,1 Hz; 0,2 Hz; 0,3 Hz e 0,5 Hz induzidas pelo estimulador. Parâmetros dos transientes de cálcio foram estudados após a exposição de culturas de células ao Verapamil (0,05; 0,5 e 5,0 μM), a amplitude e a inclinação máxima da fase de subida foram progressivamente reduzidas com doses crescentes da droga. Os dados obtidos demonstraram que o método apresentado permite a avaliação automatizada de transientes de cálcio durante a estimulação elétrica de culturas de hiPSC-CM utilizando o sistema de estimulação em um leitor de ELISA. Esses resultados validaram a aplicabilidade do sistema ao estudo das alterações da dinâmica do cálcio intracelular induzidas por drogas em células sob estimulação elétrica. O sistema de avaliação automatizada desenvolvido pode ser ampliado para realizar a triagem de alto rendimento em bibliotecas de compostos que tem como alvo o acoplamento excitação-contração em células cardíacas humanas *in vitro*.

Palavras-chave: Bioengenharia. Cálcio intracelular. Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes. Estimulador elétrico para cultura de células. Medição de fluorescência. Leitor de placas.

ABSTRACT

This study presents the development and validation of a new approach for the evaluation of intracellular calcium in cultures of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM), which can be applied to evaluate the effect of drugs on excitation-contraction coupling. The method consists of electrical stimulation and joint measurement of fluorescence in an automated manner and was made possible by the inclusion of an electrical stimulation system in an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). A compact electronic stimulator was designed to operate inside a plate reader generating monophasic square pulses with duration of 5 ms and electric field of 8 Vcm^{-1} applied by platinum-iridium metal microelectrodes to cells in culture. A culture plate used in a plate reader was modified to allow placement of the stimulator and electrodes. Fluorescence intensity of intracellular calcium was measured during electrical stimulation of cell cultures loaded with Ca^{2+} Fluo-4 AM indicator using a plate reader. The electrical stimulation of the cells generated regularly spaced contractions following the pace of the stimulator at the frequencies of 0.1 Hz, 0.2 Hz, 0.3 Hz and 0.5 Hz. Transient profile parameters were studied after treating cell cultures with Verapamil (0.05, 0.5 and 5.0 μM) the amplitude and the maximum slope of rising phase were progressively reduced with increasing verapamil doses. The data obtained demonstrated that the method presented allows the automated evaluation of calcium transients during the electrical stimulation of hiPSC-CM cultures using the stimulation system in an ELISA reader. These results demonstrated the applicability of the system to the study of changes in the intracellular calcium dynamics induced by drugs in electrically stimulated cells. The system developed is amenable to scaling thus allowing high content automated drug library screening for compounds that target the excitation-contraction coupling in human heart cells *in vitro*.

Key Words: Bioengineering. Intracellular calcium. Electrical stimulator for cell cultures. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Fluorescence measurements. Plate reader.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinal típico do potencial de ação com platô do músculo cardíaco (a) e permeabilidade da membrana aos íons envolvidos na contração cardíaca (b)..	32
Figura 2: Potencial de ação com platô e comparação de sua duração com a duração do intervalo refratário absoluto.	33
Figura 3: Esquema da estrutura do músculo cardíaco.	34
Figura 4: Estrutura do músculo estriado e organização dos filamentos de actina e miosina do sarcômero.	35
Figura 5: O aspecto de sincício do músculo cardíaco	35
Figura 6: Acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos.....	36
Figura 7: Alterações na expressão de proteínas relacionadas a regulação do cálcio no acoplamento excitação-contração.....	38
Figura 8: Diagrama de Perrin–Jablonski.	39
Figura 9: Espectro de fluorescência do Fluo-4 AM.....	40
Figura 10: Molécula do indicador de cálcio citoplasmático Fluo-4 AM.	42
Figura 11: Mecanismo de ativação do indicador fluorescente Fluo-4 AM a partir da desesterificação.	42
Figura 12: Cardiomiócitos marcados com o indicador Fluo-4 AM.	43
Figura 13: Potencial de diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas humanas.	44
Figura 14: Aplicações possíveis dos hiPSC-CM.	46
Figura 15: Sistemas utilizados para avaliação do cálcio intracelular.....	48
Figura 16: Diagrama detalhando o fluxo de trabalho para desenvolvimento e aplicação do método desenvolvido.	51
Figura 17: Estrutura do circuito estimulador projetado	53
Figura 18: Esquemático do módulo oscilador do circuito de estimulação.	53
Figura 19: Formas de onda da tensão no capacitor e da tensão de saída do oscilador.....	54
Figura 20: Esquemático do circuito detector de bordas e formas de onda demonstrando seu funcionamento.	55
Figura 21: Seleção do limiar de captura nas culturas de cardiomiócitos.....	57
Figura 22: Processo de produção dos eletrodos por fusão dos fios de prata e de liga de platina-irídio.....	58

Figura 23: Montagem experimental utilizada para avaliar a transferência de carga dos eletrodos metálicos confeccionados.	59
Figura 24: Sequência de cálculo da razão de fluorescência a partir dos sinais medidos.	69
Figura 25: Sequência de cálculo do transiente de cálcio médio a partir da segmentação dos transientes de cálcio presentes no sinal medido.	70
Figura 26: Parâmetros estimados mostrados sobre o transiente de cálcio.....	72
Figura 27: Características elétricas da primeira versão do estimulador eletrônico. ...	73
Figura 28: Circuito estimulador desenvolvido no trabalho.	75
Figura 29: Pulsos quadrados monofásicos gerados pelo estimulador eletrônico.	76
Figura 30: Transferência de carga avaliada em eletrodos de liga de platina-irídio confeccionados com diâmetros diferentes.....	77
Figura 31: Projeto mecânico da microplaca de estimulação (cotas em milímetros). 78	
Figura 32: Parte inferior da microplaca (cotas em milímetros).....	79
Figura 33: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 5% das amostras estudadas.	80
Figura 34: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 13% das amostras estudadas.	81
Figura 35: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 3% das amostras estudadas.	81
Figura 36: Variações na intensidade de fluorescência em resposta à estimulação elétrica.	82
Figura 37: Variações da intensidade de fluorescência observadas durante a fase de estimulação.	83
Figura 38: Variações na intensidade de fluorescência observadas em culturas de hiPSC-CM sem estimulação elétrica.	84
Figura 39: Variações na intensidade de fluorescência observadas em culturas de hiPSC-CM estimuladas eletricamente.	85
Figura 40: Espectro de frequência dos sinais medidos.	86
Figura 41: Diferenças nos sinais de fluorescência para diferentes densidades de plaqueamento.	87
Figura 42: Amplitude do transiente de cálcio em culturas de células com diferentes densidades.	88
Figura 43: Nível basal de Ca^{2+} medido em culturas com diferentes densidades.....	88

Figura 44: Variações na intensidade de fluorescência medidas em culturas de células estimuladas eletricamente a 0,3 Hz.	89
Figura 45: Variações na intensidade de fluorescência medidas em culturas de células apresentando atividade espontânea em poços sem estimulação elétrica.	90
Figura 46: Variações da intensidade de fluorescência representando contrações em diferentes frequências registradas nos poços com aplicação de estimulação elétrica.....	91
Figura 47: Nível de Ca^{2+} basal e variações na morfologia dos transientes de cálcio em resposta a diferentes frequências de estimulação.	92
Figura 48: Efeitos de três concentrações diferentes de verapamil nos transientes de cálcio medidos em culturas de hiPSC-CM.	94
Figura 49: Curva dose-resposta mostrando a redução da amplitude do transiente de cálcio para concentrações crescentes de verapamil.	97
Figura 50: Sinal medido nas células durante estimulação na frequência de 0,1 Hz.	120
Figura 51: Normalização dos sinais de fluorescência do cálcio intracelular.	121
Figura 52: Espectro de frequência do sinal de fluorescência do cálcio	122
Figura 53: Segmentação incorreta do registro de fluorescência para identificação de transientes de cálcio.....	123
Figura 54: Segmentação correta do registro de fluorescência para identificação de transientes de cálcio.....	124
Figura 55: Média dos transientes de cálcio obtida pela rotina desenvolvida em ambiente MATLAB.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características típicas dos sinais elétricos nos organismos vivos.....	52
Tabela 2: Descrição dos parâmetros do transiente de cálcio.	71
Tabela 3: Parâmetros de estimulação (amplitude; largura de pulso) necessários para geração de contrações sincronizadas em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos.	74
Tabela 4: Avaliação da transferência de carga dos eletrodos de prata e de liga de platina-irídio.....	77
Tabela 5: Parâmetros dos transientes de cálcio estimados em diferentes frequências de estimulação.	93
Tabela 6: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 0,05 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.....	95
Tabela 7: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 0,5 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.....	95
Tabela 8: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 5,0 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Acetoximetil
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CICR	<i>Calcium-induced calcium release</i>
CiPA	<i>Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay</i>
ddp	diferença de potencial
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FFT	<i>Fast Fourier transform</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
hiPSC-CM	<i>Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes</i>
iPSC	<i>induced pluripotent stem cells</i>
NCX	<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
PA	Potenciais de Ação
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCB	<i>Printed circuit board</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	<i>ryanodine receptors</i>
SERCA	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	29
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	31
3.1. POTENCIAL DE AÇÃO.....	31
3.2. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO.....	33
3.3. PRINCÍPIOS DA FLUORESCÊNCIA.....	38
3.4. INDICADOR FLUORESCENTE FLUO-4.....	41
3.5. APLICAÇÕES DOS HIPSC-CM.....	43
3.6. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR.....	47
3.7. O LEITOR DE PLACAS FLUOSTAR OMEGA.....	50
4. METODOLOGIA.....	51
4.1. PROJETO DO SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO.....	52
4.1.1. Projeto do Estimulador Eletrônico.....	52
4.1.2. Determinação dos Parâmetros de Estimulação.....	57
4.1.3. Projeto e Avaliação dos Eletrodos.....	58
4.1.4. Projeto da Microplaca de Estimulação.....	59
4.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO CÁLCIO.....	60
4.2.1. Fluorescência em Cardiomiócitos de Ratos Neonatos.....	60
4.2.2. Validação do Método.....	61
4.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM CULTURAS DE CARDIOMIÓCITOS.....	63
4.3.1. Adaptação do Método.....	64
4.3.2. Efeito da Densidade de Plaqueamento.....	65
4.3.3. Aplicação do Método.....	66
4.3.4. Aplicação em Avaliação do Efeito de Drogas.....	67
4.3.5. Rotina de Processamento dos Transientes de Cálcio.....	68
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	72

5. RESULTADOS.....	73
5.1. SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO	73
5.1.1. Estimulador Eletrônico.....	73
5.1.2. Eletrodos	77
5.1.3. Microplaca de Estimulação.....	78
5.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO CÁLCIO.....	80
5.2.1. Fluorescência de Cardiomiócitos de Ratos Neonatos	80
5.2.2. Validação do Método.....	82
5.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM CULTURAS DE CARDIOMIÓCITOS.....	84
5.3.1. Adaptação do Método	84
5.3.2. Efeito da Densidade de Plaqueamento	87
5.3.3. Aplicação do Método	90
5.3.4. Efeito da Frequência de Estimulação no Perfil dos Transientes.....	91
5.3.5. Cálculo dos Parâmetros de Perfil dos Transientes.....	92
5.3.6. Avaliação do Efeito de Drogas nos Transientes de Cálcio	93
6. DISCUSSÃO	99
6.1. O SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO	101
6.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO	102
6.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO	102
6.4. EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TRANSIENTE DE CÁLCIO	104
6.5. CÁLCULO DOS PARÂMETROS DOS TRANSIENTES DE CÁLCIO.....	104
6.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DROGAS.....	106
7. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE: ROTINA DE PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	119

1. INTRODUÇÃO

O coração é particularmente sensível aos efeitos colaterais de drogas não cardíacas [1], o que muitas vezes implica na necessidade de se descontinuar a comercialização de medicamentos devido a cardiotoxicidade [2]. Há portanto, a necessidade de se testar o efeito de novos medicamentos no músculo cardíaco e de se desenvolverem sistemas de avaliação de drogas de alto rendimento capazes de realizar esses testes de forma confiável e rápida [3].

Neste contexto, a iniciativa CiPA (*Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay*) foi criada em 2013 para definir procedimentos mais abrangentes e melhorar a precisão na identificação do potencial pró-arrítmico de novos medicamentos [4]. A CiPA propõe uma abordagem dividida em três ensaios pré-clínicos para testar uma droga. O primeiro avalia o efeito do fármaco em múltiplos canais iônicos cardíacos usando patch-clamp. A informação obtida é utilizada no segundo, que reconstrói o potencial de ação ventricular humano em simulações computacionais. Na terceira etapa, os ensaios são realizados com cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CM – do inglês *human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*) para avaliação do potencial de membrana e do ciclo do cálcio intracelular [5]. O aumento do interesse em entender a regulação do cálcio intracelular com aplicações em segurança farmacológica justifica o desenvolvimento de sistemas e métodos eficientes para avaliação da atividade contrátil em hiPSC-CM a partir dos transientes de cálcio.

Desde a descoberta dos hiPSC-CM [6], muitos trabalhos foram publicados enfatizando o potencial destas células para a triagem de compostos durante o desenvolvimento inicial de fármacos [7] [8] e para estabelecimento de modelos de doenças cardíacas humanas utilizando hiPSC-CM de pacientes específicos [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16]. A compreensão da fisiologia dos hiPSC-CM resultou em um modelo *in vitro* para estudar doenças cardíacas [17] e testar drogas em cardiomiócitos humanos obtidos por técnicas minimamente invasivas [18]. Os hiPSC-CM possuem propriedades de acoplamento excitação-contração semelhantes a dos cardiomiócitos adultos. Apresentam contrações rítmicas, canais de cálcio tipo-L e respostas eletrofisiológicas sob estimulação [19], [20], [21] que justificam sua aplicação para avaliar a interferência de fármacos na função cardíaca [22] e no ciclo do cálcio em cardiomiócitos.

O íon cálcio tem um papel fundamental no acoplamento excitação-contracção dos cardiomiócitos, incluindo os hiPSC-CM. A contratilidade é controlada por variações na concentração intracelular do cálcio ionizado (referido nesse trabalho de maneira simplificada como Ca^{2+}) em resposta a potenciais de acção (PA). A propagação do PA através da membrana celular ativa os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, como o canal de cálcio tipo-L. O Ca^{2+} que entra na célula através dos canais de cálcio tipo-L desencadeia a liberação de estoques de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) [23] aumentando a concentração intracelular de cálcio e permitindo que o Ca^{2+} se ligue aos filamentos de troponina C. A mudança conformacional da troponina expõe os sítios ativos da actina, permitindo a formação de pontes cruzadas de actina-miosina, o que resulta na contracção da célula [24]. O relaxamento ocorre com a redução da concentração de cálcio no citoplasma devido à atividade da SERCA (do inglês *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*) que recapta o Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e do trocador sódio-cálcio (NCX – do inglês *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*) que bombeia o Ca^{2+} para fora da célula [24]. Condições patológicas ou medicamentos podem induzir mudanças no ciclo do cálcio [25].

A caracterização da contratilidade e a triagem de drogas usando hiPSC-CM normalmente são feitas a partir dos transientes de cálcio registrados usando indicadores fluorescentes de Ca^{2+} em células apresentando atividade espontânea. O uso do indicador Fluo-4 AM em hiPSC-CM foi relatado por Sharma et al. e Itzhaki et al. para medir transientes de cálcio usando microscópios confocais [26] [11]. Este método está bem estabelecido na literatura e fornece bons resultados para células isoladas, no entanto requer investimentos em equipamentos dedicados de custo elevado e não é adequado para aplicações que demandam alto rendimento como os testes de drogas. Para esta aplicação são utilizados sistemas de imagem especiais de alto rendimento com o potencial de analisar um grande número de amostras em poucos minutos. Sirenko et al. registrou alterações no cálcio intracelular usando fluorescência em um sistema de imagem de alto conteúdo (High-content screening FLIPR Tetra, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) para avaliar o efeito de compostos na fisiologia dos cardiomiócitos [27]. Bedut et al. descreveu um método semi-automatizado utilizando um sistema especial de imagem de alto rendimento para registrar atividade eléctrica síncrona e o ciclo do cálcio intracelular em monocamadas de hiPSC-CM contraindo espontaneamente (FDSS 7000EX, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão) que tem aplicações na avaliação do

efeito de compostos na eletrofisiologia de culturas de cardiomiócitos [3]. Estas abordagens de alto rendimento, além de permitirem a caracterização funcional dos hiPSC-CM são adaptadas para testes de drogas ou avaliação de bibliotecas de compostos.

Este estudo apresenta um novo método para medir as variações dinâmicas do Ca^{2+} intracelular durante a estimulação elétrica de monocamadas de hiPSC-CM em cultura. As hipóteses são que: (i) a inclusão de um sistema de estimulação elétrica dentro de um leitor de placas multimodo, comumente conhecido como leitor de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), permite realizar análise de alto rendimento de transientes de cálcio intracelular; e (ii) o método desenvolvido pode ser utilizado para estudar o efeito de drogas no acoplamento excitação-contração cardíaca.

Para este fim, um sistema de estimulação em que hiPSC-CM podem ser cultivadas e eletricamente estimuladas foi construído e utilizado dentro de um leitor de placas (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Medidas de fluorescência foram realizadas simultaneamente com estimulação elétrica e transientes de cálcio que representam a atividade de toda a cultura de células foram registrados. As alterações no cálcio intracelular das populações celulares induzidas pela estimulação elétrica foram analisadas uma rotina MATLAB de processamento de sinais especialmente desenvolvida, que permitiu obter parâmetros dos transientes de cálcio utilizados para avaliar a dinâmica do cálcio intracelular em culturas de células.

O método foi demonstrado registrando-se transientes de cálcio induzidos pelos pulsos de estimulação em diferentes frequências e avaliando alterações dose-dependentes no perfil dos transientes de culturas de células tratadas com verapamil. Finalmente, a validação dos resultados foi feita comparando o ciclo do cálcio e os parâmetros dos transientes de cálcio registrados em hiPSC-CM com aqueles disponíveis na literatura medidos utilizando métodos estabelecidos como microscopia confocal e de fluorescência.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver, validar e aplicar um novo método que associa estimulação elétrica e medição conjunta da fluorescência para registrar, de maneira automatizada, variações no cálcio intracelular que permitam caracterizar a atividade contrátil e o efeito de drogas em culturas de cardiomiócitos.

O método permite a utilização de leitores de ELISA multimodo, comumente encontrados em laboratórios de pesquisa envolvendo culturas de células, para registrar transientes de cálcio intracelular a partir do desenvolvimento e inclusão de um sistema de estimulação no interior do leitor de placas.

Os objetivos específicos são:

- Desenvolvimento de um estimulador eletrônico de baixo consumo para utilização em placas de cultura;
- Construção de microeletrodos para estimulação;
- Desenvolvimento de uma microplaca de cultura contendo eletrodos para estimulação elétrica;
- Caracterização da contratilidade de cardiomiócitos a partir de registros de transientes de cálcio obtidos em resposta a estímulos elétricos;
- Validação do método em culturas de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. POTENCIAL DE AÇÃO

O potencial de ação (PA) é uma variação característica e bastante acentuada do potencial de membrana. Os potenciais se originam devido a excitações ou perturbações do meio externo à célula que induzem variações locais do fluxo de cargas iônicas da membrana celular.

No coração existem potenciais de ação de morfologias diferentes. Os potenciais gerados no nodo sinoatrial e propagados pelo nodo atrioventricular têm formato e dinâmica de geração muito semelhante aos dos potenciais de ação nervosos que dependem principalmente do sódio e do potássio. O nodo sinoatrial tem a capacidade de auto-geração rítmica de potenciais de ação devido à permeabilidade natural da membrana ao sódio. Os potenciais de ação gerados no sincício atrial, no sincício ventricular e nas fibras de Purkinje apresentam um platô característico (Figura 1A).

O nodo sinoatrial é naturalmente permeável ao sódio e a entrada deste íon na célula gera uma despolarização que ao atingir cerca de -40 mV promove a abertura dos canais de cálcio-sódio dependentes de diferença de potencial (ddp). Estes canais iniciam a fase ascendente do potencial de ação e permanecem ativos por um intervalo entre 100 e 150 ms, coincidindo com a abertura dos canais de potássio.

Os canais de potássio repolarizam a membrana e geram uma hiperpolarização por apresentarem um atraso para se fecharem depois de atingido o potencial de repouso. Nesse instante a entrada constante de sódio faz com que um novo ciclo de potencial de ação seja iniciado.

No músculo cardíaco o potencial de ação é gerado pela abertura de dois tipos de canais, os canais rápidos de sódio e os canais lentos de cálcio. Os canais lentos de cálcio tem uma característica essencial para o coração por permanecerem abertos por mais tempo que os canais rápidos de sódio. Isto mantém a despolarização do músculo cardíaco por um intervalo de tempo prolongado.

Figura 1: Sinal típico do potencial de ação com platô do músculo cardíaco (a) e permeabilidade da membrana aos íons envolvidos na contração cardíaca (b).

