Agatha Ribeiro da Silva

**Avaliação da influência de fibroblastos sobre a
maturação e indução de cardiomiócitos com potencial
arritmogênico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2019**

Agatha Ribeiro da Silva

**Avaliação da influência de fibroblastos sobre a
maturação e indução de cardiomiócitos com potencial
arritmogênico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Agatha Ribeiro da

Avaliação da influência de fibroblastos sobre a
maturação e indução de cardiomiócitos com potencial
arritmogênico / Agatha Ribeiro da Silva. -- São
Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Jose Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Fibroblastos 2.Miócitos cardíacos
3.Arritmias cardíacas 4.Células-tronco 5.Comunicação
parácrina 6.Repetições palindrômicas curtas agrupadas
e regularmente espaçadas

USP/FM/DBD-350/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) no Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2017/05829-4).

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha mãe, Ana Cristina Lana, e ao meu pai, Napoleão Ribeiro Silva. Muito obrigada por terem me ensinado a importância do trabalho e do estudo.

Agradecimentos

Este trabalho é resultado dos esforços de diversas pessoas. Agradeço ao Prof. José Eduardo Krieger pelas diversas oportunidades, ensinamentos e orientação. Dentre elas, gostaria de agradecer especialmente à minha co-orientadora, Dr.^a Elida Neri. Seus conselhos, ensinamentos, instruções e trabalho foram fundamentais para a realização deste projeto, para a minha formação como cientista e, também, para me tornar uma pessoa melhor. Também agradeço ao Dr. Thiago Turaça que trouxe contribuições fundamentais para este trabalho, dentre elas ideias, discussões e experimentos.

Foram imprescindíveis para a execução deste projeto a pesquisadora Dr.^a Miriam Alaniz que realizou os experimentos de *western blot* assim como a Dr.^a Gabriela Venturini pelas contribuições, o Dr. Rafael Dariolli que analisou as curvas de cálcio, as assistentes de pesquisa Mariana Bozoklian, Thaís Sobelman Vieira e Dr.^a Vera Kim que ajudaram em diversos experimentos, a Joelcimar Martins da Silva e o Dr. Mario Costa Cruz pelos experimentos de imunofluorescência e a Dr.^a Mariliza Rodrigues pelos experimentos de RT-PCR.

Gostaria de agradecer especialmente à gerente de laboratório Dr.^a Renata Carmona que sempre me ajudou, principalmente nos momentos em que eu mais precisei. Agradeço às responsáveis de RH Ana Maria Piesco, Edinalva, Marcelly Rosal, Silvana Campos e Maria de Lourdes que me auxiliaram em diversas questões durante o mestrado.

Agradeço muito aos amigos que fizeram do meu mestrado uma experiência pessoal e cientificamente enriquecedora. Dentre eles Aline Keusseyan, Iguaracy Sousa,

Juliana Alvim, João Carlos Ribeiro, Thayane Crestani, Silvestre Modestia, Théo Gremen, Samantha Teixeira, Thaís Girão e Ayumi Miyakawa.

A todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento do mestrado gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos, assim como a FAPESP que financiou e possibilitou a realização deste projeto.

“If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off... no matter what they say.” (Barbara McClintock)

Normalização adotada

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

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

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Lista de abreviações	14
Resumo.....	15
Abstract.....	17
Introdução.....	19
<i>Objetivo geral</i>	27
<i>Objetivos específicos</i>	27
Métodos.....	28
<i>Isolamento de células ventriculares primárias de ratos neonatos</i>	28
<i>Isolamento de células-tronco mesenquimais de rato do tecido adiposo</i>	28
<i>Meio condicionado</i>	29
<i>Sistema de co-cultura espacialmente delimitado</i>	30
<i>Caracterização quantitativa de culturas celulares por citometria de fluxo</i>	30
<i>Geração de hiPSC IRX3 knockout pela técnica de edição gênica com CRISPR/Cas9</i>	31
<i>Diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos</i>	32
<i>Análise relativa da expressão gênica por RT-PCR</i>	33
<i>Imunofluorescência</i>	34
<i>Análise dos transientes de cálcio</i>	34
<i>Preparo de lisado celular e análise de Western Blotting</i>	36
<i>Análise estatística</i>	37
Resultados	38
<i>Padronização das culturas e co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos extraídos de ratos neonatos</i>	38
<i>Fibroblastos cardíacos modulam a expressão de genes relacionados ao sistema de condução ventricular</i>	40
<i>Fibroblastos cardíacos influenciam espacialmente a expressão do marcador do VCS em cardiomiócitos</i>	42
<i>Cardiomiócitos em contato com fibroblastos cardíacos exibem um perfil de CaT semelhante ao das fibras de condução rápida</i>	44
<i>O meio condicionado por fibroblastos cardíacos é suficiente para regular os cardiomiócitos em direção ao sistema de condução ventricular</i>	47
<i>O meio condicionado por fibroblastos cardíacos inibe fenótipos associados à cardiomiócitos de trabalho</i>	50
<i>A indução dos cardiomiócitos para o fenótipo de condução pelos fibroblastos é independente da proliferação celular</i>	52
<i>A ativação da via do Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos é necessária para a maturação dos cardiomiócitos em células de condução rápida</i>	54
<i>Geração de cardiomiócitos de trabalho humanos in vitro</i>	58
<i>Geração de cardiomiócitos de trabalho humanos in vivo</i>	61
Discussão	65
Conclusão.....	73

Participação em evento científico.....	74
Referências.....	75
Apêndice.....	81

Lista de Figuras

Figura 1. Via canônica da sinalização Notch.	21
Figura 2. O fator de transcrição <i>Ir3</i> é essencial para o desenvolvimento e maturação do sistema de condução cardíaco e interage fisicamente com o <i>Nkx2.5</i> e <i>Tbx5</i>	23
Figura 4. Expressão relativa de genes cardíacos nas culturas ricas em cardiomiócitos e co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos.	41
Figura 5. Imagem representativa do sistema de co-cultura delimitado de cardiomiócitos e fibroblastos.	43
Figura 6. Influência dos fibroblastos cardíacos mediada por contato nos transientes de cálcio dos cardiomiócitos.....	46
Figura 7. Expressão relativa de genes relacionados com o VCS e da conexina-43 em culturas enriquecidas com cardiomiócitos, determinados por RT-PCR em tempo real.	49
Figura 8. Análise por High Content Screening de imunofluorescências das culturas enriquecidas com cardiomiócitos.	51
Figura 9. Dados de High Content Screening para avaliação de células em estado proliferativo.	53
Figura 10. Avaliação da influência da via do Notch1 na indução de fibras de condução rápida em resposta aos fatores secretados pelos fibroblastos cardíacos.	55
Figura 11. Determinação do sistema de condução ventricular mediada pelos fibroblastos cardíacos in vitro.	58
Figura 12. Geração de cardiomiócitos ventriculares de trabalho humanos à partir de células tronco pluripotentes induzidas (hiPSC) in vitro.	59
Figura 13. Análise por microscopia confocal dos rins que foram injetados com as células controle e <i>IRX3</i> KO no dia 4 da diferenciação.....	63
Figura A1. Caracterização dos fibroblastos cardíacos de ratos neonatos.	81
Figura A2. Análise transiente de cálcio de áreas enriquecidas com cardiomiócitos.....	84
Figura A3 Expressão proteica relativa de conexina-40 e conexina-43 determinada por Western Blotting.	84
Figura A4. Avaliação da expressão gênica e proteica do <i>IRX3</i> durante pontos distintos da diferenciação de células iPS em cardiomiócitos.	85
Figura A5. Teste da eficiência de clivagem dos sgRNA.	86
Figura A6. Esquema para geração e seleção dos knockouts para <i>IRX3</i> pela técnica de edição gênica CRISPR/Cas9.	86
Figura A7. Identificação do primeiro clone mutante identificado gerado pela técnica de edição gênica CRISPR/Cas9.	87
Figura A8. Identificação do segundo mutante clone 929C37.....	88
Figura A9. Descrição das sequências de aminoácidos geradas pela mutação dos clones 929C36 e 929C37.	89
Figura A10. Caracterização da diferenciação do clone de iPS 929C36 em cardiomiócitos.	89

Figura A11. Avaliação da influência do knockout para o gene IRX3 na expressão dos fatores de pluripotência em D0.....	90
Figura A12. As células IRX3 KO apresentam maior expressão proteica de Gata-4 e maior proporção de células positivas para KI67 no dia 6 da diferenciação.	91
Figura A13. No dia 30 da diferenciação as células IRX3 KO e controle apresentam um padrão similar de expressão de troponina I cardíaca e do marcador ventricular Myl2.	92
Figura A14. Análises globais não supervisionadas dos transientes de cálcio (CaT) intracelular nos cardiomiócitos no dia 30 da diferenciação não resulta no agrupamento completo dos diferentes grupos.	93
Figura A15. Imagens ilustrativas da coleta dos rins e corações que receberam as células controle e IRX3 KO injetadas no dia 4 da diferenciação.	94
Figura A16. Análise por microscopia dos corações que foram injetados com as células controle e IRX3 KO no dia 4 da diferenciação.....	95

Lista de Tabelas

Tabela A1 Lista de primers para RT-PCR em tempo real.....	82
Tabela A2. Descrição dos sgRNAs utilizados e respectivas sequências PAM.....	85

Lista de abreviações

VCS. Sistema de Condução Ventricular

Cardio. Cardiomiócitos

MSC. Células-tronco mesenquimais

fCM. Meio condicionado por fibroblastos

mCM. Meio condicionado por células-tronco mesenquimais

hiPSC. Células-tronco pluripotentes induzidas humanas

CRISPR. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas

CD90. Glicoproteína de membrana Thy-1

CD31. Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

Nkx2.5. Proteína Homeobox Nkx-2.5

Gata-4. Fator de transcrição GATA-4

Cx40. Conexina 40

Cx45. Conexina 45

Cx43. Conexina 43

Irx3. Proteína homeodomínio de classe iroquesa IRX-3

Scn5a. Proteína do canal de sódio tipo 5 subunidade alfa

Nav1.5. Proteína do canal de sódio tipo 5 subunidade alfa

Ki67. Proteína marcadora de proliferação Ki-67

CaT. Transientes de Cálcio

CaD50. Duração de 50% do transiente de cálcio

CaD90. Duração de 90% do transiente de cálcio

Notch. Proteína homóloga neurogênica do locus 1

NICD. Domínio Intracelular do Notch

Nrg1. Pro-neuregulina-1

ErbB. Receptor tirosina-kinase erbB-4

EphB4. Receptor Ephrin tipo-B 4

Resumo

Silva AR. *Avaliação da influência de fibroblastos sobre a maturação e indução de cardiomiócitos com potencial arritmogênico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Anomalias no sistema de condução ventricular (VCS) têm sido associadas à arritmias e muitos dos mecanismos para a determinação do VCS permanecem desconhecidos. Nós hipotetizamos que os fibroblastos adjacentes ao VCS influenciam a maturação de cardiomiócitos para fibras de condução rápida e poderiam estar associados à arritmias pós transplante de células-tronco em modelos de infarto do miocárdio. Utilizamos co-culturas de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos e fibroblastos cardíacos para testar esta hipótese *in vitro*. Adicionalmente, produzimos a deleção do gene candidato IRX3 em células tronco iPS para testar a hipótese de que o IRX3 influencia a diferenciação de cardiomiócitos em células especializadas de condução cardíaca. A co-cultura de fibroblastos cardíacos aumentou a expressão proteica do marcador para o VCS, Nav1.5, e alterou os transientes de cálcio intracelular (CaTs) de forma consistente com o perfil de células de condução rápida. Interessantemente, o meio condicionado por fibroblastos foi suficiente para recapitular o aumento da expressão gênica e proteica de marcadores do VCS (Gja5/Conexina 40, Scn5a/Nav1.5 e Irx3) e, também, inibir o fenótipo de cardiomiócito ventricular de trabalho (produzindo redução da área celular e diminuição da expressão de conexina 43). Mostramos também que a indução do fenótipo de condução rápida, ilustrada pelo aumento da expressão proteica da Conexina 40, requer sinalização justácrina mediada pela ativação do Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos, como demonstrado pela inibição farmacológica da via nos dois tipos celulares. Finalmente, as hiPSC IRX3 KO originaram cardiomiócitos com perfil de expressão gênica e CaTs condizentes com cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vitro* (maior expressão de troponina I e conexina 43; menor expressão de SCN5A; CaTs mais rápidos). Em conjunto, fornecemos evidências de que os fibroblastos cardíacos secretam fatores que induzem a maturação dos cardiomiócitos para células de condução rápida de forma dependente de sinalização Notch1 e que a diferenciação para células

especializadas em condução depende do gene *IRX3*, pois a sua deleção favoreceu o aparecimento de cardiomiócitos de trabalho, o que pode ser importante para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para regeneração cardíaca.

Descritores: Fibroblastos; Miócitos cardíacos; Arritmias cardíacas; Células-tronco; Comunicação parácrina; Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas.

Abstract

Silva AR. Evaluation of the influence of fibroblasts on the maturation and induction of cardiomyocytes with arrhythmogenic potential [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Ventricular conduction system (VCS) abnormalities have been associated with arrhythmias and many of the mechanisms for determining VCS remain unknown. We hypothesized that fibroblasts adjacent to the VCS influence cardiomyocyte maturation to fast-conducting fibers and could be associated with arrhythmias following stem cell transplantation in myocardial infarction models. We used ventricular cardiomyocyte co-cultures of neonatal rats and cardiac fibroblasts to test this hypothesis in vitro. Additionally, we produced the deletion of the candidate gene *IRX3* in iPS stem cells to test the hypothesis that *IRX3* influences cardiomyocyte differentiation in specialized cardiac conduction cells. Co-culture of cardiac fibroblasts increased the expression of the VCS marker, Nav1.5, and altered intracellular calcium transients (CaTs) consistently with the rapidly conducting cell profile. Interestingly, fibroblast-conditioned media was sufficient to recapitulate the increased gene and protein expression of VCS markers (*Gja5* / Connexin 40, *Scn5a* / Nav1.5 and *Irx3*) and also inhibit the ventricular working cardiomyocyte phenotype (producing reduced cell area and decreased connexin 43 expression). We have also shown that induction of the fast-conducting phenotype, illustrated by the increased protein expression of Connexin 40, requires juxtacrine signaling mediated by Notch1 activation in cardiomyocytes and fibroblasts, as demonstrated by pharmacological inhibition of the pathway in both cell types. Finally, hiPSC *IRX3* KO resulted in cardiomyocytes with gene expression profile and CaTs consistent with ventricular working cardiomyocytes (higher expression of troponin I and connexin 43; lower expression of *SCN5A*; faster CaTs) in vitro. Together, we provide evidence that cardiac fibroblasts secrete factors that induce cardiomyocyte maturation to fast-conducting cells dependent on Notch1 signaling and that differentiation to conduction-specialized cells depends on the *IRX3* gene, as its deletion favored the onset of ventricular working cardiomyocytes, which may be important for the development of more efficient strategies for cardiac regeneration.

Descriptors: Fibroblasts; Myocytes, cardiac; Arrhythmias, cardiac; Stem cells; Paracrine communication; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

Introdução

Os fibroblastos cardíacos estão entre as células mais abundantes do coração (Pinto et al, 2016)(Bergmann et al, 2015). Embora sejam primariamente conhecidos por seu papel na homeostase e remodelamento da matriz extracelular durante processos fisiopatológicos, estudos recentes mostraram a influência dos fibroblastos cardíacos no desenvolvimento embrionário e na hipertrofia pós-natal de cardiomiócitos, bem como na estabilização da contração por meio do acoplamento heterocelular (Sullivan et al, 2013) (Ieda et al, 2009) (Hachiro et al, 2007). Neste trabalho, nós avaliamos a influência dos fibroblastos cardíacos na indução de células de condução rápida, características do sistema de condução ventricular, e a modulação desta indução para a aplicação no campo de terapias com células-tronco para o infarto do miocárdio.

Os fibroblastos cardíacos estão presentes em todo o miocárdio, localizando-se principalmente no microambiente que circunda o sistema de condução ventricular (VCS, do inglês “*Ventricular Conduction System*”) (Furtado et al, 2016)(Virágh et al., 1977)(Christoffels et al, 2009). O sistema de condução ventricular é uma estrutura bem definida e especializada, responsável pela condução precisa de potenciais elétricos ao longo dos ventrículos (Mohan et al, 2018)(van Weerd et al, 2016). O VCS inicia-se no feixe de His e estende-se ao longo do sistema de condução ventricular periférico composto pelas fibras de condução rápida, conhecidas como células de Purkinje (Park et al, 2017). No coração embrionário, o VCS origina-se de miócitos presentes no miocárdio trabecular, os quais também dão origem aos cardiomiócitos ventriculares de trabalho adjacentes, responsáveis pela força de contração cardíaca (Meysen et al, 2007). Várias formas de arritmias adquiridas e hereditárias têm sido associadas à anomalias no sistema de condução ventricular e estão relacionadas à morte súbita cardíaca (Cerrone et

al, 2007)(Ben Caref et al., 2008) (Kang et al, 2010), o que ressalta a importância de se compreender o ajuste fino do sistema de condução ventricular para o funcionamento adequado do coração.

