Diogo Gonçalves Biagi dos Santos

Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para
compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com
cardiomiopatias de base genética

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

Programa Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: José Eduardo Krieger

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Diogo Gonçalves Biagi dos

Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para compreensão de
alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base genética
/ Diogo Gonçalves Biagi dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), que financiou minha vida de ensino superior nos últimos oito anos, incluindo o período desta tese de doutorado. Junto à FAPESP, gostaria de agradecer ao CNPq por financiarem os projetos dos quais a verba para realização deste projeto foram retirados.

Ao Dr. Alexandre Pereira, por desde a minha iniciação científica ter acreditado em mim para realizar os projetos. Pela confiança para me dar a liberdade de conduzir as pesquisas da maneira que eu julgava ser a melhor e sempre me direcionando quando algum obstáculo aparecia pelo caminho. Certamente um exemplo de como saber lidar com várias coisas ao mesmo tempo e uma amizade que levarei para o resto da vida.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela confiança depositada em mim e no Alexandre para realizar a pesquisa desta tese. Pela ajuda ofertada quando necessário e pelo ensinamento para enxergar a pesquisa de diferentes pontos de vista.

Aos amigos de laboratórios que tornaram a convivência no mesmo a melhor possível e pela ajuda técnica/científica/administrativa prestada sempre que necessário e com especial carinho para Rafael Dariolli, Graça Rosas, Samantha Teixeira, André Vaquero, André Martelini, Vinícius Bassanezi, Gabriela Venturini, Théo Gremen, Júlia Marsiglia, Clara Steichen, Noely Ferreira, Akauã Murari, Marina Rossi, Mirian Alaniz, Mariliza Velho, Maria Junqueira e Silvana Campos.

Ao Marcos Costa Valadares, pela ajuda técnica essencial para realização da tese, pela amizade e confiança em acreditar em mim na nova jornada que se inicia e pelas excelentes discussões sobre a vida.

Ao Vaquero e KK pela grande amizade e por alegrarem meus almoços. Por me fazerem pensar na vida e interpretá-la de maneira diferente. Por me tornarem uma pessoa melhor e mais sociável. Certamente serão amizades que perdurarão pelo resto da vida!

Aos meus pais Izilda Capela e Fernando dos Santos, pois, resumidamente, sem eles nada disso teria acontecido. Junto com meus irmãos Felipe Biagi e Tiago Biagi, por me darem bons exemplos do que é uma família que se ama e por tornarem minha vida muito mais feliz!!!!

À minha nova família Leite, Renato, Brenda, Daniel, Sérgio, Juliana e Selma, por me receberem com muito carinho e contribuírem para crescimento pessoal e felicidade!

Ao meu grande amor, Débora Leite, à qual eu não sei colocar em palavras tudo o que representa na minha vida. Pela convivência amorosa e muito divertida, pelo respeito, por entender e aceitar a necessidade de eu ter que trabalhar aos finais de semana (e às vezes ficar no laboratório comigo!), por me fazer pensar diferente, por ter o pé no chão, por me ajudar a amenizar/corrigir pequenos erros de personalidade de convívio social. Por ser a pessoal com a qual eu quero passar o resto da minha vida com a certeza de que serei feliz!

“... o impossível é só questão de opinião...”

Alexandre Magno Abrão

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

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Diferenciação de CTP induzidas em cardiomiócitos	4
1.2	Uso de CTP para modelagem de doenças cardíacas.....	7
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivos específicos.....	16
3	Materiais e Métodos	17
3.1	Declaração de ética	17
3.2	Seleção do Paciente	18
3.3	Reprogramação celular	20
3.4	Extração de DNA e RNA.....	26
3.5	Imunofluorescência.....	29
3.6	Formação de corpos embrióides.....	30
3.7	Cariótipo.....	31
3.8	Diferenciação de CTP induzidas em cardiomiócitos	32
3.9	Citometria de Fluxo	33
3.10	Análise de contratilidade	33
3.11	Microscopia eletrônica de transmissão	34
3.12	Hipertrofia Cardíaca	35
4	Resultados	36
4.1	Reprogramação de fibroblastos em CTP induzidas.....	36
4.2	Diferenciação das CTP induzidas em Cardiomiócitos.....	43
4.3	Avaliação dos fenótipos da CH no modelo celular desenvolvido	64
5	DISCUSSÃO	69
5.1	Geração de CTP induzidas	69
5.2	Diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos	73
6	Conclusões	800
7	Bibliografia	811

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de geração de células diferenciadas a partir de qualquer indivíduo através da geração de CT pluripotentes induzidas.....	3
Figura 2 - Etapas de desenvolvimento de uma célula pluripotente a um cardiomiócito maduro.....	6
Figura 3 - Modelo do projeto proposto para modelagem da doença <i>in vitro</i>	17
Figura 4 - Sequenciamento de DNA.....	19
Figura 5 - Sequência do plasmídeo poliestrônico contendo os “fatores de Yamanaka”	21
Figura 6 – Processo de produção viral.....	22
Figura 7 - Esquema da reprogramação de fibroblastos em CTP induzidas.....	24
Figura 8 - Caracterização morfológica das colônias e células pluripotentes.....	38
Figura 9 - Caracterização molecular das linhagens de CTP induzidas.....	39
Figura 10 - Expressão de marcadores proteicos de pluripotência das CTP induzidas.....	40
Figura 11 – Potencial de diferenciação nas três linhagens germinativas.....	42
Figura 12 – Cariótipo através de bandeamento GTG das linhagens celulares.....	43
Figura 13 - Protocolos de diferenciação.....	45
Figura 14 - Citometria para eficiência de diferenciação medida pela marcação da proteína Troponina T.....	46
Figura 15 - Esquema demonstrativo dos testes de DMSO realizados.....	48
Figura 16 - Protocolo de diferenciação padrão inicial e variações do momento de iniciação e tempo de duração da inibição da via da WNT.....	49
Figura 17 - Protocolo de diferenciação padrão inicial e variações do momento de inserção e tempo de tratamento de BMP4.....	50
Figura 18 - CTP induzidas no dia 0 de diferenciação.....	51

Figura 19 - Protocolos de diferenciação utilizando meio RB+ e CDM3.....	54
Figura 20 - Eficiência de diferenciação de diferentes linhagens celulares.....	55
Figura 21 - Histograma de citometria de fluxo para Troponina T cardíaca.....	57
Figura 22 - PCR de marcadores moleculares de diferentes tipos celulares.....	59
Figura 23 - Imunofluorescência Confocal de cardiomiócitos no dia 35 de diferenciação.....	61
Figura 24 - Potencial Inotrópico do estímulo com isoproterenol.....	63
Figura 25 - Pannel de expressão de genes cardíacos.....	65
Figura 26 - Comparação da expressão do marcador de hipertrofia cardíaca.....	66
Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de trabalhos publicados na modelagem de doenças cardíacas até janeiro, 2015.....	8
Tabela 2 - Alterações encontradas por SNG em painel de genes relacionados com CH no paciente e seu irmão (#1464) e a predição <i>in silico</i> da alteração na proteína.....	19
Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas no presente projeto.....	25
Tabela 4 - Lista de <i>primers</i> utilizados no projeto e suas condições de reação.....	27
Tabela 5 - Lista de anticorpos utilizados no projeto e suas condições de reação.....	30
Tabela 6 - Lista de modificações ao protocolo que foram testadas.....	47
Tabela 7 - Respostas dos diferentes clones ao estímulo com isoproterenol.....	63

LISTA DE ABREVIações

- BMP4* - gene, do inglês *bone morphogenetic protein 4*
- BSA - do inglês *bovine serum albumin*
- CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
- CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CDM3 - Meio de cultura composto de RPMI, albumina e vitamina-C
- CH - Cardiomiopatia Hipertrófica
- c-MYC - gene, do inglês *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
- CTP - Células-tronco pluripotentes
- D10S - Meio DMEM suplementado com 10% SFB
- D20F2A - Meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 2% de antibióticos
- DMEM - do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- E6 - Meio de cultura *Essencial 6*
- E8 - Meio de cultura *Essencial 8*
- EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ET-1 - Endotelina 1
- FGF2* - gene, do inglês *Fibroblast growth factor 2*
- FGF4* - gene, do inglês *Fibroblast growth factor 2*
- FM-USP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- GATA4* - gene, do inglês *GATA binding protein 4*
- GFP - do inglês *Green fluorescent protein*
- GSK3β - do inglês *Glycogen Synthase Kinase 3, Beta*
- iGSK3 - Inibidor da GSK3
- HAND1* - gene, do inglês *Heart and neural crest derivatives expressed 1*
- HBSS-- - Solução salina balanceada de Hank sem magnésio e cálcio
- HCN4* - gene, do inglês *Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*
- HGPM - Plasmídeo auxiliador para construção viral

ISL1 - gene, do inglês Islet 1

KLF4 - gene, do inglês *Kruppel-like factor 4*

KY - Composto químico KY21111

KX - Mistura dos compostos químicos KY2111 e XAV939

LaNCE - Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias

LRRC39 - gene, do inglês *Leucine rich repeat containing 39*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MLC2A - gene, do inglês *Myosin light chain 2A*