Fonte: [28].

Logo após o início do potencial de ação os canais de potássio tem a permeabilidade diminuída em aproximadamente cinco vezes, isso impede a repolarização rápida da membrana. O potencial de ação só termina depois de 0,2 a 0,3 s, quando os canais de cálcio-sódio se fecham e a permeabilidade dos canais de potássio volta ao normal fazendo com que a membrana possa ser repolarizada.

Este potencial de ação demorado também ocasiona um intervalo refratário bastante longo no músculo cardíaco, com duração de 0,2 a 0,3 s, praticamente a mesma do potencial de ação (Figura 2). Há um período refratário relativo adicional de 0,5 s.

O platô de potencial e o intervalo refratário são características muito importantes para o funcionamento do músculo cardíaco. A duração dos potenciais no músculo esquelético é de 5 ms, se o coração estivesse sujeito a tais estímulos curtos, a frequência cardíaca seria muito elevada e o bombeamento de sangue ineficiente. Para que o sangue seja bombeado adequadamente, numa velocidade que favoreça as trocas gasosas e não gere pressões muito elevadas, são necessárias contrações mais lentas e vigorosas.

O intervalo refratário longo é importante para evitar somação de contrações, evitando que o músculo cardíaco contraia novamente devido a chegada de um novo potencial de ação antes de relaxar.

Figura 2: Potencial de ação com platô e comparação de sua duração com a duração do intervalo refratário absoluto.

Fonte: [28].

3.2.ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

O músculo cardíaco une características presentes tanto nos músculos lisos como nos esqueléticos sendo mais parecido com o estriado esquelético em sua organização e estrutura.

As fibras musculares são constituídas por feixes longitudinais de fibras menores chamadas de miofibrilas, estas por sua vez são constituídas de uma repetição de unidades cilíndricas chamadas de sarcômeros que estão separados uns dos outros pelos discos Z ou discos intercalados. O sarcômero é constituído por dois tipos de filamentos, os de actina e os de miosina e é a menor unidade contrátil do músculo (Figura 4).

Em torno das miofibrilas existe uma estrutura chamada retículo sarcoplasmático, que armazena o cálcio necessário para a contração muscular.

Além destas estruturas, as fibras são revestidas pelo sarcolema, que é o nome dado à membrana celular das fibras musculares. Essa membrana é contínua para o interior da fibra na forma dos túbulos transversos, ou túbulos T. Esta rede de tubos é importante para permitir a propagação rápida do potencial de ação para o interior da fibra muscular (Figura 3).

Figura 3: Esquema da estrutura do músculo cardíaco.

Fonte: [29].

Uma particularidade do músculo cardíaco é sua característica de sincício, ou seja, massa multinucleada de células ligadas diretamente umas nas outras por junções abertas ou junções *gap*. O coração possui dois tipos de sincícios, o atrial e o ventricular (Figura 5), de modo que a condução dos sinais de excitação do músculo cardíaco só passa dos átrios para os ventrículos por uma região muscular específica chamada nodo atrioventricular.

Figura 4: Estrutura do músculo estriado e organização dos filamentos de actina e miosina do sarcômero.

Fonte [28].

Devido a esta ligação direta entre os citoplasmas das células musculares, um potencial de ação que se originar em qualquer região do coração irá se propagar rapidamente por todo o músculo.

Figura 5: O aspecto de sincício do músculo cardíaco

As regiões escuras da figura são chamadas de *discos intercalados*, são membranas que contém as *junções abertas*. Fonte [30].

O termo “acoplamento excitação-contração” se refere ao mecanismo que descreve como um potencial de ação desencadeia uma contração muscular. A Figura 6 ilustra elementos importantes deste mecanismo.

O potencial de ação inicia sua propagação no sarcolema e segue para o interior das fibras musculares através do sistema de túbulos transversos onde atua sobre as membranas dos túbulos sarcoplasmáticos longitudinais disparando o mecanismo de liberação de cálcio induzido por cálcio (CICR – do inglês *calcium-*

induced calcium release). Esta liberação ocorre com a abertura de canais presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, os receptores de rianodina (RyR – do inglês *ryanodine receptors*) e promove uma elevação de cerca de 5 vezes na concentração de cálcio no sarcoplasma [24].

Figura 6: Acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos.

A figura mostra a sequência de eventos que desencadeiam uma contração. O potencial de ação, o transiente de cálcio e o sinal de contração foram medidos em cardiomiócitos ventriculares de coelhos. Fonte: Modificada de [31].

Os íons Ca^{2+} se difundem para as miofibrilas, conectam-se à troponina causando uma mudança conformacional na tropomiosina, esta reação expõe sítios ativos no filamento de actina que são capazes de se conectar nas protuberâncias do filamento de miosina. A conexão entre a actina e a miosina forma pontes cruzadas que causam um deslizamento entre os filamentos. A contração muscular é resultado do encurtamento dos sarcômeros devido a este deslizamento.

Os sarcômeros e retículos sarcoplasmáticos presentes no músculo cardíaco não são tão desenvolvidos como o dos músculos esqueléticos e a contração depende também da entrada do cálcio presente no meio extracelular.

O cálcio penetra na região mais profunda das fibras por meio dos túbulos transversos, que no músculo cardíaco são cinco vezes maiores, com um volume 25 vezes maior do que no músculo esquelético e possuem mucopolissacarídeos que fixam cálcio em abundância.

Assim, um segundo efeito dos potenciais de ação que se propagaram nos túbulos transversos é a abertura de canais de cálcio, permitindo que grande quantidade de íons Ca^{2+} presentes no fluido extracelular dos túbulos passe para o interior do sarcoplasma.

Ao final do platô de potencial (Figura 2) a entrada de cálcio do meio extracelular é rapidamente interrompida e a retirada do cálcio do sarcoplasma é realizada pelo trocador de sódio-cálcio que bombeia o íon para os túbulos T e pela Ca-ATPase de retículo sarco-endoplasmático (SERCA) que recapta o cálcio para o retículo sarcoplasmático. Consequentemente as pontes cruzadas são rompidas e ocorre relaxamento do músculo até a ocorrência de um novo potencial de ação.

Os eventos descritos pelo acoplamento excitação-contração podem ser relacionados com o perfil do transiente de cálcio, que representa uma variação transitória da concentração de cálcio intracelular de um valor de repouso até um pico de concentração, com retorno característico ao valor de repouso ao fim do relaxamento (Figura 6).

A primeira fase do transiente de cálcio corresponde ao aumento rápido da concentração do cálcio intracelular devido principalmente à liberação dos estoques de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático, desencadeada pela entrada de cálcio através de canais do sarcolema abertos em resposta ao potencial de ação. A segunda fase do transiente correspondente à retirada do cálcio do sarcoplasma pela SERCA e pelo NCX e resulta em um decaimento exponencial da concentração de Ca^{2+} .

Em situações patológicas, como a insuficiência cardíaca existem alterações na expressão de proteínas importantes para o acoplamento excitação-contração como SERCA, RyR e NCX que afetam diretamente a capacidade contrátil do músculo cardíaco [32], [33]. A Figura 7 ilustra a expressão destas proteínas em amostras de miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca antes e depois do uso de dispositivos de assistência ventricular, quando apresentaram melhora da função cardíaca [34].

Figura 7: Alterações na expressão de proteínas relacionadas a regulação do cálcio no acoplamento excitação-contração.

Quantidade de mRNA relacionado a expressão de SERCA, RyR e NCX de pacientes com insuficiência cardíaca antes e depois do uso do DAV . Fonte: [35].

Estas alterações na contratilidade representadas pela variação na expressão das proteínas que regulam o ciclo do cálcio também podem ser observadas a partir de alterações no perfil dos transientes de cálcio.

3.3. PRINCÍPIOS DA FLUORESCÊNCIA

Fluorescência e fosforescência são casos particulares de luminescência em que uma molécula, ao absorver a energia de um fóton, passa do estado fundamental para o estado excitado. Como este estado é instável, ocorre a emissão de fótons menos energéticos que acompanha a relaxação da espécie, a chamada fotoluminescência que é um dos possíveis efeitos físicos resultantes da interação da luz com a matéria. As informações apresentadas neste tópico tem como base o livro "Molecular Fluorescence: Principles and Applications" de Bernard Valeur [36].

A luminescência é o fenômeno da emissão de fótons com energias entre o espectro ultravioleta e o infravermelho de uma espécie excitada eletronicamente. A palavra luminescência foi introduzida pelo físico Eilhardt Wiedemann em 1888, para descrever "todos esses fenômenos de luz que não são apenas condicionados pelo aumento da temperatura" em referência ao fenômeno da incandescência.

A molécula excitada pela absorção de um fóton pode retornar ao estado fundamental pelo fenômeno da fluorescência. São possíveis também outras vias

para relaxação, como conversão interna, cruzamento intersistemas, transferência de carga intramolecular, mudança conformacional e interações no estado excitado com outras moléculas.

As vias de relaxação e os fenômenos de transferência energética costumam ser didaticamente representados a partir do Diagrama de Perrin–Jablonski (Figura 8) que apresenta os níveis energéticos correspondentes aos níveis singletos (o fundamental (S_0), primeiro (S_1) e segundo (S_2) estados eletrônicos excitados) e aos estados excitados tripletos (primeiro (T_1) e segundo (T_2) tripletos). Cada um destes estados tem estados vibracionais associados representados por linhas horizontais mais finas. No diagrama, as transições eletrônicas são representadas pelas setas verticais, as transições radiativas são representadas por linhas retas e as transições provocadas por mecanismos não radiativos são representadas por ondulações.

A maioria das moléculas em equilíbrio termodinâmico encontra-se no nível energético fundamental S_0 . A absorção de um fóton pode levar a molécula a algum dos níveis vibracionais dos estados singletos excitados, em seguida a molécula retorna ao estado fundamental por diversos processos de relaxação que podem ser radiativos ou não radiativos.

Figura 8: Diagrama de Perrin–Jablonski.

São apresentados os estados singlete e tripleto, os estados vibracionais e as vias de absorção, relaxação e transferência energética em espécies excitadas. Fonte: [36].

A fluorescência é um processo de relaxação eletrônica que leva a molécula do estado vibracional mais baixo do primeiro singlete excitado para o nível energético

fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$) através da emissão de fótons. O espectro de emissão é independente do comprimento de onda de excitação porque depois de excitada a nuvem eletrônica relaxa por processos radiativos até o nível S_1 e finalmente retorna a S_0 .

O espectro de fluorescência (Figura 9) é um gráfico de intensidade em função do comprimento de onda em que são mostrados o espectro de absorção e de emissão da molécula fluorescente. O espectro de emissão está localizado em comprimentos de onda maiores do que o espectro de absorção porque o elétron excitado perde energia devido ao relaxamento vibracional e quando retorna para o estado fundamental emite um fóton com menor energia do que o fóton absorvido, ou seja, com comprimento de onda maior. De acordo com a Regra de Stokes, o comprimento de onda de uma emissão de fluorescência deve ser sempre superior ao da absorção.

Figura 9: Espectro de fluorescência do Fluo-4 AM

Espectro de excitação/absorção (linha tracejada) e de emissão (linha contínua com preenchimento) da molécula fluorescente do indicador de cálcio citoplasmático Fluo-4 AM. Fonte: [37]

No entanto, para a maioria dos casos, o espectro de excitação sobrepõe parcialmente o espectro de emissão como acontece para o Fluo-4 AM (Figura 9). Uma fração de luz é emitida em comprimentos de onda mais curtos do que a luz absorvida. Embora esta observação pareça contrariar o princípio da conservação da energia, na temperatura ambiente uma pequena fração de moléculas está em um nível vibracional superior ao nível 0 do estado fundamental e do estado excitado.

Estas moléculas são responsáveis pela sobreposição. A Regra de Stokes é completamente válida e pode ser observada sem interferências em temperaturas baixas.

A excitação eletrônica não altera significativamente a geometria dos núcleos e consequentemente o espaçamento dos níveis energéticos vibracionais é similar. Assim o espectro de emissão ($S_1 \rightarrow S_0$) é normalmente uma imagem espelho do espectro de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$). O intervalo entre o máximo da primeira banda de excitação e o máximo de emissão é chamado de Desvio de Stokes.

A emissão e a absorção de fótons são igualmente rápidas, porém as moléculas excitadas permanecem no estado S_1 por tempos entre dezenas de picosegundos e centenas de nanosegundos antes de emitir um fóton ou passar por outros processos de relaxação. Assim, após a excitação de uma população de moléculas por um pulso de luz curto, a intensidade de fluorescência diminui exponencialmente com um tempo característico, refletindo a vida útil média das moléculas no estado excitado S_1 .

O registro desse decaimento em sistemas rápidos de captação permite obter a resposta da “Fluorescência Resolvida no Tempo” (do inglês *time-resolved fluorescence*). Sistemas mais simples realizam medição da fluorescência em estado estacionário com iluminação e observação constantes. O estado estacionário é alcançado quase imediatamente após a excitação da amostra e a observação reflete a média da intensidade de decaimento do fenômeno resolvido no tempo.

A fluorescência é uma ferramenta versátil de investigação da estrutura e dinâmica da matéria e dos sistemas vivos. O sinal fluorescente está relacionado ao microambiente da molécula emissora e fornece informação espacial e temporal. Além disso, as técnicas fluorométricas têm evoluído com o surgimento de sistemas de captação de fótons de alta sensibilidade e de indicadores fluorescentes com níveis de emissão elevados.

3.4. INDICADOR FLUORESCENTE FLUO-4

O Fluo-4 é um indicador de cálcio análogo ao Fluo-3 em que dois ligantes de cloro são substituídos por flúor (Figura 10), resultando em maior excitação de fluorescência a 488 nm e consequentemente maiores níveis de sinal de fluorescência emitidos em 506 nm.

Células vivas podem ser marcadas com as formas de éster acetoximetil (AM) do indicador adicionando o fluoróforo em solução diretamente nas placas ou discos contendo as amostras. Esses indicadores são úteis para microscopia confocal de fluorescência, citometria de fluxo e aplicações de triagem de microplacas.

Figura 10: Molécula do indicador de cálcio citoplasmático Fluo-4 AM.

Fonte: [37].

O Fluo-4 AM esterificado (inativo) é capaz de atravessar a membrana celular e é ativado no interior da célula após ser desesterificado. A forma ativa do indicador torna-se fluorescente após ligar-se ao cálcio ionizado intracelular (Figura 11).

Figura 11: Mecanismo de ativação do indicador fluorescente Fluo-4 AM a partir da desesterificação.

O indicador esterificado e inativo é permeável à membrana celular, após ser internalizado ele passa para forma ativa por ação de esterases que promovem a desesterificação dos ésteres acetoximetil (AM). O indicador torna-se fluorescente quando se liga ao cálcio ionizado presente no citoplasma da célula. Fonte: Modificado de [38].

O Fluo-4 AM permite acompanhar variações rápidas na intensidade de fluorescência do cálcio intracelular de culturas de células cardíacas. Quando reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático são liberadas no citoplasma ocorre um aumento da intensidade de fluorescência devido à elevação da concentração de cálcio ionizado intracelular na presença do indicador ativado.

A marcação é específica no citoplasma, pois a desesterificação do ester acetoximetil é realizada apenas no interior das células. Além disso, a utilização de inibidores de transportadores de ânions orgânicos na preparação das soluções de leitura e marcação de fluorescência reduz a difusão do indicador na forma ativa para o exterior das células. Desta forma, os sinais e as imagens de fluorescência obtidas com o Fluo-4 AM apresentam baixa intensidade de fluorescência no meio extracelular e alta intensidade na presença de cálcio ionizado no meio intracelular, como mostrado na Figura 12.

Figura 12: Cardiomiócitos marcados com o indicador Fluo-4 AM.

Cardiomiócitos derivados de células-tronco plaqueados na densidade de 6×10^4 células/cm² observados em um microscópio de fluorescência. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5. APLICAÇÕES DOS HIPSC-CM

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC – do inglês *induced pluripotent stem cells*) foram descritas na literatura pela primeira vez em 2007 [39] [40], a descoberta rendeu a Shinya Yamanaka o prêmio Nobel de Medicina em 2012. Estas células são utilizadas em modelos para estudos *in vitro* em diversas áreas (Figura 13) devido ao potencial de se diferenciarem em vários tipos celulares específicos [41].

Figura 13: Potencial de diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas humanas.

As iPSC humanas foram diferenciadas em adipócitos, cardiomiócitos, células hematopoiéticas primitivas, células beta pancreáticas e células neuronais. Fonte: Adaptada de [41].

Os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CM) são amplamente estudados [42] e aplicados na criação de modelos de doenças cardiovasculares [43]. Além disso, a obtenção de células específicas de determinado paciente cria oportunidades para avaliação personalizada de drogas e abordagens regenerativas para medicina de precisão [44] [45].

Os hiPSC-CM exibem muitas das características dos miócitos cardíacos nativos, incluindo canais iônicos, receptores, transportadores, atividade contrátil, organização como sincício e respostas eletrofisiológicas e bioquímicas após a exposição a estímulos ambientais [46], [47]. Múltiplos canais iônicos dependentes de variações no potencial de membrana estão igualmente presentes em hiPSC-CM e cardiomiócitos adultos, permitindo que os hiPSC-CM apresentem potenciais de ação característicos de potenciais cardíacos [19]. Além disso, a caracterização de transientes espontâneos de cálcio em hiPSC-CMs sugere a presença de acoplamento excitação-contração funcional que se assemelha ao do miocárdio nativo [11]. A entrada de cálcio através dos canais de cálcio tipo-L em resposta a despolarização da membrana desencadeia uma liberação das reservas de cálcio do RS através dos receptores de rianodina (RYRs), como descrito pelo fenômeno CICR [48].

Os hiPSC-CM também apresentam características específicas que os diferem do miocárdio nativo, como um RS pouco desenvolvido e a menor presença de túbulos T, o que provavelmente afeta suas propriedades de regulação de cálcio [49].

Além disso, os hiPSC-CM exibem automaticidade contrátil espontânea, que não é observada em miócitos ventriculares saudáveis [50].

Na prática, embora os hiPSC-CM possuam algumas características diferentes de cardiomiócitos adultos, eles oferecem várias vantagens em relação aos modelos *in vitro* atuais, como linhagem de células imortalizadas, tecido cadavérico humano e culturas primárias de origem animal. Primeiramente, os hiPSC-CM são de origem humana, facilitando a translação de resultados das pesquisas e não há questões éticas relevantes para a obtenção destas células que é feita de forma minimamente invasiva tipicamente através de biópsias de pele ou de amostras de sangue. Os hiPSC-CMs preservam o genoma de um indivíduo, permitindo a avaliação das associações genotipo-fenótipo [17].

A origem de muitas das diferenças entre os hiPSC-CM e o cardiomiócitos adultos vem do caráter imaturo dos hiPSC-CM. Em algumas aplicações esta imaturidade é desejada. As células imaturas são potencialmente mais adequadas para aplicações de terapia celular e transplante de células, já que podem se tornar maduras após a integração no miocárdio hospedeiro, como recentemente observado para os cardiomiócitos derivados de células estaminais embrionárias [51], enquanto os cardiomiócitos adultos não sobrevivem ao transplante [52]. No entanto, para várias outras aplicações é interessante uso de células com um fenótipo mais semelhante ao dos cardiomiócitos adultos, isso vem sendo alcançado a partir de técnicas de maturação dos hiPSC-CM [53].

A maturação de cardiomiócitos *in vivo* é regulada por diversos fatores, incluindo vias de interações topográficas e de adesão [54], elétricas, mecânicas [55], bioquímicas e célula-célula [56]. Mimetizar estes fatores *in vitro* é um desafio atual da engenharia de tecidos e esforços recentes têm focado na utilização de estimulação elétrica ou mecânica para promover a maturação eletrofisiológica [57]. hiPSC-CM cultivados sobre substratos com micro-topografias apresentaram melhor regulação do cálcio e a liberação de cálcio do RS em resposta à cafeína foi mais organizada, sugerindo que as propriedades de regulação do cálcio do RS e a maturidade das células podem ser influenciadas por condições de cultura [58].

As publicações envolvendo hiPSC-CM tornam evidentes o potencial deste modelo celular para uma série de aplicações em terapia e pesquisa na área da cardiologia. A Figura 14 ilustra as aplicações já relatadas na literatura e as perspectivas futuras com base em estudos recentes.

Figura 14: Aplicações possíveis dos hiPSC-CM.

hiPSC-CM já mostram resultados promissores em medicina regenerativa, na criação de modelos de doenças e estudos farmacológicos. O aprimoramento do estado de maturação das células pode permitir aplicações terapêuticas melhoradas. Conforme forem desenvolvidos métodos para gerar cardiomiócitos de diferentes estágios de maturação será possível obter informações importantes sobre o desenvolvimento cardíaco humano. Fonte: adaptada de [53].