Estudos recentes têm contribuído para o entendimento do desenvolvimento do VCS através do rastreamento de linhagens celulares, análises de redes gênicas, moléculas sinalizadoras e regulação transcricional (van Weerd et al, 2016)(Govindapillai et al, 2018)(Mohan et al, 2018)(van Eif et al 2018). Uma das principais vias descritas na indução do fenótipo do sistema de condução ventricular é a via do Notch1. A via do Notch é uma via extremamente conservada e importante para a diferenciação em diversos tecidos. No coração, a via do Notch está envolvida em vários processos como especificação cardíaca, trabeculação e desenvolvimento das válvulas (MacGrogan et al, 2018). Em 2012, Rentschler et al demonstraram que a ativação da via do Notch1 em cardiomiócitos murinos durante o desenvolvimento embrionário ou no estágio pós natal é capaz de especializar os cardiomiócitos para o fenótipo de condução *in vivo* e *in vitro* (Rentschler et al, 2012). A sinalização clássica da via do Notch consiste na interação entre um ligante transmembrana localizado na célula sinalizadora e o receptor Notch transmembrana na célula receptora do sinal. Após a interação ligante-receptor, o receptor Notch extracelular é endocitado pela célula sinalizadora e sofre dois processos de clivagem ainda na membrana da célula receptora. A última clivagem é realizada pela enzima γ -secretase e termina por liberar no meio intracelular o Notch na sua forma ativa, também conhecido como NICD (*Notch IntraCellular Domain*). O Notch ativado, NICD, é então translocado para o núcleo e atua como co-fator de transcrição, modulando a expressão de diversos genes alvos (Figura 1).

Figura 1. Via canônica da sinalização Notch. Os receptores Notch (NOTCH1-NOTCH4 em mamíferos) são proteínas transmembranares de tipo I. Eles são sintetizados como um único polipeptídeo, que é diretamente clivado após a tradução por uma Furina convertase no Golgi. Esta primeira clivagem é necessária para formar o receptor heterodimérico funcional que será translocado para a membrana plasmática, onde os dois domínios do receptor permanecem associados por ligações não covalentes. O receptor Notch liga-se a ligantes extracelulares (JAG1-2, DLL1-4), que são expressos em células vizinhas. Assim como o receptor Notch, os ligantes são proteínas transmembrana tipo I. A sinalização de Notch é ativada quando o ligante associado ao receptor é modificado pela proteína Mib1 na célula sinalizadora. Este evento é crucial para a endocitose do ligante e para a geração de uma tração mecânica que produz uma mudança conformacional no receptor Notch, resultando em clivagens proteolíticas sucessivas mediadas pelas metaloproteinases ADAM (clivagem S2) e γ -secretase (clivagem S3),

culminando com a liberação do domínio intracelular Notch (NICD), e a sua translocação para o núcleo da célula receptora. No núcleo, o NICD liga-se diretamente à proteína de ligação ao DNA RBPJ (também conhecida como CBF1 e CSL) e recruta o co-ativador *Mastermind-like protein 1* (MAML1), enquanto os co-repressores (Co-R) são liberados. Os alvos do receptor Notch mais bem caracterizados são as famílias *Hairy and Enhancer of split* (HES) e HEY de repressores básicos de transcrição, embora vários outros alvos tenham sido descritos. Além disso, as consequências biológicas da ativação da via Notch são altamente dependentes do contexto, em parte devido às extensas interações de Notch com várias outras vias de sinalização (MacGrogan et al, 2018).

A via do Notch é um dos principais exemplos de sinalização justácrina, que necessita do contato entre as células no microambiente para acontecer. Outros exemplos de sinalização justácrina são a interação de receptores transmembrana com a matriz extracelular e a passagem direta de fatores do citoplasma de uma célula para o citoplasma de outra célula através de canais de membrana, conhecidos como *Gap Junctions*, ou junções comunicantes (Gilbert, 2000). As *Gap Junctions* são formadas por hemicanais que consistem de hexâmeros de proteínas chamadas conexinas e são importantes para a passagem de várias moléculas, ions e impulsos elétricos entre células vizinhas (Tarzemany et al, 2017)(Louault et al, 2008)(Zhang et al, 2008).

Quanto à regulação transcricional do sistema de condução ventricular, os fatores de transcrição Irx3, Nkx2.5 e Tbx5 atuam de forma conjunta na regulação do programa gênico de condução e indução da expressão de conexina 40 e na inibição de conexina 43, respectivamente enriquecidas no sistema de condução ventricular e nos cardiomiócitos de trabalho (Zhang et al, 2011) (Figura 2). A conexina 40 é um dos mais bem descritos marcadores para o sistema de condução ventricular e é fundamental para a rápida condução dos impulsos elétricos através dos ventrículos, juntamente com a subunidade do canal de sódio Nav1.5 (codificado pelo gene SCN5A) que também é abundantemente expressa no VCS (van Weerd et al, 2016). Trabalhos sobre perda de função em camundongos demonstraram que o fator de transcrição Irx3 é crítico para o desenvolvimento embrionário e para a maturação pós-natal do sistema de condução

ventricular, sendo que a falta deste fator de transcrição ocasiona hipoplasia do sistema de condução e taquiarritmia ventricular (Kim et al, 2016) (Koizumi et al, 2016). A hipoplasia do sistema de condução em camundongos *Irx3*^{-/-} foi relacionada à progressão do ciclo celular e aumento da proliferação dos cardiomiócitos *Irx3*^{-/-} que, por sua vez, inibia a diferenciação destas células em fibras de condução rápida e, consequentemente, direcionava para o fenótipo de cardiomiócito ventricular de trabalho.

Em humanos, mutações no gene *IRX3* também foram identificadas em pacientes com fibrilação ventricular idiopática (Koizumi et al, 2016).

Figura 2. O fator de transcrição *Irx3* é essencial para o desenvolvimento e maturação do sistema de condução cardíaco e interage fisicamente com o *Nkx2.5* e *Tbx5* (Kim et al, 2016).

Apesar dos avanços no entendimento sobre o desenvolvimento do sistema de condução ventricular, muitos dos mecanismos relacionados à determinação estrutural e funcional do VCS permanecem desconhecidos. Considerando que os fibroblastos cardíacos estão enriquecidos nas áreas adjacentes ao sistema de condução ventricular adulto, e surgem no coração embrionário em períodos próximos ao do surgimento do tecido de condução ventricular (van Weerd et al, 2016)(Ieda et al, 2009), nós

hipotetizamos que eles podem desempenhar um papel na diferenciação dos cardiomiócitos para fibras de condução rápida, que compõem o VCS. A compreensão desta intercomunicação entre fibroblastos e cardiomiócitos contribui para o entendimento do desenvolvimento cardíaco e pode ajudar na elucidação de possíveis mecanismos fisiopatológicos relacionados à arritmia. Além do desenvolvimento cardíaco, este fenômeno poderia ajudar na elucidação de uma importante questão do campo das terapias com células-tronco para doenças cardiovasculares que é a ocorrência de arritmias pós-transplante de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes em modelos de infarto do miocárdio (Chong et al, 2014)(Shiba et al, 2016).

Durante o quadro de infarto do miocárdio, o coração pode perder mais de um bilhão de células, o que corresponde a 25% de sua massa funcional (Chen et al, 2015). O dano tecidual causado pelo infarto estimula os fibroblastos cardíacos que são então ativados e tornam-se miofibroblastos, intensificando a síntese de colágeno e contribuindo para a formação de fibrose e enrijecimento do tecido cardíaco (McArthur et al, 2015). Apesar de cardiomiócitos adultos serem capazes de se dividir (Bergmann et al, 2009), a capacidade de regeneração cardíaca é extremamente limitada e parece ser inibida pela quantidade de fibrose produzida (van Berlo et al, 2014). Deste modo, a terapia celular cardíaca visa transplantar células no miocárdio infartado com o intuito de reconstituir a massa de contração perdida ou ativar os mecanismos de reparo do hospedeiro por meio da secreção de fatores parácrinos (Menasché, 2018).

As células-tronco embrionárias (ESC) têm ganhado destaque no campo da medicina regenerativa com a finalidade de substituir o tecido de contração perdido. Elas possuem capacidade de proliferação ilimitada e são capazes de se diferenciar em qualquer tecido encontrado no corpo adulto (Duelen et al, 2017). Recentemente, foi conduzido o primeiro *clinical trial* composto por seis pacientes com disfunção

isquêmica severa do ventrículo esquerdo e que receberam células progenitoras cardíacas derivadas de ESC (Menasché et al, 2018). Apesar de não ter sido possível definir se houve algum benefício com o tratamento, uma vez que todos os pacientes foram submetidos a uma cirurgia de revascularização (CABG), o estudo demonstrou a viabilidade de produzir em larga escala células progenitoras cardíacas derivadas de ESC e que a terapia celular não conferiu nenhum risco adicional aos pacientes em questão. No entanto, o uso de células-tronco embrionárias na pesquisa e na clínica ainda é muito questionado em decorrência dos fatores éticos associados à obtenção destas células. Em 2007, Yamanaka et al demonstraram pela primeira vez a reprogramação de células somáticas humanas adultas em células-tronco pluripotentes (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) através da transdução retroviral dos fatores de transcrição (KLF4, SOX2, cMYC e OCT3/4) (Takahashi et al., 2007), atualmente conhecidos como fatores de pluripotência. As iPSCs possuem um perfil semelhante às ESCs quanto à capacidade de proliferação ilimitada e diferenciação em qualquer tecido encontrado no corpo adulto, além de conferirem vantagens relacionadas à ausência dos conflitos éticos anteriormente citados e a possibilidade de utilização na medicina personalizada.

Desde seu estabelecimento, os protocolos de diferenciação de iPSC em cardiomiócitos têm se tornado cada vez mais eficientes, assim como a inserção das células transplantadas no miocárdio e a capacidade de melhorar a contração cardíaca (Masumoto et al, 2014). No entanto, diversos estudos também apontam o surgimento de arritmias pós-transplante celular (Chong et al, 2014)(Chen et al, 2015)(Shiba et al, 2016). Este é o caso do estudo publicado recentemente pelo grupo do professor Charles Murry, no qual os pesquisadores realizaram um transplante de cardiomiócitos humanos derivados de ESC em macacos (Liu et al, 2018). Muito embora as células transplantadas tenham se acoplado eletricamente ao coração e melhorado a função cardíaca (o que

representa um grande passo para a medicina regenerativa) observou-se o aparecimento de taquicardia ventricular espontânea nos animais que receberam as células. Os pesquisadores observaram que as arritmias induzidas no grupo controle originavam-se em regiões de baixa voltagem próximas à escara, que constituiria uma barreira em decorrência de sua baixa condutividade causando micro reentradas. Por outro lado, no grupo tratado com as células, as taquicardias ventriculares eram espontâneas e recorrentes, sendo associadas à geração de impulso anormal.

É possível que o grande número de fibroblastos na área infartada possa estar correlacionado com a ocorrência de arritmias pós-transplante de células-tronco, consequente do direcionamento das células transplantadas para a formação ectópica de células de condução. Alternativamente, é preferível que as células transplantadas contribuam para o funcionamento do sincício cardíaco como massa de contração, unicamente na forma de cardiomiócitos de trabalho. Deste modo, este projeto teve por hipótese central o papel dos fibroblastos na maturação e indução de cardiomiócitos de condução rápida, característicos do sistema de condução, e que, ao serem induzidos de forma ectópica, contribuiriam para o surgimento das arritmias pós-transplante celular. A fim de investigar esta relação, nós avaliamos as propriedades moleculares e funcionais de cardiomiócitos de ratos neonatos co-cultivados com fibroblastos cardíacos ou tratados com o meio condicionado por fibroblastos cardíacos. Investigamos se as respostas observadas seriam dependentes de sinalização justácrina (Via do Notch1), uma vez que os fibroblastos e cardiomiócitos estão em regiões adjacentes no microambiente cardíaco e esta via já foi descrita na indução do VCS. Em uma abordagem translacional, testamos o modelo de cardiomiócitos derivados de iPSC humanas *knockout* para IRX3 com o intuito de inibir a indução de células de condução e, consequentemente, favorecer a formação de cardiomiócitos de trabalho humanos.

Nossos achados fornecem evidências de que os fibroblastos cardíacos influenciam a maturação dos cardiomiócitos pós-natais de ratos em direção ao sistema de condução ventricular através de mediadores solúveis secretados e de forma dependente de sinalização justácrina (ativação da via Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos) *in vitro*. Adicionalmente, nós geramos cardiomiócitos derivados de hiPSC com o perfil de expressão gênica e de transientes de cálcio intracelular consistentes com os de cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vitro*. **Portanto, o presente projeto teve por objetivos:**

Objetivo geral

Testar a hipótese de que os fibroblastos cardíacos induzem a diferenciação/maturação de cardiomiócitos em células de condução rápida e que o gene candidato IRX3 desempenha papel importante neste processo.

Objetivos específicos

1. Avaliar a influência dos fibroblastos cardíacos em parâmetros moleculares e funcionais de cardiomiócitos de ratos neonatos;
 - 1.1. Investigar se as respostas observadas nas co-culturas resultam da secreção de mediadores solúveis ou da interação de receptores presentes nas membranas celulares.
2. Desenvolver estratégias para a obtenção de cardiomiócitos ventriculares de trabalho humanos e inibição de células arritmogênicas para terapias celulares:
 - 2.1. Gerar cardiomiócitos derivados de iPSC humanas *knockout* para IRX3 para verificar se os cardiomiócitos derivados das iPSKO_IRX3 resultarão preferencialmente em cardiomiócitos de trabalho.

Métodos

Isolamento de células ventriculares primárias de ratos neonatos

A experimentação animal foi realizada de acordo com as diretrizes fornecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo. Cardiomiócitos e fibroblastos ventriculares foram isolados dos mesmos ratos Wistar de um dia de idade (Wistar Rattus norvegicus) e na mesma solução de digestão, como previamente descrito por (Jensen et al, 2018). Resumidamente, os corações coletados foram picados e digeridos com uma solução de colagenase II (154 U/ml) e pancreatina (0,17 mg/ml). Após seis digestões, o sedimento foi filtrado e pré-plaqueado por 45 minutos a 37°C sob 5% de CO₂, a fim de separar os fibroblastos cardíacos dos cardiomiócitos. As células foram contadas e plaqueadas em placas revestidas com laminina com uma mistura de meios DMEM-Low e 199 (4:1) contendo 10% de soro de cavalo (HRS), 5% de soro de bezerro recém nascido (NBCS), penicilina-estreptomicina a 1% e Bromodesoxiuridina a 1% (BrdU, Sigma B5002). Culturas enriquecidas com cardiomiócitos foram obtidas pela plaqueamento do sobrenadante da incubação anterior. As co-culturas de fibroblastos e cardiomiócitos foram obtidas adicionando fibroblastos cardíacos anteriormente isolados e sobrenadantes enriquecidos com cardiomiócitos, numa proporção de 1:1. Após 48h, o meio de cultura foi substituído a cada dois dias com DMEM-Low e 199 media (4:1) contendo 1% de penicilina-estreptomicina e 1% de BrdU.

Isolamento de células-tronco mesenquimais de rato do tecido adiposo

Células-tronco mesenquimais (MSCs) foram isoladas como descrito anteriormente (Fathi et al, 2016). O tecido adiposo de rato adulto foi picado em aproximadamente 3

mm³ e lavado com PBS. Para isolar as MSCs, as amostras foram centrifugadas a 2000 RPM por cinco minutos para coletar os pedaços de tecido adiposo. Os pedaços de gordura foram então tratados com colagenase do tipo I. A atividade enzimática foi neutralizada com DMEM *low glucose* contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e centrifugada a 1200 RPM durante dez minutos para obtenção do *pellet*. O *pellet* foi ressuspenso em meio completo (DMEM *low* contendo 10% de FBS, 1% penicilina-estreptomicina) e filtrado para remover os debris celulares. As células foram então plaqueadas e incubadas durante a noite a 37°C sob 5% de CO₂. Após 24 horas, as células sanguíneas contaminantes que não aderiram foram removidas pela troca do meio. As células-tronco mesenquimais foram expandidas e criopreservadas até o momento do uso.

Meio condicionado

Os meios condicionados dos fibroblastos cardíacos e das células mesenquimais foram obtidos como descrito anteriormente (Pedrotty et al, 2009). Resumidamente, monocamadas de fibroblastos cardíacos ou MSCs foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 24h a 37°C sob 5% de CO₂ com o meio controle (DMEM-Low + 199 media (4:1), contendo 1% de penicilina-estreptomicina e 1% BrdU). O meio condicionado resultante foi coletado e filtrado com um filtro de 0,22 mm para remover os debris celulares. Antes do uso, o meio condicionado foi concentrado 10X usando um filtro por centrifugação com um valor de *cutoff* de 3.000MW (Millipore), e então diluído para 1X com o meio controle, a fim de excluir qualquer possível influência do consumo prévio do meio pelos fibroblastos ou MSCs. Culturas enriquecidas com cardiomiócitos receberam meios condicionados frescos em intervalos de 48h, sempre em paralelo ao grupo controle.