MLC2V - gene, do inglês *Myosin light chain 2A*

MYBPC3 - gene, do inglês *myosin binding protein C*

MYH6 - do inglês *Myosin heavy chain 6*

MYH7 - gene, do inglês *Myosin heavy chain 7*

MYOM1 - gene, do inglês *Myomesin 1*

NaB - Butirato de sódio

NFAT - gene, do inglês *Nuclear factor of activated T-cells*

NKX2.5 - gene, do inglês *NK2 homeobox 5*

NPPB - gene, do inglês *Natriuretic peptide B*

NTC - do inglês *no template control*

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

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - do inglês *polymerase chain reaction*

Phe - Fenilalanina

PLN - gene, do inglês *Phospholamban*

qRT-PCR - reação da cadeia de polymerase em tempo real

RB+ - Meio RPMI suplementado com B27

RB- - Meio RPMI suplementado com B27 sem insulina

REV - Plasmídeo empacotador de lentivirus

Ri - do inglês, *Rock Inhibitor*

RPM - rotações por minuto

RMPI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SCN4A - gene, do inglês *Sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit*

SFP - Soro fetal bovino

SNG - Sequenciamento de nova geração

SOX2 - gene, do inglês *Sex determining region Y- box 2*

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

STEMCCA - do inglês *Stem cell casset*

SYNE1 - gene, do inglês *spectrin repeat containing, nuclear envelope 1*

SYNE2 - gene, do inglês *spectrin repeat containing, nuclear envelope 2*

TAT - Plasmídeo transativador de transcrição

TNNT2 - gene, do inglês *cardiac troponin T2*

TNNI3 - gene, do inglês *Troponin I type 3*

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

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

TTN - gene, Titina

Tyr - Tirosina

VSV-g - proteína VSV-G de envelope viral

XAV - composto químico XAV939

WNT - do inglês *wingless-type MMTV integration site*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C - graus Célsius

cm² - centímetros quadrados

ng - nano grama

nM - nanomolar

µg - micrograma

µL - microlitro

mm - milímetro

µm - micrometro

nm - nanômetro

µM - micromolar

mM - milimolar

L - Litro

U - unidade

Δ - Delta

RESUMO

Santos DGB. Uso de células-tronco pluripotentes induzidas para compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base genética [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O estudo de mutações genéticas como causa das cardiomiopatias teve início com a descoberta de mutações em proteínas sarcoméricas que levavam à Cardiomiopatia Hipertrófica, desde então, alterações em diversos genes, de proteínas contráteis ou não, foram descobertas e listadas como a responsável pelo desenvolvimento de diferentes cardiomiopatias. Estudar o efeito destas mutações nos cardiomiócitos destes pacientes permanecia um desafio devido ao difícil acesso às células cardíacas. Em 2007, a técnica de reprogramação de células somáticas em células-tronco pluripotentes foi descoberta. Pelo fato das células-tronco pluripotentes serem capazes de ser diferenciadas em cardiomiócitos, surgiu-se a possibilidade de se estudar essas células de indivíduos portadores das mutações genéticas. Esta tese teve como objetivo a criação de um modelo celular para estudar a Cardiomiopatia Hipertrófica causada por mutações genéticas. Inicialmente foi estabelecido um protocolo de reprogramação celular para se estabelecer linhagens celulares das células-tronco induzidas de um paciente com mutação no gene *MYH7*. Tendo as células caracterizadas, elas foram diferenciadas em cardiomiócitos através de um protocolo adaptado de protocolos de diferenciação direta em cardiomiócitos. Os cardiomiócitos gerados apresentaram características moleculares e funcionais semelhantes à cardiomiócitos primários humanos e foi visualizado, através de microscopia eletrônica de transmissão, que os cardiomiócitos do paciente com alteração genética possuíam grande proporção de sarcômeros desorganizados em comparação a cardiomiócitos de indivíduos saudáveis. Em conclusão, o modelo celular desenvolvido sugere ser possível o estudo do efeito de mutações genéticas em Cardiomiopatia Hipertrófica.

Descritores: células-tronco pluripotentes induzidas; cardiomiopatia hipertrófica;
miócitos cardíacos; mutação; reprogramação nuclear

ABSTRACT

Santos DGB. Induced pluripotent stem cells to study cardiomyocytes derived from patients with genetic cardiomyopathies [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The study of genetic mutations as the cause of cardiomyopathies initiates with the discovery of mutations in sarcomeric proteins genes that lead to Hypertrophic Cardiomyopathy. Since then, mutations in several genes, coding to sarcomeric proteins or not, were discovered and listed as the reason to the cardiomyopathies. To study the effect of these mutations was a challenge due the difficulty to accesses cardiac cells. In 2007, the technique of reprogramming somatic cells into pluripotent stem cells was discovered. The fact that the pluripotent stem cells are capable of differentiating into cardiomyocytes opened the opportunity to study these cells from individuals with genetic mutations. This thesis aimed to create a cellular model to study Hypertrophic Cardiomyopathy caused by genetic mutations. Initially we established a cell reprogramming protocol to establish induced stem cells lines from a patient with mutation in *MYH7* gene. Having characterized the cells, they were differentiated into cardiomyocytes using an adapted protocol from direct differentiation protocols. Cardiomyocytes generated showed molecular and functional characteristics similar to human primary cardiomyocytes and were visualized by means of transmission electron microscopy. The patient's cardiomyocytes had a large proportion of disorganized sarcomeres compared to cardiomyocytes from healthy individuals. In conclusion, the cell model developed suggests that it is possible to study the effect of genetic mutation in Hypertrophic Cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes.

Descriptors: induced pluripotent stem cells; cardiomyopathy, hypertrophic; myocytes, cardiac; mutation; nuclear reprogramming.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de mutações genéticas como causa das cardiomiopatias teve início com a descoberta de mutações em proteínas sarcoméricas que levavam à Cardiomiopatia Hipertrófica (CH)¹, e pouco tempo depois à Cardiomiopatia Dilatada (CD)². Passados 25 anos após a primeira descoberta, e mesmo com ferramentas potentes capazes de se analisar o genoma inteiro, os estudos genéticos continuam demonstrando que a CH ocorre predominantemente por mutações em proteínas sarcoméricas e que a CD ocorre por razões mais diversas. Somado a isso, as mutações no sarcômero têm sido identificadas ocorrendo concomitantemente com outras desordens cardíacas, sejam estruturais ou de função. Isto inclui fenótipos que se sobrepõem com outras cardiomiopatias de fisiologias diferenciadas, como, por exemplo, não compactação do ventrículo esquerdo³. Mutações em CH usualmente aumentam a sensibilidade ao cálcio citoplasmático, levando a uma função sistólica exacerbada e disfunção diastólica⁴. Em contraste, mutações na CD usualmente diminuem a sensibilidade ao cálcio citoplasmático e/ou geração/transmissão de força no miofilamento, levando a disfunção sistólica⁴. Isto levanta uma importante questão de como diferentes alterações genéticas no mesmo gene podem levar a fenótipos tão distintos?

Determinar como as alterações genéticas levam às cardiomiopatias tem sido um dos maiores desafios atuais e a busca por modelos doença-específico (ou paciente-específico) se apresenta como uma das áreas de maior interesse em medicina⁵. Os modelos mais utilizados são os de animais geneticamente modificados e, apesar de fornecerem informações bastante valiosas, esses modelos não retratam por completo o problema no homem, principalmente o que ocorre na célula humana⁶. Os modelos em cultura de células surgem como um excelente complemento para as informações dos modelos animais. Entretanto, a obtenção de cardiomiócitos primários humanos por biópsia endomiocárdica é um procedimento invasivo

com riscos associados⁷. Outro fator impactante é o fato de que os cardiomiócitos primários humanos possuem de baixo a nenhum potencial de proliferação *in vitro*⁸, logo, limitando significativamente a quantidade de estudos que poderiam ser feitos.

Uma nova fonte de cardiomiócitos para o estudo de doenças cardíacas são as células-tronco pluripotentes (CTP). Hoje, a criação de um modelo celular para estudo de doenças cardíacas pode ser feito de duas maneiras: 1- através do uso de CTP embrionárias, onde a mutação causadora de uma doença específica pode ser inserida no genoma da célula através de técnicas de modificação de genoma⁹; ou 2- através do uso de CTP induzidas^{10, 11}, onde a mesma técnica do anterior poderia ser utilizada ou se utilizar células do próprio indivíduo que carrega a alteração. A geração de CTP induzidas foi descrita pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka em 2006¹² em camundongos e, posteriormente em 2007, o mesmo grupo, quase que concomitantemente com o grupo de James Thompson, desenvolveu as CTP induzidas humanas^{10, 11}. Nesta técnica, representada na Figura 1, através do uso de vírus que levarão a uma superexpressão de genes de pluripotência, células somáticas são reprogramadas (desdiferenciadas) a um estado pluripotente semelhante ao de CTP embrionárias. Posteriormente, estas células podem ser diferenciadas em diversos outros tipos celulares, como, por exemplo, células cardíacas.