Essas células foram aplicadas em estudos de doenças cardiovasculares hereditárias e adquiridas, doenças infecciosas, desenvolvimento cardiovascular, descoberta de drogas, terapia celular personalizada [17], avaliação de cardiotoxicidade [59] e triagem de drogas [20], [27]. Em relação à avaliação de drogas as perspectivas são promissoras no desenvolvimento de aplicações e sistemas para avaliação personalizada, já que diferentes indivíduos podem ter respostas distintas a um medicamento específico [53].

O uso dos hiPSC-CM avança em paralelo com o desenvolvimento de métodos e instrumentação que viabilizam as aplicações citadas. Neste trabalho um sistema de estimulação e um método que permite medições ópticas de variações dinâmicas do Ca^{2+} intracelular foram desenvolvidos e permitiram estabelecer uma nova abordagem para estudo das propriedades do acoplamento excitação-contração de hiPSC-CM e para avaliação de alto rendimento do efeito de drogas.

3.6. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO CÁLCIO INTRACELULAR

A contração em células cardíacas é regulada pelas variações na concentração do cálcio intracelular [60] e estudos da dinâmica espaço-temporal do cálcio [61] utilizam-se frequentemente de indicadores fluorescentes sensíveis ao Ca^{2+} presente no citoplasma dos cardiomiócitos [61].

A medição da fluorescência do cálcio intracelular é feita com o auxílio de vários tipos de equipamentos. Microscópios confocais registram imagens de fluorescência com taxas de aquisição de frações de segundos que permitem estudar transientes de cálcio. Estes sistemas permitem estudar células isoladas ou pequenas regiões de interesse (ROI – do inglês *region of interest*) contendo grupos de células [62]. Lax et al. utilizou esta técnica para estudar fluxos de cálcio em mioblastos H9c2 (2-1), Sharma et al. avaliou hiPSC-CM como modelos de miocardite viral e Dittami et al. estudou transientes de cálcio em cardiomiócitos de ratos neonatos [63], [64].

Sistemas de mapeamento óptico construídos utilizando filtros ópticos e câmeras CCD (*charge-coupled device*) foram utilizados por Efimov et al. para avaliação do cálcio intracelular em corações de ratos perfundidos com um sistema de Langendorff [65] e Askar et al. utilizou um sistema semelhante adaptado para microplacas de cultura e avaliou a propagação de ondas de contração e transientes de cálcio em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos [66].

Microscópios de fluorescência com câmeras para aquisição rápida de imagens de fluorescência (50 – 1000 frames por segundo) foram utilizados por Pogwizd et al. para estudar a origem de arritmias e fatores associados a disfunção cardíaca em miócitos isolados obtidos de coelhos [33] e por Hwang et al. para comparar a dinâmica do cálcio de hiPSC-CM obtidos em diferentes laboratórios dos Estados Unidos [18].

Outros métodos menos comuns também são descritos na literatura. Variações no nível do cálcio intracelular em suspensões de mioblastos H9c2 (2-1) tratados com soro fetal e diferentes concentrações de cálcio extracelular foram avaliados utilizando um espectrofluorímetro [67].

Aplicações relacionadas com testes de drogas demandam métodos de alto rendimento, Bedut et al. utilizou um sistema de imagem de alto rendimento para estudar o efeito de drogas no potencial de ação e na regulação do cálcio de hiPSC-

CM [3]. Sirenko et al. estudou cardiotoxicidade em hiPSC-CM utilizando um sistema semelhante para avaliação de drogas (Figura 15A) registrando o cálcio intracelular por fluorescência em microplacas de cultura de 96 e 384 [27].

A partir da revisão da literatura é possível verificar que os microscópios confocais e de fluorescência têm sido tradicionalmente utilizados para avaliação do cálcio intracelular em cardiomiócitos [18]. Estes métodos permitem estudar células isoladas sob estimulação elétrica, mecânica ou química e existem sistemas comerciais específicos para avaliação de transientes de cálcio que já incluem softwares de processamento (IonWizard, IonOptix, Massachusetts, EUA) para obtenção de parâmetros a partir dos sinais medidos.

Os métodos de microscopia são bem estabelecidos, porém a análise de células isoladas é um procedimento trabalhoso e de baixo rendimento. A demanda por métodos mais rápidos resultou no desenvolvimento de sistemas especiais de imagem de alto rendimento capazes de medir simultaneamente o cálcio intracelular de todas as amostras presentes em placas de culturas de 96, 384 e 1536 poços [3] [27]. Tais equipamentos têm um custo elevado que somente justifica seu uso em laboratórios especializados em triagem de drogas.

Figura 15: Sistemas utilizados para avaliação do cálcio intracelular.

Equipamentos comerciais para avaliação do cálcio intracelular por fluorescência: (A) Sistema FLIPR Tetra de alto rendimento. (B) Microscópio de Fluorescência da IonOptix para avaliação de força de contração e de transientes de cálcio. (C) Fluostar Omega utilizado para desenvolvimento do método descrito no trabalho. Fonte: Adaptado de [68] [69]

Os leitores de ELISA multimodo (Figura 15C) não costumam ser utilizados para avaliação de cálcio intracelular, porém são capazes de medir fluorescência de modo automatizado em amostras presentes em placas de cultura e são equipamentos extremamente comuns em laboratórios de análises clínicas e laboratórios de pesquisa que trabalhem com culturas de células. Comparados com os microscópios de fluorescência, eles possuem menor sensibilidade e, portanto, não podem ser utilizados para estudos em células isoladas. No entanto, são capazes de medir fluorescência global de uma cultura contendo milhares de células e podem analisar várias amostras em poucos minutos. Em comparação com os sistemas especiais de alto rendimento, eles registram a fluorescência global das culturas de células presentes nos poços das placas de cultura sequencialmente e sem a capacidade de discriminação de regiões de interesse específicas.

A partir destas características é possível vislumbrar o potencial do uso de leitores de ELISA multimodo para avaliação de alto rendimento de transientes de cálcio intracelular em culturas de cardiomiócitos. Até o momento, nenhum outro grupo de pesquisa publicou um método que faça uso destes equipamentos para caracterização de transientes de cálcio com aplicação em testes de drogas, provavelmente devido a limitações técnicas do equipamento a serem superadas:

- (i) baixa sensibilidade para medir transientes de cálcio de células específicas ou regiões de interesse da cultura;
- (ii) medição um valor único de intensidade de fluorescência que representa toda a cultura de células do poço; e
- (iii) ausência de ferramentas para processamento dos sinais medidos e cálculo dos parâmetros de perfil dos transientes de cálcio no software do equipamento.

Na prática, a única forma de medir transientes de cálcio com leitores de ELISA multimodo é avaliar culturas contendo uma quantidade elevada de células e apresentando atividade contrátil sincronizada. Nesta situação, o sinal gerado pelas células individualmente será somado em fase, resultando em transientes de intensidade alta o suficiente para serem medidos pelo equipamento. Caso a atividade contrátil não esteja sincronizada, no instante da medida as células estarão em momentos diferentes do ciclo de contração e os transientes de cálcio individuais não estarão em fase, resultando em um sinal com um perfil que não corresponde a

um transiente de cálcio global e não pode ser utilizado para cálculo de parâmetros que caracterizem a contratilidade da cultura de células.

Viabilizar esta aplicação exige o desenvolvimento de instrumentação, estabelecimento de protocolos de preparação das amostras e ferramentas específicas para análise dos dados. A abordagem apresentada neste trabalho diferencia-se das atualmente utilizadas ao incluir um sistema de estimulação elétrica em um leitor de ELISA (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha), o que viabiliza o desenvolvimento de um método de alto rendimento para registro de transientes de cálcio intracelular de culturas de hiPSC-CM e obtenção parâmetros úteis na caracterização da contratilidade e na avaliação do efeito de drogas, utilizando um equipamento não específico para aquisição dos sinais de fluorescência.

3.7. O LEITOR DE PLACAS FLUOSTAR OMEGA

O FLUOstar Omega é um leitor de ELISA multimodo que pode realizar ensaios de luminescência, absorvância e fluorescência em grande quantidade de amostras de forma automática. As informações gráficas e tabelas com a intensidade de fluorescência fornecidas pelo equipamento podem ser utilizadas para análise contínua de eventos dinâmicos que representam a atividade global medida nas amostras, por exemplo, alterações no fluxo de cálcio intracelular. O equipamento é capaz de fazer medidas rápidas ao longo de intervalos de tempo definidos, a máxima taxa de aquisição é de 25 Hz, sendo possível medir até 1000 pontos consecutivos por poço da microplaca. Assim, é possível fazer um registro de até 40 segundos de duração para avaliar variações na intensidade de fluorescência do cálcio intracelular de cultura de células presente em cada poço da microplaca. Além disso, o equipamento possui um sistema de injeção de reagentes que permite adicionar drogas no poço em análise durante o registro da fluorescência.

Os sinais foram medidos utilizando filtro de excitação de 488 nm e filtro de emissão de 520 nm e as amostras foram plaqueadas em microplacas de poliestireno preto com baixa intensidade de fluorescência de fundo.

4. METODOLOGIA

O conceito do método descrito neste trabalho é a criação um sistema automatizado de alto rendimento para avaliação do cálcio intracelular durante a estimulação elétrica e o estabelecimento dos protocolos necessários para viabilizar o registro de transientes de cálcio utilizando o sistema desenvolvido. Os sinais medidos foram empregados na caracterização da atividade contrátil das células e na avaliação do efeito de drogas no acoplamento excitação-contração em hiPSC-CM.

Nesta seção serão descritos os procedimentos de projeto e validação do sistema de estimulação e os protocolos desenvolvidos ao longo do trabalho para estimulação elétrica e medição da fluorescência do cálcio intracelular que resultaram na criação de um método sistematizado de caracterização da atividade contrátil do cardiomiócito utilizando um leitor de placas. A parte inicial do trabalho envolveu o projeto e a construção dos protótipos da instrumentação necessária para viabilizar a aplicação do conceito da estimulação elétrica e da medição da fluorescência simultaneamente no interior do FLUOstar Omega.

Figura 16: Diagrama detalhando o fluxo de trabalho para desenvolvimento e aplicação do método desenvolvido.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, conforme ilustra o diagrama de fluxo de trabalho da Figura 16, as atividades experimentais realizadas envolvendo culturas de células foram divididas em duas partes: (i) estabelecimento da metodologia; e (ii) aplicação da metodologia

em hiPSC-CM. A primeira envolve os primeiros experimentos de fluorescência com cardiomiócitos de ratos neonatos e os experimentos de estimulação e medição conjunta da fluorescência em mioblastos H9c2 (2-1). A segunda envolve a adaptação da metodologia estabelecida em mioblastos para uso em hiPSC-CM, a otimização dos protocolos e a obtenção de transientes de cálcio para caracterização da atividade contrátil das culturas de células e para avaliação do efeito de drogas no acoplamento excitação-contração. Além disso, foi desenvolvida uma rotina em MATLAB para cálculo semi-automatizado dos parâmetros dos transientes de cálcio.

4.1. PROJETO DO SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO

O sistema de estimulação concebido no trabalho é composto de um estimulador eletrônico simples e compacto que funciona com baterias e de uma microplaca de cultura de 96 poços modificada. A placa contém poços com eletrodos metálicos na base e uma região onde o circuito estimulador e as baterias podem ser posicionados sem exceder as dimensões normais de microplacas de cultura comerciais. O sistema de estimulação permite que as células sejam estimuladas durante a medição da fluorescência no FLUOstar Omega.

4.1.1. Projeto do Estimulador Eletrônico

O estimulador foi concebido considerando parâmetros de estimulação descritos na literatura para gerar respostas fisiológicas semelhantes às aquelas observadas no tecido cardíaco *in vivo* [70], [71].

Tabela 1: Características típicas dos sinais elétricos nos organismos vivos.

Parâmetros Elétricos em Ambientes Biológicos	
Condutividade elétrica do fluido extracelular (G_e)	3 - 12 mS/cm
Condutividade elétrica do meio de cultura (G_c)	15 mS/cm
Gradientes de campo elétrico dos vertebrados (E)	0,1 - 10 V/cm
Frequência (f)	0,05 - 20 Hz

Fonte: [70].

Os valores considerados para a seleção dos parâmetros de estimulação elétrica tem como base características elétricas de meios biológicos mostradas na Tabela 1.

O estimulador foi projetado utilizando um *software* de desenvolvimento de circuitos eletrônicos (Cadence Orcad, San Jose, CA, EUA) e pode ser dividido em: (i) gerador de clock; (ii) detector de bordas; e (iii) estágio de saída. Desta forma é possível ajustar independentemente a frequência e a duração dos pulsos de estímulo. Um esquema dos elementos funcionais do circuito de estimulação é ilustrado na Figura 17.

Figura 17: Estrutura do circuito estimulador projetado

O circuito estimulador é formado por três elementos funcionais, um oscilador, um detector de bordas e um estágio de saída para amplificação de corrente. Fonte: Elaborada pelo autor

O circuito oscilador foi projetado utilizando uma *NAND schmitt trigger* (CD4093BC, Fairchild, Sunnyvale, CA, EUA), um resistor e um capacitor conforme mostrado na Figura 18.

Figura 18: Esquemático do módulo oscilador do circuito de estimulação.

Fonte: Elaborada pelo autor

A frequência dos pulsos gerados é determinada pelos tempos de carga e descarga do capacitor. O sinal de controle é mantido sempre conectado à alimentação do circuito (V_{cc} – nível lógico “1”) e o capacitor encontra-se inicialmente descarregado (nível lógico “0”). Desta forma, o valor de tensão de saída (V_{out}) será V_{cc} (nível lógico “1”), resultando no carregamento do capacitor. Com o capacitor carregado, as duas entradas da porta NAND passam a estar no nível lógico “1”,

consequentemente V_{out} passa para o nível lógico “0”, que corresponde à tensão nula. Assim, o capacitor se descarrega através do resistor e o nível lógico em uma das entradas da porta NAND retorna para o nível lógico “0”, reiniciando o ciclo.

Figura 19: Formas de onda da tensão no capacitor e da tensão de saída do oscilador.

A tensão no capacitor é representada pela curva vermelha (V_{C1}) e a tensão de saída (V_{out}) é representada pela curva azul (V_{R1}). Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 19 mostra as curvas das tensões medidas no capacitor e na saída do oscilador em simulações realizadas com o Cadence Orcad nas quais é possível identificar os intervalos de tempo de descarga inicial (t_0), carga (t_1) e descarga (t_2) do capacitor que definem a frequência do sinal gerado. A duração dos ciclos de carga e descarga foi calculada utilizando as equações (1), (2) e (3):

$$t_0 = RC \ln \left(\frac{V_{cc}}{V_{T-}} \right) \quad (1)$$

$$t_1 = RC \ln \left(\frac{V_{cc} - V_{T-}}{V_{cc} - V_{T+}} \right) \quad (2)$$

$$t_2 = RC \ln \left(\frac{V_{T+}}{V_{T-}} \right) \quad (3)$$

onde R é o valor da resistência, C é o valor da capacitância, V_{cc} é a tensão de alimentação do circuito integrado e V_{T+} e V_{T-} são os limiares de transição para os estados lógico “1” e “0” respectivamente. Estas fórmulas foram obtidas a partir de

informações do *datasheet* do CD4093BC e da equação (4) que determina a tensão no circuito RC (V_{RC}):

$$V_{RC} = \frac{1}{C} \int i dt + Ri \quad (4)$$

onde i é a corrente do circuito, t é o tempo e C é o valor do capacitor.

A frequência do sinal gerado pelo circuito oscilador depende da tensão de alimentação do circuito integrado e dos valores do resistor (R) e do capacitor (C), estes valores foram selecionados convenientemente de modo que a frequência pudesse ser ajustada entre 0,1 Hz e 5 Hz utilizando um *trimpot* para variar o valor da resistência.

Figura 20: Esquemático do circuito detector de bordas e formas de onda demonstrando seu funcionamento.

O circuito é formado por um resistor e um capacitor como mostra o esquema elétrico da esquerda. As formas de onda da direita mostram a tensão de entrada (V_{in}) e as tensões na porta NAND (V_{cc} , V_i e V_{out}). Fonte: Elaborada pelo autor.

O detector de bordas presente no circuito de estimulação também foi projetado a partir de uma porta NAND *schmitt trigger*. A Figura 20 mostra à esquerda o esquema elétrico do circuito e à direita as formas de onda que descrevem seu funcionamento. O capacitor C é carregado sempre que a tensão em V_{in} for nula, resultando em estado lógico “1” na entrada da porta NAND e consequentemente estado lógico “0” em V_{out} . Quando V_{in} passa para o estado lógico “1” a diferença de potencial entre V_{cc} e V_{in} é nula, ou seja, nenhuma corrente circula pelo circuito. Em contrapartida, quando V_{in} passa para o estado lógico “0”, ocorre uma descarga rápida do capacitor C , que altera o nível lógico de V_{in} para “0” e o nível lógico de V_{out} para “1”. Nesta situação, entretanto, o capacitor C também é carregado através do resistor R até atingir o valor de V_{T+} , e então o estado lógico na entrada da porta NAND passa a ser “1” e consequentemente em V_{out} passa a ser “0” novamente.

Este regime de funcionamento estabelece um circuito em que um pulso é gerado em V_{out} apenas quando a tensão V_{in} passa do estado lógico “1” para o “0” e a duração do pulso é definida pela equação (5):

$$t_p = RC \ln \left(\frac{V_{cc}}{V_{cc} - V_{T+}} \right) \quad (5)$$

O valor do capacitor (C) e do resistor (R) foram selecionados de modo que a duração dos pulsos pudesse ser escolhida entre 2 e 30 ms, utilizando um *trimpot* para variar o valor da resistência.

Conectando-se o circuito oscilador ao circuito detector de bordas, é possível gerar pulsos de estímulo com frequência e duração definidas, porém a corrente de saída da porta NAND é muito baixa para permitir a estimulação de cargas de baixa impedância, como os poços contendo solução eletrolítica nos quais as células são mantidas em cultura.

Assim, um estágio de saída foi projetado utilizando um transistor bipolar de junção BC548 na configuração de seguidor de emissor, que apresenta uma alta impedância de entrada, uma baixa impedância de saída e um alto ganho de corrente. Nesta configuração o ganho de tensão é unitário e o perfil do sinal observado na saída do circuito de estimulação segue o perfil do sinal na base do transistor, ou seja, os pulsos de estimulação gerados na saída do detector de bordas serão gerados na saída do estágio de amplificação com a mesma tensão, porém com uma corrente adequada para permitir a estimulação de um grupo poços contendo solução eletrolítica de baixa impedância.

Após projeto e simulações, o circuito montado em *protoboard* foi testado para avaliação do funcionamento medindo-se a largura de pulso, amplitude e frequência dos sinais de estímulo com um osciloscópio (TDS460A, Tektronix, Beaverton, OR, EUA). O roteamento das conexões dos componentes foi realizado utilizando um software para projeto de circuitos (Eagle 7.2.0, Cadsoft, Pleiskirchen, Alemanha) e o conjunto em placa de circuito impresso (PCB – do inglês *printed circuit board*) foi produzido manualmente. Finalmente, o circuito em PCB foi empregado para avaliar os parâmetros do estímulo utilizando um osciloscópio TDS460A e registrando os sinais para análise posterior em um software de visualização de formas de onda (WaveStar, Tektronix, Beaverton, OR, EUA).

4.1.2. Determinação dos Parâmetros de Estimulação

A seleção adequada da amplitude e da largura do pulso de estimulação é importante para garantir a ativação sincronizada das células em cultura e ao mesmo tempo garantir a estabilidade da solução na qual as células são mantidas durante os registros de fluorescência. Estes parâmetros foram determinados em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos estimuladas eletricamente com um estimulador comercial (MyoPacer EP, IonOptix Westwood, MA, EUA). As células foram cultivadas em placas transparentes de 96 poços contendo eletrodos metálicos na base e durante a estimulação foram observadas em um microscópio óptico invertido (Eclipse TE300, Nikon, Tóquio, Japão). A cultura foi estimulada na frequência de 1 Hz, amplitude inicial de 40 V e largura de pulso inicial de 4 ms. A partir destes valores, a amplitude foi reduzida e a largura de pulso aumentada gradativamente, enquanto a presença ou ausência de contrações sincronizadas em toda a cultura era observada no microscópio. O diagrama da Figura 21 mostra detalhadamente as etapas para determinação dos limiares de captura.

Figura 21: Seleção do limiar de captura nas culturas de cardiomiócitos.

Sequência de etapas para determinação do menor limiar de captura com amplitude de estímulo mínima de 5V e largura de pulso máxima de 30ms. “Amp” corresponde ao valor da amplitude e “Lpul” ao da largura de pulso. Fonte: Elaborada pelo autor.

O objetivo deste experimento foi encontrar a menor amplitude associada a menor largura de pulso que gera contrações sincronizadas nas culturas de células. Os parâmetros encontrados foram utilizados para construção do estimulador.

4.1.3. Projeto e Avaliação dos Eletrodos

Os eletrodos foram produzidos pelo método de fusão utilizando-se fios de prata e de liga de platina-irídio com diâmetro 0,15 mm. Uma das pontas de um segmento de fio foi fundida lentamente na chama do maçarico conectado a cilindros de oxigênio-acetileno até que se formasse uma esfera. Foram confeccionados eletrodos com diâmetros de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,2 mm.