Sistema de co-cultura espacialmente delimitado

A influência da disposição dos fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos no microambiente foi avaliada por um sistema de co-cultura espacialmente delimitado. Nós desenvolvemos uma barreira celular usando a base de ponteiros de pipeta de 1000µl. A barreira celular foi colocada no centro de lamínulas de vidro revestidas com laminina. Os cardiomiócitos foram plaqueados no interior da barreira celular e os fibroblastos cardíacos na parte exterior. As células foram incubadas durante 24 h para adesão e depois a barreira celular foi removida para permitir que as células formassem uma zona de contato. Como resultado, obtivemos um sistema de co-cultura espacialmente delimitado, consistindo de uma área enriquecida com cardiomiócitos, uma zona de contato e uma área enriquecida com fibroblastos cardíacos. As células foram cultivadas em meio controle, a fim de destacar a influência da disposição celular no microambiente na sinalização celular. O mesmo sistema de co-cultura usando cardiomiócitos em ambos os lados, e MSCs ao invés dos fibroblastos cardíacos foram usados como controles. As análises funcionais e moleculares foram realizadas sete dias após o plaqueamento.

Caracterização quantitativa de culturas celulares por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada para analisar a composição celular de células ventriculares primárias de ratos neonatos em culturas enriquecidas em cardiomiócitos e co-culturas de fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos em diferentes momentos (Dariolli et al, 2013). As amostras foram coletadas 24 horas, 48 horas e 7 dias após o plaqueamento das células. Anticorpos para os marcadores fenotípicos CD90 e CD31 foram utilizados para marcar, respectivamente, fibroblastos cardíacos e células endoteliais. Células negativas para CD90 e CD31 foram designadas como

cardiomiócitos. A marcação com os anticorpos foi realizada conforme descrito pelos fabricantes.

Geração de *hiPSC IRX3 knockout* pela técnica de edição gênica com CRISPR/Cas9

A edição gênica para geração de knockouts com a técnica Crispr/Cas9 foi realizada conforme descrito anteriormente (Remy et al, 2017). As sequências de sgRNA utilizadas foram geradas por meio da plataforma CRISPOR (Concordet et al, 2018), na qual os sgRNAs foram selecionados conforme sua baixa atividade *off-target* e alta predição de atividade *on-target*. Os sgRNAs foram produzidos com o T7 Hcribe transcription kit (NEB) e purificados com EZNA microelute RNA clean up kit (Omega biotech). O produto da purificação foi então eluído em 25µl de água milliQ e armazenado à -80°C até o uso.

A eficiência de clivagem dos sgRNAs foi avaliada por meio do ensaio com a endonuclease I T7 (New England Biolabs ref: M0302S), sendo que o sgRNA com maior percentual de produção de Indels foi considerado para geração dos knockouts. Os sgRNAs foram clonados em plasmídeos MLM3636 (Origene) utilizando sítios de restrição BsmBI, para posterior transformação de bactérias competentes XL1-blue (Promega), clonagem e purificação dos plasmídeos que foram então armazenados à -20°C até o uso.

A transfecção de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) foi realizada com a utilização de um clone estabelecido pelo laboratório (SS109), dados ainda não publicados. A eletroporação foi realizada com o sistema (Neo nucleoporator, Invitrogen), utilizando um pulso único à 1400 V. Para cada reação, foram utilizadas 2.5×10^5 células e 4µg de cada um dos plasmídeos contendo respectivamente o sgRNA e a enzima Cas9. As células transfectadas foram plaqueadas em placas B60 com a

finalidade de obtenção de colônias puras e o meio foi trocado após um intervalo de 48h. Após 7 dias de cultivo, o método de *pick colony* foi empregado para a coleta de 96 colônias puras que foram posteriormente amplificadas e congeladas. Amostras dos 96 clones resultantes foram coletadas para avaliação de possíveis mutantes pela amplificação da região de interesse por PCR e posterior sequenciamento. Após a identificação dos clones mutados, foi realizada a subclonagem dos mesmos para verificar se os clones eram de fato puros.

Diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos

Para a obtenção de cardiomiócitos humanos derivados de células tronco pluripotentes induzidas (hiPSC) nós realizamos a diferenciação das hiPSC com um protocolo de cultivo celular em monocamada no qual a via da WNT é ativada e subsequentemente inibida. O procedimento foi realizado com um clone de hiPSC de alta eficiência para a diferenciação, previamente estabelecido no laboratório (dados não publicados). O clone utilizado (SS109) foi gerado pela transdução com um vetor lentiviral poliestrônico (STEMCCA – cordialmente cedido pelo Prof. Gustavo Mostoslavski, Universidade de Boston, EUA) e indução da expressão dos fatores de pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC).

Para início da diferenciação, foram plaqueadas $1,2 \times 10^5$ hiPSC por poço da placa de 12 poços previamente recoberto com Geltrex (150µg/ml, GIBCO, Life Technologies) em meio E8 (GIBCO, Life Technologies) + mTeSR1 (STEMCELL) na proporção de 1:1 + inibidor da ROCK Y-27632 (5µM, Sigma), com a finalidade de que as células atingissem a confluência em 2 dias. Uma vez que as células alcançaram a confluência entre 95-100%, nós iniciamos o Dia 0 da diferenciação, que consiste na ativação da via da WNT com o CHIR99021 (9µM) em meio RB- (RPMI + suplemento B27 sem

insulina, GIBCO, Life Technologies). O CHIR99021 é um forte inibidor da serina/treonina quinase GSK3 que, por sua vez, inibe a via da WNT através da fosforilação da β -catenina. A ativação da via da WNT promove a diferenciação das células-tronco para a mesoderme que posteriormente dará origem à linhagem cardíaca. No Dia 1, após 20h do início da diferenciação, metade do meio de cultura foi retirado e repostado com CHIR99021 (9 μ M, Merck Millipore) + BMP4 (10 μ g/ml) em meio RB-. A subsequente inibição da via da WNT é necessária para a posterior especificação das células em cardiomiócitos progenitores. Deste modo, no Dia 2 a via da WNT é inibida com XAV939 (2,5 μ M, Cayman Chemical Company) e KY02111 (2.5 μ M, Cayman Chemical Company) em RB-; que permanece durante o Dia 3. No Dia 4, as células são novamente tratadas com XAV939 (2,5 μ M) e KY02111 (2.5 μ M), porém em RB+ (RPMI + suplemento B27 com insulina, GIBCO, Life Technologies). Do Dia 5 ao Dia 7 o meio é trocado a cada 24h com RB+. A partir do Dia 9, o meio passa a ser trocado a cada 48h com CDM5, composto por RPMI + 1,66ml ácido ascórbico (VITC /sigma/a8960) + 3,4ml DPBS 7,5% albumina/sigma/a8412 + antioxidante + NEAA.

Análise relativa da expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. A Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-PCR) foi realizada como descrito anteriormente (Jensen et al, 2018) para determinar a expressão gênica relativa dos fatores de transcrição Nkx2.5, Gata-4, Irx3; Proteínas das *Gap Junctions*, conexina-43 (Gja1), conexina-40 (Gja5) e conexina-45 (Gjc1); e a subunidade do canal de cálcio Nav1.5 (Scn5a). A ciclofilina foi utilizada como *housekeeping gene* e os resultados são dispostos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado como previamente descrito (de Carvalho et al, 2017) para análise *High Content Screening* (IN Cell Analyzer 2200, GE) e microscopia confocal (Multiphoton Microscope LSM 780 NLO, Zeiss). As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA) durante 60 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS, permeabilizadas com Triton a 0,1% durante 15 minutos e bloqueadas com Albumina de Soro Bovino a 5% (BSA). Foram utilizados anticorpos primários contra as seguintes proteínas: troponina cardíaca I 1:400 (4T21 / 2, HyTest), vimentina 1:900 (AB92547, Abcam), conexina-43 1:750 (AB11370, Abcam) e Nav1.5 1:100 (sc-271255, Santa Cruz). Todos os anticorpos primários foram diluídos em BSA a 2% e incubados durante a noite a 4°C.

Análise dos transientes de cálcio

As análises dos transientes de cálcio intracelular (CaT) foram realizadas como descrito previamente (Jensen et al., 2018). Em resumo, células experimentais (cardiomiócitos, fibroblastos e MSCs) foram plaqueadas em lâminas de vidro revestidas com laminina, conforme o nosso sistema de co-cultura espacialmente delimitado (Figura 7), dentro de placas de cultura P60 e analisadas 7 dias após o plaqueamento. Depois disso, as células foram mudadas para um meio fresco suplementado com 3 μ M de Fura-2 AM (Molecular Probes, F1201) e incubadas por 15 minutos a 37°C. O meio foi trocado mais uma vez com um meio livre de Fura-2 AM e a lamínula foi transferida para a câmara de análise. Todas as gravações foram realizadas sob estimulação elétrica a 0,5 Hz, 4 msec e 10 volts (Myopacer, IonOptix). A emissão de fluorescência foi de 340-380nm, e foi coletada com um tubo fotomultiplicador através da objetiva de óleo 40x durante a excitação contínua a 510nm com uma lâmpada Xenon de 75W. Usamos o sistema de

contratilidade IonOptix para registrar os transientes de cálcio. As gravações foram avaliadas por um especialista cego para os grupos experimentais. Os dados foram processados e analisados usando um *script* personalizado construído em MATLAB® (MathWorks, Natick, MA). Em resumo, os traços brutos foram tratados para apagar desvios técnicos (por exemplo, alteração no foco da imagem que alterou o traçado para uma linha de base diferente). Além disso, os traços brutos foram filtrados para reduzir o ruído (função *sgolayfilt* no MATLAB). Após a filtragem, picos representativos de cada célula foram selecionados, e diferentes parâmetros foram medidos no CaT (Amplitude, Tempo para pico, CaD50, CaD90, decaimento do CaT (Tau) e período de repouso) como mostrado na Figura 5. Os sinais de fluorescência foram corrigidos pelo seu respectivo basal e expressos como F/F_0 (a razão de fluorescência durante o transiente de cálcio dividido pela fluorescência de repouso). As curvas médias de CaT de cada grupo experimental foram criadas através do alinhamento da fluorescência de cada célula registrada e calculada pela média da fluorescência por ponto no tempo. Os resultados do CaT foram expressos como média $\pm$ DP para representar a média e a variância dos dados. Cada parâmetro de CaT medido foi previamente submetido ao teste de Anderson-Darling para encontrar o tipo de distribuição (Gaussian ou Non-Gaussian). Os dados distribuídos de forma gaussiana foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA de uma via e os dados distribuídos de forma não gaussiana foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ambos considerados significantes quando $p < 0,05$). Um teste post-hoc de Bonferroni foi aplicado (alfa 0,05) para comparações múltiplas em dados paramétricos e não paramétricos.

Preparo de lisado celular e análise de *Western Blotting*

As células foram lisadas num tampão de amostra SDS (2% SDS, 5% glicerol, 60 mM Tris pH 6,8). A concentração de proteína foi medida com um kit de ensaio de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) (Carneiro et al, 2017). Quantidades de proteína equivalentes foram solubilizadas em tampão de amostra SDS-PAGE (0,5% SDS, 10% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 50 mM ditioneitol, 50 mM Tris pH 6,8), e submetidas a SDS-PAGE usando 10% de gel de poliacrilamida. Após a electroforese, as proteínas foram subsequentemente transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF 0,45, Amersham Hybond P, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). As membranas de PVDF contendo as proteínas transferidas foram incubadas primeiro em uma solução de bloqueio (albumina de soro bovino a 5% e Tween 20 a 0,1% em TBS, pH 7,4) durante 1h, a temperatura ambiente, seguido de incubação durante a noite com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio à 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: Conexina 40 da Millipore (Burlington, MA, EUA) e Conexina 43 da Abcam (Cambridge, MA, EUA). As membranas foram também incubadas com um anticorpo monoclonal específico para GAPDH (Abcam) como controlo interno. Após incubação durante 1h à temperatura ambiente com um anticorpo secundário conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP), o anticorpo ligado foi detectado utilizando um sistema aprimorado de quimiluminescência (GE Healthcare). Os sinais foram capturados usando um analisador de imagem quimioluminescente (ImageQuant LAS 4000 mini, GE HealthCare) e foram quantificados por densitometria usando o software ImageJ (Wayne Rasband, Instituto Nacional de Saúde, EUA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método ANOVA de uma via com o teste posthoc de Dunnett, salvo indicação de forma diferente. Quando apropriado, os resultados foram analisados pelo teste t de *Student*, não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Padronização das culturas e co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos extraídos de ratos neonatos

Testamos a hipótese de que fibroblastos cardíacos influenciam a maturação dos cardiomiócitos para o tecido especializado de condução ventricular por meio de um sistema de co-cultivo. Nós isolamos células ventriculares primárias de ratos neonatos e as pré-plaqueamos para separar os cardiomiócitos dos fibroblastos. Para garantir que estávamos trabalhando de fato com fibroblastos cardíacos e não com miofibroblastos, nós fizemos um painel de imunofluorescência com alguns dos principais marcadores para fibroblastos (Figura A1). Nossas culturas de fibroblastos foram positivas para a marcação com vimentina, fibronectina, CD90 e PDGFR α (todos marcadores para fibroblastos), porém negativas para alfa actina de músculo liso, α SMA (marcador para ativação de fibroblastos em miofibroblastos).

Nossos experimentos foram realizados com culturas enriquecidas com cardiomiócitos, consistindo de 80% de cardiomiócitos e co-culturas com 50% de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos sete dias após o plaqueamento (Figura 3A). Para a padronização das culturas e co-culturas, nós partimos de dados iniciais de citometria do laboratório que apontavam a composição celular obtida da extração de células ventriculares primárias de ratos neonatos em T=0. Com base nestes dados, nós conseguimos estabelecer culturas ricas em cardiomiócitos, com 95-80% de cardiomiócitos (Figura 3B) e co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos com uma proporção próxima a 50% dos dois tipos celulares ao longo dos sete dias em cultura (Figura 3C).

Figura 3. Validação quantitativa e qualitativa de culturas e co-culturas de cardiomiócitos de curto e longo prazo. A composição celular de nossas culturas enriquecidas com cardiomiócitos e co-culturas mistas foram avaliadas qualitativamente por imunofluorescência e quantitativamente por citometria de fluxo. (A) Imagens de imunofluorescência de culturas enriquecidas com cardiomiócitos e co-culturas mistas sete dias após o plaqueamento, respectivamente. Os núcleos das células foram corados com DAPI (Azul), os cardiomiócitos foram identificados como células positivas para Troponina I cardíaca (Vermelho) e os fibroblastos cardíacos como células positivas para Vimentina (Verde). Escala=20µm. (B) Análise de citometria de fluxo de culturas enriquecidas com cardiomiócitos 24h, 48h e sete dias após o plaqueamento. (C) Análise de citometria de fluxo de co-culturas mistas 24h, 48h e sete dias após o plaqueamento. As células foram identificadas pela expressão diferencial de antígenos de superfície como cardiomiócitos (CD90-CD31-), fibroblastos cardíacos (CD90+) e células endoteliais (CD31+). Os resultados estão dispostos como média $\pm$ SEM. Os dados foram submetidos ao ANOVA de duas vias, seguido por comparações múltiplas contra os tipos celulares específicos para cada tempo; $p < 0,05$ foi considerado significativo. N=6.

Com a finalidade de inibir a proliferação excessiva dos fibroblastos, as células foram mantidas em meio de cultura contendo BrdU. Apesar disso, nas culturas ricas em cardiomiócitos houve um aumento significativo do número de fibroblastos com o tempo (24h $6,52 \pm 0,41$ vs. 48h $18,17 \pm 1,12$ e 24h e 7 dias $17,62 \pm 2,12$); p de interação $< 0,0001$; Figura 3). Isso possivelmente decorre do fato dos fibroblastos cardíacos

continuarem proliferando em cultura (Lindner et al, 2012), enquanto que os cardiomiócitos de neonatos apresentam menor proliferação e esta cai consideravelmente após quatro dias em cultura (Belostotskaya et al, 2014). Nas co-culturas, o mesmo não foi observado. Apesar de termos plaqueado o mesmo número de células nas culturas e co-culturas, é provável que a grande quantidade de fibroblastos nas co-culturas possa ter facilitado a adesão das células na placa em decorrência da produção de matriz extracelular e, conseqüentemente, aumentado o número total de células e inibido, portanto, a proliferação celular.

Fibroblastos cardíacos modulam a expressão de genes relacionados ao sistema de condução ventricular

A possível influência dos fibroblastos cardíacos na maturação dos cardiomiócitos em relação ao sistema de condução ventricular foi primeiramente avaliada pela expressão gênica de importantes genes cardíacos em nosso sistema de co-cultivo misto.