Desde 2006, diversos métodos de geração de CTP induzidas foram desenvolvidos e revisões detalhadas sobre o tema podem ser encontradas na literatura¹³⁻¹⁵. Resumidamente, os métodos podem ser classificados em duas principais categorias: 1- Possuem integração de material exógeno no genoma hospedeiro. Nestes métodos são usados retrovírus ou lentivírus e os genes responsáveis pela reprogramação podem estar separados em diversos vírus¹⁴ ou num só¹⁶, neste caso ele é chamado de vírus poliestrônico. 2 - não possuem integração no genoma. Nestes métodos são utilizados vírus não integrativos (vírus Sendai é o mais comum)¹⁷

ou vetores episomais¹⁸, neste caso, são mais comuns os plasmídeos que agrupam os genes responsáveis pela reprogramação em combinações específicas.

Figura 1 - Esquema de geração de células diferenciadas a partir de qualquer indivíduo através da geração de CTP induzidas. Modificado de Murata e colaboradores, 2010¹⁹.

Os genes iniciais utilizados foram *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*¹², passando a ser conhecidos como “os fatores de Yamanaka”. Hoje, diversas combinações de genes em conjunto com microRNAs e outros compostos químicos são utilizados e apresentam diferentes taxas de eficiência que variam de acordo com o tipo celular inicial utilizado, que podem ser fibroblastos, queratinócitos, células mononucleares do sangue, células-tronco adultas, etc¹⁴.

Importante ressaltar que todas as tecnologias utilizadas levarão a uma superexpressão endógena dos genes de pluripotência, que consequentemente cessará o perfil de expressão da célula somática original. Estas células passarão então a apresentar características de CTP embrionárias, como o potencial (teoricamente) infinito de auto-renovação, expressão de fatores de transcrição específicos (como *OCT4*, *NANOG* e *SOX2*), presença de proteínas específicas (alto nível de expressão de Fosfatase Alcalina) e proteínas de membrana (SSEA3 e 4 e uma proteína proteoglicana reconhecida pelos anticorpos TRA-1-81 e TRA-1-60), além de seu

potencial de diferenciação nos três tipos de linhagens germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme)²⁰. Esta célula com potencial pluripotente bem definido pode ser utilizada para diferenciação em cardiomiócitos e modelagens de doenças cardíacas.

1.1 Diferenciação de CTP induzidas em cardiomiócitos

O processo de diferenciação de CTP em cardiomiócitos ocorre de maneira estágio e tempo-específica. Os protocolos desenvolvidos até o momento se basearam no complexo processo de cardiomiogenesis animal^{21,22} e nos próprios protocolos *in vitro* que foram sendo desenvolvidos²³. Toda essa informação se encontra muito bem resumida nos recentes trabalhos de Paige e colaboradores²⁴ e Meganathan e colaboradores²⁵.

De uma maneira geral, os protocolos de diferenciação podem ser agrupados em dois tipos de abordagem: 1- que utilizam uma pré-agregação das células pluripotentes para formação de estruturas esféricas chamadas de corpos embrióides^{26,27}. Essas estruturas tem o potencial de se diferenciar em células derivadas das três linhagens germinativas, entre elas cardiomiócitos. 2- diferenciação direta, onde as células pluripotentes são diretamente diferenciadas para cardiomiócitos^{26,27}.

Independente do método utilizado, os protocolos seguem a sequência de desenvolvimento embrionário descrito a seguir e exemplificada na Figura 2; basicamente trata-se de uma regulação temporal de superexpressão e consequente bloqueio da via da WNT. Inicialmente, as células pluripotentes passam por uma transição epitélio-mesenquimal através da ativação da via da WNT dando origem à chamada mesendoderme²⁸. Neste estágio, as células podem dar origem a tecidos endodérmicos ou mesodérmicos. A quantidade de ativação da WNT (através da inibição da GSK3 β) e o tempo de ação da mesma podem determinar qual destino as células seguirão^{29,30}. Alta ativação por pouco tempo (24-48 horas) leva à formação de endoderme, enquanto que baixa ativação por mais tempo (de 48-120

horas) leva à formação de endoderme. Nos protocolos já descritos, essa regulação fina é realizada pela remoção dos compostos que ativam a WNT ou pela adição de compostos que irão controlá-la de maneira diferente³¹.

Após a formação de mesoderme, o próximo estágio relaciona-se com a especificação cardíaca, através da formação de progenitores cardíacos. Esta etapa ocorre através da inativação da via da WNT, que pode ser realizada por diferentes compostos químicos. A inativação irá desfazer um complexo proteico que mantinha a β -Catenina no citoplasma permitindo que a mesma alcance o núcleo. Uma vez no núcleo, ela irá ativar a expressão de fatores de transcrição (como ISL1, NKX2.5) que levarão para a especificação cardíaca²³. A simples remoção dos inativadores da WNT após 48-96 horas é suficiente para as células progenitoras se diferenciarem em cardiomiócito imaturos (também chamados de fetais) entre o sétimo e o décimo quinto dias.

Com 15 dias, estas células já expressam várias das proteínas cardíacas mas algumas outras proteínas só aparecerão com o amadurecimento das células³²⁻³⁴. Diferentes modelos para amadurecimento dos cardiomiócitos vêm sendo descritos de maneira a antecipar o amadurecimento que ocorre normalmente com o tempo destas células em cultura^{32,33}. Na maturação com o tempo em cultura, com 30-40 dias os cardiomiócitos já apresentam a grande maioria de proteínas cardíacas sendo que com 90-180 dias já se pode observar um amadurecimento estrutural e eletrofisiológico completo^{35,36}. Faz-se importante ressaltar que a vasta maioria dos trabalhos de modelagem de doença cardíaca através de CTP induzidas é realizada entre 30-40 dias.

Figura 2 - Etapas de desenvolvimento de uma célula pluripotente a um cardiomiócito maduro. Adaptado de Mummery e colaboradores, 2012²⁶ e Burridge e colaboradores, 2012²⁷.

Os ensaios realizados para fenotipagem celular para demonstrar que os cardiomiócitos gerados recapitulam características semelhantes às de cardiomiócitos maduros são extensos e complexos e vão desde a análise de expressão gênica a diversos ensaios funcionais^{23,26,27}. Estes mesmos ensaios são utilizados para estudar as diferentes doenças cardíacas e até mesmo as respostas a diferentes compostos (fármacos)^{23,26,27}. Os ensaios fenotípicos mais comuns presentes na literatura são: 1- avaliação de marcadores moleculares através de expressão gênica (RT-PCR); 2- avaliação de marcadores proteicos através da utilização de anticorpos contra proteínas contráteis. Este ensaio também permite a avaliação da organização sarcomérica, além da verificação de hipertrofia celular através da medição da área celular; 3- avaliação da ultraestrutura celular através de microscopia eletrônica.

Ensaio funcionais indicam uma resposta celular mais complexa, normalmente são realizadas: 1- avaliação de resposta a estimuladores β -adrenérgicos³⁷; 2- avaliação de transiente de cálcio através de corantes fluorimétricos específicos³⁸⁻⁴¹ 3- avaliação eletrofisiológica, que se inicia com a verificação do potencial de ação e pode chegar à análise de correntes iônicas específicas⁴². A geração do potencial de ação necessário para a

propagação do sinal elétrico pelo miocárdio e disparo da liberação do cálcio intracelular garante a contração mecânica celular. As curvas de potencial de ação podem informar a maturidade dos cardiomiócitos (cardiomiócitos maduros e fetais exibem diferentes padrões³³, além de mostrar os tipos de cardiomiócitos presentes naquela população analisada⁴³ (ventriculares, atriais e nodais). A análise de corrente iônica fica mais restrita aos casos que estudam doenças cardiovasculares arrítmicas⁴⁴.

De maneira geral, apesar do aumento dos protocolos que utilizam condições e fatores definidos, ainda há certa variabilidade de eficiência de diferenciação entre diferentes linhagens (*comunicação pessoal com três diferentes laboratórios*). Acredita-se que quanto mais definido, melhor a eficiência de diferenciação^{31,45} e tem sido proposto que as diferenças que ainda persistem podem ser devido ao fato de que cada linhagem celular produz sua própria quantidade (variável) de fatores de crescimento tornando sua sensibilidade a outros fatores de crescimento ou fatores inibitórios (compostos químicos), usados nos protocolos de diferenciação, diferentes para cada linhagem⁴⁶.

1.2 Uso de CTP para modelagem de doenças cardíacas.

Após o desenvolvimento das CTP induzidas, diversas doenças cardíacas foram estudadas no nível celular com intuito de entender características celulares que recapitulassem as doenças e, assim, determinar a tecnologia como uma importante ferramenta para modelagem de doenças. A Tabela 1 lista todas as doenças cardíacas primárias ou síndromes com efeito cardíaco secundário já estudadas até o momento (Janeiro de 2015). Esses estudos analisaram fenótipos complexos de doenças cardiovasculares como: 1- Cardiomiopatias (Hipertrófica e Dilatada); 2- Canalopatias (grupo que reúne doenças devidas a mutações em proteínas de canais, como: Síndrome de QT longo e arritmia ventricular catecolaminérgica); 3- Mitocondriais (mutações em genes de proteínas mitocondriais); 4- Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito e 5- Outras síndromes com problema

cardíaco secundário. Destes 45 trabalhos publicados nos últimos cinco anos, destacam-se as Canalopatias com 57% dos trabalhos publicados (26 no total).