Figura 22: Processo de produção dos eletrodos por fusão dos fios de prata e de liga de platina-irídio

(A) Fusão dos fios e formação do microeletrodo esférico. (B) Esfera na ponta da pinça. (C) Avaliação dimensional da esfera. Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 22 mostra o processo de confecção dos eletrodos. O comprimento de fio necessário para criar uma esfera com um diâmetro específico foi estimado a partir das fórmulas do volume do cilindro e da esfera. Igualando os volumes, é possível determinar o comprimento (h) de fio necessário para produzir a esfera adequada, após a fundição, conforme a equação (5):

$$h = \frac{4}{3} \frac{(r_{esfera})^3}{(r_{fio})^2} \quad (6)$$

A avaliação dos eletrodos foi realizada utilizando um osciloscópio (TDS460A, Tektronix, Beaverton, OR, EUA) e um sistema de estimulação comercial (MyoPacer

EP, IonOptix Westwood, MA, EUA) conforme a montagem experimental ilustrada na Figura 23. Os eletrodos produzidos foram imersos em uma solução de tampão fosfato salino e conectados ao estimulador configurado para gerar pulsos quadrados monofásicos com duração de 5 ms, frequência de 1 Hz e amplitude de 9 V (V_{estim}). A ponta de prova do osciloscópio foi posicionada no centro do poço para medição da tensão elétrica ($V_{poço}$).

Figura 23: Montagem experimental utilizada para avaliar a transferência de carga dos eletrodos metálicos confeccionados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A razão entre a tensão medida no interior do poço e a tensão de saída do estimulador ($V_{poço}/V_{estim}$) foi utilizada para medir a transferência de carga para a solução e o material com maior capacidade de transferência de carga foi selecionado para confecção dos eletrodos utilizados na montagem do sistema de estimulação.

4.1.4. Projeto da Microplaca de Estimulação

No projeto da microplaca de estimulação foram definidos o posicionamento do circuito estimulador e dos furos para colocação de eletrodos considerando as restrições dimensionais (128 mm x 86 mm x 13 mm) de placas de cultura de 96 poços comerciais (CulturPlate Black, PerkinElmer, Massachusetts, EUA) a partir de desenhos mecânicos realizados em um software de projeto (Visio 2010, Microsoft, Washington, EUA). A microplaca modificada mantém a mesma dimensão de uma microplaca comum para ser utilizada em qualquer leitor de microplacas comercial.

Microplacas comerciais de 96 poços pretas (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) e transparentes (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) foram utilizadas para construção da microplaca de estimulação. A partir do projeto mecânico da peça, uma

máquina CNC (controle numérico computadorizado) foi programada e realizou a remoção de 54 poços da região central da microplaca para abrigar o circuito de estimulação e as baterias. Em seguida a peça foi virada e foram feitos orifícios na base de 16 poços para colocação de eletrodos, a área de cultura dos poços da placa é de 0,3 cm².

A máquina CNC também foi utilizada para confecção de um módulo metálico de cobre montado na base dos poços contendo eletrodos para dar sustentação mecânica e fazer a conexão elétrica com o circuito estimulador. Durante o projeto da microplaca diferentes estratégias de montagem e de conexão da fiação foram estudadas de modo a evitar a ruptura dos fios dos eletrodos devido a movimentação mecânica durante o uso do sistema de estimulação.

4.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO CÁLCIO

Durante o desenvolvimento do método foram utilizadas culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos (Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, São Paulo, Brasil) e culturas de mioblastos cardíacos de linhagem H9c2 (2-1) (*American Type Culture Collection*, Virgínia, EUA). Os meios e demais materiais utilizados nas culturas foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e foram seguidos os protocolos de cultura celular desenvolvidos no Laboratório de Bioengenharia do InCor.

4.2.1. Fluorescência em Cardiomiócitos de Ratos Neonatos

O principal objetivo dos experimentos com cardiomiócitos de ratos neonatos foi validar a capacidade do FLUOstar Omega de medir variações no cálcio intracelular de culturas de células contráteis. Os cardiomiócitos de ratos neonatos podem apresentar contrações espontâneas em cultura e por esta razão representam um modelo que permite avaliar o perfil dos sinais de fluorescência obtidos em culturas de células que não necessariamente apresentam atividade sincronizada. Nenhum tipo de estimulação elétrica foi utilizada nesta etapa.

As culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos foram plaqueadas na densidade de $1,3 \times 10^4$ células/cm² em microplacas de 96 poços pretas previamente tratadas com laminina por 2 horas e foram mantidas em meio DMEM

com 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina na incubadora com 5% de CO₂ a 37°C por 1 semana com trocas de meio a cada 2-3 dias.

A marcação com indicador fluorescente foi realizada utilizando o Fluo-4 NW *Calcium Assay Kit* (Life Technologies, Califórnia, EUA). Resumidamente, adicionou-se 10 ml do tampão fornecido e 100 µL de Probenecid ao frasco contendo o fluoróforo liofilizado. O meio de cultura das células foi removido e foram adicionados 90 µL de solução de marcação em cada poço. As células foram incubadas a 37°C com 5% CO₂ por 45 minutos.

As soluções de leitura e de marcação foram adicionadas em três poços sem células que foram utilizados para estimar o valor de fluorescência de fundo do material da placa e verificar a qualidade da marcação. Estes poços foram tratados exatamente como os poços contendo cardiomiócitos durante o procedimento de cultura e medição da fluorescência e representam os controles negativos do experimento.

Após a incubação, a intensidade de fluorescência foi registrada continuamente durante 40 segundos em cada poço com frequência de amostragem de 25 Hz a 37 °C utilizando o FLUOstar Omega.

Os sinais medidos foram apresentados em unidades relativas de fluorescência, sem normalização. Para eliminação do ruído, eles foram processados utilizando um filtro de média móvel de 30 pontos e o perfil das variações espontâneas do cálcio intracelular das amostras estudadas foi categorizado qualitativamente conforme a ritmicidade e a presença ou ausência de transientes de cálcio.

4.2.2. Validação do Método

A principal inovação do método proposto no trabalho é a possibilidade de controlar a atividade contrátil de culturas de células durante avaliação do cálcio intracelular em sistemas de alto rendimento através da estimulação elétrica.

Para os sistemas de baixo rendimento, como os microscópios de fluorescência, é comum encontrar no mercado estimuladores elétricos e câmaras de perfusão especiais para avaliação de fluorescência em células sob estimulação elétrica. No caso dos leitores de ELISA e dos sistemas de imagem de alto

rendimento esta abordagem não é trivial, pois não existem na literatura sistemas ou protocolos pra estimulação elétrica em leitores de placa.

Os experimentos de validação do método tiveram como objetivo estabelecer os protocolos de estimulação e de marcação com indicador de cálcio de modo a garantir: (i) a seleção adequada dos parâmetros de estimulação e da solução de manutenção das células durante a medição da fluorescência; (ii) a detecção de alterações no cálcio intracelular induzidas pela estimulação elétrica; e (iii) a ausência da formação de bolhas e de morte celular.

Os mioblastos H9c2 (2-1) utilizados nos experimentos são uma linhagem de células embrionárias de ratos que se diferenciam para formar miotubos e dão origem aos músculos esqueléticos [72]. As células H9c2 (2-1) foram utilizadas como modelo celular, pois expressam canais do tipo-L com características cardíacas específicas e possuem propriedades eletrofisiológicas semelhantes às dos cardiomiócitos neonatos embora não apresentem contrações [73] [74] [75].

As células foram cultivadas no laboratório em garrafas T75 com meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina na incubadora (5% de CO₂ a 37°C) até atingirem aproximadamente 80% de confluência. As células foram coletadas e plaqueadas na densidade de $3,3 \times 10^4$ células/cm² (aproximadamente 10 mil células por poço) em microplacas de 96 poços modificadas contendo eletrodos para estimulação elétrica. Em seguida, as células foram incubadas por 24h a 37°C com 5% de CO₂ antes da realização dos experimentos.

O protocolo de marcação com o indicador fluorescente considerou informações do fabricante [76] [77], a solução de marcação para avaliação da fluorescência foi preparada em PBS (Phosphate-buffered saline). Resumidamente, o meio de cultura nos poços foi aspirado e 100 µL da solução de marcação contendo 5,0 µM de Fluo-4 AM, 0,02% de detergente não-iônico Pluronic-F127 e 2,5 mM de Probenecid (inibidor de transporte de ânions orgânicos) foi adicionada em cada poço. As microplacas de cultura foram incubadas por 60 minutos a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, a solução foi aspirada e as células foram incubadas em 95 µL de solução de leitura contendo 2,5 mM de Probenecid durante 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂ para permitir a desesterificação dos ésteres AM.

As amostras presentes na microplaca foram divididas em dois grupos: estimuladas (plaqueadas em poços com eletrodos) e não estimuladas (plaqueadas

em poços sem modificação). As soluções de leitura e de marcação foram adicionadas em três poços sem células que foram utilizados para estimar o valor de fluorescência de fundo e verificar a qualidade da marcação.

Durante a medição de fluorescência foram registradas variações no cálcio intracelular a 25 °C e as células plaqueadas nos poços com eletrodos foram estimuladas na frequência de 1,0 Hz, amplitude de campo elétrico de 8 V cm⁻¹ e largura de pulso de 5 ms.

O FLUOstar Omega realizou uma varredura em todas as amostras medindo a intensidade de fluorescência de cada um dos poços sequencialmente de forma rápida. O número de varreduras foi definido pela duração do experimento, a medição de cada amostra foi realizada uma vez por minuto e no intervalo de tempo entre duas medidas consecutivas no mesmo poço foi possível realizar uma medição em todos os demais poços da placa.

A intensidade de fluorescência das amostras foi registrada continuamente em três fases: pré-estimulação (10 minutos), estimulação (20 minutos) e pós-estimulação (40 minutos). Após 70 minutos de experimento, para cada amostra foi obtido um registro independente com duração de 70 minutos representando as variações na intensidade de fluorescência do cálcio intracelular no tempo.

Os sinais de fluorescência foram normalizados em relação à máxima intensidade (em RFU) obtida ao longo dos 40 minutos de avaliação e as variações da concentração de Ca²⁺ intracelular das culturas de mioblastos em poços sem estimulação foi comparada com a de culturas de células estimuladas eletricamente em poços contendo eletrodos.

4.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM CULTURAS DE CARDIOMIÓCITOS

Dada a grande importância em pesquisa dos hiPSC-CM, eles foram selecionados como modelo celular para aplicação do método propriamente dito proposto no trabalho. No entanto, por serem células contráteis de natureza distinta das células H9c2 (2-1) foi necessário adaptar os protocolos de estimulação, marcação e registro de fluorescência estabelecidos na primeira fase do trabalho para uso em culturas de hiPSC-CM. As células foram adquiridas congeladas (PluricardioTM, Pluricell Biotech, São Paulo, Brasil) e foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços modificadas contendo eletrodos para estimulação elétrica. Antes do plaqueamento, as microplacas foram tratadas com

matriz de membrana basal (Geltrex™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e incubadas durante 2 horas a 37 °C e 5% de CO₂.

Foram utilizados dois protocolos de cultura diferentes. O primeiro foi aplicado nos experimentos de adaptação da metodologia desenvolvida. Foram plaqueadas células na densidade de $6,0 \times 10^4$ células/cm² (aproximadamente 20 mil células por poço) em microplacas contendo eletrodos para estimulação elétrica imediatamente após a aspiração da matriz. As células foram incubadas durante 48 horas a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, o meio de descongelamento foi aspirado e substituído pelo meio de manutenção, no qual as células foram mantidas em incubação (37 °C e 5% CO₂) por 4 dias antes dos experimentos.

No segundo protocolo, foram plaqueadas três densidades distintas de células, $1,2 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$, $3,6 \times 10^5$ células/cm², em microplacas contendo eletrodos após a aspiração da matriz. As células também foram incubadas durante 48 horas a 37 °C e 5% CO₂ em meio de descongelamento que em seguida foi substituído pelo meio de manutenção. As culturas de hiPSC-CM permaneceram na incubadora por 20 dias e foram realizadas trocas de meio a cada 2-3 dias até a realização dos experimentos. As culturas de células nas densidades de $1,2 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$ e $3,6 \times 10^5$ células/cm² foram utilizadas para avaliar o efeito da densidade de plaqueamento nos sinais medidos. Nos experimentos de aplicação do método adaptado em culturas de hiPSC-CM e de avaliação do efeito de drogas foram utilizadas apenas culturas de células plaqueadas na densidade de $2,4 \times 10^5$ células/cm².

4.3.1. Adaptação do Método

A partir dos resultados obtidos com o estabelecimento da metodologia em mioblastos, de informações da literatura sobre a fisiologia dos hiPSC-CM [19] [11] e sobre o acoplamento excitação-contração [24] [31] foram realizadas as seguintes alterações no método aplicado nas culturas de mioblastos:

- (i) O PBS anteriormente utilizado na preparação das soluções de marcação e leitura de fluorescência foi substituído pelo HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Essa substituição é importante, pois a solução na qual os cardiomiócitos serão mantidos deve possuir cálcio para que eles possam contrair.

- (ii) O modo de leitura utilizado no FLUOstar Omega foi modificado. A medição da intensidade de fluorescência foi realizada de forma sequencial. A cabeça de leitura do equipamento permaneceu posicionada sobre o poço contendo a cultura em análise durante 40 segundos e após concluir o registro desta amostra se moveu para o poço seguinte onde realizou uma nova medição. Esse procedimento foi repetido de forma automática até que todas as amostras fossem avaliadas.
- (iii) A frequência de estimulação foi reduzida de 1,0 Hz para 0,3 Hz, pois em frequências de estimulação menores, a amplitude dos transientes de cálcio é maior [78], facilitando a detecção dos sinais.

As células foram marcadas com o indicador de cálcio citoplasmático Fluo-4 AM seguindo o mesmo protocolo utilizado em mioblastos H9c2 (2-1). Os experimentos foram realizados a uma temperatura constante de 25°C e a intensidade de fluorescência foi registrada a uma taxa de amostragem de 25 Hz. A amplitude de campo elétrico e a duração do pulso de estimulação foram mantidas (8 V cm^{-1} e 5 ms). Todos os demais experimentos com hiPSC-CM foram realizados utilizando as condições (i) e (ii).

4.3.2. Efeito da Densidade de Plaqueamento

Os experimentos de otimização do método avaliaram o efeito de diferentes densidades de plaqueamento no perfil dos transientes de cálcio intracelular medidos nas culturas de hiPSC-CM. Os valores de densidade de plaqueamento selecionados levaram em consideração os resultados obtidos nos experimentos de adaptação do método descritos no tópico anterior.

Culturas de células nas densidades de $1,2 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$, $3,6 \times 10^5$ células/cm² foram estimuladas durante a medição da fluorescência na frequência de 0,3 Hz por pulsos elétricos com amplitude de 5 ms que geram um campo elétrico de 8 V cm^{-1} .

Os transientes medidos foram comparados para identificar a densidade de plaqueamento ideal para obtenção de parâmetros que permitam caracterizar a contratilidade das culturas de células.

4.3.3. Aplicação do Método

Uma vez adaptado o método para as culturas de hiPSC-CM e selecionada a densidade de plaqueamento ideal para avaliação da contratilidade partir dos parâmetros dos transientes de cálcio, foram realizados os experimentos aplicando o método em cardiomiócitos humanos.

hiPSC-CM plaqueados na densidade de $2,4 \times 10^5$ células/cm² foram cultivados no sistema de estimulação durante 20 dias em poços comuns e em poços contendo eletrodos para estimulação elétrica. No dia do experimento, as células foram marcadas com o indicador de Ca²⁺ (Fluo-4 AM) utilizando as soluções de marcação e de leitura preparadas em HBSS, considerando os procedimentos e tempos de incubação descritos no protocolo de marcação utilizado anteriormente em mioblastos.

A intensidade de fluorescência medida nos poços controles negativos nos quais as culturas de células não foram marcadas foi comparada com a dos poços contendo células para avaliar a qualidade da marcação. Em seguida, as variações dinâmicas da [Ca²⁺] intracelular foram registradas sequencialmente em cada poço por 40 segundos utilizando o FLUOstar Omega. As medidas foram realizadas em poços com eletrodos e em poços comuns a uma temperatura constante de 25 °C e taxa de amostragem de 25 Hz.

Para verificar a hipótese de que a inclusão de um sistema de estimulação no interior do FLUOstar Omega permitiria o registro de transientes de cálcio foi inicialmente registrada a atividade espontânea das culturas de células a partir da medição da intensidade de fluorescência nos poços com e sem eletrodos na ausência da estimulação elétrica.

Em seguida o estimulador eletrônico foi ligado, ajustado para a frequência de 0,1 Hz e a intensidade de fluorescência foi medida nos poços com eletrodos. Após o registro da intensidade de fluorescência de todos os poços, o estimulador eletrônico foi desligado por 3 minutos. Após este intervalo sem estimulação, as células foram estimuladas na frequência de interesse imediatamente superior. Este procedimento foi repetido até que as células fossem estimuladas em todas as frequências de interesse (0,1 Hz; 0,2 Hz; 0,3 Hz e 0,5 Hz).

Os sinais medidos foram processados para cálculo dos parâmetros dos transientes de cálcio e o efeito das diferentes frequências de estimulação no perfil

sinais foi avaliado. A validação do conceito de estimulação elétrica e medição simultânea da fluorescência utilizando um leitor de ELISA multimodo foi realizada avaliando:

- (i) a capacidade do sistema de estimulação de estabelecer um ritmo para a atividade contrátil das células que possa ser identificado a partir dos transientes de cálcio medidos nas amostras; e
- (ii) a possibilidade determinar parâmetros a partir da morfologia dos transientes de cálcio medidos que possam ser utilizados para discutir a fisiologia das culturas de células estudadas.

4.3.4. Aplicação em Avaliação do Efeito de Drogas

As características do sistema de cultura e estimulação e dos procedimentos desenvolvidos, adaptados e validados para culturas hiPSC-CM buscaram estabelecer uma metodologia de alto rendimento adequada para pesquisas envolvendo descoberta e teste de drogas.

Para avaliar a aplicação do método na identificação do efeito de drogas no acoplamento excitação-contração cardíaco foi utilizado um bloqueador do canal de cálcio tipo-L (Verapamil, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As culturas de células foram tratadas com verapamil e os transientes de cálcio antes e depois da aplicação do fármaco foram comparados.

Para este fim, soluções concentradas em 20x de verapamil de 1 μM , 10 μM e 100 μM foram preparadas em água destilada e 5 μL foram adicionados aos poços utilizando o sistema de injeção de leitor de placas. O volume final nos poços foi de 100 μL , e as concentrações de verapamil finais foram 0,05 μM ; 0,5 μM e 5,0 μM .

A bomba de injeção foi preenchida com solução de leitura e soluções de verapamil. As culturas celulares foram separadas em 4 grupos de 3 poços (controle, 0,05 μM ; 0,5 μM e 5,0 μM). Nas culturas de células do grupo controle, a solução de leitura foi injetada para avaliar se o movimento na solução causado pela gota geraria contrações na cultura de células. Entre cada injeção com solução distinta ou concentração diferente, a bomba de injeção foi lavada três vezes com água destilada.

As culturas celulares foram estimuladas por pulsos elétricos (8 V cm^{-1} e 5 ms) a 0,1 Hz e os sinais obtidos foram utilizados para estimar a intensidade de

fluorescência em repouso. Em seguida, as culturas foram estimulados a 0,2 Hz e a intensidade de fluorescência dos mesmos poços sob estimulação elétrica contínua foi medida antes e 5 minutos após a injeção de verapamil.

Para validar a capacidade do método de identificar o efeito de drogas no acoplamento excitação-contração, a morfologia dos transientes medidos e os valores dos parâmetros calculados antes da adição da droga foram comparados com os dos transientes medidos depois da aplicação da droga. Foi verificado se as variações nos transientes de cálcio esperadas de acordo com o mecanismo de ação do verapamil ocorreram nos sinais medidos com o método desenvolvido no trabalho.

4.3.5. Rotina de Processamento dos Transientes de Cálcio

Os sistemas de avaliação de cálcio de alto-rendimento produzem volumes massivos de dados em poucos minutos e processar estas informações exige uso de softwares especializados. O volume de dados obtido com o método desenvolvido justificou o desenvolvimento de uma rotina semi-automática para processamento de transientes de cálcio. Os sinais originais foram exportados usando o software de visualização de resultados do leitor de placas (Mars Data Analysis, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) e foram processados em uma rotina em ambiente MATLAB desenvolvida no trabalho e estruturada em três etapas:

- (i) normalização dos sinais;
- (ii) segmentação do sinal e cálculo do transiente de cálcio médio; e
- (iii) cálculo dos parâmetros dos transientes de cálcio.

Os detalhes sobre o desenvolvimento e funcionamento da rotina se encontram no apêndice da tese.