O fator de transcrição Nkx2.5 teve um aumento de duas vezes na expressão gênica nas co-culturas quando comparado às culturas de cardiomiócitos sete dias após o plaqueamento ($1,00 \pm 0,02$ vs. $2,46 \pm 0,49$ $p = 0,0009$; Figura 4A). Embora o Nkx2.5 seja importante para várias vias cardiogênicas, ele é regulado positivamente durante o desenvolvimento do sistema de condução ventricular (Harris et al, 2006). A expressão gênica do fator de transcrição Gata-4 também aumentou nas co-culturas ($1,00 \pm 0,02$ vs. $1,76 \pm 0,001$ $p = 0,0046$; Figura 4B).

Para avaliar se este era um aumento geral na expressão gênica ou representava uma ativação transcricional em direção ao sistema de condução cardíaco, nós avaliamos a expressão gênica das principais conexinas presentes no coração. As conexinas 40 e 45, que são expressas principalmente no sistema de condução cardíaco, também tiveram aumento da expressão gênica nas co-culturas ($1,00 \pm 0,02$ vs. $2,68 \pm 0,18$; $p < 0,0001$; e

1,00 $\pm$ 0,01 vs. 1,69 $\pm$ 0,17; $p = 0,0006$; respectivamente, Figuras 4C-D), mas não a conexina 43 (1,00 $\pm$ 0,03 vs. 1,02 $\pm$ 0,11; ns; Figura 4E), que é principalmente expressa em cardiomiócitos de trabalho. Concluimos que as co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos apresentam expressão aumentada de genes-chave relacionados ao sistema de condução ventricular quando comparadas aos cardiomiócitos sozinhos após sete dias de cultivo. Estes dados sugerem que a ativação da expressão gênica de Nkx2.5 e Gata-4 nas co-culturas pode estar relacionada com o deslocamento do fenótipo dos cardiomiócitos em direção às células de condução cardíaca.

Figura 4. Expressão relativa de genes cardíacos nas culturas ricas em cardiomiócitos e co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos. O RNA total foi isolado a partir de extratos das culturas enriquecidas com cardiomiócitos, co-culturas de cardiomiócitos e fibroblastos e culturas de fibroblastos cardíacos sete dias após o plaqueamento. A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada por RT-PCR em tempo real. (A-B) Níveis de expressão gênica relativa dos fatores de transcrição cardiogênicos Nkx2.5 e Gata-4. (C-E) Níveis de expressão gênica relativa das proteínas de *Gap Junctions*: conexinas 40 (Gja5), 43 (Gja1) e 45 (Gjc1). A ciclofilina foi usada como *housekeeping gene* e os resultados estão dispostos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalizado pelo número de cardiomiócitos em cada grupo, exceto no grupo de fibroblastos usado como controle negativo), média $\pm$ SEM. Os dados foram submetidos ao ANOVA de uma via, seguido por

comparações múltiplas contra o grupo enriquecido com cardiomiócitos, usado como controle; $p < 0,05$ foi considerado significativo. N=2-5.

Fibroblastos cardíacos influenciam espacialmente a expressão do marcador do VCS em cardiomiócitos

Considerando-se que há uma grande quantidade de fibroblastos cardíacos no microambiente adjacente ao sistema de condução ventricular, nós investigamos se a influência dos fibroblastos cardíacos nos cardiomiócitos ocorreria de maneira dependente da proximidade das duas células no microambiente. Para isto, desenvolvemos uma co-cultura em monocamada consistindo de uma área enriquecida com cardiomiócitos, seguida por uma zona de contato e uma área enriquecida com fibroblastos (Figura 5). Além de determinar diferentes regiões na lamínula de cultura, o sistema de co-cultura também foi mantido em meio controle para **diluir os efeitos parácrinos** e enfatizar a influência da disposição celular na sinalização. Os cardiomiócitos foram diferenciados dos fibroblastos cardíacos pela marcação positiva para troponina I, e a subunidade Nav1.5 do canal de cálcio (codificada pelo gene Scn5a) foi utilizada como marcador para fibras de condução rápida (Remme et al, 2009).

Grupos de cardiomiócitos positivos para Nav1.5 surgiram na zona de contato com fibroblastos cardíacos e foram gradualmente reduzidos em direção à área enriquecida com cardiomiócitos, delimitada pela linha tracejada (b) (Figura 5). A comparação qualitativa das amostras das áreas de contato e enriquecidas com cardiomiócitos (ampliadas respectivamente no lado direito e esquerdo da Figura 5) mostra cardiomiócitos positivos para Nav1.5 na zona de contato e a ausência de marcação na área enriquecida com cardiomiócitos. Estes achados também se refletiram na quantificação da intensidade de fluorescência do Nav1.5, logo abaixo da figura, que demonstrou um aumento progressivo da intensidade de fluorescência em direção à

região de contato. Estes dados sugerem que a expressão do marcador para o sistema de condução Nav1.5 nos cardiomiócitos é induzida pela proximidade com os fibroblastos cardíacos no microambiente.

Figura 5. Imagem representativa do sistema de co-cultura delimitado de cardiomiócitos e fibroblastos. Cardiomiócitos foram plaqueados dentro e fibroblastos cardíacos fora de uma barreira celular em uma lamínula de vidro revestida com laminina. Após 48h a barreira foi retirada e como resultado obtivemos um sistema de co-cultura delimitado, consistindo de uma área enriquecida com cardiomiócitos, uma zona de contato e uma área enriquecida com fibroblastos cardíacos sete dias após o plaqueamento. Diferentes campos foram combinados no processo de aquisição para produzir uma imagem composta e que possui perspectiva longitudinal. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (Azul), os cardiomiócitos foram identificados como células positivas para Troponina I cardíaca (Vermelho), os fibroblastos cardíacos como células negativas para Troponina I, e o marcador para o sistema de condução Nav1.5 é mostrado em (Verde). A linha tracejada (b) delimita a área enriquecida com cardiomiócitos no lado

esquerdo e o início da zona de contato. Amostras da área enriquecida de cardiomiócitos e da zona de contato foram ampliadas no lado esquerdo e direito da figura, respectivamente. Escala=100µm. A expressão do marcador do sistema de condução Nav1.5 foi mensurada através da quantificação longitudinal da fluorescência do Nav1.5 e normalizada pela fluorescência do Dapi (quantidade de células) para cada respectiva região.

Cardiomiócitos em contato com fibroblastos cardíacos exibem um perfil de CaT semelhante ao das fibras de condução rápida

Para verificar se a expressão de marcadores do VCS em cardiomiócitos em contato com fibroblastos cardíacos era acompanhada de alterações funcionais correspondentes às células de condução rápida, nós analisamos os transientes de cálcio intracelular (CaT) de cardiomiócitos nas lamínulas com o sistema de co-cultura delimitado descrito previamente (Figura 6). Outra co-cultura apresentando o mesmo perfil, mas tendo células tronco mesenquimais (MSCs) ao invés de fibroblastos cardíacos, e uma cultura somente de cardiomiócitos foram utilizadas como controles para avaliar a especificidade da interação cardiomiócito-fibroblasto cardíaco.

A análise global das curvas médias dos transientes de cálcio (CaT) demonstrou que os cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos apresentaram CaT mais longos, enquanto que os cardiomiócitos em contato com MSCs não diferiram do grupo contendo somente cardiomiócitos, utilizado como controle (Figura 6A-B). Os CaTs não apresentaram diferenças consistentes entre as áreas enriquecidas com cardiomiócitos nas duas co-culturas diferentes, com fibroblastos cardíacos ou MSCs, e o grupo somente com cardiomiócitos (Figura A2). Este resultado concorda com o aumento da expressão proteica de Nav1.5 apenas na área de contato entre cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos no mesmo sistema de co-cultura.

Figura 6. Influência dos fibroblastos cardíacos mediada por contato nos transientes de cálcio dos cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram plaqueados no centro do nosso sistema de co-cultura delimitado e ou fibroblastos cardíacos ou células tronco mesenquimais (MSCs) foram plaqueados na área externa. Os transientes de cálcio das células contráteis nas zonas de contato e nas áreas enriquecidas com cardiomiócitos foram medidos. A) Curvas médias de CaT para cada grupo experimental. B) *Heatmap* dos parâmetros de CaT para cada grupo experimental. C) Amplitudes dos CaT normalizadas. D) Tempo para atingir 50% de decaimento de cálcio (CaD50). E) tempo para atingir 90% de decaimento de cálcio (CaD90). F) Tempo para atingir o pico máximo de cálcio por ciclo de batimento (*Time to Peak*). G) Tempo para atingir os níveis basais de cálcio após o pico máximo (tempo de decaimento do Ca). H) O intervalo de repouso ou o tempo entre o nível basal alcançado após a contração e o novo CaT. A área enriquecida com cardiomiócitos no centro da lâmina somente de cardiomiócitos foi usada como controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ após o teste post-hoc de Bonferroni (alfa 0,05). Os tamanhos das amostras foram de 15 células de cardiomiócitos (centro), 12 células de Cardio/Fibro (contato) e 10 células de Cardio/MSCs (contato).

Análises mais aprofundadas mostram que as amplitudes de CaT não diferem nas zonas de contato entre os diferentes grupos (Figura 6C); no entanto, o tempo para atingir 50% de decaimento do cálcio (duração de cálcio à 50% - Ca50) foi aproximadamente 34% maior em cardiomiócitos em contato com fibroblastos cardíacos do que no grupo somente com cardiomiócitos ($0,72 \pm 0,185$ segundos vs. $0,54 \pm 0,057$ segundos; $p < 0,05$; Figura 6D), e o tempo para atingir 90% de decaimento (CaD90) foi aproximadamente 26% maior comparado ao controle ($1,42 \pm 0,281$ segundos contra $1,13 \pm 0,130$ segundos; $p < 0,01$; Figura 6E). O tempo necessário para atingir o pico de cálcio foi mais de 60% mais lento nos cardiomiócitos em contato com fibroblastos cardíacos vs. o controle ($0,34 \pm 0,108$ segundos vs. $0,201 \pm 0,026$ segundos; $p < 0,01$; Figura 6F). O tempo de decaimento do cálcio (tempo entre o pico de cálcio e o nível basal de cálcio alcançado após o pico) foi quase 15% maior nos cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos ($1,51 \pm 0,212$ segundos Contra $1,32 \pm 0,251$ segundos; $p < 0,01$; Figura 6G). O intervalo de repouso, tempo entre o primeiro segundo após a recuperação dos níveis basais de cálcio e o início de um novo CaT, foi 68% menor nos cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos em comparação com o controle ($0,14 \pm 0,235$ segundos vs. $0,45 \pm 0,242$ segundos; $p < 0,001$; Figura 6H).

De acordo com os resultados observados, as fibras de condução rápida também possuem CaTs mais longos quando comparados aos dos cardiomiócitos de trabalho (Pallante et al, 2010). Em conjunto com a expressão do marcador para o sistema de condução ventricular Nav1.5 no mesmo sistema de co-cultura, a análise funcional mostra que os cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos têm CaTs semelhantes aos que seriam esperados para as fibras de condução rápida. Muito embora, a análise dos transientes de cálcio sozinha não possa descartar a possibilidade de que o CaT alterado na zona de contato com fibroblastos cardíacos seja devido ao acoplamento mecânico heterocelular, a ausência de alteração dos CaTs nas co-culturas com células mesenquimais reforça a hipótese de que os fibroblastos cardíacos de fato influenciam o fenótipo dos cardiomiócitos para fibras de condução rápida. Assim, esses dados sugerem fortemente que os fibroblastos cardíacos modificam os transientes de cálcio dos cardiomiócitos em direção ao sistema de condução ventricular.

O meio condicionado por fibroblastos cardíacos é suficiente para regular os cardiomiócitos em direção ao sistema de condução ventricular

Para investigar se as alterações moleculares e funcionais em direção ao fenótipo de condução rápida foram causadas pela sinalização de proteínas transmembrana ou mediadores solúveis especificamente secretados por fibroblastos cardíacos, nós comparamos culturas enriquecidas com cardiomiócitos com o meio controle e culturas enriquecidas com cardiomiócitos que receberam meios condicionados por fibroblastos cardíacos (fCM) ou por células tronco mesenquimais (mCM). O meio condicionado por fibroblastos cardíacos foi suficiente para aumentar em quatro vezes a expressão gênica da conexina 40 ($1,00 \pm 0,02$ vs. $4,40 \pm 1,10$; $p = 0,0058$; Figura 7A), enquanto a expressão da conexina 43 foi mantida em todos os grupos ($1,00 \pm 0,04$ vs. $1,04 \pm 0,11$

vs. $0,75 \pm 0,07$; ns; Figura 7B). Paralelamente à expressão gênica, os níveis de expressão protéica da conexina 40 aumentaram nos cardiomiócitos tratados com fCM ($1,00$ vs. $1,47 \pm 0,19$; $p < 0,05$; Figura A3A), sendo que a conexina 43 não teve alteração em relação ao controle ($1,00$ vs $1,09 \pm 0,21$; ns; figura A3B). O fator de transcrição Irx3 também estava superexpresso nos cardiomiócitos que receberam fCM quando comparado ao controle ($1,00 \pm 0,03$ vs. $2,14 \pm 0,27$; $p = 0,0002$; Figura 7C). Este fator de transcrição regula antiteticamente a expressão das conexinas 40 e 43, consequentemente modulando o destino dos cardiomiócitos em fibras de condução rápida ao invés de cardiomiócitos de trabalho (Zhang et al, 2011) (Kim et al, 2016). A subunidade de canal de sódio Nav1.5, codificada pelo gene Scn5a, teve a sua expressão gênica aumentada nos cardiomiócitos que receberam o fCM ($1,00 \pm 0,04$ vs. $1,69 \pm 0,30$; $p = 0,0114$; Figura 7D). Como o Scn5a também é um marcador do VCS (Remme et al, 2009), este resultado é consistente com o aumento observado na expressão dos genes relacionados ao VCS. Embora a existência de qualquer influência mediada por proteínas transmembrana de fibroblastos cardíacos não possa ser excluída, esses resultados demonstram que o meio condicionado por fibroblastos cardíacos é suficiente para induzir de forma parácrina a expressão de marcadores do VCS em cardiomiócitos e excluem a possibilidade dos fibroblastos cardíacos serem responsáveis pela expressão aumentada dos genes relacionados com o VCS nas co-culturas mistas ao invés dos cardiomiócitos (Figura 3). Por outro lado, o meio condicionado por células-tronco mesenquimais (MSCs) não causou nenhuma alteração na expressão gênica dos marcadores do sistema de condução ventricular analisados e nem na conexina 43, apesar da semelhança das MSCs com os fibroblastos. Deste modo, estes dados sugerem que os fibroblastos cardíacos especificamente secretam mediadores solúveis capazes de induzir

a maturação dos cardiomiócitos para o fenótipo de fibra de condução rápida característica do sistema de condução ventricular.

Figura 7. Expressão relativa de genes relacionados com o VCS e da conexina-43 em culturas enriquecidas com cardiomiócitos, determinados por RT-PCR em tempo real. O RNA total foi isolado de extratos de culturas enriquecidas com cardiomiócitos tratados com o meio controle, meio condicionado de fibroblastos cardíacos (fCM) ou MSC (mCM) sete dias após o plaqueamento. (A-B) Níveis de expressão gênica relativa das proteínas de Gap Junctions: conexinas 40 (Gja5) e 43 (Gja1), respectivamente. (C) Níveis de expressão gênica relativa do fator de transcrição Irx3. (D) Níveis de expressão gênica relativa

da subunidade do canal de cálcio Scn5a. A ciclofilina foi usada como *housekeeping gene* e os resultados estão dispostos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, média $\pm$ SEM.