Tabela 1 - Lista de trabalhos publicados na modelagem de doenças cardíacas até janeiro, 2015.

Trabalho	Autores e ano
CARDIOMIOPATIAS	
Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy	Sun e colaboradores, 2012 ⁴⁷
Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific iPS Cells	Lan e colaboradores, 2013 ³⁸
Patient-specific iPS cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of DCM due to a novel DES mutation	Tse e colaboradores, 2013 ⁴⁸
Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells	Han e colaboradores, 2014 ⁴⁹
ET-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-iPS cell-derived cardiomyocytes	Tanaka e colaboradores, 2014 ⁵⁰
CANALOPATIAS	
Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome	Moretti e colaboradores, 2010 ⁵¹
Cardiomyocytes obtained from iPS cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro	Malan e colaboradores, 2011 ⁵²
Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics	Terrenoire e colaboradores, 2011 ⁵³
Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome	Pasca e colaboradores, 2011 ⁵⁴
Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome	Yazawa e colaboradores, 2011 ⁵⁵
Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells	Itzhaki e colaboradores, 2011 ⁵⁶
Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture	Lahti e colaboradores, 2011 ⁵⁷
Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human iPS cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation	Matsa e colaboradores, 2011 ⁵⁸
Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease	Davis e colaboradores, 2012 ⁵⁹
Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells	Egashira e colaboradores, 2012 ⁶⁰
Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific iPS cells	Ma e colaboradores, 2013 ⁶¹
Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome	Bellin e colaboradores, 2013 ⁶²
Modeling Timothy syndrome with iPS cells	Yazawa e colaboradores, 2013 ⁶³
The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom	Okata e colaboradores, 2013 ⁶⁴

Continua

Tabela 1 - Lista de trabalhos publicados na modelagem de doenças cardíacas até janeiro, 2015. Continuação.

Trabalho	Autores e ano
Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia	Spencer e colaboradores, 2014 ⁴¹
Re-trafficking of hERG reverses long QT syndrome 2 phenotype in human iPS-derived cardiomyocytes	Mehta e colaboradores, 2014 ⁶⁵
Three-dimensional filamentous human diseased cardiac tissue model	Ma e colaboradores, 2014 ⁶⁶
Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype	Cerrone e colaboradores, 2014 ⁶⁷
Allele-specific RNA interference rescues the long-QT syndrome phenotype in human-induced pluripotency stem cell cardiomyocytes	Matsa e colaboradores, 2014 ⁶⁸
ARRITIMIA VENTRICULAR CATECOLAMINERGICA	
In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells	Fatima e colaboradores, 2011 ⁶⁹
Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells	Itzhaki e colaboradores, 2011 ⁷⁰
Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific ES model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	Jung e colaboradores, 2012 ⁷¹
Cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia reveals early and delayed after depolarizations	Kujala e colaboradores, 2012 ⁷²
Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation	Novak e colaboradores, 2012 ⁷³
Ca ²⁺ signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects.	Zhang e colaboradores, 2013 ⁷⁴
CaMKII inhibition rectifies arrhythmic phenotype in a patient-specific model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	Pasquale e colaboradores, 2013 ⁷⁵
PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS	
Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patient	Liu e colaboradores, 2011 ⁷⁶
Neurons and cardiomyocytes derived from iPS cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia	Hick e colaboradores, 2013 ⁷⁷
Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells.	Lee e colaboradores, 2014 ⁷⁸
Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an iPS cell model of Barth syndrome	Dudek e colaboradores 2013 ⁷⁹
Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency	Yasuno e colaboradores, 2014 ⁸⁰
CARDIOMIOPATIA ARRITMOGÊNICA DO VENTRÍCULO DIREITO	
Generation of patient-specific iPS cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	Ma e colaboradores, 2013 ⁸¹
Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells	Caspi e colaboradores, 2013 ⁸²

Continua

Tabela 1 - Lista de trabalhos publicados na modelagem de doenças cardíacas até janeiro, 2015. Conclusão.

Trabalho	Autores e ano
Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs	Kim e colaboradores, 2013 ⁸³
Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy	Asimaki e colaboradores, 2014 ⁸⁴
OUTRAS SÍNDROMES ASSOCIADAS COM CARDIOMIOPATIA	
Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome	Carvajal e colaboradores, 2010 ⁸⁵
Human Pompe disease-iPS cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification	Huang e colaboradores, 2011 ⁸⁶
Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C	Ho e colaboradores, 2011 ⁸⁷
Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells	Siu e colaboradores, 2012 ⁸⁸
Pompe Disease Results in a Golgi-based Glycosylation Deficit in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes	Raval e colaboradores, 2015 ⁸⁹

Dentre as cardiomiopatias primárias, há apenas dois trabalhos descritos para a CD^{47,48} e três para a CH^{38,49,50}. Para melhor compreender como esses trabalhos podem ajudar na criação de um modelo de doenças para CH, uma análise mais profunda está apresentada a seguir.

1.2.1 A Cardiomiopatia Hipertrófica

A CH é uma doença monogenética relativamente comum e está associada com o aumento da parede do ventrículo esquerdo e do septo intraventricular, os indivíduos também apresentam fibrose no miocárdio e desorganização das miofibras⁹⁰. Estes fatores fazem com que seja comum ocorrer arritmias cardíacas e morte súbita⁹⁰. A CH é conhecida como a cardiomiopatia hereditária com a maior prevalência já encontrada, 1:500⁹¹. Nos últimos 25 anos, desde a primeira descoberta de uma mutação genética associada com a doença, no gene sarcomérico codificante para a miosina de cabeça pesada MYH7¹, diversos trabalhos de

rastreamento genético foram realizados. Mais de 1400 mutações foram descritas como associadas à CH⁹², sendo que 50% a 60% dos casos descritos eram de CH familiar e o restante aparentemente de casos esporádicos⁹³.

Após a primeira descrição de mutação associada com a doença em 1990, diversos trabalhos foram conduzidos e alterações em outros genes codificantes para proteínas contráteis e do disco-Z foram encontradas³¹, fazendo com que a doença fosse chamada de “doença do sarcômero”. Hoje, já estão descritas mutações em diferentes genes, sejam em proteínas sarcoméricas, do disco Z e dos moduladores de cálcio intracelular⁹⁴. As mutações nos genes sarcoméricos são, na maioria, substituições únicas de nucleotídeos onde a proteína mutante exerce um efeito negativo no sarcômero. A única exceção até o momento é o gene da proteína C de ligação da miosina (*MYBPC3*), onde grande parte das mutações são deleções ou inserções que levam a uma mudança na sequência de tradução gerando uma proteína truncada ou sem função. Nestes casos, acredita-se que a doença seja causada por haploinsuficiência⁹⁴. Para os outros genes (disco Z e moduladores de cálcio), a maioria das mutações são trocas únicas de nucleotídeos que levam a dominância negativa ou haploinsuficiência e estudos mais específicos precisam ser realizados⁹⁴.

Nos pacientes com alteração patogênica ou possivelmente patogênica, as frequências de mutações ocorrem em diferentes proporções entre os genes. Os genes cadeia pesada da miosina e da proteína C de ligação da miosina são responsáveis por aproximadamente 25% e 45% dos casos, respectivamente. Os outros genes variam entre frequências de 5% a 1% dos casos⁹⁵.

Dada a complexidade das bases genéticas da CH, um dos maiores desafios para o diagnóstico molecular reside na confirmação da patogenicidade da alteração genética. Neste ponto, os modelos animais tiveram grande contribuição nas últimas duas décadas, entretanto

a criação de modelos celulares humanos pode complementar, ou até mesmo substituir os modelos animais na verificação do efeito da mutação genética. Como demonstrado anteriormente, a possibilidade de geração de cardiomiócitos humanos de qualquer indivíduo a partir de CTP induzidas surge como uma nova ferramenta para elucidação desta questão.

1.2.2 Uso de CTP induzidas para modelagem de CH

Como mostrado anteriormente na Tabela 1, estão descritos três trabalhos que estudaram a CH através de cardiomiócitos de pacientes com mutações genéticas. Dois trabalhos estudaram mutações no gene *MHY7*^{38,49} e um no gene *MYBPC3*⁵⁰, ambos codificantes de proteínas sarcoméricas.