Os leitores de placas registram a intensidade de fluorescência global das células dentro do poço em unidades relativas de fluorescência (RFU – do inglês *Relative Fluorescence Units*). O valor de RFU representa a intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias considerando um valor de referência que é característico do equipamento e depende do software, do sistema de detecção de fótons, dos filtros e da eletrônica do sistema. É necessário normalizar estes sinais adotando uma referência que não dependa do equipamento utilizado, para que os resultados possam ser comparados com dados da literatura. Isso costuma ser feito adotando um valor de intensidade de fluorescência que represente um

comportamento fisiológico normalmente observado nas amostras em análise, por exemplo, o nível de cálcio basal de cardiomiócitos em repouso na ausência de estimulação elétrica [79].

A primeira etapa do processamento dos sinais consiste na determinação da pseudo-razão ($\Delta F/F$) ou simplesmente razão de fluorescência. Esta forma de normalização é utilizada para indicadores que apresentam apenas um pico de excitação e um pico de emissão de fluorescência, como o Fluo-4, e permite identificar a intensidade da variação da concentração de Ca^{2+} intracelular em relação a um valor de referência. Essa razão é calculada usando a equação (7) [80]:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{(F - F_{\text{repouso}})}{(F_{\text{repouso}} - F_{\text{fundo}})}, \quad (7)$$

onde F_{repouso} é a intensidade de fluorescência de repouso e F_{fundo} é a fluorescência de fundo medida em um poço preenchido com solução, porém sem células.

Figura 24: Sequência de cálculo da razão de fluorescência a partir dos sinais medidos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de F_{repouso} foi estimado a partir do valor de fluorescência basal em RFU medido nas células estimuladas na frequência de 0,1 Hz. Nesta frequência após o decaimento exponencial do transiente de cálcio, que representa o relaxamento das células, o nível de cálcio basal é praticamente o mesmo encontrando nas culturas em repouso sem estimulação elétrica.

Conforme mostrado na Figura 24, a estimativa de F_{repouso} é feita a partir de uma versão filtrada do sinal original medido em RFU, em seguida o sinal filtrado é descartado e o cálculo da razão de fluorescência é realizado no sinal original medido. Após a normalização, a intensidade de fluorescência apresentada como $\Delta F/F$ representa a intensidade das variações na concentração de Ca^{2+} no citoplasma em relação à situação de repouso.

Na segunda etapa de processamento, ocorre a segmentação do sinal para determinação do transiente de cálcio médio que representa a atividade contrátil da cultura de células (Figura 25). O usuário marca manualmente o início e o final do primeiro transiente de cálcio como uma primeira aproximação, em seguida o algoritmo identifica a frequência de contrações, determina a duração, o início e o final de cada transiente de cálcio e realiza a segmentação do sinal medido. Cada seguimento contém um transiente de cálcio que é utilizado para cálculo do transiente de cálcio médio do registro.

Figura 25: Sequência de cálculo do transiente de cálcio médio a partir da segmentação dos transientes de cálcio presentes no sinal medido.

Fonte: Elaborada pelo autor

Finalmente a terceira etapa da rotina de processamento calcula parâmetros de perfil dos transientes a partir do transiente médio determinado na etapa anterior.

A Tabela 2 descreve e a Figura 26 ilustra os parâmetros dos transientes de cálcio calculados pela rotina de processamento: (1) inclinação máxima da fase ascendente (diff); (2) tempo até o pico (tpeak); (3) tempo de subida (rt); (4) amplitude do transiente de cálcio (amp); (5) duração em 10% do valor de pico da amplitude (pw10); (6) duração em 50% do valor de pico da amplitude (pw50); (7) tempo de decaimento de 90% a 10% do valor de pico (dct); e (8) taxa de decaimento exponencial (τ). Além destes parâmetros, a rotina também identifica o valor de pico e o nível basal de Ca^{2+} .

Tabela 2: Descrição dos parâmetros do transiente de cálcio.

Parâmetros	Forma de cálculo	Unidade
Inclinação Máxima (diff)	Obtida a partir do valor máximo da derivada da fase de subida do sinal.	[s ⁻¹]
Tempo de pico (tpeak)	Tempo entre o instante inicial do transiente até o instante da amplitude máxima.	[s]
Tempo de subida (rt)	Tempo entre 10% e 90% do valor de pico na fase de subida.	[s]
Amplitude (amp)	Diferença entre a o valor pico e o nível basal de cálcio.	$\Delta F/F$
Duração em 10% (pw10)	Tempo entre 10% do valor de pico na fase de subida e 10% do valor de pico na fase de descida.	[s]
Duração em 50% (pw50)	Tempo entre 50% do valor de pico na fase de subida e 50% do valor de pico na fase de descida.	[s]
Tempo de decaimento (dct)	Tempo entre 90% e 10% do valor de pico na fase de descida.	[s]
Taxa de decaimento (τ)	Coeficiente do decaimento da função exponencial $y=a*\exp(x/\tau)$ ajustada entre 90% e 10% da amplitude na fase de descida.	[s]

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26: Parâmetros estimados mostrados sobre o transiente de cálcio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros dos transientes de cálcio, o valor de pico e o nível basal de Ca^{2+} foram determinados diretamente no sinal medido. Não foram utilizados modelos matemáticos ou ajuste de funções aos pontos experimentais.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) de pelo menos 3 experimentos independentes. Os testes estatísticos foram feitos usando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar o efeito das densidades de plaqueamento no perfil dos transientes de cálcio e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para comparar os parâmetros dos transientes de cálcio do mesmo poço antes e após a injeção do verapamil. As diferenças foram consideradas significativas em $P < 0,05$ (*).

5. RESULTADOS

5.1. SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO

5.1.1. Estimulador Eletrônico

O estimulador eletrônico desenvolvido consiste de um módulo oscilador, um detector de borda baseado em portas NAND *schmitt trigger* e um estágio de saída na configuração de seguidor de emissor (ganho unitário) para amplificação de corrente.

A primeira versão do estimulador eletrônico projetado para gerar estímulos com parâmetros definidos a partir da literatura foi testada em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos. Para otimizar os parâmetros de estimulação foi avaliada a capacidade de gerar contrações sincronizadas na cultura. A Figura 27 mostra as características elétricas deste estimulador alimentado com 4 baterias de 3V.

Figura 27: Características elétricas da primeira versão do estimulador eletrônico.

(A) Módulo de conexão e protótipo do sistema de estimulação. (B) Parâmetros do pulso de estímulo para carga de 470 Ω . (C) Pulso de estímulo com indicação do período. (D) Detalhes da forma de onda do estímulo gerado mostrando a largura de pulso e a amplitude.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os estímulos aplicados na solução dos poços utilizando esta versão do estimulador resultaram na formação de bolhas e consequente interferência no sinal de fluorescência. Este efeito foi eliminado reduzindo a largura do pulso de estimulação.

A largura de pulso necessária para estimular sincronizadamente as células da cultura foi definida a partir da resposta contrátil de cardiomiócitos de ratos neonatos estimulados eletricamente com o MyoPacer EP. A Tabela 3 apresenta os parâmetros de estimulação identificados como ideais.

Tabela 3: Parâmetros de estimulação (amplitude; largura de pulso) necessários para geração de contrações sincronizadas em culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos.

Amplitude do Pulso de Estímulo (V)	Duração mínima do pulso (ms)
11	4
9	5
7	10
6	20

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos resultados obtidos ajustou-se a duração do pulso de saída do estimulador eletrônico para 5 ms. Nesta condição a cultura de células apresentou contrações sincronizadas sem a formação de bolhas na solução presente nos poços.

A versão final do protótipo do estimulador eletrônico (Figura 28) possui as seguintes características: (i) ajuste da frequência de estimulação entre 0,1 e 5 Hz; (ii) ajuste da largura de pulso entre 1 e 5 ms; (iii) amplitude do estímulo fixa e dependente da tensão da fonte de alimentação ou da bateria; (iv) estágio de saída construído na configuração *low-side driver* para amplificação de corrente; e (v) tensão na carga segue a tensão na base do transistor.

Figura 28: Circuito estimulador desenvolvido no trabalho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O circuito, mostrado na Figura 28, consiste de um par RC que define a frequência de oscilação (A), outro par RC que define a largura do pulso (B), um circuito integrado 4093 com portas lógicas NAND *schmitt-trigger*, um estágio de saída composto de um transistor bipolar, um capacitor e um resistor. O ajuste de frequência e largura de pulso é feito a partir do valor das resistências correspondentes em dois *trimpots*. Esta estrutura simples atende a dois requisitos importantes da aplicação: (1) ocupar pouco espaço no interior da microplaca; e (2) baixo consumo de energia aumentando a duração da bateria e garantindo estabilidade de tensão.

A Figura 29 ilustra os pulsos de estímulo com duração de 5 ms gerados pelo estimulador eletrônico em experimentos com culturas de hiPSC-CM. A amplitude na saída no estimulador foi de 7,8 V para 6 poços conectados ao sistema de estimulação e a amplitude de um estímulo medido na região central de um poço preenchido com solução é de aproximadamente 4,0 V. Nos experimentos foram utilizados pulsos com frequência de 0,1 Hz; 0,2 Hz; 0,3 Hz e 0,5 Hz que geraram variações detectáveis no cálcio intracelular das culturas de células estimuladas.

Figura 29: Pulsos quadrados monofásicos gerados pelo estimulador eletrônico.

Os pulsos foram medidos no estágio de saída e no interior de um poço contendo células aderidas e solução de leitura de fluorescência. A largura de pulso é de 5 milissegundos. Fonte: Elaborada pelo autor.

O projeto permitiu que os experimentos com culturas de hiPSC-CM fossem realizados sem necessidade de manipulação do estimulador durante os registros de fluorescência. Um grupo de poços com células foi constantemente estimulado e outro grupo controle não recebeu estimulação.

O estimulador foi ligado e conectado na microplaca e o sistema de estimulação foi introduzido no FluoStar Omega. Foi possível medir transientes de cálcio induzidos pela estimulação elétrica em diferentes frequências e com perfis bem definidos, validando a hipótese de que a inclusão de um estimulador elétrico em um leitor de ELISA permitiria a avaliação de alto rendimento de transientes de cálcio em culturas de cardiomiócitos.

5.1.2. Eletrodos

A avaliação dos eletrodos mostrou que aqueles produzidos com liga de platina-irídio transferem mais carga para a solução dos poços, conforme dados da Tabela 4.

Tabela 4: Avaliação da transferência de carga dos eletrodos de prata e de liga de platina-irídio

Eletrodos de 0,8 mm	$V_{\text{poço}}/V_{\text{estim}}$
<i>Prata</i>	$0,24 \pm 0,01$
<i>Platina-Irídio</i>	$0,50 \pm 0,01$

Fonte: Elaborada pelo autor.

A comparação de eletrodos com diferentes diâmetros não revelou diferenças significativas que justificassem o uso de eletrodos maiores. O sistema de estimulação foi construído com eletrodos de 0,8 mm, pois nesta dimensão os eletrodos têm aspecto mais esférico que em dimensões menores e são mais fáceis de produzir que os eletrodos de 1,2 mm.

Figura 30: Transferência de carga avaliada em eletrodos de liga de platina-irídio confeccionados com diâmetros diferentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados justificaram o uso da liga de platina-irídio para confecção dos eletrodos utilizados no sistema de estimulação.

5.1.3. Microplaca de Estimulação

A placa desenvolvida permitiu estimular culturas celulares dentro do leitor de placas durante as medições de fluorescência sem fazer modificações neste equipamento ou alterações nos procedimentos de plaqueamento celular e de manutenção das culturas de células.

Figura 31: Projeto mecânico da microplaca de estimulação (cotas em milímetros).

(A) Esquema da microplaca modificada com bateria e estimulador. (B) Projeto mecânico do módulo de conexão localizado na parte inferior da microplaca. (C) Vista detalhada de um poço com eletrodos. (D) Os eletrodos platina-irídio vistos em detalhes. Fonte: Elaborada pelo autor

A microplaca projetada foi desenvolvida a partir de microplacas de cultura comerciais transparentes e pretas de 96 poços, garantindo a biocompatibilidade do material e a baixa fluorescência de fundo para avaliação da fluorescência nas placas pretas. A remoção dos 54 poços da região central (Figura 31A) para instalação da

bateria e do estimulador não reduziu a quantidade de poços disponíveis na placa a ponto de prejudicar a realização dos experimentos. Os poços das linhas 1 e 2 têm furos na base (Figura 31C) para a colocação de eletrodos esféricos metálicos (Figura 31D) com diâmetros entre 0,8 e 0,9 mm obtidos por fusão de fios de liga de platina-irídio de 0,15 mm de diâmetro.

Figura 32: Parte inferior da microplaca (cotas em milímetros).

Módulo de conexão posicionado na parte inferior da placa (esquerda). O esquema mostra como o eletrodo é posicionado, o fio passa pelos orifícios da base do poço e é soldado no módulo de conexão. Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma pequena placa de circuito posicionada na parte inferior da microplaca (Figura 31B e Figura 32) conecta os eletrodos ao estimulador, ela é chamada de módulo de conexão. O posicionamento dos orifícios para colocação dos eletrodos é ilustrado no desenho mecânico da Figura 31C. A Figura 32 ilustra o posicionamento do módulo de conexão na parte inferior da microplaca. Os orifícios são vedados e as partes eletrônicas da placa são isoladas com silicone grau médico.

Esta estratégia de montagem foi selecionada após varias tentativas para fixar os eletrodos. Nesta configuração o fio de platina fica fixo o tempo todo após a montagem da placa, evitando a ruptura por movimentação mecânica comum para este tipo de liga metálica. Assim, a solda é feita muito próxima da posição em que o eletrodo está inserido no fundo dos poços da microplaca. O módulo de conexão na parte inferior da placa também permite que os eletrodos sejam soldados ao cobre e façam contato com o estimulador eletrônico.

Foram construídas versões pretas e transparentes da microplaca de estimulação. As pretas foram utilizadas para avaliação da fluorescência das culturas de células e as transparentes como controles que permitiam acompanhar o desenvolvimento das células e observar as contrações induzidas pelo estimulador.

5.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO CÁLCIO

5.2.1. Fluorescência de Cardiomiócitos de Ratos Neonatos

Foram registrados sinais correspondentes a variações espontâneas na concentração de cálcio intracelular de culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos que possivelmente representam a soma da intensidade de fluorescência de grupos de células contraindo em sincronismo. Estes sinais foram filtrados utilizando-se um filtro de média móvel com janela de 30 elementos para eliminação do ruído e são apresentados nas Figura 33, Figura 34 e Figura 35.

Figura 33: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 5% das amostras estudadas.

Os sinais de fluorescência mostram flutuações de menor amplitude e maior frequência sobrepostas a flutuações de maior amplitude em relação ao nível basal. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os sinais de fluorescência do cálcio intracelular como os mostrados na Figura 33 e na Figura 34 não apresentam transientes com ritmos regulares e perfis uniformes, isso dificulta o cálculo de parâmetros que possam ser utilizados para caracterizar a atividade contrátil da cultura. Na prática a obtenção de sinais como estes, que apresentam variações espontâneas bem detectáveis é rara, os sinais com perfil semelhantes ao da Figura 33 foram obtidos em apenas 5 % (9/176) dos poços medidos e sinais com perfil semelhante ao da Figura 34 foram obtidos em 13% (23/176) dos poços estudados.

Figura 34: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 13% das amostras estudadas.

Os sinais mostram flutuações de frequência elevada sobrepostas em flutuações de menor frequência e de maior amplitude em relação ao nível basal. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 35: Morfologia dos sinais de fluorescência encontrados em 3% das amostras estudadas.

Os sinais apresentam um ritmo bem definido, com perfis regulares e as contrações se sustentam por períodos de mais de 20 segundos. Fonte: elaborada pelo autor.

O sinal mostrado na Figura 35 apresenta contrações sincronizadas representadas por transientes de cálcio com perfil uniforme ao longo de todo o registro. Neste registro serial possível extrair parâmetros que poderiam permitir a caracterização da atividade contrátil da cultura, porém sinais com este foram obtidos em apenas 3% dos poços estudados (5/176).

Estes resultados sugerem que o uso de um sistema de estimulação é necessário para sincronizar a atividade das células em cultura, permitindo o registro de transientes de cálcio com ritmos e perfis uniformes em um percentual maior das amostras estudadas.

5.2.2. Validação do Método

Experimentos para avaliação inicial da montagem experimental foram realizados utilizando-se estimulação elétrica em culturas de mioblastos H9c2 (2-1). A obtenção de cardiomiócitos de ratos neonatos apresenta dificuldades não encontradas no cultivo de células de linhagem. Assim, os protocolos foram testados e definidos após experimentos exaustivos utilizando este tipo celular. Nesses experimentos foi possível determinar parâmetros de marcação e de estimulação que em conjunto permitiram registrar variações na fluorescência do cálcio intracelular induzidas pela estimulação elétrica, validando o conceito do método desenvolvido.

Figura 36: Variações na intensidade de fluorescência em resposta à estimulação elétrica.

(A) Células sem adição de cálcio na solução de cultura. (B) Células com adição de cálcio na solução. As setas indicam o início e o fim da estimulação. Nos instantes 10 e 30 min observam-se artefatos resultantes da exposição da placa a luz ambiente durante a manipulação para ligar e desligar o estimulador. Fonte: Elaborada pelo autor [81]

A Figura 36 mostra o registro da fluorescência com as fases de pré-estimulação (primeiros 10 minutos), estimulação (20 minutos) e pós-estimulação (40 minutos) em culturas de mioblastos. A Figura 37 destaca o comportamento das culturas de mioblastos com ou sem adição de cálcio à solução de cultura durante a fase de estimulação. As células tratadas com adição de cálcio foram incubadas por 15 minutos em solução contendo 1.8 mM de CaCl_2 .

Figura 37: Variações da intensidade de fluorescência observadas durante a fase de estimulação.

Variações no cálcio intracelular medidas em amostras sem estimulação elétrica (controle) e sob estimulação elétrica em duas situações distintas: Superior – sem adição de cálcio no meio de cultura; Inferior – incubação adicional em solução contendo 1,8 mM de CaCl_2 . Fonte: Elaborada pelo autor [82]

A estimulação elétrica das células em soluções sem cálcio resultou em redução de 26% na intensidade de fluorescência, de $1,00 \pm 0,09$ para $0,74 \pm 0,06$. A intensidade de fluorescência das células do grupo controle não estimulado manteve-se praticamente constante ao longo da estimulação de 20 minutos variando de $0,91 \pm 0,06$ para $0,94 \pm 0,08$.

Nas culturas de células tratadas 1.8 mM de CaCl_2 o comportamento observado foi semelhante. A intensidade da fluorescência medida nas culturas de células estimuladas eletricamente apresentou uma redução de 28%, variando de $1,00 \pm 0,06$ para $0,73 \pm 0,03$. As células não estimuladas apresentaram uma variação menor, equivalente a 6%, de $0,88 \pm 0,05$ para $0,83 \pm 0,06$.

Os resultados demonstraram a estabilidade da montagem experimental e validaram o conceito de estimulação e de medição conjunta da fluorescência no leitor de ELISA proposto no trabalho. Nestes experimentos variações lentas na concentração do cálcio intracelular foram observadas ao longo de 20 minutos durante estimulação elétrica constante na frequência de 1 Hz.

5.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM CULTURAS DE CARDIOMIÓCITOS

5.3.1. Adaptação do Método

Um transiente de cálcio é definido como uma variação transitória no nível de cálcio intracelular, ou seja, que parte de um valor, atinge um pico e retorna para o valor inicial. Os resultados da avaliação da contratilidade das células cardíacas muitas vezes são representados utilizando transientes de cálcio [83], cujas características podem ser utilizadas como indicadores de funções fisiológicas [63].

A metodologia anteriormente descrita, utilizada para a marcação e estimulação das células foi aplicada aos hiPSC-CM. Foram obtidos transientes de cálcio representando contrações sincronizadas na frequência dos estímulos elétricos. As culturas sem estimulação apresentaram transientes de cálcio espontâneos sem ritmo definido.

Os sinais apresentados neste tópico foram filtrados utilizando-se um filtro de média móvel com janela de 30 elementos disponível no software do FLUOstar Omega (Mars Data Analysis, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) para reduzir o ruído em excesso que dificultava a observação dos transientes de cálcio presentes nos sinais medidos.

Figura 38: Variações na intensidade de fluorescência observadas em culturas de hiPSC-CM sem estimulação elétrica.

O ritmo e a morfologia de transientes de cálcio espontâneos registrados em diferentes amostras sem aplicação de estímulo elétrico apresenta um padrão irregular. Fonte: Elaborada pelo autor [84].

A Figura 38 mostra variações na concentração intracelular do cálcio em culturas de hiPSC-CM sem a aplicação de estímulo elétrico. Na figura, a curva da esquerda mostra registros de contrações espontâneas bem sincronizadas ainda que o padrão de atividade em uma amostra com atividade espontânea regular possa se tornar aleatório. As formas de onda apresentadas no centro e à direita da figura

mostram eventos espontâneos com ritmos variados e com transientes irregulares ao longo do tempo.