O meio condicionado por fibroblastos cardíacos inibe fenótipos associados à cardiomiócitos de trabalho

Nós avaliamos se o meio condicionado por fibroblastos cardíacos além de ativar a especialização dos cardiomiócitos em direção ao sistema de condução ventricular poderia também inibir o fenótipo dos cardiomiócitos de trabalho. Nós buscamos alterações fenotípicas relacionadas aos cardiomiócitos de trabalho ao nível unicelular com a técnica de *High Content Screening* que analisa imagens de imunofluorescência em larga escala. Apenas as células positivas para a troponina I cardíaca, correspondentes aos cardiomiócitos, foram consideradas para a análise. A área média dos cardiomiócitos diminuiu mais de $100\mu\text{m}^2$ no grupo que recebeu o fCM comparado ao grupo controle ($1044 \pm 28,03 \mu\text{m}^2$ vs. $853,90 \pm 24,13 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0004$; Figura 8A), conforme ilustrado na figura 8A onde é possível observar células troponina I positivas menores indicadas pelas setas brancas. Embora não tenha havido redução nos níveis de expressão gênica e proteica da conexina 43 nos extratos totais em relação ao controle (Figuras 7B e A3B), a expressão protéica média da conexina 43 por cardiomiócito foi reduzida no grupo que recebeu fCM ($560 \pm 16,01$ vs $484,7 \pm 7,32$; $p = 0,0016$; Figura 8B). Essa diferença pode ser devido ao fato de que na análise por *High Content Screening* nós conseguimos observar especificamente a expressão da conexina 43 em cada cardiomiócito de forma individual, reduzindo o ruído gerado por outros tipos celulares que estariam presentes no extrato total. Nós avaliamos se esta diminuição da expressão da conexina 43 foi decorrente da menor expressão de conexina 43 por cardiomiócito ou da redução de cardiomiócitos expressando conexina 43 no grupo tratado com fCM. De fato, no grupo tratado com fCM houve uma redução superior a 10% dos cardiomiócitos que expressam conexina 43 na população de cardiomiócitos

($81,28 \pm 1,12\%$ vs. $66,43 \pm 1,97\%$; $p < 0,0001$; Figura 8C). Esses dados sugerem que a redução da expressão de conexina 43 por cardiomiócito é consequência do aumento de cardiomiócitos que não expressam conexina 43. Em ratos e camundongos, os cardiomiócitos de trabalho são maiores do que as fibras de condução rápida e expressam grandes quantidades de conexina 43 (Ono et al, 2009) (van Weerd et al, 2016). Portanto, estes dados sugerem que o meio condicionado pelos fibroblastos cardíacos reduziu a quantidade de cardiomiócitos com características de cardiomiócitos de trabalho na população de células.

Figura 8. Análise por High Content Screening de imunofluorescências das culturas enriquecidas com cardiomiócitos. Os parâmetros fenotípicos foram adquiridos para cada célula identificada e apenas as células positivas para troponina I (cardiomiócitos) foram incluídas na análise. (A) Imagens de imunofluorescência representativas dos grupos controle e tratado com fCM, respectivamente. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (Azul), os cardiomiócitos foram identificados como células

positivas para Troponina I cardíaca (Vermelho) e conexina-43 (Verde). Escala=20 μ m. (B) Área média dos cardiomiócitos (μ m²), dada pela área média de troponina I ao redor de um núcleo válido. (C) Expressão média de conexina 43 por cardiomiócito, dada pela média da intensidade total da fluorescência para conexina 43 na população de cardiomiócitos. (D) Porcentagem de cardiomiócitos positivos para conexina 43 (Cx43+) na população de cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram considerados Cx43+ se a intensidade de fluorescência da conexina 43 foi igual ou superior a 350 (AU) e a quantidade de grânulos identificados como conexina 43 foi igual ou superior a 5. Os resultados estão dispostos como média $\pm$ SEM. Os dados foram submetidos ao teste t de *Student* não pareado contra o grupo controle; p <0,05 foi considerado significativo. N=6.

A indução dos cardiomiócitos para o fenótipo de condução pelos fibroblastos é independente da proliferação celular

Nós utilizamos a técnica de *High Content Screening* para identificar células em estado proliferativo com o intuito de investigar se a indução do fenótipo de condução rápida em cardiomiócitos pelos fibroblastos seria causada por alguma alteração prévia na proliferação celular. Para tal, nós comparamos cardiomiócitos em co-cultura com fibroblastos e cardiomiócitos que receberam o meio condicionado de fibroblastos ou de células mesenquimais com o grupo controle após 48h do plaqueamento. O tempo de análise foi inferior a sete dias uma vez que nós queríamos investigar se as proporções diferentes de células de condução e trabalho após sete dias em cultura seriam resultantes da proliferação diferencial prévia entre estes tipos celulares. Além disso, os cardiomiócitos possuem capacidade limitada de proliferação, a qual decai progressivamente com o tempo em cultura e, conseqüentemente, diferenças na proliferação celular seriam mais facilmente observadas em uma janela de tempo inferior.

Os cardiomiócitos foram identificados como células troponina I positivas (em vermelho), fibroblastos como células troponina I negativas e células em estado proliferativo como Ki67 positivas (magenta) na região nuclear delimitada pela marcação por Dapi em azul (Figura 9A). Não houve alteração no percentual de cardiomiócitos em estado proliferativo na co-cultura ou no grupo que recebeu o meio condicionado por

fibroblastos em comparação ao controle ($9,397 \pm 1,16$ vs $11,39 \pm 0,90$ vs $9,208 \pm 0,57$; $p = ns$; Figura 9B). No entanto, os cardiomiócitos que receberam o meio condicionado pelas células mesenquimais tiveram um aumento de 5% na proporção de cardiomiócitos em estado proliferativo ($9,397 \pm 1,16$ vs $14,34 \pm 1,96$; $p = 0,0323$; Figura 9C).

Figura 9. Dados de High Content Screening para avaliação de células em estado proliferativo. A avaliação de células em estado proliferativo foi realizada 48h após o plaqueamento das células uma vez que a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos decai progressivamente após o nascimento dos animais. (A) Imagens ilustrativas. As células foram contabilizadas pela marcação nuclear por Dapi em azul. Cardiomiócitos foram identificados pela marcação com troponina I em vermelho e fibroblastos pela ausência de marcação. Células em estado proliferativo foram identificadas pela marcação nuclear de Ki67 em magenta. Escala= 20 μ m. (E) Cardiomiócitos Ki67 positivos. (F) Fibroblastos Ki67 positivos. Os dados foram submetidos ao ANOVA de uma via, seguido por comparações múltiplas contra o grupo enriquecido com cardiomiócitos que recebeu o meio controle; $p < 0,05$ foi considerado significativo. N=6.

Deste modo, nossos dados permitem concluir que as respostas fenotípicas observadas anteriormente não estão atreladas a uma alteração prévia da proliferação celular nas células estudadas, uma vez que os cardiomiócitos sob influência dos fibroblastos, seja na co-cultura ou pelos fatores secretados, não apresentaram diferenças

quanto às células em estado proliferativo. Por outro lado, os fatores secretados pelas células mesenquimais foram capazes de induzir a proliferação dos cardiomiócitos sem causar alteração para o fenótipo de condução rápida. É interessante notar que a proporção de fibroblastos em estado proliferativo permaneceu constante independente dos tratamentos (Figura 9C). Estas observações nos permitem excluir a possibilidade do maior número de células com o fenótipo de condução rápida ser ocasionado simplesmente pelo aumento prévio da proliferação celular.

A ativação da via do Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos é necessária para a maturação dos cardiomiócitos em células de condução rápida

Considerando a importância da proximidade entre cardiomiócitos e fibroblastos no microambiente para a indução do fenótipo de condução rápida, nós decidimos investigar se a via do Notch, que é uma das principais vias de sinalização justácrina, estaria envolvida nesta resposta. Para isto, nós utilizamos o inibidor DAPT que inibe a clivagem do Notch e sua consequente ativação para testar o papel desta via nos cardiomiócitos e nos fibroblastos durante o processo de indução de fibras de condução rápida. Deste modo, submetemos os cardiomiócitos a diferentes tratamentos: meio controle, meio condicionado por fibroblastos, meio condicionado por fibroblastos previamente inibidos por DAPT e o meio condicionado por fibroblastos com a concomitante adição do inibidor DAPT (conforme descrito na Figura 10). As expressões proteicas do Notch não ativado e ativado, assim como a da conexina 40 utilizada como marcador para o sistema de condução foram avaliadas por Western Blot.

Figura 10. Avaliação da influência da via do Notch1 na indução de fibras de condução rápida em resposta aos fatores secretados pelos fibroblastos cardíacos. Para inibir a via do Notch1 e avaliar o seu papel na resposta de indução dos cardiomiócitos para fibras de condução rápida nós utilizamos o inibidor DAPT que impede a clivagem e consequente ativação do receptor Notch. Amostras de proteína foram isoladas de extratos totais de culturas enriquecidas com cardiomiócitos tratadas com meio controle (CTL), meio condicionado por fibroblastos (fCM), meio condicionado por fibroblastos previamente inibidos por DAPT (fCMi) e meio condicionado por fibroblastos com a concomitante adição do inibidor DAPT (fCM+i). A expressão proteica relativa foi analisada por Western Blot. (A) Esquema ilustrativo dos tratamentos. Cada grupo foi mantido em cultura por sete dias e teve o seu meio trocado a cada 48h,

conforme os tratamentos descritos. (B) Níveis de expressão proteica relativa do receptor Notch1 não ativado nos cardiomiócitos conforme os tratamentos, N=5. (C) Níveis de expressão proteica relativa do receptor Notch1 ativado (NICD, *Notch Intracellular Domain*) nos cardiomiócitos conforme os tratamentos, N=6-8. (D) Níveis de expressão proteica relativa da conexina 40 nos cardiomiócitos conforme os tratamentos, N=3-5. A proteína GAPDH foi utilizada como proteína housekeeping, e os resultados são dispostos como a expressão relativa para o grupo controle para cada gel, média $\pm$ SEM. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via e teste posthoc de Dunnett contra o grupo controle; $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A expressão proteica do Notch1 não difere entre os grupos (Figura 10A), o que sugere que o meio condicionado pelos fibroblastos ou pelos fibroblastos inibidos com DAPT não influencia a expressão proteica do receptor, tão menos a adição do DAPT ao meio condicionado pelos fibroblastos. Uma vez que a ação do inibidor refere-se apenas à clivagem e consequente ativação do receptor. Investigamos também a expressão do receptor Notch1 ativado. O meio condicionado pelos fibroblastos foi suficiente para aumentar em aproximadamente 50% a ativação do Notch1 nos cardiomiócitos ($1,00 \pm 0,058$ vs $1,48 \pm 0,14$; $p=0,0011$; Figura 10B), assim como também dobrar a expressão de conexina 40 ($1,00 \pm 0,058$ vs $1,48 \pm 0,14$; $p=0,0011$; Figura 10C). Em 2012, Rentschler et al demonstraram que a superexpressão do notch1 ativado nos cardiomiócitos resulta na especialização dos cardiomiócitos em células de condução rápida. Portanto, mostramos que os fibroblastos cardíacos secretam fatores que induzem a expressão de conexina 40 e ativam a via do Notch1 nos cardiomiócitos, consistente com achados anteriores do papel desta via na indução de fibras de condução rápida.

Ao adicionarmos o inibidor DAPT junto ao tratamento com o meio condicionado pelos fibroblastos, observamos uma redução significativa de Notch1 ativado quando comparado ao grupo tratado somente com o meio condicionado, atingindo valores semelhantes ao grupo controle ($1,48 \pm 0,14$ vs $0,83 \pm 0,08$; $p=0,0011$; Figura 10C). Interessantemente, isto previniu o aumento da expressão de conexina 40 ($1,00 \pm 0,058$

vs $1,17 \pm 0,12$; $p=0,0011$; Figura 10D), sugerindo que a ativação do Notch1 nos cardiomiócitos é necessária para a especialização em fibras de condução rápida em resposta aos fatores secretados pelos fibroblastos. No entanto, a inibição prévia da via do Notch com o DAPT nos fibroblastos fez com que o meio condicionado pelos fibroblastos inibidos perdesse a atividade de indução da expressão de conexina 40 e ativação da via do Notch1 nos cardiomiócitos, como demonstrado pelo tratamento fCMI. Essa resposta ressalta o papel da ativação da via do Notch nos próprios fibroblastos para a produção dos mediadores solúveis em questão.

Estes dados sugerem que a via do Notch1 desempenha um papel central na intercomunicação entre cardiomiócitos e fibroblastos no microambiente e que, sua ativação nos dois tipos celulares é necessária para a indução da maturação dos cardiomiócitos em fibras de condução rápida.

Figura 11. Determinação do sistema de condução ventricular mediada pelos fibroblastos cardíacos *in vitro*. Os fibroblastos cardíacos são enriquecidos na área adjacente ao sistema de condução ventricular em formação e adulto. Nós demonstramos que os fibroblastos cardíacos de ratos neonatos induzem alterações moleculares e funcionais características de fibras de condução rápida nos cardiomiócitos adjacentes (Ex. aumento da expressão de Cx40, Irx3, SCN5A e transientes de cálcio mais longos) e reduzem características de cardiomiócitos de trabalho (Ex. diminuição do tamanho celular, expressão de Cx43, e transientes de cálcio mais rápidos). O meio condicionado pelos fibroblastos cardíacos foi suficiente para ativar a via do Notch1 e induzir a expressão de marcadores do sistema de condução nos cardiomiócitos. Interessantemente, a secreção desses fatores mostrou-se dependente da ativação da via do Notch1 nos fibroblastos, o que traz luz ao papel central que a via do Notch1 tem na intercomunicação entre fibroblastos e cardiomiócitos e consequente indução das fibras de condução rápida de forma justácrina *in vitro*.

Geração de cardiomiócitos de trabalho humanos *in vitro*

Com base na influência dos fibroblastos cardíacos na indução de cardiomiócitos para o fenótipo de condução, exploramos de forma translacional uma estratégia para melhorar a eficiência de terapias com células tronco para reparação cardíaca. É possível que o grande número de fibroblastos na área infartada possa estar correlacionado com a ocorrência de arritmias pós-transplante de células-tronco em decorrência do

direcionamento das células transplantadas para a formação ectópica de células de condução. Alternativamente, é preferível que as células transplantadas contribuam preferencialmente para o funcionamento do sincício cardíaco como massa de contração, na forma de cardiomiócitos de trabalho. Deste modo, fizemos um *knockout* para o fator de transcrição IRX3 em células tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC), com o intuito de impedir que estas células se tornem de condução e, consequentemente, tornem-se cardiomiócitos de trabalho com base em dados que sugerem um papel central do IRX3 neste processo (Kim et al, 2016).

Figura 12. Geração de cardiomiócitos ventriculares de trabalho humanos à partir de células tronco pluripotentes induzidas (hiPSC) in vitro. (A) Esquema ilustrativo do *knockout* para o gene do IRX3 em células tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) com a utilização da tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9. O *knockout* foi realizado com o intuito de direcionar a diferenciação das hiPSC para o fenótipo de cardiomiócito de trabalho. (B) Expressão gênica relativa da Conexina 43 (GJA1), Troponina I isoforma lenta esquelética (TNNI1), fator de transcrição (IRX3), Conexina-40 (GJA5), e subunidade de canal de sódio Nav1.5 (SCN5A) nos cardiomiócitos controle e mutante no dia 15 do protocolo de

diferenciação cardíaca. O gene da ciclofilina foi usado como *housekeeping gene* e os resultados estão apresentados na forma de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, média $\pm$ erro padrão, com $P < 0,05$ considerado significativo. $N=4$ realizado com duplicatas biológicas. (C-E) Análise dos transientes de cálcio intracelular em cardiomiócitos derivados de hiPSC. No dia 30 da diferenciação as células foram marcadas com o indicador de cálcio Fura-2 AM e os transientes espontâneos de cálcio intracelular foram medidos. (C) Tempo para atingir o pico máximo de cálcio por ciclo de batimento em segundos (*Time to Peak*). (D) Tempo para atingir os níveis basais de cálcio após o pico máximo (tempo de decaimento do Ca em segundos). (E) Duração total do CaT em segundos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ após o teste post-hoc de Bonferroni (alfa 0,05). N amostral= 18-39.

Produzimos o knockout para IRX3 em hiPSs utilizando a técnica de edição gênica CRISPR/Cas9 (Figura Apêndice A6). Após identificação e seleção do clone hiPSC IRX3 KO (C36) (Figuras A7 e A9) fizemos a sua diferenciação paralelamente ao clone controle (Figura A10). No dia 15 da diferenciação, quando as células já se tornaram cardiomiócitos, observamos um direcionamento do perfil de expressão gênica do clone IRX3 KO para o fenótipo de trabalho em comparação ao controle, ilustrado pela expressão gênica 10 vezes maior de conexina 43 ($1,00 \pm 0,06$ vs $10,08 \pm 2,60$; $p=0,013$; Figura 12B), 5 vezes maior da Troponina I ($1,00 \pm 0,03$ vs $5,11 \pm 1,62$; $p=0,0446$; Figura 12B), redução dos níveis de mRNA do IRX3 (Figura 12B) e redução da expressão gênica do marcador para o sistema de condução ventricular SCN5A ($1,00 \pm 0,02$ vs $0,81 \pm 0,07$; $p=0,0334$; Figura 12B).

Para verificar se as diferenças observadas seriam de fato causadas pela mutação do gene IRX3 ou se seriam somente por conta dos clones serem diferentes, nós isolamos e diferenciamos outro clone mutante, IRX3 KO (C37) (Figura A8 e A9). No dia 30 da diferenciação, portanto em um estágio mais maduro, os transientes de cálcio intracelular nas células IRX3 KO (C36 e C37) foram mais rápidos quando comparados ao grupo controle, conforme a redução do tempo para o pico (figura 12C), tempo de retorno ao estado basal (Figura 12D) e duração total do transiente (Figura 12E). Conforme descrito anteriormente, os cardiomiócitos de trabalho apresentam CaTs mais rápidos do que os

das células de condução. É importante salientar que os dois mutantes apresentaram o mesmo perfil de redução do tempo do transiente de cálcio intracelular. Estes dados sugerem que geramos *in vitro* cardiomiócitos derivados de hiPSC com perfil de expressão gênica e de transientes de cálcio semelhantes aos que seriam esperados para cardiomiócitos ventriculares de trabalho.