No trabalho de Tanaka e colaboradores⁵⁰ foram avaliados três pacientes com CH, dois destes pacientes não tinham mutações nos principais genes relacionados com CH (62 e 75 anos) e um tinha uma mutação no gene *MYBPC3* (Gly999-Gln1004del) (45 anos). Nas análises realizadas e descritas abaixo, não houve diferenças entre o paciente com mutação conhecida e os sem mutação. Este trabalho utilizou indivíduos saudáveis sem parentesco com os pacientes como controles. Tecnicamente, as CTP induzidas foram geradas de duas maneiras diferentes 1- a partir de fibroblastos, com integração viral, através de retrovírus e 2- a partir de células mononucleares de sangue, sem integração viral, através de Sendai vírus. O método de geração de cardiomiócitos utilizado foi através da formação de corpos embrióides e posterior dissociação e plaqueamento. Neste trabalho os autores relatam pequena diferença entre CH x controle nas condições basais, entretanto, os cardiomiócitos derivados de pacientes com CH (cardiomiócitos-HC) apresentavam tamanho significativamente maior que os controles. Com relação à ultraestrutura, os cardiomiócitos-CH apresentavam sarcômeros normais, mas

também apresentavam sarcômeros desarranjados, enquanto que os sarcômeros dos controles eram todos normais.

No intuito de acentuar os sinais da hipertrofia, os autores utilizaram Endotelina-1 (ET-1), um conhecido fator hipertrófico. Após estímulo com ET-1, a área celular aumentou em ambos (controle e CH), sendo significativamente maior nos cardiomiócitos-HC. Este estímulo levou a um aumento da porcentagem de sarcômeros desarranjados apenas nos cardiomiócitos-HC. Além disso, observou-se maior translocação do NFAT (fator de transcrição conhecido com papel crucial na patogênese da CH⁹⁶) para o núcleo nos cardiomiócitos-CH. De maneira complementar, observou-se que a utilização de um bloqueador de ET-1 impedia que as diferenças observadas previamente acontecessem. Por fim, os autores indicam os cardiomiócitos derivados de pacientes com CH um excelente modelo para se estudar a interação base genética e ambiente envolvidos no desenvolvimento da doença. Além de fornecer um mecanismo preciso para entender a doença de acordo com cada mutação.

No trabalho de Han e colaboradores⁴⁹, foi avaliado um paciente com mutação no gene *MYH7* (R442G). Através de sequenciamento do exoma das células das CTP induzidas geradas foi visto que esta era a única alteração presente em genes previamente relacionados com a doença. Além disso, essa alteração já havia sido descrita num caso familiar de CH. Este trabalho utilizou dois indivíduos saudáveis sem parentesco com os pacientes como controles. Tecnicamente, fibroblastos da paciente de 37 anos foram reprogramados, com inserção viral, através de retrovírus. O método de geração de cardiomiócitos utilizado foi através da formação de corpos embrióides e posterior dissociação e plaqueamento.

No trabalho, os autores reportaram várias características relacionadas à CH que os indivíduos controle não possuíam. Inicialmente, demonstrou-se que os cardiomiócitos-CH apresentam níveis de expressão para os genes *NFAT* e *FGF2* e 4 elevados nos cardiomiócitos-

CH. Esta alta expressão já foi previamente relacionada com a CH^{96 97}. O aumento de expressão do NFAT também foi acompanhado por uma maior translocação do NFAT para o núcleo nos cardiomiócitos-CH. As células da paciente também demonstraram maior tamanho que as do controle.

O desarranjo dos sarcômeros foi demonstrado por microscopia confocal e ultra-estrutura por microscopia eletrônica de transmissão, em ambos foram observados sarcômeros desarranjados nos cardiomiócitos-CH. Estes cardiomiócitos também apresentavam alterações eletrofisiológicas tanto na análise em células isoladas quando em agrupamento de células em monocamada. Estas alterações foram acompanhadas por diversas modificações no controle do cálcio, fato este analisado pelo tráfico do cálcio de canais iônicos e do retículo endoplasmático, de maneira consistente com o que já foi previamente demonstrado em células animais e humanas⁹⁸. Com isso, os autores sugerem que a desregulação no controle do cálcio intracelular pode representar um papel essencial no desenvolvimento da CH.

No trabalho de Lan e colaboradores³⁸, foram avaliados cinco indivíduos de uma família com mutação no gene *MYH7* (A663H). Através de sequenciamento de 18 genes relacionados com CH foi visto que esta era a única alteração que segregava junto com a doença nesta família. Este trabalho utilizou cinco familiares saudáveis como controle (pai e irmãos). Tecnicamente, fibroblastos do pacientes foram reprogramados, com inserção viral, através de lentivírus. O método de geração de cardiomiócitos utilizado foi através da formação de corpos embrióides e posterior dissociação e plaqueamento.

Os autores demonstraram que os cardiomiócitos-CH apresentavam aumento do tamanho celular, maior proporção de células binucleadas, translocação nuclear do NFAT e desorganização sarcoméricas, com já descrito na literatura⁹⁹. Após ensaios com inibição da via calcineurina-NFAT, os autores descrevem essa via como papel principal no desenvolvimento da

CH por, após sua inibição, ser observado diminuição no tamanho das células e expressão dos fatores de transcrição responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

Verificando características eletrofisiológicas e de regulação de cálcio, os autores observaram características de CH nos cardiomiócitos dos pacientes com mutação. De maneira interessante, após um estímulo inotrópico (isoproterenol) percebeu-se que os fenótipos hipertróficos eram antecipados para um menor tempo das células em cultura. Por fim, após tratamento da disfunção da regulação do cálcio, concluíram que o controle do cálcio intracelular é o principal iniciador do desenvolvimento da CH nestas células.

Em resumo, os trabalhos realizados mostram que estes modelos celulares, mesmo sendo compostos principalmente por células com características imaturas, recapitulam diversos aspectos da doença, seja no seu desenvolvimento ou até mesmo em fenótipos mais tardios. Desta maneira, os cardiomiócitos derivados de CTP de indivíduos com mutações genéticas em genes relacionados com Cardiomiopatia Hipertrófica se apresentam como uma excelente ferramenta para estudar como estas alterações genéticas levam aos fenótipos das doenças.

2 OBJETIVO

Estabelecer uma metodologia para determinação de um modelo celular para Cardiomiopatia Hipertrófica.

2.1 Objetivos específicos

A - Reprogramar células adultas humanas de pacientes com alterações genéticas e indivíduos controle em CTP induzidas

B - Diferenciar as CTP induzidas em cardiomiócitos e realizar caracterização fenotípica comparando indivíduos com alteração genética x indivíduos saudáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para se atingir os objetivos propostos, fibroblastos de pele de um indivíduo com CH e indivíduos saudáveis foram reprogramadas para geração de CTP induzidas. O potencial de pluripotência destas células foi comprovado através de sua comparação com células tronco embrionárias. As CTP induzidas foram diferenciadas em cardiomiócitos e estes cardiomiócitos foram comparados com os cardiomiócitos de indivíduos saudáveis, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3 - Modelo do projeto proposto para modelagem da doença *in vitro*. Modificado de Murata e colaboradores, 2010¹⁹ CTPi abrevia célula-tronco pluripotente induzida; CTE abrevia célula-tronco pluripotente embrionária.

Abaixo seguem descritas as metodologias utilizadas.

3.1 Declaração de ética

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo 6646/10. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento Esclarecido. (Anexo 1)

3.2 Seleção do Paciente

Pacientes com Cardiomiopatia Hipertrófica foram selecionados após o diagnóstico de médicos especialistas seguindo o critério de possuir hipertrofia de uma das paredes do ventrículo esquerdo com espessura superior a 15 mm e com ausência de outra condição que pudesse levar a uma hipertrofia secundária foram convidados a participar do projeto “ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES PORTADORES DE CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA” sob a responsabilidade da doutoranda Julia Marsiglia Carneiro (CAPPesq: 0759/09). Dentre estes pacientes, foi convocado um paciente que possuía uma alteração genética no gene da cadeia pesada da miosina (*MYH7*). A alteração resultante da troca de uma Timina por uma Adenina na posição 2291 (c.2291T>A) (Figura 4 A) levou à troca do aminoácido Fenilalanina (Phe – F) pelo Tirosina (Tyr – Y) na posição 764 (F764Y ou p.Phe764Tyr). Esta troca foi predita como danosa à proteína por programas de predição de debilidade de função para alterações genéticas (PROVEAN, SIFT e Poluphen-2). Este paciente possui um irmão e uma filha não acometidos com a doença e ambos não apresentam a alteração (Figura 4 B).

Por fim, para se excluir outro fator genético como possível causa da doença, realizou-se o sequenciamento de um painel de 74 genes relacionados a diversas cardiomiopatias hereditárias por Sequenciamento de Nova Geração (SNG) (Ion Torrent - Life Technologies) de um painel de genes comumente descritos como associados à Cardiomiopatia Hipertrófica (análise integrante do trabalho de Oliveira TGM, 2015 - *paper em confecção*). Não foi encontrada nenhuma nova alteração que pudesse estar relacionada com o desenvolvimento da doença (Tabela 2).

Figura 4 - Sequenciamento de DNA. Em A, sequenciamento do paciente e seus familiares. Em B, sequenciamento dos clones de CTP induzidas utilizadas no projeto. Asterisco determina a base que apresenta alteração genética.

Tabela 2 - Alterações encontradas por SNG em painel de genes relacionados com CH no paciente e seu irmão (#1464) e a predição *in silico* da alteração na proteína.