As culturas de células com padrões de contratilidade irregular e diferentes entre si dificultam a extração de parâmetros dos transientes de cálcio que permitam caracterizar a atividade contrátil necessários aos testes de drogas ou aplicações de engenharia de tecidos.

Um ambiente controlado pode ser obtido estimulando eletricamente estas células. Os resultados apresentados na Figura 39 mostram variações na concentração intracelular do cálcio em culturas estimuladas eletricamente. A atividade contrátil da cultura foi semelhante em todas as amostras observadas e ainda que os transientes de cálcio não tenham morfologias idênticas, a frequência das contrações é bem regular, apresentando um padrão facilmente identificado em todos os registros.

Figura 39: Variações na intensidade de fluorescência observadas em culturas de hiPSC-CM estimuladas eletricamente.

Os transientes de cálcio registrados durante a estimulação elétrica exibem um ritmo de acordo com a frequência do estímulo. Fonte: Elaborada pelo autor [84]

A Figura 39 mostra que as células da cultura estão contraindo na frequência de 0,3 Hz, que foi a frequência ajustada no estimulador nesses experimentos. A Transformada de Fourier foi utilizada para verificar a frequência fundamental dos eventos contráteis registrados nas células eletricamente estimuladas e nos sinais obtidos nas culturas não estimuladas, embora nessas não exista uma frequência predominante.

A Figura 40 mostra o espectro de frequências dos sinais de cálcio intracelular medidos em culturas não estimuladas (à esquerda) e estimuladas (à direita). O espectro de frequências mostra que a potência do sinal está concentrada nas frequências abaixo de 0,3 Hz. É difícil identificar uma frequência dominante nas

culturas não estimuladas. Em contraste, o espectro das culturas de células estimuladas mostra claramente uma componente dominante em 0,3 Hz, que é a frequência dos pulsos gerados pelo estimulador elétrico.

Os sinais obtidos nas culturas estimuladas eletricamente não apresentam a morfologia típica dos transientes de cálcio descrita na literatura (Figura 6), porém já é possível calcular alguns parâmetros como tempo de pico e duração que podem ser utilizados para estudar objetivamente a atividade contrátil de culturas de cardiomiócitos.

Figura 40: Espectro de frequência dos sinais medidos.

FFT dos sinais medidos nas culturas de células não estimuladas (à esquerda) e estimuladas (à direita). Nota-se que nas culturas de células sob estimulação existe uma componente dominante em 0,3 Hz correspondente aos eventos contráteis induzidos pela estimulação elétrica. Fonte: Elaborada pelo autor.

A atividade espontânea das células é imprevisível e a estimulação elétrica criou um ambiente controlado em que a atividade contrátil apresenta um ritmo bem definido com potencial de otimizar a caracterização de variações na dinâmica do cálcio intracelular a partir de parâmetros de perfil do transiente de cálcio.

Estes resultados validaram o conceito da metodologia proposta no trabalho e motivaram a realização de mais experimentos otimizando os protocolos de estimulação, a preparação das amostras e o processamento dos dados para melhorar a qualidade dos transientes de cálcio obtidos.

5.3.2. Efeito da Densidade de Plaqueamento

A partir dos resultados obtidos nos primeiros experimentos com hiPSC-CM alguns parâmetros morfológicos foram identificados e medidos para comparação com dados da literatura. Porém variações observadas no nível de cálcio basal após decaimento dos transientes dificultou a estimativa de parâmetros como o tempo até o pico e a largura do transiente. Os procedimentos foram reavaliados e otimizados para permitir a obtenção de transientes com perfis mais uniformes e melhor definidos.

As células foram plaqueadas em concentrações maiores, de $1,2 \times 10^5$, $2,4 \times 10^5$ e $3,6 \times 10^5$ células/cm² e foram estimuladas nas frequências 0,1 Hz; 0,2 Hz; 0,3 Hz; e 0,5 Hz.

Figura 41: Diferenças nos sinais de fluorescência para diferentes densidades de plaqueamento.

Com o aumento da densidade de plaqueamento a amplitude do transiente de cálcio aumentou e a definição do sinal melhorou. Os transientes de cálcio foram induzidos por estimulação elétrica na frequência de 0,3 Hz. Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 41 mostra o efeito da concentração de células no sinal medido. Nota-se que a intensidade do sinal é maior para concentrações de células mais altas, resultando em um perfil bem definido. Este resultado é esperado considerando a natureza de formação dos sinais medidos, mais células marcadas correspondem a maior intensidade de sinal. Além disso, a quantidade de células não afeta a capacidade do estimulador em gerar contrações sincronizadas na cultura.

A Figura 42 mostra os valores de amplitude dos transientes para cada concentração considerando um $N = 4$. O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas nos valores de amplitude (* $P = 0,003$).

Figura 42: Amplitude do transiente de cálcio em culturas de células com diferentes densidades.

Valores obtidos em transientes de cálcio induzidos por estimulação elétrica na frequência de 0,3 Hz.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O nível basal de Ca^{2+} , que corresponde a intensidade de fluorescência de repouso medida na ausência de estimulação elétrica, apresenta o mesmo comportamento observado na amplitude dos transientes de cálcio. A Figura 43 ilustra os valores deste parâmetro em relação ao valor medido nas culturas de células plaqueadas na densidade mais baixa (120.000 células/ cm^2).

Figura 43: Nível basal de Ca^{2+} medido em culturas com diferentes densidades.

Os valores de intensidade de fluorescência foram normalizados em relação a intensidade do grupo com menor densidade de plaqueamento. Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 44 ilustra os sinais medidos em culturas de células de três poços com a mesma densidade de plaqueamento ($2,4 \times 10^5$ células/ cm^2) sob estimulação na frequência de 0,3 Hz. Os transientes de cálcio apresentam morfologia uniforme, com subida rápida e decaimento exponencial bem definido. Estes sinais permitem a extração de parâmetros tipicamente utilizados na literatura como amplitude, duração, tempo até o pico e tempo de decaimento.

Figura 44: Variações na intensidade de fluorescência medidas em culturas de células estimuladas eletricamente a 0,3 Hz.

Sinais de três poços contendo $2,4 \times 10^5$ células/cm². Os sinais apresentam transientes de cálcio com morfologia bem definida e uniforme ao longo do registro. Não há variações na linha de base como observado nos experimentos de adaptação do método com culturas plaqueadas na densidade de $6,0 \times 10^4$ células/cm². Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados destes experimentos mostraram que a densidade de plaqueamento afeta significativamente a qualidade do sinal medido e densidades maiores são mais adequadas para registrar transientes com perfis uniformes e que representam com melhor nível de detalhamento a atividade contrátil das células em cultura utilizando o método desenvolvido.

5.3.3. Aplicação do Método

As variações no cálcio intracelular foram medidas a partir da fluorescência emitida pela molécula Fluo-4 AM ligada ao Ca^{2+} livre. A intensidade do sinal de fluorescência das células marcadas com o indicador foi cerca de 10 vezes maior do que o sinal de fluorescência medido no controle negativo, determinando um bom resultado no procedimento de marcação com o indicador fluorescente.

Os resultados foram obtidos em culturas de hiPSC-CM plaqueadas na densidade de $2,4 \times 10^5$ células/cm², escolhida como ideal para os experimentos por apresentar transientes de cálcio com perfil bem definido e utilizar uma densidade intermediária de células.

A aplicação do método desenvolvido em culturas de hiPSC-CM foi validada comparando os sinais de fluorescência do Ca^{2+} intracelular em culturas de células sem estimulação elétrica com os de culturas de células estimuladas eletricamente em diferentes frequências.

Figura 45: Variações na intensidade de fluorescência medidas em culturas de células apresentando atividade espontânea em poços sem estimulação elétrica.

A atividade contrátil não apresenta um ritmo bem definido, a frequência varia durante os registros e os transientes de cálcio não apresentaram perfil uniforme. Fonte: Elaborada pelo autor

As variações registradas na intensidade de fluorescência do Ca^{2+} intracelular representam contrações sincronizadas de grupos de hiPSC-CM. A Figura 45 representa sinais fluorescentes correspondentes a transientes de cálcio originados da ativação espontânea das células, na ausência de estimulação elétrica. Esses transientes de cálcio apresentaram frequências, amplitudes e ritmos irregulares.

Figura 46: Variações da intensidade de fluorescência representando contrações em diferentes frequências registradas nos poços com aplicação de estimulação elétrica.

Os sinais representam contrações sincronizadas com o ritmo do estimulador que resultam em transientes de cálcio com perfil uniforme e ritmo bem definido ao longo do registro. Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 46 representa sinais de fluorescência apresentando transientes de cálcio medidos nas culturas de células sob estimulação elétrica. Os transientes de cálcio seguem a frequência dos pulsos de estimulação e apresentam um perfil uniforme ao longo do experimento com amplitude e ritmo bem definidos.

A estimulação elétrica estabeleceu um ambiente controlado para detectar variações no perfil do transiente e a otimização dos protocolos resultou em sinais bem definidos, ideais para o cálculo de parâmetros que podem ser utilizados para caracterizar objetivamente a atividade contrátil das culturas de células.

5.3.4. Efeito da Frequência de Estimulação no Perfil dos Transientes

Usando os dados obtidos, foi possível identificar o efeito da frequência de estimulação no perfil dos transientes de cálcio registrados nas culturas de células. A Figura 47 mostra os transientes de cálcio médios obtidos após o processamento dos sinais e destaca os valores da amplitude de pico e da intensidade de fluorescência do nível basal de Ca^{2+} para estimulação em 0,1 Hz; 0,2 Hz; 0,3 Hz e 0,5 Hz.

A amplitude do transiente, definida pela diferença entre a amplitude do pico do sinal e o nível basal de Ca^{2+} , diminuiu com o aumento da frequência de estimulação. Embora o valor do pico não se altere significativamente com a frequência, o nível de cálcio basal no citoplasma da célula aumenta significativamente (*p < 0,05).

Figura 47: Nível de Ca^{2+} basal e variações na morfologia dos transientes de cálcio em resposta a diferentes frequências de estimulação.

Os gráficos mostram transientes de cálcio resultantes da estimulação por campo elétrico em frequências crescentes. A amplitude do transiente de cálcio é obtida pela diferença entre amplitude de pico e o valor da linha de base. Dados obtidos em 3 experimentos independentes com 5 réplicas para cada amostra. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os transientes de cálcio registrados apresentaram um perfil bem definido: um aumento rápido até o pico de amplitude seguido de um decaimento exponencial. Os transientes de cálcio obtidos em qualquer frequência de estimulação podem ser usados para calcular parâmetros, porém apenas os transientes de cálcio obtidos em frequências de estimulação baixas apresentam o perfil completo. Para caracterizar a atividade contrátil da cultura é mais apropriado usar um transiente de cálcio que atinja o pico e decaia completamente. Os dados obtidos com estímulos em frequências mais altas (0,3 Hz ou 0,5 Hz) permitem observar outros mecanismos, como o aumento do nível de cálcio basal.

5.3.5. Cálculo dos Parâmetros de Perfil dos Transientes

A rotina de processamento desenvolvida no MATLAB permitiu a caracterização quantitativa de transientes de cálcio a partir da estimativa de parâmetros que podem ser utilizados para estudar a atividade contrátil de culturas de células e comparar os resultados com dados da literatura. A Tabela 5 mostra os

valores dos parâmetros dos transientes de cálcio estimados pela rotina de processamento para as quatro frequências de estimulação utilizadas no trabalho.

Tabela 5: Parâmetros dos transientes de cálcio estimados em diferentes frequências de estimulação.

Parâmetros de Perfil dos Transientes				
	0,1 Hz	0,2 Hz	0,3 Hz	0,5 Hz
<i>diff</i> [s^{-1}]	4,37 ± 0,30	4,26 ± 0,47	3,08 ± 0,39	2,84 ± 0,38
<i>amp</i> [$\Delta F/F$]	1,06 ± 0,06	0,98 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,63 ± 0,04
<i>tpeak</i> [s]	0,80 ± 0,07	0,81 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,60 ± 0,09
<i>rt</i> [s]	0,54 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,37 ± 0,05
<i>pw10</i> [s]	5,21 ± 0,28	3,74 ± 0,08	2,73 ± 0,03	1,70 ± 0,02
<i>pw50</i> [s]	1,86 ± 0,08	1,66 ± 0,06	1,42 ± 0,05	1,00 ± 0,06
<i>dct</i> [s]	4,20 ± 0,26	2,81 ± 0,10	1,78 ± 0,04	0,96 ± 0,07
<i>τ</i> [s]	1,86 ± 0,11	1,37 ± 0,05	0,95 ± 0,02	0,54 ± 0,03
<i>amp de pico</i> [$\Delta F/F$]	1,06 ± 0,06	1,13 ± 0,07	1,11 ± 0,05	1,18 ± 0,11
<i>basal Ca²⁺</i> [$\Delta F/F$]	referência	0,16 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,54 ± 0,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.6. Avaliação do Efeito de Drogas nos Transientes de Cálcio

A aplicação do método na avaliação do efeito de drogas foi validada pela observação de alterações dose-dependentes na morfologia dos transientes de cálcio após a adição de verapamil nas culturas de células. Essas alterações foram consistentes com as esperadas de acordo com o mecanismo de ação da droga e com os mecanismos que controlam a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático descrito pelo acoplamento excitação-contração.

A Figura 48 mostra o efeito do Verapamil em culturas de células estimuladas eletricamente tratadas com 0,05 μM , 0,5 μM e 5,0 μM . Os transientes de cálcio médios obtidos a partir do processamento dos sinais medidos nas culturas de células antes e 5 minutos após a adição do fármaco são mostrados nos gráficos. Nota-se que para concentrações crescentes o efeito do bloqueio dos canais de cálcio tipo-L se intensifica, resultando em transientes de cálcio com amplitude menor.

Figura 48: Efeitos de três concentrações diferentes de verapamil nos transientes de cálcio medidos em culturas de hiPSC-CM.

Os gráficos apresentam os transientes de cálcio medidos antes do tratamento com a droga e 5 minutos após a adição da verapamil em três concentrações distintas: 0,05 μM (superior), 0,5 μM (centro) e 5,0 μM (inferior). Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores dos parâmetros calculados a partir dos transientes de cálcio médios utilizando a rotina de processamento desenvolvida em MATLAB são mostrados na Tabela 6, na Tabela 7 e na Tabela 8 e quantificam as alterações no ciclo do cálcio induzidas pelo verapamil em diferentes concentrações.

Tabela 6: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 0,05 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.

Verapamil - 0,05 μM			
	Antes	Após	Variação(%)
<i>diff</i> [s^{-1}]	1,77 $\pm$ 0,15	1,75 $\pm$ 0,23	1,39
<i>amp</i> [$\Delta F/F$]	0,62 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,09	8,29
<i>tpeak</i> [s]	0,88 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,08	7,58
<i>rt</i> [s]	0,50 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,04	0,88
<i>pw10</i> [s]	3,98 $\pm$ 0,09	3,96 $\pm$ 0,06	5,59
<i>pw50</i> [s]	1,69 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,06	0,57
<i>dct</i> [s]	3,01 $\pm$ 0,07	3,04 $\pm$ 0,04	2,13
<i>τ</i> [s]	1,53 $\pm$ 0,02	1,55 $\pm$ 0,01	0,94
<i>amp de pico</i> [$\Delta F/F$]	0,80 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,12	1,38
<i>Basal Ca²⁺</i> [$\Delta F/F$]	0,19 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,04	21,58

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 0,5 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.

Verapamil - 0,5 μM			
	Antes	Após	Variação(%)
<i>diff</i> [s^{-1}]	2,24 $\pm$ 0,29	1,54 $\pm$ 0,32	31,34 *
<i>amp</i> [$\Delta F/F$]	0,78 $\pm$ 0,17	0,42 $\pm$ 0,19	46,39 *
<i>tpeak</i> [s]	0,79 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,06	6,78
<i>rt</i> [s]	0,47 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,02	19,09
<i>pw10</i> [s]	4,00 $\pm$ 0,08	3,92 $\pm$ 0,08	2,00
<i>pw50</i> [s]	1,73 $\pm$ 0,05	1,77 $\pm$ 0,09	2,15
<i>dct</i> [s]	3,09 $\pm$ 0,03	3,12 $\pm$ 0,04	0,86
<i>τ</i> [s]	1,60 $\pm$ 0,05	1,63 $\pm$ 0,08	2,41
<i>amp de pico</i> [$\Delta F/F$]	1,16 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,19	37,58 *
<i>Basal Ca²⁺</i> [$\Delta F/F$]	0,38 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,04	18,48

Fonte: Elaborada pelo autor.

As culturas de células tratadas com 0,05 μM de verapamil não apresentaram alterações significativas nos transientes de cálcio. Os parâmetros após a injeção do fármaco são muito próximos aos valores antes da injeção (Tabela 6).

As culturas de células tratadas com 0,5 μM de verapamil mostraram uma redução significativa na atividade contrátil. Alterações foram observadas nos transientes de cálcio e nos valores de seus parâmetros, especialmente aqueles relacionados à fase de subida: os valores de inclinação (diff) e de amplitude do transiente (amp) diminuíram 30% e 45% respectivamente (Tabela 7).

Tabela 8: Parâmetros dos transientes de cálcio medidos antes e após a adição de 5,0 μM de verapamil nas culturas de cardiomiócitos.

Verapamil - 5,0 μM			
	Antes	Após	 Variação(%)
<i>diff</i> [s^{-1}]	1,86 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,08	62,91 *
<i>amp</i> [$\Delta F/F$]	0,69 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,04	81,59 *
<i>tpeak</i> [s]	0,71 $\pm$ 0,07	1,22 $\pm$ 0,02	72,64 *
<i>rt</i> [s]	0,42 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,05	151,92 *
<i>pw10</i> [s]	3,96 $\pm$ 0,15	4,10 $\pm$ 0,06	3,64
<i>pw50</i> [s]	1,47 $\pm$ 0,11	1,51 $\pm$ 0,12	2,49
<i>dct</i> [s]	3,08 $\pm$ 0,12	2,88 $\pm$ 0,07	6,49
<i>τ</i> [s]	1,57 $\pm$ 0,07	1,96 $\pm$ 0,09	24,96 *
<i>amp de pico</i> [$\Delta F/F$]	1,08 $\pm$ 0,18	0,38 $\pm$ 0,15	65,16 *
<i>Basal Ca^{2+}</i> [$\Delta F/F$]	0,40 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,06	36,65

Fonte: Elaborada pelo autor.

As culturas de células tratadas com 5,0 μM de Verapamil tiveram os transientes de cálcio quase totalmente suprimidos. Os parâmetros apresentaram grandes variações, a inclinação (diff) diminuiu 60%, a amplitude (amp) diminuiu 80%, o tempo até o pico aumentou 70% e o tempo de subida aumentou 150% (Tabela 8).

Figura 49: Curva dose-resposta mostrando a redução da amplitude do transiente de cálcio para concentrações crescentes de verapamil.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos resultados obtidos para as três doses de verapamil, calculou-se a razão entre as amplitudes dos transientes de cálcio após e antes da adição do fármaco, estes dados foram compilados na Figura 49, que representa uma relação dose-resposta para o verapamil nas culturas de hiPSC-CM.

Estes resultados mostraram que o método desenvolvido no trabalho permite identificar e quantificar variações na contratilidade das culturas de células induzidas por drogas. A presença do sistema de estimulação foi determinante para obtenção de transientes de cálcio com perfil bem definido e para estabelecimento de um ambiente controlado que permite isolar e avaliar o efeito da droga a partir das variações observadas nos parâmetros dos transientes de cálcio medidos nas culturas de cardiomiócitos.

6. DISCUSSÃO

O conceito do método desenvolvido no trabalho é a criação um sistema de alto rendimento para avaliação do cálcio intracelular de forma semelhante ao que é feito tanto pelos microscópios de fluorescência quanto pelos sistemas de imagem especiais de alto rendimento como o FLIPR Tetra (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) e o FDSS 7000EX (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão). No entanto, o sistema desenvolvido inova ao introduzir uma nova abordagem que associa simultaneamente estimulação elétrica e medição automatizada da fluorescência em um leitor de ELISA. O trabalho também permitiu estabelecer protocolos para preparação das amostras e para avaliação da fluorescência viabilizando a estimulação elétrica em soluções estáticas no interior de leitores de placas.

Esta nova abordagem criou um ambiente controlado para identificação de variações nos transientes de cálcio induzidas pelo efeito de drogas já que a frequência da atividade contrátil das células é determinada pelos pulsos de estimulação. Além disso, os estímulos garantem que o leitor de ELISA será capaz de registrar um transiente de cálcio global que representa a atividade da cultura, pois os pulsos elétricos sincronizam a atividade dos cardiomiócitos.

O novo método validado e aplicado permitiu registrar de transientes de cálcio intracelular globais em monocamadas de hiPSC-CM eletricamente estimuladas. Para este fim, um FLUOstar Omega foi associado a um sistema customizado para cultura e estimulação de células estabelecendo um ambiente único e controlado para avaliação de mudanças nos parâmetros de transientes de cálcio induzidos por drogas que afetam o acoplamento excitação-contração cardíaco.