Geração de cardiomiócitos de trabalho humanos *in vivo*

Com o objetivo de investigar se as células IRX3 KO seriam mais eficientes em gerar cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vivo*, nos baseamos em um trabalho recentemente liderado pelo Professor Kenneth R. Chien (Foo et al, 2018) e injetamos as células cardíacas progenitoras derivadas de iPSC humanas em camundongos imunodeficientes. Injetamos as células controle e IRX3 KO (C36) no dia 4 da diferenciação nos rins ou corações de camundongos nudes. Injetamos as células no dia 4 da diferenciação ao invés do dia 6, como havia sido reportado no trabalho anterior, para testar a hipótese de que as células já estariam comprometidas com o fenótipo cardíaco (“committed”) já no dia 4 e que as mesmas apresentariam maior proliferação em decorrência de seu estágio mais imaturo. De acordo com essa hipótese, análises de *High Content Screening* realizadas no início da diferenciação (dia 6) demonstraram que as células IRX3 KO possuem cerca de 20% a mais de proliferação (Figura A12 D e E) e maior expressão do fator de transcrição cardiogênico Gata4 (Figura A12 A-C) quando comparadas ao grupo controle. Nós injetamos 1×10^6 células por animal no rim ou no coração, sem adição de nenhuma matriz. Os animais foram mantidos por 2 meses seguidos da injeção e posteriormente eutanasiados para coleta dos rins e corações, que foram fixados para análise histológica e de imunofluorescência.

Nós observamos em 3 dos 4 rins injetados com as células IRX3 KO uma massa transparente e viscosa envolta dos rins (asterisco, Figura 14A). O mesmo não foi observado nos animais injetados com as células controle. Alguns dos corações injetados apresentaram uma coloração levemente esbranquiçada na região onde as células foram injetadas (Figura A15B). A posterior análise histológica com picrossirius descartou a possibilidade de geração de escara ou área infartada por não haver marcação aumentada para colágeno em relação ao resto do coração (Figura A16C-D).

Figura 13. Análise por microscopia confocal dos rins que foram injetados com as células controle e IRX3 KO no dia 4 da diferenciação. (A-B) Amostras de rins injetados respectivamente com as células controle e IRX3 KO. O Sglt2 foi utilizado como marcador de túbulo proximal. Massa amorfa negativa para Sglt2 próxima à cápsula renal (*). (C) Corte do rim de um segundo animal que recebeu as células IRX3 KO. É possível observar uma massa celular não correspondente à morfologia característica do rim e

positivas para troponina cardíaca I e também para o marcador de cardiomiócitos ventriculares Myl2. Aumento de 100x. (D) Aumento de 400x da imagem em C; setas brancas ressaltam estruturas que se assemelham às fibras do aparato de contração cardíaco.

Na maior parte dos rins avaliados por microscopia confocal 2 meses após a injeção, nós identificamos apenas uma massa celular amorfa negativa para o marcador de tubulo proximal Sglt2, em uma região proxima à cápsula renal (onde as células foram injetadas) (Figuras 13A-B). No entanto, em dois cortes distintos do mesmo animal que recebeu as células IRX3 KO nós observamos uma massa celular positiva para troponina cardíaca I (Figura 13 C-D) e, em um dos cortes, positiva também para o marcador de células ventriculares Myl2 (Figura 13C). Imagens dos mesmos cortes foram adquiridas novamente no aumento de 400x (Figura 13D), na Figura 13D é possível observar estruturas semelhantes às fibras do aparato de contração cardíaco indicadas pelas setas brancas. É muito provável que estas células sejam de fato cardiomiócitos gerados *in vivo* à partir do dia 4 da diferenciação.

Nos corações nós observamos apenas um pequeno aglomerado de células com morfologia divergente do restante do coração (Figura A16). É possível que o constante estímulo mecânico presente no coração tenha tornado o microambiente mais hostil para as células injetas e que, por consequência, não tenhamos observado o surgimento de cardiomiócitos provenientes das células injetadas.

Estes dados trazem uma evidência inicial de que nós conseguimos gerar cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vivo*. Mais experimentos estão em andamento para confirmar estes achados.

Discussão

Diversos estudos têm sido realizados nos últimos anos para elucidar o desenvolvimento e a maturação do sistema de condução ventricular, principalmente quanto à origem das células progenitoras, a rede transcricional ativada durante o desenvolvimento do VCS e a caracterização de suas células especializadas (Mohan et al, 2018)(van Weerd, et al 2016)(van Eif et al, 2018). No entanto, ainda é controverso como ocorre a determinação do VCS. Neste estudo, fornecemos evidências moleculares e funcionais de que os fibroblastos cardíacos influenciam a especialização pós-natal de cardiomiócitos de ratos neonatos para células de condução rápida *in vitro* através da secreção de fatores dependente de sinalização justácrina (ativação da via Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos). Demonstramos também a utilização deste conhecimento para aplicação em um estudo de caráter translacional com a finalidade de produzir preferencialmente cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vitro* para utilização em terapias com células tronco para o infarto do miocárdio ou estudos de *disease modeling*.

Os fibroblastos cardíacos são conhecidos principalmente por seu papel na regulação do *turnover* da matriz extracelular tanto na homeostase quanto em processos patológicos (Furtado et al, 2016). Entretanto, estudos recentes demonstraram a influência dos fibroblastos cardíacos na proliferação de cardiomiócitos embrionários, assim como na contração e expressão de canais iônicos em cardiomiócitos mediante sinalização parácrina (Ieda et al, 2009) (Pedrotty et al, 2009) (Hachiro et al, 2007) (Howard et al, 2014). Nós demonstramos que co-culturas entre cardiomiócitos de ratos neonatos e fibroblastos cardíacos possuem maior expressão dos fatores de transcrição cardiogênicos Nkx2.5 e Gata-4 quando comparadas às culturas de cardiomiócitos. Embora esses fatores de transcrição estejam envolvidos em processos cardiogênicos

gerais, o Nkx2.5 é superexpresso durante o desenvolvimento do VCS, e é necessário para a maturação pós-natal do sistema de condução ventricular periférico (Terada et al, 2011) (Harris et al, 2006) (Moskowitz et al, 2007) (Meysen et al, 2007). Esses fatores de transcrição interagem fisicamente e regulam positivamente a expressão da conexina 40 (Durocher et al, 1997) (Linhares et al., 2004) (Oyamada et al, 2013). De fato, a expressão gênica das conexinas 40 e 45 também estava aumentada nas mesmas co-culturas. No coração, as conexinas 40 e 45 são principalmente restritas ao sistema de condução cardíaco, sendo a primeira considerada um dos principais marcadores para o VCS (van Weerd, et al 2016). Por outro lado, a expressão gênica da conexina 43 não mudou em nosso sistema de co-cultura em comparação com o controle. A conexina 43 é a conexina mais abundante no coração e é altamente expressa em cardiomiócitos de trabalho. Em conjunto, estes resultados sugerem que a interação entre cardiomiócitos e fibroblastos nas co-culturas leva à ativação pós-natal da expressão gênica dos fatores de transcrição Nkx2.5 e Gata-4 e pode estar relacionada com a alteração do fenótipo dos cardiomiócitos para células de condução cardíaca.

A citoarquitetura do coração revela que os fibroblastos cardíacos estão enriquecidos na área adjacente ao VCS adulto. Recentemente, Ieda et al ao investigarem a influência de fibroblastos cardíacos embrionários sobre a proliferação de cardiomiócitos viram que as células positivas para a vimentina e DDR2 (marcadores de fibroblastos) estão presentes no miocárdio embrionário, incluindo a região subendocárdica e trabecular (Ieda et al, 2009), que dá origem ao sistema de condução ventricular. Fibroblastos cardíacos embrionários surgem aproximadamente em E12.5 e aumentam em número até o nascimento. Usando um sistema de co-cultura delimitado, nós demonstramos que o contato celular entre fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos foi fundamental para gerar um fenótipo de fibra de condução rápida em cardiomiócitos.

A expressão de Nav1.5 aumentou na zona de contato entre os fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, e gradualmente desvaneceu em direção à área enriquecida com cardiomiócitos em nossa co-cultura delimitada. Em acordo com a expressão do marcador fenotípico, os transientes de cálcio também estavam alterados nos cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos e exibiram um perfil semelhante aos das fibras de condução rápida. Outros estudos relataram alterações funcionais similares relacionadas ao acoplamento excitação-contração quando os cardiomiócitos estão sob a influência do meio condicionado por fibroblastos cardíacos ou contato celular (Guo et al, 1999)(Mayourian, 2018). No entanto, essas alterações foram atribuídas principalmente à influência arritmogênica dos fibroblastos cardíacos através da regulação negativa da expressão de canais iônicos e do acoplamento heterocelular (Pedrotty et al, 2009) (Sridhar et al, 2017) (Trieschmann et al, 2016). Nós correlacionamos diretamente a alteração no CaT com as alterações fenotípicas observadas em direção à fibras especializadas de condução rápida no que tange a expressão gênica e proteica de marcadores do sistema de condução.

Curiosamente, não houve alteração molecular nem funcional nos cardiomiócitos longe dos fibroblastos cardíacos em nossa co-cultura espacialmente delimitada. Esses dados sugerem fortemente que quando a organização celular no microambiente é considerada, apenas os cardiomiócitos em contato com os fibroblastos cardíacos mudam seu fenótipo para fibras de condução rápida, sugerindo que a resposta seria mediada por sinalização justácrina (interação de receptores localizados na membrana de células adjacentes, interação com a matriz extracelular ou sinalização mediada por *Gap junctions*) ou formação de gradiente. Consequentemente, esta intercomunicação celular entre cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, que estão adjacentes durante os estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário e a maturação pós-natal do VCS, pode

resultar no ajuste fino e manutenção do sistema de condução ventricular adulto, assim como é necessário para o seu bom funcionamento. De fato, os fibroblastos cardíacos secretam vários componentes da matriz extracelular que já demonstraram influenciar cardiomiócitos durante o desenvolvimento embrionário (Ieda et al, 2009), bem como morfógenos que podem influenciar as células adjacentes de maneira dependente de gradiente (Abonnenc et al, 2013). Diversos trabalhos também demonstram a importância da via do Notch nos fibroblastos (Sassoli et al, 2013)(Nemir et al, 2014)(Fan et al, 2011) e nós também verificamos a forte expressão do Notch1 ativado nas nossas culturas de fibroblastos (Dados não mostrados). Além disso, a sinalização justácrina também foi associada ao desenvolvimento do VCS através da sinalização mediada por Notch, Nrg1 / ErbB (Egfr) e efrina B2 / EphB4 (Rentschler et al, 2012) (Rentschler et al, 2002) (van Weerd et al, 2016).

Nós fornecemos evidências de que o meio condicionado por fibroblastos cardíacos é suficiente para induzir a expressão de genes relacionados ao sistema de condução ventricular em cardiomiócitos, regulando positivamente a expressão da conexina 40, do *Irx3* e do *Scn5a* nos cardiomiócitos. Tendo em vista a característica justácrina da resposta, é provável que os fibroblastos secretem componentes da matriz extracelular ou morfógenos que são capazes de desencadear a resposta de especiação em fibra de condução rápida nos cardiomiócitos. O meio condicionado por fibroblastos cardíacos também reduziu as características de cardiomiócitos ventriculares de trabalho na população enriquecida em cardiomiócitos (redução na área de cardiomiócitos e número de cardiomiócitos positivos para conexina 43). Estes dados são consistentes com o processo de recrutamento de miócitos para diferenciação em fibras de condução rápida, que foi descrito durante a maturação pós-natal do sistema de condução

ventricular periférico e depende da expressão dos fatores de transcrição NKX2.5/IRX3 (Kim et al, 2016) (Meysen et al, 2007).

Embora os resultados sejam congruentes para apoiar a influência de mediadores solúveis secretados por fibroblastos cardíacos na maturação de VCS, não observamos uma resposta hipertrófica em nossas culturas enriquecidas com cardiomiócitos tratadas com fCM como foi relatado por outros grupos (Harada et al, 1997) (Cartledge et al, 2015) (Yu et al, 2018). Essa diferença pode ser devido ao fato de que o nosso fCM foi primeiramente concentrado 10x com um dispositivo de filtração por centrifugação e diluído para 1x com o meio controle fresco antes do uso. Isso nos permitiu reter os mediadores solúveis secretados pelos fibroblastos cardíacos e excluir a possibilidade de qualquer resposta derivada do consumo prévio dos meios. Fisiologicamente, a circulação fornece constantemente nutrientes do sangue necessários para o metabolismo celular e garante a eliminação de metabólitos da atividade celular. Qualquer desregulação neste equilíbrio pode causar respostas celulares alteradas, como é observado em condições patológicas, como o infarto do miocárdio. Portanto, quando as condições fisiológicas foram mantidas nos nossos experimentos, o fCM foi suficiente para regular antiteticamente o sistema de condução ventricular e o fenótipo de cardiomiócitos de trabalho, possivelmente recrutamento cardiomiócitos para especializarem-se em fibras de condução rápida.

Visando melhor compreender o caráter justácrino da resposta de especialização dos cardiomiócitos em fibras de condução rápida, nós demonstramos que a indução dos cardiomiócitos para células de condução em resposta aos fatores secretados pelos fibroblastos é dependente da ativação da via do Notch1 nos cardiomiócitos e também nos fibroblastos. Em 2012, Rentschler et al demonstraram que a ativação da via do Notch1 em cardiomiócitos murinos durante o desenvolvimento ou no estágio pós natal é

capaz de especializar os cardiomiócitos para o fenótipo de condução *in vivo* e *in vitro* (Rentschler et al, 2012). Assim como nós observamos nos cardiomiócitos sob influência dos fibroblastos cardíacos, eles também observaram alterações semelhantes no perfil de expressão gênica e prolongamento dos potenciais de ação nas células com a via do Notch transitoriamente ou constitutivamente ativada. Neste trabalho, nós mostramos que os fatores secretados pelos fibroblastos cardíacos ativam a via do notch1 nos cardiomiócitos e que a concomitante administração do inibidor DAPT ao tratamento com o meio condicionado pelos fibroblastos deixa de induzir a ativação da conexina 40, utilizada como marcador para o sistema de condução ventricular. Nossos dados reforçam o papel da via do notch1 para a indução de células de condução, conforme descrito anteriormente, e esclarecem a importância dos fibroblastos cardíacos para a ativação dessa via nos cardiomiócitos. Interessantemente, a secreção desses fatores pelos fibroblastos cardíacos mostrou-se dependente da ativação do Notch1 nos próprios fibroblastos.

Esses dados sustentam a ativação do Notch1 como sinalização central da resposta de indução de fibras de condução rápida em consequência da intercomunicação entre cardiomiócitos e fibroblastos *in vitro*. Recentemente, a via do Notch foi apontada como uma via integradora de respostas celulares presentes no microambiente, sendo responsiva a uma variedade de fatores e eventos no microambiente tais como estresse de cisalhamento, hipóxia e principalmente a composição da matriz extracelular que, por sua vez, é diretamente influenciada pelos fibroblastos (LaFoya et al, 2016).

As células endoteliais foram associadas com os estágios iniciais do desenvolvimento do sistema de condução cardíaco embrionário, principalmente por meio da sinalização por endotelina-1 (Pennisi et al, 2002). Embora trabalhos recentes de Hua e colaboradores tenham mostrado que camundongos sem sinalização da endotelina-

1 têm a função e a estrutura do VCS normais (Hua et al, 2014), um possível papel das células endoteliais no desenvolvimento do VCS não pode ser descartado. Isto contribui para a ideia de que a determinação do VCS depende da fina organização e comunicação celular dentro do microambiente cardíaco para ativação e manutenção da rede molecular que determina o VCS.