Gene	Mutação	PROVEAN	SIFT	Polyphen-2	Observação	# 1464
<i>TTN</i>	NM_133378: c.64287C>G p.Phe21429Leu (Het)	Deleterious	Damaging	possibly Damaging	Não Descrita	Positivo (Het)
<i>SYNE1</i>	NM_182961: c.26044G>C p.Gly8682Arg (Het)	Deleterious	Tolerated	probably Damaging	rs201664645 Raro em todas as pops HapMap	Positivo (Het)
<i>SYNE1</i>	NM_182961: c.9841G>C p.Glu3281Gln (Het)	Neutral	Damaging	probably Damaging	Não Descrita	Negativo
<i>MYH7</i>	NM_000257: c.2291T>A p.Phe764Tyr (Het)	Deleterious	Damaging	probably Damaging	Descrita por Marsiglia e colaboradores, 2013 ¹⁰⁰	Negativo

Nota: Pops: populações; Het: heterozigoto

3.2.1 Biópsia

A biópsia foi realizada em uma sala limpa por um médico especialista. A área da pele para biópsia foi limpa com Polvidine e anestesiada subcutaneamente. Um *punch* de 3 mm foi utilizado para coletar o fragmento de pele. O fragmento foi separado em uma solução DMEM adicionado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5% de antibióticos (penicilina/estreptomicina - Life Technologies - #15140148). O fragmento foi mantido refrigerado (0-8°C) por, no máximo, duas horas.

No fluxo laminar, o fragmento foi lavado 4 vezes com PBS adicionado com 5% de antibióticos e cortado com um bisturi em pequenos pedaços, excluindo-se a parte com gordura da derme. Estes pequenos pedaços foram colocados sobre uma fina camada de SFB numa garrafa de cultura T25. A garrafa foi invertida com o topo virado para baixo e deixada na incubadora por 24 horas. Após esse período, a garrafa foi virada para sua posição normal e cuidadosamente foram adicionados 3 mL de DMEM suplementado com 20% de SFB e 2% de antibióticos (D20F2A). A garrafa com células foi deixada na incubadora por 7 dias sem troca de meio. Após esse período, fez-se troca de 3 mL de meio D20F2A a cada 3 dias. Os fibroblastos começam a aparecer após 7-10 dias em cultura. Após a garrafa atingir a confluência, as células foram tripsinizadas por 3 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células plaqueadas em uma placa de 100 mm com 10 mL de D20F2A, a troca do meio era realizada a cada 3 dias. Novamente, após atingir confluência, as células passaram por um novo processo de tripsinação, foram contadas e congeladas em meio 60% DMEM, 30% SFB e 10% DMSO.

3.3 Reprogramação celular

A reprogramação foi realizada utilizando-se um método integrativo através da utilização de um lentivírus poliestrônico que continha os chamados “fatores de Yamanaka”¹⁰

(Figura 5). Os componentes do lentivírus, além do plasmídeo com os fatores, foram cordialmente cedidos pelo Prof. Gustavo Mostoslavski da Universidade de Boston, EUA e produzidos em nosso laboratório.

Figura 5 - Sequência do plasmídeo policistrônico contendo os “fatores de Yamanaka”: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*⁸⁸.

3.3.1 Produção Viral

A produção viral foi realizada através da transfecção de células 293T, cedidas pelo Prof. Bryan Strauss, FM-USP, pelo método de coprecipitação de fosfato de cálcio, dos plasmídeos virais acessórios (VSV-G, TAT, REV e HGPM) junto ao plasmídeo de interesse (STEMCCA). O meio de cultura contendo os lentivírus foi coletado 24 e 48 horas após a transfecção, ultra-centrifugado a 23.000 rpm por 120 minutos e ressuspensos para um volume final de 200 µL. Alíquotas únicas de 10 µL foram armazenadas a -80°C. O processo de validação da produção do vírus e sua eficiência de transdução está demonstrado na Figura 6 A-F. O vírus produzido com GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*) apresentou eficiência de transdução de 71% (Figura 6 – D).

Figura 6 – Processo de produção viral. Em A, imagem em campo claro das células 293T transfectadas. Em B, representação em fluorescência de A. Em C, eficiência de transfecção medida por citometria. Em D, eficiência de transdução medida por citometria. Em E e F, fibroblastos transduzidos visualizados em campo claro e fluorescência, respectivamente.

Este mesmo processo de produção viral foi utilizado para produção do vírus com o plasmídeo STEMCCA. Este único lote de vírus criado foi utilizado na reprogramação das quatro linhagens utilizadas no projeto.

3.3.2 Reprogramação Viral

A reprogramação foi realizada com pequenas modificações sobre o protocolo original de Somers e colaboradores, 2010¹⁶, dentre as quais se destacam: 1- ausência do uso de

fibroblastos embrionários de camundongo como camada de sustentação (*feeder layer*), 2- uso de matrigel qualificada para cultura de CTP embrionárias (BD - #354277) e 3- uso de butirato de sódio (NaB) – (Cayman - #13121).

Um esquema da reprogramação viral está representado na Figura 7. Um criotubo com 10^5 fibroblastos foi descongelado e plaqueado em placas de 35 mm coberta com a matriz extracelular Matrigel. Dezesesseis horas após o plaqueamento, os fibroblastos foram transduzidos com aproximadamente 10^6 do lentivírus STEMCCA por 6 horas. Após o período, o meio foi trocado para DMEM suplementado com 10% SFB (D10S) (Life Technologies - #26140087) e permaneceu por 3 dias. Na sequência, as células foram soltas da placa com Tripsina 0,25% (Life Technologies - #25200056) e contadas. Foram plaqueadas 10^4 células sobre novas placas de 35 mm cobertas com Matrigel. As células restantes foram congeladas. As células foram plaqueadas com o meio D10S adicionado com 5 μ M Rock Inhibitor (Ri) (Sigma -#Y0503).

No dia seguinte, o meio foi trocado para meio E8 (Life Technologies - #A1517001) e trocado a cada dois dias até o dia 10. A partir do dia 11, o meio foi trocado diariamente com a adição de 0,25 μ M de NaB até os dias 20-25, quando as colônias estavam com o tamanho ideal para coleta. As colônias foram coletadas manualmente dentro do fluxo laminar usando o microscópio EVOS XL Image System (antes AMG e agora Life Technologies - #AME3300) como suporte. No mínimo 12 colônias foram selecionadas. Cada colônia foi plaqueada em um poço de uma placa multi-well de 12 poços com meio E8 suplementado com Ri.

Figura 7 - Esquema da reprogramação de fibroblastos em CTP induzidas. Os números abaixo dos quadrantes significam dias.

3.3.3 Manutenção celular

Após a coleta, as CTP induzidas eram mantidas com o meio de cultura E8 com troca diária de meio. As células eram repicadas entre 3-5 dias usando Versene (Life Technologies - # 15040-066) seguindo o manual do produto. Resumidamente, as células eram lavadas uma vez com Versene e depois ficavam no Versene por 5 minutos para remover o cálcio do meio e liberar as ligações celulares. O Versene era removido do poço de cultura e as células eram ressuspendidas em meio E8 de maneira a ficarem células isoladas. As células replaqueadas numa diluição de 1:6 a 1:10.

A cobertura das placas para adesão celular foram feitas inicialmente com Matrigel (BD Bioscience - #356234) e posteriormente com Geltrex (Life Technologies - #A1413302). Ambas matrizes são extraídas a partir de um tumor de murinos Engelbreth-Holm-Swarm. Esta matriz é rica em laminina (principal componente), colágeno tipo V e proteoglicanas. Não foi observada diferença na mudança de Matrigel para Geltrex.

As células foram sempre mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.3.4 Subclonagem

As CTP induzidas do paciente passaram pelo processo de subclonagem. Clones em passagem 5 foram dissociados com Versene por 10 minutos para garantir que todas as células ficassem isoladas (únicas). As células foram ressuspensas em E8 e pipetadas gentilmente e repetidamente para completa dissociação. Realizou-se uma diluição 1:1000 em E8 (6 µL em 6 mL) e foi adicionado 10 µM de Ri. 500 µL desta diluição foram plaqueados em 12 poços de uma placa de 24 poços coberta com Matrigel. Aproximadamente 10 dias após o plaqueamento, os poços onde as células isoladas aderiram já apresentavam uma colônia passível de ser repicada. As colônias selecionadas após esse processo foram chamadas de subclone.

3.3.5 Expansão celular

Os clones e subclones foram expandidos de acordo com o processo de manutenção. Os ensaios de caracterização foram realizados em diferentes momentos e estarão descritos abaixo. A diferenciação das células em cardiomiócitos foi realizada após a passagem 20.

A Tabela 3 resume as células que foram utilizadas no projeto. Além das células reprogramadas de indivíduos saudáveis (TAY6 e SS7) e dos dois subclones do paciente (1176-4.1 e 6.9), foi utilizada como controle das CTP induzidas a CTP embrionária BR-1, fornecida gentilmente pelo LANCE-SP representado pela Prof^a Lygia da Veiga Pereira.

Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas no presente projeto.

Indivíduo	Clone. Subclone	Tipo	Idade	Sexo
TAY	6	Induzida	24	XX
SS	7	Induzida	25	XX
1176	4.1 6.9	Induzida	31	XX
BR1	-	Embrionária	-	XX

3.4 Extração de DNA e RNA

As CTP induzidas foram cultivadas em poços de 35 mm até atingirem 70% de confluência, quando, normalmente há na placa 10^6 células. Neste dia, foram dissociadas com Versene e centrifugadas por 4 minutos a 200 *g*. Após remoção do sobrenadante, o pelete de células foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) e mantido a 4°C por, no máximo, uma semana para extração do DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada de maneira automatizada com o Kit QIAamp DNA mini kit e o instrumento QIAcube (Qiagen - #51304 e #9001292) de acordo com o manual do fabricante.

O RNA total dos fibroblastos, CTP induzidas e cardiomiócitos foram extraídos adicionando-se 1 mL do reagente TRIzol (Life Technologies - #15596026) ao poço de cultivo (placa de 24 poços à placa de 6 poços) e homogeneizando o líquido. Esta solução foi mantida a -20°C por, no máximo 2 semanas, para consequente extração com Clorofórmio/Isopropanol/Etanol de acordo com o manual do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima de transcrição reversa *SuperScript III* (Life Technologies - #18080093) de acordo com o manual do fabricante.

3.4.1 PCR

As verificações (*endpoint*) de presença de genes a partir do cDNAs foram realizadas através das reações em cadeia da polimerase (PCR - do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) utilizando o Kit GoTaq DNA polimerase (Promega - #M3001) de acordo com o manual do fabricante. Os *primers* se encontram na tabela 4.

Tabela 4 - Lista de *primers* utilizados no projeto.

Gene	Sequência senso	Sequência antisenso
Normalizador / Controle		
GAPDH	GAAGACGGGCGGAGAGAAAC	CGACCAAATCCGTTGACTCC
Pluripotência		
<i>POUF51</i>	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	CTCCCTCCAACCAAGTTGCCCAAAC
<i>SOX2</i>	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
<i>NANOG</i>	CAGCCCTGATTCTCCACCACTCCC	TGGAAGGTTCCCAAGTCGGGTTCAAC
<i>GDF3</i>	CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG	GTGCCAACCAGGTCCCGGAAGTT
<i>ESG/DPPA5</i>	ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC	ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC
<i>DPPA4</i>	GGAGCCGCTGCCCTGGAAAATTC	TTTTCTCTGATATTCTATCCCAT
<i>DPPA2</i>	CCGTCCCGCAATCTCTTCCATC	ATGATGCCAATAGGCTCCCGGTG
<i>hTERT</i>	CCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTG	GGAAAAGCTGGCCCTGGGGTGGAGC
<i>REX1/ZFP42</i>	AAAGCATCTCTCATTCATGGT	TGGGCTTTCAGGTTATTTGACT
Cardiomiócitos		
GATA4	TCCAAACCAGAAAACGGAAG	AAGACCAGGCTGTCCAAGA
HAND1	ACATCGCCTACCTGATGGAC	CGGCTCACTGGTTAACTCC
HCN4	GATCCTCAGCCTCTACGCC	CCCCAGGAGTTGTTACCAT
ISL1	GTTACCAGCCACCTTGAAA	TTCCCACTTTCTCCAACAGG
LRRC39	CTGGGTACTCTGTCTCAG	TCCCGTCTCTCTTCTCATC
MEF2C	AGCCCTGAGTCTGAGGACAA	GTGAGCCAGTGGAATAGGT
MESP1	CGTATATCGGCCACCTGTC	GGCATCCAGGTCTCCAACAG
MIXL1	AAGCGCACGTCTTCAGC	TGGAAGGATTCCCACTCTG
MSX1	CGAGAGGACCCGTGGATGCAGAG	GGCGGCCATCTCAGCTTCTCCAG
MYH6	ACGCAGAGTCGGTGAAGG	CTGCACCTTGCGGAACCT
MYH7	ACGAAGGGCTTGAATGAGGA	TTCTCCCAAGGAGCTGTTAC
MYL2	CGTTCGGGAAATGCTGAC	TTCTCCGTGGGTGATGATG
MYL7	GGAGTTCAAAGAAGCCTTCAGC	TCCTCTGGGACACTCACCTT
MYOM1	GAGTCTAGGCTGCTGTGTG	TCCCATCCGTACACGGATTG
NKX2.5	AAGGACCCTAGAGCCGAAA	GTTGTCCGCTCTGT
NPPA	CAGCCGAATGAAGAAGCGG	ATCGATCAGAGGAGTCCAG
NPPB	TTCAGCCTCGACTTGGA	CAGACCTTGACCATCTTG
PLN	ACAGCTGCCAAGGCTACCTA	GCTTTTGACGTGCTTGTGA
SCN4A	GAATGTGCTGCTGTCTGCC	GACCTCGGAGATGTCGAACC
T	CTTCCTGAGACCCAGTTCA	CAGGGTTGGGTACCTGTCAC
TNNI3	CTGCAGATTGCAAGCAAGA	CCTCTTCTTCACTGCTTG
TNNT2	TTCACCAAAGATCTGCTCTCGCT	TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGGG
WNT3A	GCCCCACTCGGATACTTC	GGCATGATCTCCACGTAGT

3.4.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

A reação de qRT-PCR foi realizada com auxílio do aparelho ABI Prism[®] 7500 *Fast Sequence Detection System* (Life Technologies). Os *primers* utilizados estão listados na tabela 4. O gene do *GAPDH* foi utilizado como normalizador. As reações, tanto para o normalizador como para os genes de interesse, foram realizadas em placas ópticas de 96 amostras (Life Technologies - #4346907).

O protocolo experimental consistiu de reações contendo 1 µL de cDNA *template* (2,5 ng/µL), 0,16 µL de cada *primer* senso e antisenso específicos para cada gene em estudo (200 nM final), 5 µL do 2X *SYBR Green PCR Master Mix* e 3,84 µL de água DEPC, totalizando um volume final de 10 µL. O 2X *SYBR Green PCR Master Mix* contém a *AmpliTaQ DNA Polymerase*, o *SYBR Green Buffer*, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *SYBR Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX. A amplificação consistiu em: 95 °C por 10 minutos para a ativação da *AmpliTaQ DNA Polymerase*, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (associação do primer e extensão). A coleta do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo.

O *software* quantifica a intensidade da fluorescência dada pelo SYBR e normaliza pelos dados de fluorescência obtidos pelo ROX. Este procedimento serve para corrigir possíveis erros de quantificação, resultantes da alteração nos volumes de reação que possam ocorrer ao longo do tempo.

Para excluir a possibilidade de contaminação, foi realizado um controle negativo para cada gene que consistiu em uma reação com ausência de cDNA (NTC, do inglês *No Template Control*). As amostras controle e experimental para um mesmo gene, incluindo seu respectivo controle negativo, foram realizadas a partir de uma mesma mistura de reagentes e na mesma placa óptica. Todas as reações foram processadas em duplicata.

A reação de amplificação do qRT-PCR é dividida basicamente em três fases: a fase geométrica, caracterizada por apresentar alta precisão na duplicação do número de moléculas, devido à presença de grande quantidade de reagentes (nucleotídeos, primers, enzima, $MgCl_2$, etc.), possibilitando a replicação de todas as moléculas de cDNA; a fase linear, onde a taxa de produção de novas cadeias de DNA via PCR passa gradualmente de uma progressão geométrica para uma progressão linear, devido à crescente escassez de um ou mais reagentes, geralmente *primers*; e, por fim, a fase de platô onde a eficiência de amplificação cai drasticamente para níveis insignificantes, com baixa ou nenhuma produção de novas cadeias de DNA. É geralmente nesta fase que o PCR convencional é interrompido para ser visualizado em gel de agarose.

Os valores médios de Ct para cada gene de interesse foram subtraídos pelos respectivos valores médios de Ct obtidos para o gene. Esse valor normalizado corresponde ao ΔCt . A diferença de expressão gênica dos diferentes genes nas diferentes amostras foi analisada comparando-se as médias de ΔCt . Foram realizadas comparações das duas médias de ΔCt através de teste t de Student para dados não pareados e em todos os casos foi adotado um nível de significância de 5 % ($p < 0.05$). Os dados foram apresentados em expressão relativa, de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representando quantas vezes cada gene está mais ou menos expresso em relação à amostra controle¹⁰¹.