Os leitores de ELISA são equipamentos comuns em laboratórios de análises clínicas e laboratórios de pesquisa não necessariamente especializados em triagem de drogas. Eles costumam realizar medições de intensidade de fluorescência de forma sequencial e por isso são mais lentos que sistemas de imagem de alto rendimento como o FDSS 7000 EX (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão) e o FLIPR Tetra (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA), no entanto permitem avaliar uma quantidade elevada de amostras em placas de cultura em intervalos de tempo curtos em comparação com métodos estabelecidos como a microscopia confocal e de fluorescência. Por exemplo, o FluoStar Omega pode registrar transientes de cálcio durante 40 segundos em 30 amostras em 20 minutos. Desta forma, a

metodologia desenvolvida pode ser considerada de alta processividade em relação aos métodos tradicionais de microscopia.

Outra vantagem em utilizar os leitores de ELISA é que eles medem a intensidade de fluorescência global do poço, ou seja, um único valor que representa toda a cultura de células e assim heterogeneidades fenotípicas são compensadas, conduzindo a sinais mais reprodutíveis.

A inclusão do sistema de estimulação no interior do leitor de placas durante a avaliação de fluorescência contribui para aumentar ainda mais a reprodutibilidade dos sinais medidos e garante o registro de transientes de cálcio ao sincronizar a atividade contrátil da cultura. Caso a atividade das células fosse dessincronizada, a intensidade de fluorescência medida seria a somatória instantânea do nível de cálcio intracelular de células em momentos diferentes do ciclo de contração e o perfil do sinal possivelmente não corresponderia a um transiente de cálcio.

Além disso, a presença do sistema de estimulação mantém as culturas de células em um regime de atividade conhecido e qualquer variação na frequência ou amplitude dos transientes de cálcio observados, por exemplo, devido a adição de uma droga, pode ser facilmente identificada e isolada.

Nos experimentos realizados no trabalho, a quantidade elevada de transientes de cálcio medidos inviabilizou o processamento manual dos dados, de fato sistemas de alto rendimento produzem grandes volumes de informação que exigem softwares específicos de processamento. A rotina de processamento dos sinais desenvolvida em MATLAB permitiu agilizar muito o cálculo dos parâmetros dos transientes de cálcio e foi um componente essencial para obtenção dos resultados.

Diferentemente do que é feito em alguns sistemas comerciais, em que os parâmetros dos transientes de cálcio são estimados a partir do ajuste de modelos teóricos, como modelos de exponencias simples ou duplas e funções binomiais, a rotina desenvolvida no trabalho estima os parâmetros diretamente nos sinais obtidos após o cálculo da razão de fluorescência ($\Delta F/F$). Com isso, espera-se estimar parâmetros que descrevem fielmente a atividade contrátil a partir das variações do cálcio intracelular e que permitam detectar alterações incomuns no perfil dos transientes de cálcio que possuam significado fisiológico e que poderiam não ser identificadas a partir de curvas ajustadas aos pontos experimentalmente medidos.

Esta abordagem para estimativa dos parâmetros dos transientes de cálcio foi adotada porque a estimulação elétrica garante a obtenção de sinais com perfis e

ritmos bastante regulares que permitem calcular um transiente de cálcio médio com um nível de ruído muito baixo, no qual é feita a estimativa de parâmetros que representam bem a atividade contrátil da cultura de células.

6.1.O SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO

O sistema de estimulação desenvolvido consiste de um estimulador eletrônico e uma microplaca de cultura modificada. O estimulador eletrônico é compacto, simples e funciona com baterias comerciais.

A seleção dos parâmetros de estimulação (amplitude e largura do pulso) foi feita a partir de experimentos com culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos observados em um microscópio óptico e de testes realizados na solução de leitura do protocolo de fluorescência. Os pulsos elétricos de estimulação induziram contrações sincronizadas na cultura de cardiomiócitos e não formaram bolhas na solução. A formação de bolhas gera interferências que inviabilizam a detecção correta do sinal de fluorescência emitido pelo indicador de cálcio intracelular e deve ser evitada minimizando a largura dos pulsos de estimulação.

Os parâmetros do pulso de estimulação determinados (Figura 29) foram: (i) amplitude de 8V; e (ii) largura de pulso de 5 ms. Esses parâmetros geram um campo elétrico de 8 V cm^{-1} , próximo a valores descritos na literatura e utilizados em sistemas de estimulação elétrica para engenharia de tecidos [70].

A microplaca modificada é de fácil manuseio e foi projetada para ter 16 poços com eletrodos e 26 poços comuns. Cada amostra pode ser medida por até 40 segundos com uma resolução temporal de 40 milissegundos e a injeção de drogas pode ser realizada pelo sistema de injeção do leitor de placas.

Os procedimentos de manutenção da cultura em poços com eletrodos são os mesmos usados em poços comuns de microplacas comerciais. Uma versão transparente da microplaca modificada foi produzida e utilizada como controle para observação de células em poços comuns e poços com eletrodos durante os procedimentos de cultura em todos os experimentos. A presença de eletrodos de liga de platina-irídio e de silicone de grau médico (Figura 31C) não impediu a adesão e o desenvolvimento esperado das células. Além disso, os materiais utilizados não apresentaram autofluorescência significativa e não afetaram a medição da fluorescência de cálcio intracelular usando Fluo-4 AM.

6.2. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO

Os experimentos iniciais com os mioblastos H9c2 (2-1) foram essenciais para o estabelecimento da metodologia propriamente dita posteriormente validada e aplicada em hiPSC-CM. A principal dificuldade em realizar a estimulação de amostras em placas de cultura é que a ausência da perfusão exige a seleção criteriosa da solução na qual as células serão mantidas durante o experimento e dos parâmetros de estimulação, uma vez que os estímulos elétricos podem remover as células da monocamada, promover hidrólise e formação bolhas que impedem a medição da fluorescência do cálcio intracelular. Utilizando os mioblastos foi possível entender a dinâmica do Fluo-4 AM e a influência das soluções de marcação e de leitura de fluorescência no desempenho dos protocolos de estimulação elétrica, resultando na definição dos parâmetros de estimulação e dos protocolos de preparação das amostras.

Os dados obtidos, mostrando uma redução do cálcio intracelular nas células estimuladas eletricamente (Figura 37), contribuíram para validar o conceito da estimulação e medição conjunta da fluorescência no interior do leitor de placas. No entanto o significado fisiológico desta redução não foi investigado, pois os resultados forneciam bases suficientes para a expansão da metodologia para cardiomiócitos, com aplicações de maior impacto terapêutico e em pesquisa.

A grande contribuição resultados obtidos em mioblastos foi mostrar a possibilidade de associar com êxito os protocolos de avaliação de fluorescência e a estimulação elétrica no interior do FLUOstar Omega, sem a formação de bolhas mesmo com estimulação contínua por 20 minutos. Dessa forma, em seguida os esforços foram direcionados para aplicação da metodologia e adaptação do sistema de estimulação para uso em hiPSC-CM.

6.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido permitiu registrar transientes de cálcio com perfis uniformes e ritmos bem definidos induzidos pela estimulação elétrica em hiPSC-CM. Os sinais de fluorescência medidos apresentaram a morfologia típica de transientes de cálcio intracelular presentes em outros trabalhos da literatura [18] e permitiram calcular parâmetros que caracterizam quantitativamente a atividade contrátil de culturas de hiPSC-CM.

As culturas de células estudadas sem estimulação elétrica e durante a estimulação elétrica foram tratadas seguindo os mesmos protocolos e apresentaram padrões de atividade completamente diferentes, conforme mostra a Figura 45 e a Figura 46. Nas culturas de células não estimuladas, o padrão de atividade mais comumente encontrado foi a variação irregular no nível de cálcio intracelular alternada com o surgimento de transientes espontâneos com perfis e ritmos irregulares. As células em repouso podem apresentar contrações espontâneas isoladas ou sustentadas, a frequência de ocorrência dos transientes de cálcio não é uniforme e a amplitude varia durante o registro de fluorescência.

Dados da literatura mostram que mesmo nas situações em que as culturas de hiPSC-CM apresentam frequências espontâneas de contração bem definidas as taxas de batimentos encontradas por diferentes grupos de pesquisa variam entre 28 e 108 bpm [85].

A estimulação com o sistema desenvolvido resultou em transientes de cálcio nas culturas de acordo com a frequência do estimulador, com perfis uniformes e bem definidos ao longo de todo o registro de fluorescência. É interessante destacar que o perfil dos transientes de cálcio induzidos pela estimulação elétrica tem morfologia e amplitude semelhantes a dos transientes de cálcio espontâneos (Figura 45), indicando que a estimulação induz atividade contrátil fisiológica.

Estes resultados demonstraram a capacidade do método em criar um ambiente controlado para registro de transientes de cálcio com perfis e ritmos bem definidos induzidos pela estimulação elétrica.

A avaliação de drogas realizada em sistemas de imagem de alto rendimento utiliza parâmetros obtidos a partir de transientes de cálcio intracelular medidos em culturas de células apresentando atividade espontânea [3] [27]. As variações intrínsecas na atividade contrátil e no perfil dos transientes dificulta a identificação do efeito da droga e exige que um número muito elevado de amostras seja estudado para conduzir a resultados com significância estatística. No caso dos sinais obtidos na presença da estimulação elétrica, essa variabilidade intrínseca não se manifesta, e a boa reprodutibilidade dos transientes de cálcio medidos permite isolar bem o efeito de fármacos utilizando um número bem menor de amostras, conforme mostram nossos resultados (Figura 48).

6.4. EFEITO DA FREQUÊNCIA NO TRANSIENTE DE CÁLCIO

Avaliando a dependência da frequência dos transientes de cálcio observou-se que em frequências mais altas a amplitude dos transientes de cálcio diminuiu e o nível de cálcio basal aumentou (Figura 47).

Este comportamento foi descrito anteriormente em cardiomiócitos de ratos neonatos e pode ser o responsável por manter o balanço de fluxo entre a entrada e a saída de cálcio das células em regime de contração [78]. Dibb et al. descreveu em seu trabalho que o fluxo de entrada de cálcio na célula é balanceado por um fluxo de saída com dois componentes: o fluxo sistólico proporcional a amplitude do transiente de cálcio e o fluxo diastólico proporcional ao nível basal de cálcio.

Nas frequências de estimulação mais baixas (0,1 Hz) o nível de Ca^{2+} basal é constante e o equilíbrio dos fluxos de cálcio é controlado pelo fluxo sistólico. Em frequências mais altas, o transiente de cálcio anterior não teve tempo de decair completamente antes do próximo estímulo, e consequentemente menos cálcio é recaptado para o retículo sarcoplasmático (RS). O conteúdo menor de cálcio no RS é responsável pela diminuição da amplitude do transiente de cálcio que também reduz o fluxo sistólico, o que conduziria a célula a uma situação de desbalanço entre o fluxo de entrada e de saída de cálcio. Isso não ocorre porque o nível de cálcio basal aumenta, e portanto, aumenta o componente de fluxo diastólico. Isso compensará o menor fluxo sistólico restabelecendo o equilíbrio entre a entrada e a saída [24]. O nível de cálcio basal em células apresentando contrações é determinado por uma combinação dos fluxos do sarcolema e do retículo sarcoplasmático [79] e é importante na manutenção dos fluxos de entrada e saída de cálcio da célula.

Os resultados do trabalho revelaram nas culturas de hiPSC-CM uma resposta dependente da frequência consistente com os mecanismos descritos em miócitos ventriculares de ratos por Dibb et. al. Até o momento nenhum outro trabalho estudou este mecanismo em culturas de hiPSC-CM.

6.5. CÁLCULO DOS PARÂMETROS DOS TRANSIENTES DE CÁLCIO

Os transientes de cálcio medidos com o método desenvolvido representam a atividade global de uma cultura de hiPSC-CM com aproximadamente 80 mil células apresentando contrações sincronizadas induzidas por pulsos de estimulação

elétrica. A partir deles é possível caracterizar quantitativamente a atividade contrátil das culturas de cardiomiócitos.

A caracterização da contratilidade a partir dos parâmetros dos transientes de cálcio normalmente é feita utilizando células isoladas avaliadas em microscópios de fluorescência [11] [18] [63]. Estudos realizados utilizando sistemas de imagem de alto rendimento normalmente são empregados exclusivamente para avaliação do efeito drogas a partir de variações percentuais nos parâmetros, cujos valores absolutos não são publicados [27] [86]. Desta forma, os resultados obtidos com frequência de estimulação de 0,5 Hz foram comparados com dados da literatura obtidos em células isoladas cujos transientes de cálcio foram medidos utilizando microscopia de fluorescência.

Hwang et al. caracterizou hiPSC-CM estimulados eletricamente (0,5 Hz) gerados por múltiplos laboratórios e encontrou tempo até o pico variando entre 500 e 600 ms, taxa de decaimento variando entre 1,0 e 1,2 s, amplitude variando entre 0,3 e 0,4 ($\Delta F/F$), nível de Ca^{2+} basal variando entre 1,0 e 1,1 ($\Delta F/F$) em hiPSC-CM isolados [18]. Neste trabalho foram encontrados tempo até o pico de 600 ± 90 ms, taxa de decaimento de $0,54 \pm 0,03$ s, amplitude de $0,63 \pm 0,04$ ($\Delta F/F$) e nível de Ca^{2+} basal de $0,54 \pm 0,11$ ($\Delta F/F$).

O valor de tempo até o pico encontrado em nosso estudo foi muito próximo ao de células isoladas, o que sugere que embora nos sinais tenham sido medidos transientes de cálcio que representam a atividade de uma população de células, a ativação das células em cultura ocorre de maneira bem sincronizada e tão rápida quanto a de uma célula isolada. Isso só é possível, provavelmente, devido à presença da estimulação elétrica.

Os demais parâmetros medidos em nossos experimentos apresentaram maiores diferenças em relação aos dados medidos em células isoladas, a taxa de decaimento foi 55% menor, a amplitude do transiente 50% maior e o nível de cálcio basal 50% menor. Estes parâmetros estão muito relacionados à intensidade do sinal de fluorescência, e portanto, as diferenças podem ser devido ao uso de diferentes densidades de células nos estudos. No entanto, considerando o acoplamento excitação-contração e a regulação dos fluxos de cálcio intracelular, as diferenças são coerentes. Os transientes de cálcio de maior amplitude medidos em nossas culturas de hiPSC-CM geram fluxos sistólicos maiores, assim o componente de fluxo diastólico deve ser menor, resultando num nível de Ca^{2+} basal proporcionalmente

mais baixo. Além disso, a taxa de decaimento também deve ser proporcionalmente menor porque um nível maior de Ca^{2+} intracelular deve decair até um nível menor de Ca^{2+} basal no mesmo intervalo de tempo de 2 segundos, definido pela frequência de estimulação (0,5 Hz). Estes dados sugerem que tanto as células em cultura estudadas com o novo método desenvolvido no trabalho, quanto as células isoladas estudadas utilizando o método já bem estabelecido de microscopia de fluorescência apresentam o mesmo padrão de atividade contrátil e de balanço de fluxos de entrada e saída de cálcio.

6.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DROGAS

A aplicação do método na identificação do efeito de drogas no acoplamento excitação-contração cardíaco permitiu observar e quantificar variações específicas no transiente de cálcio. Foram avaliadas alterações nos transientes de cálcio após o tratamento das células com três concentrações de Verapamil (0,05 μM , 0,5 μM e 5,0 μM) aplicadas utilizando o sistema de injeção do leitor de placas (Figura 48). A frequência de 0,2 Hz utilizada para estimular as culturas de células durante a avaliação da droga é relativamente baixa para o transiente de cálcio decair quase completamente antes do próximo pulso de estimulação, porém também permite observar o nível de cálcio basal em relação aos sinais de referência estimulados em 0,1 Hz.

Dentre os parâmetros estimados, alguns podem representar a fase de subida do transientes de cálcio (diff, tpeak, rt, amplitude) relacionada ao mecanismo de liberação de cálcio induzido por cálcio (CICR) em resposta a uma despolarização na membrana celular e outros representam a fase de decaimento (dct, τ) relacionada ao bombeamento de cálcio do citoplasma para fora da célula, realizado pelo trocador sódio-cálcio (NCX) e à recaptação do Ca^{2+} para o RS, realizada pela SERCA.

O verapamil é um inibidor dos canais de cálcio do tipo-L, que são responsáveis por desencadear o CICR, consequentemente a ação da droga inibe a contração e reduz a amplitude do transiente de cálcio [86]. Nos resultados obtidos observou-se uma redução progressiva da amplitude do transiente de cálcio para doses crescentes de verapamil. Na concentração de 0,05 μM as variações não foram significativas, no entanto, tanto a inclinação da fase de subida (diff) como a amplitude diminuíram cerca de 10%. Na concentração de 0,5 μM , observou-se uma redução de 30% na inclinação (diff), acompanhada de uma redução de 45% na

amplitude. Células tratadas com 5,0 μM de verapamil tiveram as maiores alterações nos parâmetros. O transiente de cálcio ainda representa um pequeno aumento atrasado na concentração intracelular de Ca^{2+} , seguido de um decaimento exponencial. A inclinação (diff) diminuiu 60% e a amplitude (amp) diminuiu 80% ($p < 0,05$).

Pointon et al. avaliou a contração cardíaca em culturas de hiPSC-CM associando dados de contratilidade e medidas de cálcio intracelular em um sistema baseado em um microscópio de fluorescência (IonOptix, Massachusetts, EUA). O efeito do Verapamil foi avaliado em células isoladas sob estimulação elétrica na frequência de 1,0 Hz comparando-se o valor dos parâmetros do transiente de cálcio (amplitude, largura, tempo de subida e tempo de decaimento) antes e após o tratamento com o fármaco. A curva dose-resposta determinada no estudo mostrou uma redução na amplitude do transiente de cálcio de aproximadamente 50% para a concentração de aproximadamente 0,6 μM de Verapamil. Neste trabalho foi encontrada uma redução de 45% nas culturas celulares tratadas com 0,5 μM e a partir da curva dose-resposta obtida (Figura 49) é possível estimar que a redução de 50% seria obtida em culturas celulares tratadas com 0,63 μM de verapamil.

Estes dados validaram a aplicabilidade do novo método desenvolvido na identificação do efeito de drogas no acoplamento excitação-contração cardíaco e demonstram sua capacidade de gerar resultados semelhantes aos de sistemas comerciais baseados em métodos já estabelecidos como a microscopia de fluorescência.

O uso de células no desenvolvimento do trabalho foi previsto em protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da FMUSP, nº 144/15.

7. CONCLUSÕES

O método desenvolvido associa um leitor de placas a um sistema de estimulação composto por um estimulador eletrônico e uma microplaca modificada e estabelece uma nova abordagem para estudo de transientes de cálcio associando com êxito estimulação elétrica e medição conjunta da fluorescência no interior de um leitor de ELISA multimodo.

A microplaca modificada com eletrodos de liga de platina-irídio no fundo dos poços permitiu a adesão e desenvolvimento dos hiPSC-CM. O estimulador eletrônico foi capaz de gerar contrações sincronizadas na cultura de células e o uso do leitor de placas permitiu realizar a medição do cálcio intracelular de uma grande quantidade de amostras em pouco tempo.

A solução desenvolvida é nova e sua aplicação permitiu: (i) registrar transientes de cálcio com um perfil bem definido que representa contrações geradas por um estímulo elétrico; (ii) observar mecanismos fisiológicos de regulação de fluxos de cálcio nas culturas de hiPSC-CM; e (iii) avaliar o efeito do verapamil no acoplamento excitação-contração cardíaco.

Os sinais registrados apresentaram transientes de cálcio bem definidos possibilitando estimar parâmetros que puderam ser empregados para caracterizar quantitativamente alterações na regulação de cálcio e avaliar o efeito de drogas no acoplamento excitação-contração de hiPSC-CM.

Este método é escalável, permitindo assim a avaliação automatizada *in vitro* de alto rendimento de bibliotecas de medicamentos que afetam o acoplamento excitação-contração em células cardíacas.

REFERÊNCIAS

1. BRAAM, S. et al. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Res**, v. 4, n. 2, p. 107-16, 2010.
2. HIMMEL, H. Drug-induced functional cardiotoxicity screening in stem cell-derived human and mouse cardiomyocytes: effects of reference compounds. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 68, n. 1, p. 97-111, 2013.
3. BEDUT, S. et al. High-throughput drug profiling with voltage- and calcium-sensitive fluorescent probes in human iPSC-derived cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 311, n. 1, p. H44-53, 2016.
4. COLATSKY, T. et al. The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative - Update on progress. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 81, p. 15-20, 2016.
5. GINTANT, G.; SAGER, P.; STOCKBRIDGE, N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 7, p. 457-71, 2016.
6. ZHANG, J. et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. **Circ Res**, v. 104, n. 4, p. e30-41, 2009.
7. MORDWINKIN, N. M.; BURRIDGE, P. W.; WU, J. C. A Review of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for High-Throughput Drug Discovery, Cardiotoxicity Screening and Publication Standards. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 6, n. 1, p. 22–30, 2013.
8. BLINOVA, K. et al. Comprehensive Translational Assessment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Evaluating Drug-Induced Arrhythmias. **Toxicol Sci**, v. 155, n. 1, p. 234-247, 2017.
9. YAZAWA, M. et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. **Nature**, v. 471, p. 230–234, 2011.
10. MATSA, E. et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. **Eur Heart J**, v. 32, p. 952–962, 2011.
11. ITZHAKI, I. et al. Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18037, 2011.
12. LAHTI, A. et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic. **Dis Model Mech**, v. 5, p. 220–230, 2012.