Em relação ao aspecto translacional do nosso trabalho, nossos dados sugerem que nós tivemos êxito em gerar cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vitro* e, possivelmente, *in vivo* por meio de um *knockout* do fator de transcrição IRX3 em células tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC). Em 2016, Kim et al demonstraram que camundongos *knockout* para o fator de transcrição IRX3 no período pós-natal apresentavam hipoplasia do sistema de condução ventricular decorrente do não recrutamento de cardiomiócitos para especialização em células de condução rápida e, consequente aumento dos cardiomiócitos ventriculares de trabalho. Essa resposta foi relacionada à progressão do ciclo celular e aumento da proliferação dos cardiomiócitos *Irx3* ^{-/-} que, por sua vez, inibia a diferenciação destas células em fibras de condução rápida. Como esperado, os nossos cardiomiócitos derivados de hiPSC IRX3 KO (C36) apresentaram expressão 10 vezes maior de conexina 43, que é majoritariamente expressa em cardiomiócitos ventriculares de trabalho. Estudos recentes indicam que a superexpressão de conexina 43 melhora a terapia celular para doenças cardiovasculares e diminui a ocorrência de arritmias (Roell et al, 2018)(Fernandes et al, 2009). Nossos cardiomiócitos hiPSC IRX3 KO também apresentaram diminuição significativa do marcador para o sistema de condução ventricular SCN5A e alteração do perfil dos transientes de cálcio intracelular consistentes com o fenótipo de condução rápida. Assim como Kim et al, nós também observamos aumento da proliferação celular (mais de 20% de aumento comparado ao controle) nas nossas células IRX3 KO durante o início do

protocolo de diferenciação cardíaca. As células IRX3 KO também tiveram maior expressão de Gata-4 no início da diferenciação. Altos níveis de expressão de Gata-4 foram correlacionados com um maior potencial de diferenciação cardíaca em células tronco-embrionárias, o que poderia indicar que as células IRX3 KO possuem uma maior predisposição para a geração de cardiomiócitos (Laemmle et al, 2016). Isto pode justificar o fato de termos encontrado células troponina I positivas (marcador para cardiomiócitos) e Myl2 positivas (marcador para cardiomiócitos ventriculares de trabalho) somente no rim do animal injetado com células progenitoras cardíacas derivadas do clone hiPSC IRX3 KO.

Conclusão

O desenvolvimento embrionário adequado e a maturação pós-natal do sistema de condução ventricular são passos fundamentais para a condução adequada de impulsos elétricos em todo o coração. Este trabalho fornece fortes evidências de que os fibroblastos cardíacos ativam a rede VCS e induzem a maturação pós-natal dos cardiomiócitos para fibras de condução rápida em resposta à secreção de fatores pelos fibroblastos e dependente da sinalização justácrina decorrente da ativação da via do Notch1 nos cardiomiócitos e nos fibroblastos *in vitro*. Com base nisto, estamos propondo um modelo no qual a intercomunicação entre fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos no microambiente contribui para a determinação e manutenção da estrutura e função do VCS (Figura 11). No entanto, mais estudos são necessários para investigar se esta interação celular entre os fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, e a extensão desta, também acontece *in vivo* e determinar os fatores secretados que causam essa resposta. O processo descrito neste trabalho contribui para o esclarecimento do possível papel dos fibroblastos cardíacos no desenvolvimento de VCS e pode dar origem a novos alvos para tratar arritmias.

Em relação à parte translacional, nossos resultados sustentam a ideia de que é possível produzir preferencialmente cardiomiócitos ventriculares de trabalho *in vitro*. Esperamos que os resultados descritos neste trabalho contribuam para a geração de modelos experimentais de *disease modeling* associados ao sistema de condução ventricular e, principalmente, para a geração de terapias celulares mais eficientes e seguras para o infarto do miocárdio, livre de arritmias pós-transplante celular.

Participação em evento científico

- **Famelab Brasil 2018**

Semifinalista da etapa brasileira da competição de comunicação científica Famelab Brasil organizada pelo British Council, a qual a FAPESP é parceira. O evento ocorreu do dia 22 de abril 2018 ao dia 27 de abril de 2018, no Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Referências

1. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res*. 2016;118;400–409.
2. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjostrom SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos Remedios C, Malm T, Andrä M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H, Frisén J. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1566-75.
3. Sullivan KE, Black LD. The role of cardiac fibroblasts in extracellular matrix-mediated signaling during normal and pathological cardiac development. *J Biomech Eng*. 2013 Jul 1;135(7):71001.
4. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, et al. Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through $\beta 1$ Integrin Signaling. *Developmental cell*. 2009;16(2):233-244.
5. Hachiro T, Kawahara K, Sato R, Yamauchi Y, Matsuyama D. Changes in the fluctuation of the contraction rhythm of spontaneously beating cardiac myocytes in cultures with and without cardiac fibroblasts. *Biosystems*. 2007 Nov-Dec;90(3):707-15.
6. Furtado MB, Nim HT, Boyd SE, Rosenthal NA. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development*. 2016 Feb 1;143(3):387-97.
7. Virág S, Challice CE. The development of the conduction system in the mouse embryo heart. II. Histogenesis of the atrioventricular node and bundle. *Dev Biol*. 1977 Apr;56(2):397-411.
8. Christoffels VM, Moorman AF. Development of the cardiac conduction system: why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009 Apr;2(2):195-207.
9. Mohan RA, Boukens BJ, Christoffels VM. Developmental Origin of the Cardiac Conduction System: Insight from Lineage Tracing. *Pediatr Cardiol*. 2018 May 17.
10. van Weerd JH, Christoffels VM. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development*. 2016 Jan 15;143(2):197-210.
11. Park DS, Fishman GI. Development and Function of the Cardiac Conduction System in Health and Disease. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2017;4(2).
12. Meysen S, Marger L, Hewett KW, Jarry-Guichard T, Agarkova I, Chauvin JP, Perriard JC, Izumo S, Gourdie RG, Mangoni ME, Nargeot J, Gros D, Miquerol L. Nkx2.5 cell-autonomous gene function is required for the postnatal formation of the peripheral ventricular conduction system. *Dev Biol*. 2007 Mar 15;303(2):740-53.
13. Cerrone M, Noujaim SF, Tolkacheva EG, Talkachou A, O'Connell R, Berenfeld O, Anumonwo J, Pandit SV, Vikstrom K, Napolitano C, Priori SG, Jalife J. Arrhythmogenic mechanisms in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2007 Nov 9;101(10):1039-48.
14. Ben Caref E, Boutjdir M, Himel HD, El-Sherif N. Role of subendocardial Purkinje network in triggering torsade de pointes arrhythmia in experimental long QT syndrome. *Europace*. 2008 Oct;10(10):1218-23.
15. Kang G, Giovannone SF, Liu N, Liu FY, Zhang J, Priori SG, Fishman GI. Purkinje cells from RyR2 mutant mice are highly arrhythmogenic but responsive to targeted therapy. *Circ Res*. 2010 Aug 20;107(4):512-9.

16. Govindapillai A, Hotchkiss A, Baguma-Nibasheka M, Rose RA, Miquerol L, Smithies O, Maeda N, Pasumarthi KBS. Characterizing the role of atrial natriuretic peptide signaling in the development of embryonic ventricular conduction system. *Sci Rep*. 2018 May 2;8(1):6939.
17. van Eif VWW, Devalla HD, Boink GJJ, Christoffels VM. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Jun 6.
18. MacGrogan D, Münch J, de la Pompa JL. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Nov;15(11):685-704.
19. Rentschler S, Yen AH, Lu J, Petrenko NB, Lu MM, Manderfield LJ, Patel VV, Fishman GI, Epstein JA. Myocardial Notch signaling reprograms cardiomyocytes to a conduction-like phenotype. *Circulation*. 2012 Aug 28;126(9):1058-66.
20. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Juxtacrine Signaling.
21. Tarzemany R, Jiang G, Jiang JX, Larjava H, Häkkinen L. Connexin 43 Hemichannels Regulate the Expression of Wound Healing-Associated Genes in Human Gingival Fibroblasts. *Sci Rep*. 2017 Oct 26;7(1):14157.
22. Louault C, Benamer N, Faivre JF, Potreau D, Bescond J. Implication of connexins 40 and 43 in functional coupling between mouse cardiac fibroblasts in primary culture. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1778(10):2097-104.
23. Zhang Y, Kanter EM, Laing JG, Aprhys C, Johns DC, Kardami E, Yamada KA. Connexin43 expression levels influence intercellular coupling and cell proliferation of native murine cardiac fibroblasts. *Cell Commun Adhes*. 2008 Sep;15(3):289-303.
24. Zhang SS, Kim KH, Rosen A, Smyth JW, Sakuma R, Delgado-Olguín P, Davis M, Chi NC, Puviindran V, Gaborit N, Sukonnik T, Wylie JN, Brand-Arzamendi K, Farman GP, Kim J, Rose RA, Marsden PA, Zhu Y, Zhou YQ, Miquerol L, Henkelman RM, Stainier DY, Shaw RM, Hui CC, Bruneau BG, Backx PH. Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13576-81.
25. Kim KH, Rosen A, Hussein SM, Puviindran V, Korogyi AS, Chiarello C, Nagy A, Hui CC, Backx PH. *Irx3* is required for postnatal maturation of the mouse ventricular conduction system. *Sci Rep*. 2016 Jan 20;6:19197.
26. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, Shimizu W, Miura N, Furukawa T. Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, *IRX3*, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur Heart J*. 2016 May 7;37(18):1469-75.
27. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014 Jun 12;510(7504):273-7.
28. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016 Oct 20;538(7625):388-391.
29. Chen CH, Sereti KI, Wu BM, Ardehali R. Translational aspects of cardiac cell therapy. *J Cell Mol Med*. 2015 Aug;19(8):1757-72.
30. McArthur L, Chilton L, Smith GL, Nicklin SA. Electrical consequences of cardiac myocyte: fibroblast coupling. *Biochem Soc Trans*. 2015 Jun;43(3):513-8.

31. Bergmann, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98–102 (2009).
32. van Berlo JH, Molkentin JD. An emerging consensus on cardiac regeneration. *Nat Med.* 2014 Dec;20(12):1386-93.
33. Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol.* 2018 May 9.
34. Duellen R, Sampaolesi M. Stem Cell Technology in Cardiac Regeneration: A Pluripotent Stem Cell Promise. *EBioMedicine.* 2017 Feb;16:30-40.
35. Menasché P, Vanneau V, Hagège A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, Cacciapuotì I, Al-Daccak R, Benhamouda N, Blons H, Agbulut O, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Charron D, Tartour E, Tachdjian G, Desnos M, Larghero J. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Jan 30;71(4):429-438.
36. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
37. Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci Rep.* 2014 Oct 22;4:6716.
38. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel KW, Astley CA, Baldessari A, Ogle J, Don CW, Steinberg ZL, Seslar SP, Tuck SA, Tsuchida H, Naumova AV, Dupras SK, Lyu MS, Lee J, Hailey DW, Reinecke H, Pabon L, Fryer BH, MacLellan WR, Thies RS, Murry CE. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol.* 2018 Aug;36(7):597-605.
39. Jensen L, Neri E, Bassaneze V, De Almeida Oliveira NC, Dariolli R, Turaça LT, Levy D, Veronez D, Ferraz MSA, Alencar AM, Bydlowski SP, Cestari IA, Krieger JE. Integrated molecular, biochemical, and physiological assessment unravels key extraction method mediated influences on rat neonatal cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 2018 Jul;233 (7):5420-5430.
40. Fathi E, Farahzadi R. Isolation, Culturing, Characterization and Aging of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells: A Brief Overview. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2016 Mar; 59, e16150383.
41. Pedrotty DM, Klinger RY, Kirkton RD, Bursac N. Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.* 2009; 83(4):688-697
42. Dariolli R, Bassaneze V, Nakamuta JS, Omae SV, Campos LC, Krieger JE. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *PLoS One.* 2013 Jul 9;8(7):e67939.
43. Remy S, Chenouard V, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Brusselle L, Heslan JM, Nguyen TH, Bellien J, Merot J, De Cian A, Giovannangeli C, Concordet JP, Anegon I. Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep.* 2017 Nov 29;7(1):16554.
44. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018 May 14.

45. de Carvalho AETS, Bassaneze V, Forni MF, Keusseyan AA, Kowaltowski AJ, Krieger JE. Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative Energy Metabolism. *Sci Rep*. 2017 Nov 13;7(1):15434.
46. Carneiro AP, Fonseca-Alaniz MH, Dallan LAO, Miyakawa AA, Krieger JE. β -arrestin is critical for early shear stress-induced Akt/eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):75-81.
47. Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Schulze K, Schultheiss HP, Tschöpe C, Westermann D. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int*. 2012; 2012:875742.
48. Belostotskaya GB, Golovanova TA. Characterization of contracting cardiomyocyte colonies in the primary culture of neonatal rat myocardial cells: a model of in vitro cardiomyogenesis. *Cell Cycle*. 2014;13 (6):910-8.
49. Harris BS, Spruill L, Edmonson AM, Rackley MS, Benson DW, O'Brien TX, Gourdie RG. Differentiation of cardiac Purkinje fibers requires precise spatiotemporal regulation of Nkx2-5 expression. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):38-49.
50. Remme CA, Verkerk AO, Hoogaars WM, Aanhaanen WT, Scicluna BP, Annink C, van den Hoff MJ, Wilde AA, van Veen TA, Veldkamp MW, de Bakker JM, Christoffels VM, Bezzina CR. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2009 Sep;104(5):511-22.
51. Pallante BA, Giovannone S, Fang-Yu L, Zhang J, Liu N, Kang G, Dun W, Boyden PA, Fishman GI. Contactin-2 expression in the cardiac Purkinje fiber network. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010 Apr;3(2):186-94.
52. Ono N, Yamaguchi T, Ishikawa H, Arakawa M, Takahashi N, Saikawa T, Shimada T. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 2009;72(3):139-49.
53. Foo KS, Lehtinen ML, Leung CY, Lian X, Xu J, Keung W, Geng L, Kolstad TRS, Thams S, Wong AO, Wong N, Bylund K, Zhou C, He X, Jin SB, Clarke J, Lendahl U, Li RA, Louch WE, Chien KR. Human ISL1(+) Ventricular Progenitors Self-Assemble into an In Vivo Functional Heart Patch and Preserve Cardiac Function Post Infarction. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1644-1659.
54. Howard CM, Baudino TA. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 May;70:19-26.
55. Terada R, Warren S, Lu JT, Chien KR, Wessels A, Kasahara H. Ablation of Nkx2-5 at mid-embryonic stage results in premature lethality and cardiac malformation. *Cardiovasc Res*. 2011 Jul 15;91(2):289-99.
56. Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, Wolf CM, Peterson MA, Shendure J, Nobrega MA, Yokota Y, Berul C, Izumo S, Seidman JG, Seidman CE. A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1365-76.
57. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *The EMBO Journal*. 1997;16(18):5687-5696.
58. Linhares VLF, Almeida NAS, Menezes DC, et al. Transcriptional regulation of the murine *Connexin40* promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovascular research*. 2004; 64(3):402-411. doi:10.1016/j.cardiores.2004.09.021.
59. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1828(1):118-33.

60. Guo W, Kamiya K, Yasui K, Kodama I, Toyama J. Paracrine hypertrophic factors from cardiac non-myocyte cells downregulate the transient outward current density and Kv4.2 K⁺ channel expression in cultured rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1999 Jan;41(1):157-65.
61. Mayourian J, Ceholski DK, Gonzalez DM, Cashman TJ, Sahoo S, Hajjar RJ, Costa KD. Physiologic, Pathologic, and Therapeutic Paracrine Modulation of Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Circ Res.* 2018 Jan 5;122(1):167-183.
62. Sridhar S, Vandersickel N, Panfilov AV. Effect of myocyte-fibroblast coupling on the onset of pathological dynamics in a model of ventricular tissue. *Sci Rep.* 2017 Jan 20;7:40985.
63. Trieschmann J, Bettin D, Haustein M, Köster A, Molcanyi M, Halbach M, Hanna M, Fouad M, Brockmeier K, Hescheler J, Pfannkuche K, Hannes T. The Interaction between Adult Cardiac Fibroblasts and Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Leads to Proarrhythmic Changes in In Vitro Cocultures. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2936126.
64. Abonnenc M, Nabeebaccus AA, Mayr U, Barallobre-Barreiro J, Dong X, Cuello F, Sur S, Drozdov I, Langley SR, Lu R, Stathopoulou K, Didangelos A, Yin X, Zimmermann WH, Shah AM, Zampetaki A, Mayr M. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circ Res.* 2013 Oct 25;113(10):1138-47.
65. Sassoli C, Chellini F, Pini A, Tani A, Nistri S, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Bani D, Formigli L. Relaxin prevents cardiac fibroblast-myofibroblast transition via notch-1-mediated inhibition of TGF- β /Smad3 signaling. *PLoS One.* 2013 May 21;8(5):e63896.
66. Nemir M, Metrich M, Plaisance I, Lepore M, Cruchet S, Berthonneche C, Sarre A, Radtke F, Pedrazzini T. The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart. *Eur Heart J.* 2014 Aug 21;35(32):2174-85.
67. Fan YH, Dong H, Pan Q, Cao YJ, Li H, Wang HC. Notch signaling may negatively regulate neonatal rat cardiac fibroblast-myofibroblast transformation. *Physiol Res.* 2011;60(5):739-48.
68. Rentschler S, Zander J, Meyers K, France D, Levine R, Porter G, Rivkees SA, Morley GE, Fishman GI. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10464-9.
69. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Igaki T, Yamashita J, Masuda I, Yoshimasa T, Tanaka I, Saito Y, Nakao K. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation.* 1997 Nov 18;96(10):3737-44.
70. Cartledge JE, Kane C, Dias P, Tesfom M, Clarke L, Mckee B, Al Ayoubi S, Chester A, Yacoub MH, Camelliti P, Terracciano CM. Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc Res.* 2015 Mar 1;105(3):260-70.
71. Yu J, Seldin MM, Fu K, Li S, Lam L, Wang P, Wang Y, Huang D, Nguyen TL, Wei B, Kulkarni RP, Di Carlo D, Teitell M, Pellegrini M, Lusi AJ, Deb A. Topological Arrangement of Cardiac Fibroblasts Regulates Cellular Plasticity. *Circ Res.* 2018 Jun 22;123(1):73-85.
72. Pennisi DJ, Rentschler S, Gourdie RG, Fishman GI, Mikawa T. Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int J Dev Biol.* 2002 Sep;46(6):765-75.
73. Hua LL, Vedantham V, Barnes RM, Hu J, Robinson AS, Bressan M, Srivastava D, Black BL. Specification of the mouse cardiac conduction system in the absence of Endothelin signaling. *Dev Biol.* 2014 Sep 15;393(2):245-254.
74. Roell W, Klein AM, Breitbart M, Becker TS, Parikh A, Lee J, Zimmermann K, Reining S, Gabris B, Ottersbach A, Doran R, Engelbrecht B, Schiffer M, Kimura K, Freitag P, Carls E, Geisen C, Duerr GD, Sasse P, Welz A, Pfeifer A, Salama G, Kotlikoff M, Fleischmann BK. Overexpression of

Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling. *Sci Rep.* 2018 May 8;8(1):7145.