13. SUN, N. et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. **Sci Transl Med**, v. 4, p. 130ra47–130ra47, 2012.
14. NOVAK, A. et al. Cardiomyocytes generated from CPVT D307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 3, p. 468-82, 2012.
15. JUNG, C. et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. **EMBO Mol Med**, v. 4, n. 3, p. 180-91, 2012.
16. KO, H.; GELB, B. Concise review: drug discovery in the age of the induced pluripotent stem cell. **Stem Cells Transl Med**, v. 3, n. 4, p. 500-9, 2014.
17. KARAKIKES, I. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. **Circ Res**, v. 117, n. 1, p. 80-8, 2015.
18. HWANG, H. et al. Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. **J Molec Cell Cardiol**, v. 85, p. 79–88, 2015.
19. 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, 2011.
20. LIANG, P. et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. **Circulation**, v. 127, n. 16, p. 1677-91, 2013.
21. RANA, P. et al. Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: bioenergetics and utilization in safety screening. **Toxicol Sci**, v. 130, n. 1, p. 117-31, 2012.
22. GUO, L. et al. Use of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (hiPSC-CMs) to Monitor Compound Effects on Cardiac Myocyte Signaling Pathways. **Curr Protoc Chem Biol**, v. 7, n. 3, p. 141-85, 2015.
23. FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **Am J Physiol**, v. 245, n. 1, p. C1-14, 1983.
24. EISNER, D. et al. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circ Res**, v. 2, n. 121, p. 181-195, 2017.
25. SEO, K. et al. Relevance of cardiomyocyte mechano-electric coupling to stretch-induced arrhythmias: optical voltage/calcium measurement in mechanically

stimulated cells, tissues and organs. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 115, n. 2-3, p. 129-39, 2014.

26. SHARMA, A. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as an in vitro model for coxsackievirus B3-induced myocarditis and antiviral drug screening platform. **Circ Res**, v. 115, n. 6, p. 556-66, 2014.

27. SIRENKO, O. et al. Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. **J Biomol Screen**, v. 18, n. 1, p. 39-53, 2013.

28. WIDMAIER, E.; RAFF, H.; STRANG, K. **Vander Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function**. 11^a. ed. New York: The McGraw-Hill Company, 2001.

29. HANSEN, J. T.; M., K. B. **Netter's Atlas of Human Physiology**. 1^a. ed. Philadelphia: Saunders, 2002.

30. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11^a. ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2006.

31. BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.

32. HEERDT, P. M. et al. Chronic unloading by left ventricular assist device reverses contractile dysfunction and alters gene expression in end-stage heart failure. **Circulation**, v. 102, p. 2713–2719, 2000.

33. POGWIZD, S. M. et al. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual b-adrenergic responsiveness. **Circ Res**, v. 88, n. 11, p. 1159-67, 2001.

34. HEERDT, P. M.; KLOTZ, S.; BURKHOF, D. Cardiomyopathic etiology and SERCA2a reverse remodeling during mechanical support of the failing human heart. **Anesth. Analg.**, v. 102, p. 32–37, 2006.

35. KLOTZ, S.; JAN DANSER, A. H.; BURKHOF, D. Impact of left ventricular assist device (LVAD) support on the cardiac reverse remodeling process. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 97, n. 2-3, p. 479–96, 2008.

36. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 1. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

37. THERMO Fisher Scientific: Fluo-4 AM cell permeant. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201>>. Acesso em: 06 dez. 2017.

38. DISCOVERX'S HitHunter Calcium No WashPLUS Assay. Disponível em: <<https://www.discoverx.com/technologies-platforms/fluorescence-intensity-technology/calcium>>. Acesso em: 06 dez. 2017.
39. TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, 2007.
40. YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917-20, 2007.
41. AMABILE, G.; MEISSNER, A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. **Trends Mol Med**, v. 15, n. 2, p. 59-68, 2009.
42. BURRIDGE, P. et al. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 1, p. 16-28, 2012.
43. BAYZIGITOV, D. et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Afford New Opportunities in Inherited Cardiovascular Disease Modeling. **Cardiol Res Pract**, v. 2016, p. 3582380, 2016.
44. MATSA, E.; BURRIDGE, P.; WU, J. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 239, p. 239ps6, 2014.
45. MORDWINKIN, N.; LEE, A.; WU, J. Patient-specific stem cells and cardiovascular drug discovery. **JAMA**, v. 310, n. 19, p. 2039-40, 2013.
46. COHEN, J. et al. Use of human stem cell derived cardiomyocytes to examine sunitinib mediated cardiotoxicity and electrophysiological alterations. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 257, n. 1, p. 74-83, 2011.
47. GUO, L. et al. Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Toxicol Sci**, v. 123, n. 1, p. 281-9, 2011.
48. NUNES, S. et al. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Nat Methods**, v. 10, n. 8, p. 781-7, 2013.
49. GHERGHICEANU, M. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: comparative ultrastructure. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 11, p. 2539-51, 2011.
50. ENG, G. et al. Autonomous beating rate adaptation in human stem cell-derived cardiomyocytes. **Nature Communications**, v. 7, n. 10312, p. 1-10, 2016.
51. CHONG, J. et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. **Nature**, v. 510, n. 7504, p. 273-7, 2014.

52. REINECKE, H. et al. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. **Circulation**, v. 100, n. 2, p. 193-202, 1999.
53. YANG, X.; PABON, L.; MURRY, C. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 114, n. 3, p. 511-23, 2014.
54. HUETHORST, E. et al. Enhanced Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocyte Maturation Using a Dual Microgradient Substrate. **ACS Biomater Sci Eng**, v. 2, n. 12, p. 2231–2239, 2016.
55. ZHU, R. et al. Physical developmental cues for the maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 117, p. 1-18, 2014.
56. FONG, A. et al. Three-Dimensional Adult Cardiac Extracellular Matrix Promotes Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Tissue Eng Part A**, v. 22, n. 15-16, p. 1016-25, 2016.
57. HIRT, M. et al. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 74, p. 151-61, 2014.
58. RAO, C. et al. The effect of microgrooved culture substrates on calcium cycling of cardiac myocytes derived from human induced pluripotent stem cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 10, p. 2399-411, 2013.
59. ANSON, B.; KOLAJA, K.; KAMP, T. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. **Clin Pharmacol Ther**, v. 89, n. 5, p. 754-8, 2011.
60. LUNDY, S. et al. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 14, p. 1991-2002, 2013.
61. GUATIMOSIM, S.; GUATIMOSIM, C.; SONG, L.-S. Imaging Calcium Sparks in Cardiac Myocytes. **Methods Mol Biol.**, v. 689, p. 205–214, 2011.
62. LAX, A.; SOLER, F.; FERNÁNDEZ-BELDA, F. Intracellular Ca(2+) pools and fluxes in cardiac muscle-derived h9c2 cells. **J Bioenerg Biomembr**, v. 37, n. 4, p. 249-59, 2005.
63. SHARMA, A. et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes as an In Vitro Model for Coxsackievirus B3–Induced Myocarditis and Antiviral Drug Screening Platform. **Circulation Research**, v. 115, p. 556-566, 2014.

64. DITTAMI, G. et al. Intracellular calcium transients evoked by pulsed infrared radiation in neonatal cardiomyocytes. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 6, p. 1295-306, 2011.
65. EFIMOV, I. R.; NIKOLSKI, V. P.; SALAMA, G. Optical imaging of the heart. **Circ Res**, v. 94, n. 1, p. 21-33, 2004.
66. ASKAR, S. et al. Antiproliferative treatment of myofibroblasts prevents arrhythmias in vitro by limiting myofibroblast-induced depolarization. **Cardiovasc Res**, v. 90, n. 2, p. 295-304, 2011.
67. SOLER, F. et al. Passive Ca(2+) overload in H9c2 cardiac myoblasts: assessment of cellular damage and cytosolic Ca(2+) transients. **Arch Biochem Biophys**, v. 512, n. 2, p. 175-82, 2015.
68. FLIPR Tetra High-Throughput Cellular Screening System. Disponível em: <<https://www.moleculardevices.com/systems/flipr-tetra-high-throughput-cellular-screening-system>>. Acesso em: 06 dez. 2017.
69. IONOPTIX: Calcium and Contractility in Isolated Myocytes. Disponível em: <<http://www.ionoptix.com/product/myocyte-calcium-and-contractility-recording-system/>>. Acesso em: 06 dez. 2017.
70. TANDON, N. et al. Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. **Nat Protoc**, v. 4, n. 2, p. 155-173, 2009.
71. TANDON, N. et al. Optimization of Electrical Stimulation Parameters for Cardiac Tissue Engineering. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, n. 6, p. e115–e125, 2011.
72. KIMES, B.; BRANDT, B. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. **Exp Cell Res**, v. 98, n. 2, p. 367-81, 1976.
73. KUZNETSOV, A. et al. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism; mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, n. 2, p. 276-84, 2015.
74. MÉNARD, C. et al. Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 41, p. 29063-70, 1999.
75. HESCHELER, J. et al. Morphological; biochemical; and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. **Circ Res**, v. 69, n. 6, p. 1476-86, 1991.
76. FLUO-4 Nw Calcium Assay Kits. **Life Technologies**. Disponível em: <<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp36205.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

- 77.FLUO Calcium Indicators. **Life Technologies**. Disponível em: <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp01240.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.
- 78.DIBB, K. M.; EISNER, D. A.; TRAFFORD, A. W. Regulation of systolic $[Ca^{2+}]_i$ and cellular Ca^{2+} flux balance in rat ventricular myocytes by SR Ca^{2+} , L-type Ca^{2+} current and diastolic $[Ca^{2+}]_i$. **J Physiol**, v. 585, n. 2, p. 579–592, 2007.
- 79.ANTOONS, G. et al. Mechanisms underlying the frequency dependence of contraction and $[Ca^{2+}]_i$ transients in mouse ventricular myocytes. **J Physiol**, v. 543, n. 3, p. 889-98, 2002.
- 80.TAKAHASHI, A. et al. Measurement of Intracellular Calcium. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1089-1125, 1999.
- 81.VERONEZ, D. M.; CESTARI, I. N.; CESTARI, I. A. A Novel Method for Evaluation of Intracellular Calcium during Electrical Stimulation inside a Plate Reader. **Artif Organs**, v. 40, n. 5, p. A12, 2016.
- 82.VERONEZ, D. M.; CESTARI, I. N.; CESTARI, I. A. **Método para avaliação da dinâmica do cálcio por fluorescência em culturas de células eletricamente estimuladas em um leitor de microplacas**. XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2016. Foz do Iguaçu, Brasil: Foz do Iguaçu. 2015 out 17-20. p. 333-336.
- 83.ION Optix - Transient Analysis. **Prime Tech Engineering**. Disponível em: <<http://www.primetech.co.jp/Portals/0/db/product/ION/MonotonicTransientAnalysisDefined.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2015.
- 84.VERONEZ, D. M.; CESTARI, I. N.; CESTARI, I. A. A Novel Approach for High Content Screening Using Human Cardiomyocytes. **Circulation**, v. 136, n. 1, p. A15509, 2017.
- 85.HOEKSTRA, M. et al. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. **Front Physiol**, v. 3, p. 346, 2012.
- 86.POINTON, A. et al. Assessment of cardiomyocyte contraction in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Toxicol Sci.**, v. 144, n. 2, p. 227-37, 2015.

APÊNDICE: ROTINA DE PROCESSAMENTO DOS DADOS

O método desenvolvido no trabalho permitiu registrar transientes de cálcio em resposta à estimulação elétrica com um perfil bem definido que permite extração de parâmetros úteis na caracterização da atividade contrátil das culturas de células e da regulação do cálcio no acoplamento excitação contração.

Em cada placa do sistema de estimulação 12 amostras foram analisadas em 4 frequências distintas gerando aproximadamente 50 registros com transientes de cálcio a serem processados.

O grande volume de dados gerados em pouco tempo é uma característica de sistemas de alto rendimento como leitores de microplaca e se tornou inviável processar estes dados manualmente. Isso motivou o desenvolvimento da rotina personalizada em MATLAB que foi utilizada como ferramenta para processamento dos sinais e cálculo automatizado dos parâmetros do transiente de cálcio.

O algoritmo processa os sinais em três etapas assistidas pelo usuário. Neste tópico serão dados detalhes sobre cada uma das etapas do processamento.

(a) Normalização do sinal bruto de fluorescência

A fluorescência de sinais brutos é registrada no tempo como valores de unidades relativas de fluorescência (RFU). O primeiro passo do processamento é representar os sinais em *pseudoratio* ou simplesmente razão de fluorescência ($\Delta F/F$). Para isso é necessário selecionar um valor para F_{repouso} .

Verificamos que a intensidade de fluorescência após o decaimento do transiente de cálcio na frequência de 0,1 Hz é muito próxima do valor da fluorescência de repouso após desligar o estimulador, portanto, o sinal sob estimulação de 0,1 Hz (R01) foi selecionado como referência para normalização dos dados nas demais frequências.

A estimativa de F_{repouso} é feita selecionando-se o valor mínimo do sinal R01 após filtrá-lo utilizando o filtro de Savitzky–Golay de ordem 3 e janela de 9 pontos (Figura 50). Este filtro utiliza um polinômio da mesma ordem que a ordem do filtro e o ajusta em subconjuntos de pontos sucessivos utilizando o método dos mínimos quadrados. Sua vantagem em relação ao filtro de média é que ele aumenta a

relação sinal-ruído sem distorcer muito o sinal. No caso dos transientes de cálcio, a rápida fase de subida sofre menos distorções ao utilizarmos este filtro do que utilizando uma janela de média móvel simples.

Figura 50: Sinal medido nas células durante estimulação na frequência de 0,1 Hz.

Cada amostra é estudada nas frequências de 0,1 Hz, 0,2 Hz, 0,3 Hz e 0,5 Hz. O sinal de 0,1 Hz é sempre selecionado como referência para normalizar os demais sinais medidos no mesmo poço. O valor de fluorescência de repouso é selecionado com o mínimo do sinal filtrado com o filtro de Savitzky–Golay (SG) e está indicado no gráfico. Fonte: Elaborada pelo autor.

O sinal filtrado é descartado depois que o valor de F_{repouso} é obtido e a razão de fluorescência é calculada. A parte superior da Figura 51 mostra um sinal de fluorescência em RFU registrado sob estimulação elétrica na frequência de 0,2 Hz (R02), na parte inferior o mesmo sinal está normalizado e representa a intensidade de fluorescência apresentada como razão de fluorescência ($\Delta F/F$). Podemos observar que o valor de F_{repouso} estimado em R01 está em torno de 100 mil unidades relativas, no sinal R02 normalizado a intensidade de fluorescência dos transientes de cálcio varia entre 0,2 e 1,4 (amplitude de aproximadamente 1,2), isso quer dizer que a intensidade de fluorescência aumentou entre 20% e 140% em relação à intensidade no repouso.

Figura 51: Normalização dos sinais de fluorescência do cálcio intracelular.

Dados brutos (superior) e dados apresentados como razão de fluorescência (inferior) utilizando o valor de fluorescência de repouso estimado no sinal R01 filtrado com o filtro de Savitzky–Golay.
Fonte: Elaborada pelo autor

Além de calcular a razão de fluorescência, a primeira etapa da rotina também obtém o espectro de frequências do sinal utilizando a transformada rápida de Fourier (FFT – do inglês *Fast Fourier transform*). A FFT do sinal é utilizada para confirmar que os transientes gerados seguem a frequência do estimulador e também para orientar a próxima etapa da rotina de processamento. A Figura 52 mostra o espectro de frequências do sinal normalizado mostrado na Figura 51.

Figura 52: Espectro de frequência do sinal de fluorescência do cálcio

Espectro de frequência do sinal R02. Nota-se que a principal componente em frequência encontra-se em 0,2 Hz de acordo com a frequência de estimulação. A componente DC do sinal é eliminada antes do cálculo da FFT. Fonte: Elaborada pelo autor

(b) Detecção dos transientes

Cada amostra é medida durante 40 segundos, dependendo da frequência de estimulação utilizada, o sinal registrado pode ter entre 4 e 20 transientes de cálcio. Em situações normais estes transientes de cálcio devem apresentar um perfil uniforme, retornando para o mesmo valor de mínimo e atingindo o mesmo valor de pico, além de seguir o ritmo do estimulador. Calcular um transiente de cálcio médio a partir dos transientes de cálcio presentes no sinal é uma abordagem simples e eficiente para atenuar o ruído e estimar de forma mais precisa os parâmetros do transiente de cálcio que representa a contração das células em cultura.

A segunda etapa da rotina permite obter o transiente de cálcio médio do registro e auxilia o usuário a identificar precisamente o início, o fim e a duração dos transientes de cálcio.

Os gráficos dos sinais normalizados são mostrados na tela e o usuário seleciona uma aproximação do ponto inicial e final do primeiro transiente do registro. Em seguida, o algoritmo destaca este transiente e sequencialmente corta o registro em segmentos de mesma duração que são sobrepostos e o resultado é mostrado na tela conforme a Figura 53.

Figura 53: Segmentação incorreta do registro de fluorescência para identificação de transientes de cálcio.

Primeiro transiente (T1) até sétimo transiente de cálcio (T7). Resultados da sobreposição quando o tamanho do segmento não concorda com a frequência das contrações. Na curva superior o segmento é maior do que deveria, enquanto na inferior o segmento é menor. Fonte: Elaborada pelo autor.

A duração do segmento está relacionada com a frequência de ocorrência das contrações, que no caso das células estimuladas é a frequência definida no estimulador. Quando a duração do segmento é incorreta observa-se um perfil semelhante aos mostrados na Figura 53, em que o a duração do segmento pode ser maior ou menor do que o valor correto.

Caso a duração do segmento esteja correta espera-se uma sobreposição perfeita dos transientes de cálcio já que a contração é um evento periódico que segue o ritmo da estimulação. A partir dos resultados mostrados pela rotina do

MATLAB, o usuário pode ajustar corretamente a duração do segmento até obter o resultado mostrado na Figura 54 em que os segmentos se sobrepõem perfeitamente e o transiente médio pode ser obtido. A Figura 55 ilustra o transiente de cálcio médio para o sinal R02.

Figura 54: Segmentação correta do registro de fluorescência para identificação de transientes de cálcio.

Primeiro transiente (T1) até sétimo transiente de cálcio (T7). Quando a duração do segmento está de acordo com a frequência das contrações, os segmentos se sobrepõem perfeitamente. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 55: Média dos transientes de cálcio obtida pela rotina desenvolvida em ambiente MATLAB.

O transiente de cálcio médio tem o mesmo perfil que os demais transientes de cálcio do registro, porém o ruído é bastante atenuado pelo cálculo da média sem distorcer as características do sinal. Fonte: Elaborada pelo autor.

(c) Cálculo dos parâmetros do transiente de cálcio

Os parâmetros que caracterizam o transiente de cálcio são calculados sobre o transiente de cálcio médio obtido na etapa anterior da rotina considerando 7 valores de referência identificados no sinal, são eles: valor de pico da amplitude, 90%, 50% e 10% do valor de pico na fase de subida e 90%, 50% e 10% do valor de pico na fase de decaimento.

Inicialmente a rotina identifica o valor de pico e calcula a amplitude do transiente de cálcio considerando o nível de cálcio basal do sinal, este é o primeiro valor de referência. Em seguida são calculados os percentuais (90, 50 e 10%) deste valor e o transiente de cálcio é dividido em dois sinais, um que representa a fase de subida (instante inicial até instante de pico) e outro que representa a fase de decaimento (instante de pico até fim do transiente).

Como o decaimento do transiente de cálcio é lento comparado com a frequência de amostragem é simples encontrar valores próximos o suficiente dos valores de interesse na fase de descida, os pontos amostrados do sinal contém os valores de interesse.

Já a fase de subida possui uma derivada elevada e a diferença entre os pontos consecutivos é grande, por conta disso é necessário fazer uma interpolação para encontrar os valores de interesse já que na maioria das vezes os pontos amostrados do sinal não contém valores tão próximos de 90%, 50% e 10% do valor de pico necessários para estimar corretamente os parâmetros.

Identificados estes valores de referência na fase de subida com interpolação e na fase de descida, os parâmetros dos transientes são calculados conforme a Tabela 2. A Figura 26 também ajuda a entender de que forma os parâmetros são obtidos indicando-os sobre o perfil do transiente de cálcio.