75. Fernandes S, van Rijen HV, Forest V, Evain S, Leblond AL, Mérot J, Charpentier F, de Bakker JM, Lemarchand P. Cardiac cell therapy: overexpression of connexin43 in skeletal myoblasts and prevention of ventricular arrhythmias. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3703-12.
76. Laemmle LL, Cohen JB, Glorioso JC. Constitutive Expression of GATA4 Dramatically Increases the Cardiogenic Potential of D3 Mouse Embryonic Stem Cells. *Open Biotechnol J.* 2016;10:248–257. doi:10.2174/1874070701610010248

Apêndice

Figura A1. Caracterização dos fibroblastos cardíacos de ratos neonatos. Nós utilizamos a técnica de imunofluorescência para caracterizar os fibroblastos cardíacos de ratos. Além disso, todos os fibroblastos cardíacos de ratos neonatos foram usados impreterivelmente na passagem 1, a fim de inibir a diferenciação em miofibroblastos. (A) Cultura de fibroblastos marcada com vimentina (em verde), marcador para fibroblastos. (B) Cultura de fibroblastos marcada com fibronectina (em vermelho), marcador para fibroblastos. (C) Cultura de fibroblastos marcada com CD90 (em magenta), marcador para fibroblastos. (D) Cultura de fibroblastos marcada com PDGFRα (em ciano), marcador para fibroblastos.

(E) Cultura de fibroblastos marcada com alfa actina de músculo liso, α SMA (em ciano), marcador para diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Escala= 20 μ m.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>Nkx2.5</i>	Forward	ATTTTATCCGCGAGCCTACG
	Reverse	TGCGTGGACGTGAGCTT
<i>Gata-4</i>	Forward	GCCTCTTGCAATGCGGAA
	Reverse	GACCTGCTGGTGTCTTAGATTTATT
<i>Gja5</i> (connexin-40)	Forward	AGAGCCTGAAGAAGCCAACTC
	Reverse	ACCGTAGAGTGCTTGTGGAC
<i>Gjc1</i> (connexin-45)	Forward	CCATCGAGGAACTCAAGAGAGAA
	Reverse	ACCGCAGTTAGGACAATTTCG
<i>Gjal</i> (connexin-43)	Forward	CGCCGGCTTCACTTTCATTA
	Reverse	GTGGAGTAGGCTTGGACCTT

Tabela A1 Lista de primers para RT-PCR em tempo real. A RT-PCR para os genes *Irx3* e *Scn5a* foi realizada utilizando sondas TaqMan.

Suppl. Fig 2

Figura A2. Análise transiente de cálcio de áreas enriquecidas com cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram plaqueados no centro do nosso sistema de co-cultura espacialmente delimitado e quer os fibroblastos cardíacos quer as células estaminais mesenquimais foram plaqueadas na área exterior. Os transientes de cálcio das células contráteis nas áreas enriquecidas com cardiomiócitos foram registrados e medidos. A) Curvas de CaT ilustrativas descrevendo os parâmetros analisados. (B) curvas médias de CaT para cada grupo experimental. C) Amplitudes CaT normalizadas. D) Tempo para atingir 50% de decaimento de cálcio (CaD50). E) tempo para atingir 90% de decaimento de cálcio (CaD90). F) Tempo para atingir o pico máximo de cálcio por ciclo de batimento (Time to Peak). G) Tempo para atingir os níveis basais de cálcio após o pico máximo (tempo de decaimento do Ca). H) O intervalo de descanso ou o tempo entre o nível basal alcançado após a contração até o novo CaT. A área enriquecida com cardiomiócitos no centro da lamela somente de cardiomiócitos foi usada como controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ após o teste post-hoc de Bonferroni (alfa 0,05). Os tamanhos das amostras foram 15 células de cardiomiócitos (centro), 12 células de Cardio / Fibro (contato) e 10 células de Cardio / rMSCs (contato).

Figura A3 Expressão proteica relativa de conexina-40 e conexina-43 determinada por Western Blotting. Amostras de proteína foram isoladas de extratos inteiros de culturas enriquecidas com cardiomiócitos tratados com o controle ou meio condicionado por fibroblastos cardíacos (fCM) por sete dias após o plaqueamento. (A-B) Nível de expressão proteica relativa das proteínas de junção de hiato: conexinas 40 (GJA5) e 43 (GJA1), respectivamente. A proteína GAPDH foi utilizada como proteína housekeeping, e os resultados são dispostos como a expressão relativa para o grupo controle, média $\pm$ SEM. Os dados foram submetidos ao teste t de Student não pareado, contra o grupo controle; $p < 0,05$ foi considerado significativo. N=4-5.

Figura A4. Avaliação da expressão gênica e proteica do IRX3 durante pontos distintos da diferenciação de células iPS em cardiomiócitos. (A) Dados de expressão gênica do IRX3 no banco de células do laboratório para diferentes pontos da diferenciação em cardiomiócitos. O gene GAPDH foi usado como *housekeeping gene* e os resultados estão apresentados na forma de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, média, com $P < 0,05$ considerado significativo. (B) Dados de expressão proteica do IRX3 no banco de células do laboratório para diferentes pontos da diferenciação em cardiomiócitos. A expressão proteica do GAPDH foi utilizada para a normalização das amostras e os resultados estão apresentados na forma expressão relativa ao grupo D0 (iPSC) utilizado como controle, apresentando média, com $P < 0,05$ considerado significativo. $N=9$. (C) Análise da expressão do IRX3 ao longo do processo de diferenciação. Dados coletados em diferentes bancos de dados, gerados por protocolos e laboratórios distintos descritos na literatura.

N° sgRNA	Nome do sgRNA	Sequência sgRNA	PAM
927	sghIRX3_1	GCCCCGAGGCGTTCAGCTCCG	AGG
929	sghIRX3_3	GTACGGGGCGCCCTACGCCG	CGG

Tabela A2. Descrição dos sgRNAs utilizados e respectivas sequências PAM. Os *single guide RNAs* (sgRNA) são sequências de 20pb específicas para a região que será clivada seguidos pela sequência PAM (NGG). Uma vez expressos na célula, o sgRNA e a enzima Cas9 formam um complexo ribonucleoproteico, deixando a enzima em sua forma ativa e capaz de se ligar ao DNA. Caso haja total complementariedade entre o sgRNA e o DNA, a enzima causa uma quebra de dupla fita cerca de 3pb *upstream* à sequência PAM. A quebra da dupla fita pode resultar em inserções e deleções e, eventualmente, gerar mutações por *frameshift* e códon de parada prematuro.

Figura A5. Teste da eficiência de clivagem dos sgRNA. Os sgRNAs foram desenvolvidos por colaboração com o grupo coordenado pelo pesquisador Jean Paul Concordet MNDN, Paris, França. O ensaio com a enzima T7 endonuclease I (T7endoI) é utilizado para verificar a ocorrência de inserções ou deleções (InDels) na região de interesse. A T7endoI reconhece e cliva regiões que não estão corretamente pareadas no DNA. Inicialmente, a região de interesse para a qual os sgRNAs foram desenhados é amplificada por PCR nas amostras de células que passaram pela edição gênica com CRISPR/Cas9. As sequências amplificadas são então desnaturadas e aneladas, permitindo a formação de *mismatches* na dupla hélice em regiões onde ocorreram inserções ou deleções. A T7endoI cliva as regiões de *mismatch* encontradas e o produto da clivagem dá origem a mais de uma banda no gel de agarose. Caso não tenha havido mutação, não haverá *mismatch* e haverá apenas uma banda no gel de corrida. Dessa forma, o sgRNA 929 foi o mais eficiente na geração de InDels (18%), como descrito no primeiro gel da imagem.

Figura A6. Esquema para geração e seleção dos knockouts para IRX3 pela técnica de edição gênica CRISPR/Cas9. As células iPS foram eletroporadas com um de dois sgRNAs diferentes testados. Após a transfecção das células, fizemos plaqueamento com baixa concentração de células para que as mesmas ficassem singularizadas e formassem colônias puras. Selecionamos 96 colônias de iPS, as quais foram

amplificadas, tiveram seu DNA coletado e purificado para posterior avaliação de possíveis mutações da região de interesse. As amostras amplificadas foram sequenciadas para confirmação das mutações.

Figura A7. Identificação do primeiro clone mutante identificado gerado pela técnica de edição gênica CRISPR/Cas9.

A região de 423pb que continha as regiões de corte específicas para os sgRNA utilizados foi amplificada nos diferentes clones. (A) É possível identificar no cromatograma gerado pelo sequenciamento das duas bandas do clone 929C36 uma deleção de 2pb em um alelo e 59pb no outro alelo. (B) Gel de agarose com os produtos gerados por PCR do clone mutado 929C36 e um de seus subclones. A mutação foi confirmada pela geração de 17 subclones os quais apresentaram exatamente a mesma deleção no sequenciamento.

A **B**

Figura A8. Identificação do segundo mutante clone 929C37. (A) O cromatograma gerado pelo sequenciamento indica que houve uma inserção de um fragmento de 252pb do exon 2 no exon 1 e deleção de 229pb próxima a sequência PAM do sgRNA utilizado em um dos alelos. (B) Segundo alelo apresenta uma deleção de 2 pb próxima à sequência PAM do sgRNA utilizado.

Figura A9. Descrição das sequências de aminoácidos geradas pela mutação dos clones 929C36 e 929C37. A sequência de aminoácidos foi gerada por meio da tradução das sequências de DNA mutadas observadas no cromatograma utilizando o software *Geneius*. (A) Sequência *wild type* com 501 aminoácidos. (B) Alelos mutados do clone 929C36 com deleções de 59pb e 2 pb, resultando respectivamente em peptídeos com 73 e 92 aminoácidos. (C) Alelo mutado do clone 929C37 uma deleção de 2 pb próxima à sequência PAM, resultando em um peptídeo com 92 aminoácidos. O alelo do clone 929C37 com uma inserção de um fragmento de 252pb do exon 2 no exon 1 e deleção de 229pb próxima a sequência PAM não resulta em nenhuma sequência peptídica pois perdeu o start códon. As regiões em amarelo correspondem ao *frameshift* causado pelas deleções e o asterisco vermelho (*) indica *stop codon* prematuro.

Figura A10. Caracterização da diferenciação do clone de iPS 929C36 em cardiomiócitos. Três clones foram diferenciados em cardiomiócitos paralelamente. (A) iPS controle que não passou pelo procedimento (SS109). (B) iPS controle que passou pela edição gênica com o sistema CRISPR/Cas9, mas não teve mutação (929C28). (C) iPS *knockout* para o gene IRX3.

Figura A11. Avaliação da influência do knockout para o gene IRX3 na expressão dos fatores de pluripotência em D0. (A) Expressão gênica relativa do gene IRX3 no clone controle e mutante C36 (929C36) no D0 da diferenciação. (B) Expressão gênica relativa do gene KLF4 no clone controle e mutante C36 no D0 da diferenciação. (C) Expressão gênica relativa do gene MYC no clone controle e mutante C36 no D0 da diferenciação. (D) Expressão gênica relativa do gene Nanog no clone controle e mutante C36 no D0 da diferenciação. O gene da ciclofilina foi usado como *housekeeping gene* e os resultados estão apresentados na forma de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, média $\pm$ erro padrão, com $P < 0,05$ considerado significativo. $N=2-3$ realizado com duplicatas biológicas.

Figura A12. As células IRX3 KO apresentam maior expressão proteica de Gata-4 e maior proporção de células positivas para Ki67 no dia 6 da diferenciação. (A) Imagens ilustrativas do ensaio de High Content Screening para avaliação da expressão proteica de Gata-4 em células individualizadas (single cell). (B) Porcentual de células positivas para Gata-4 nas amostras controle e IRX3 KO. (C) Expressão de Gata-4, correspondente à intensidade média de fluorescência, nas células positivas para Gata-4. (D) Imagens ilustrativas do ensaio de High Content Screening para avaliação da expressão proteica de Ki67 em células individualizadas (single cell). (E) Porcentual de células positivas para Ki67. Para cada amostra biológica foram analisados dois poços de uma placa de 96 wells, com 5 à 10 campos distintos por poço. Escala = 100 μ m. Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão, com $P < 0,05$ considerado significativo.

Figura A13. No dia 30 da diferenciação as células IRX3 KO e controle apresentam um padrão similar de expressão de troponina I cardíaca e do marcador ventricular Myl2. (A) Imagens ilustrativas do ensaio de High Content Screening para avaliação da expressão protéica de troponina I cardíaca (marcador para cardiomiócitos) e Myl2 (marcador para cardiomiócitos ventriculares) em células individualizadas (single cell). (B) Área média dos cardiomiócitos (μm^2), dada pela área média de troponina I ao redor de um núcleo válido nas amostras controle e IRX3 KO. (C) Porcentual de células positivas para troponina I cardíaca, correspondente ao porcentual de cardiomiócitos. (D) Expressão de troponina I cardíaca, correspondente à intensidade média de fluorescência, nas células positivas para troponina I cardíaca. (E) Porcentual de células positivas para Myl2, correspondente ao porcentual de cardiomiócitos ventriculares. (F) Expressão de Myl2, correspondente à intensidade média de fluorescência, nas células positivas para Myl2. Para cada amostra biológica foram analisados dois poços de uma placa de 96 wells, com 5 à 10 campos distintos por poço. Aumento 200x. Resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão, com $P < 0,05$ considerado significativo.

Figura A14. Análises globais não supervisionadas dos transientes de cálcio (CaT) intracelular nos cardiomiócitos no dia 30 da diferenciação não resulta no agrupamento completo dos diferentes grupos. No dia 20 da diferenciação os cardiomiócitos foram plaqueados em lamínulas de vidro previamente recobertas com a matriz Geltrex e cultivadas até o dia 30. No D30 as células foram marcadas com o indicador de cálcio Fura-2 AM e os transientes espontâneos de cálcio intracelular foram medidos. A) Análise não supervisionada de t-SNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) em 2D e 3D foi utilizada para agrupar amostras que apresentassem parâmetros dos transientes de cálcio parecidos. (B) *Heatmap* dos parâmetros de CaT para cada grupo experimental. N amostral= 18-39.

Figura A15. Imagens ilustrativas da coleta dos rins e corações que receberam as células controle e IRX3 KO injetadas no dia 4 da diferenciação. Os animais foram eutanasiados 2 meses após a injeção das células e as amostras de rim e coração foram coletadas e fixadas para análise histológica e de imunofluorescência por microscopia confocal. (A) Rim exposto do animal que recebeu a injeção de células IRX3 KO no dia 4 da diferenciação. Observamos uma massa transparente (indicada pelo asterisco *) envolta dos rins de 3 dos 4 animais que receberam as células IRX3 KO, o mesmo não foi observado no grupo controle. (B) Coração exposto do animal que recebeu as células IRX3 KO. É possível observar uma coloração levemente esbranquiçada na área onde as células foram injetadas, indicada pela seta branca.

Figura A16. Análise por microscopia dos corações que foram injetados com as células controle e IRX3 KO no dia 4 da diferenciação. (A-B) Imunofluorescência avaliada por microscopia confocal de coração injetado com as células IRX3 KO. Os núcleos foram marcados com DAPI e a troponina I cardíaca foi marcada em vermelho. Identificamos uma massa de células próxima a região em que as células foram injetadas, porém ainda não conseguimos concluir se estas células de fato seriam as células injetadas. Aumento de 100x (C-D) Marcação por picrosirius para avaliar possível formação de escara e aumento de colágeno. Não identificamos nenhuma intensificação para a marcação de colágeno na área próxima à massa celular identificada. Aumento de 100x em C e 200x em D.