3.5 Imunofluorescência

A Imunofluorescência das CTP induzidas foi realizada em poços de placa de 24 poços devido à dificuldade destas células se manterem aderidas às lâminas de vidro durante o protocolo. As células foram plaqueadas sobre poços com matrigel e o protocolo se iniciou após dois dias. As células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído por 20 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, as células foram bloqueadas com PBS 1% BSA por 1 hora à temperatura ambiente, quando a marcação de proteínas nucleares foi

necessária, foi adicionado 0,1% de NP-40 à solução para dissociação da membrana. A solução de bloqueio foi substituída por PBS 1% BSA contendo os anticorpos primários diluídos (Tabela 5) por 2 horas a temperatura ambiente ou 16 horas a 4°C. Após incubação com os primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubada com os respectivos anticorpos secundários diluídos (Tabela 5) em PBS 1% BSA por uma hora à temperatura ambiente e protegido da luz. Faltando 10 minutos, foi adicional o DAPI para marcar o DNA. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e analisadas no microscópio invertido Axiovert 200M (Carl Zeiss). As imagens foram analisadas e tratadas no software LSM Image Browser (Carl Zeiss).

Tabela 5 - Lista de anticorpos utilizados no projeto e suas condições de reação.

Anticorpo	Hospedeiro	Fabricante	# catalog	Epitopo	[uso]	Ab. Sec	[uso]
Oct4A	Rabbit	Cellsignaling	#2840S	IgG	1:400	AF anti-rabbit	1:300
Nanog	Rabbit	Cellsignaling	#4903S	IgG	1:600	AF anti-rabbit	1:300
Sox2	Rabbit	Cellsignaling	#3579S	IgG	1:200	AF anti-rabbit	1:300
TRA-1-60	Mouse	Cellsignaling	#4746S	IgM	1:500	AF anti-mouse	1:200
TRA-1-81	Mouse	Cellsignaling	#4745S	IgM	1:500	AF anti-mouse	1:200
SSEA4	Mouse	Cellsignaling	#4755S	IgG3	1:500	AF anti-mouse	1:300
MLC-2a	Mouse	Abcam	ab68086	IgG	1:140	AF anti-mouse	1:300
MLC-2v	Rabbit	Abcam	ab79935	IgG	1:200	AF anti-rabbit	1:300
TNN2T	Goat	HY-test	4T19-2	IgG	1:200	AF anti-goat	1:300
cardiac MYH7	Mouse	Abcam	AB15	IgG1	1:100	AF anti-mouse	1:300

AF: Alexa Fluor

3.6 Formação de corpos embrióides

Para testar o potencial de diferenciação das CTP induzidas *in vitro* foi realizado o ensaio de formação de corpos embrióides. As células foram plaqueadas em alta densidade $1,2 \times 10^5$ células /cm² em placas de 35 mm. Em dois dias a placa estava 100% confluenta. Com o uso de um bisturi, foram feitos cortes superficiais na placa de maneira quadriculada, formando quadrados de tamanho aproximado de 1,5 x 1,5 mm. A placa foi lavada 1X com HBSS sem

cálcio e sem magnésio (HBSS--) (Life Technologies - #14025076), foi adicionado 1 mL de dispase (1U/mL) (StemCell Technologies - #07923) a temperatura ambiente e a placa foi deixada à 37°C por 15 minutos. Após este tempo, as colônias se soltam da placa com um simples balançar de meio e são coletadas num tubo cônico de 15 mL. Lavam-se as células 2X com HBSS-- com centrifugação por 1 minuto a 200 g. Ressuspende-se as colônias gentilmente para não quebrá-las no meio E6 (Life Technologies - #A1516401) suplementado com 4 µg/mL de álcool polivinílico (Sigma - #P8136) (filtrado) e plaqueou-se as colônias em placas de baixa aderência (Corning - #3261) com 5 µM de Ri. Foram realizadas trocas parciais (70%) de meio a cada 3 dias até o dia 12, quando os corpos embrióides foram coletados, centrifugados por 4 minutos a 200 g, o sobrenadante foi completamente retirado com cautela para não descartar células e o RNA foi extraído com TRIzol, como descrito acima.

A formação de células derivadas dos três folhetos embrionários foi realizada através da PCR de marcadores moleculares (Tabela 4), como descrito acima.

3.7 Cariótipo

O preparo das células para o cariótipo foi realizado como descrito em Seabright¹⁰² com algumas modificações.

Foi utilizado um poço de 35 mm 80-90% confluyente. 200 µL de colchicina 4×10^{-3} µg/mL (Sigma - #C9754) foi acrescentado a 1 mL de meio de cultura e mantido por 90 minutos. Seguiu-se com três lavagens com HBSS-- . As células foram dissociadas com Versene por 10 minutos, coletadas num tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Na sequência, as células foram ressuspensas em solução hipotônica (KCl) por 15 minutos a 37°C. Neste intervalo, foi preparada a solução fixadora (compreendendo de 3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético). Após os 15 minutos, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e as células foram ressuspensas em solução fixadora. Este processo foi repetido por

mais duas vezes e, no final, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução fixadora e armazenada a 4 °C até o momento da análise.

A análise dos cromossomos foi terceirizada. O método utilizado foi bandeamento GTG visto sob aumento de 400 vezes. Um total de 20 metáfases foi analisado. As imagens foram adquiridas usando o sistema CytoVision (Applied Imaging Corporation).

3.8 Diferenciação de CTP induzidas em cardiomiócitos

A diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos enfrentou diversas dificuldades de maneira que uma grande adaptação precisou ser realizada. Pelo fato dos ensaios realizados para esta adaptação poderem ser úteis para outros grupos, eles foram descritos na próxima sessão (resultados). Toda a adaptação foi baseada no protocolo de Lian e colaboradores, 2012^{103,104}, que segue descrito abaixo.

Pré-diferenciação, as células foram expandidas até que se atingisse 60-70% de confluência. As células foram dissociadas usando Versene por 8 minutos e 5-10 pipetagens gentis para completa dissociação. As células foram lavadas duas vezes com HBSS-- com centrifugação de 4 minutos a 200 *g*. Removido o sobrenadante, as células foram ressuspensas em E8 suplementado 3 μ M Ri e contadas. Foram plaqueadas 10⁵ células por poço de uma placa de 12 poços cobertos com matrigel. Foi trocado 1 mL de E8 diariamente até as células atingirem 100% de confluência (4-5 dias). Este dia foi considerado o dia 0 e o meio E8 é trocado para RPMI com L-Glutamina (Life Technologies - #11875-119) suplementado com 1X de B27 sem insulina (Life Technologies - #A1895601) (meio RB-) e 6-12 μ M de inibidor de GSK3 (CHIR99021 - Merck - #361571). 24 horas depois, o meio é trocado para RB- sem adição de outros compostos onde permanece por 48 horas. A seguir, no dia 3, 50% do meio é trocado para RPMI com L-Glutamina suplementado com 1X de B27 (Life Technologies - #17504044) (meio RB+) com 5 μ M de IWP-2 (Sigma - #I0536) ou IWP-4 (Stemgent - #04-0036) onde

permanece por 48 horas. No dia 5 e a cada dois dias, o meio é trocado por RB+. As primeiras células contráteis aparecem no 7º dia do protocolo de diferenciação e acredita-se que após 30 dias a maioria das células apresentem características de cardiomiócitos maduros.

3.9 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para verificação da eficiência dos protocolos de diferenciação seguindo metodologia descrita por Lian e colaboradores, 2012¹⁰⁴. Resumidamente, no dia 15 de diferenciação, as células foram dissociadas com tripsina por 5 minutos, inativadas com RPMI suplementado com 10% SFB, filtrada com filtro 40 µm e lavadas duas vezes com centrifugações de 3 minutos a 1200 rpm. As células foram incubadas com 1% paraformaldeído a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente fixadas com metanol 90% por 15 minutos a 4°C. 5×10^5 células foram separadas por tubos e lavadas três vezes com tampão 1. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão 2 com o anticorpo primário TNNT2 (Tabela 5) a temperatura ambiente por 1 hora. As células foram lavadas duas vezes no tampão 2 e ressuspensas em 100 µL do tampão 2 com anticorpo secundário Alexa Fluor anti-goat na diluição 1:2000 e deixadas por 30 minutos a temperatura ambiente protegida da luz. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes com 300 µL do tampão 1 e transferidas para tubos de citometria (BD Biosciences - #352052). Pelo menos, 10.000 eventos foram lidos no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo *software* Cell Quest (BD Biosciences).

3.10 Análise de contratilidade

As células foram plaqueadas sobre lâminas de vidro (25 x 25 mm) (Corning #2845-25) cobertas com 2 µg/cm² de laminina (Life Technologies - # 23017-015) e foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por quatro dias para completa recuperação. Apenas células isoladas e com contração espontânea foram utilizadas para análise usando um microscópio invertido Nikon TS100 acoplado com um sistema de vídeo microscópico IonOptix (IonOptix). Antes da

aquisição de dados, as células foram colocadas na câmara de estímulos e cultivadas com solução Tyrode tamponado com HEPES a 37°C e ao longo de todo o experimento. A medição foi realizada através do deslocamento das bordas celulares. A medição farmacológica foi realizada através da perfusão da solução Tyrode adicionada de 10 μ M de isoproterenol. A aquisição de dados foi realizada e analisada com o *software* Ionwizard e um mínimo de 5 aquisições foram analisadas.

3.11 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica as células foram plaqueadas em alta confluência em lâminas *multiwell* (Thermo Scientific - #177445) cobertas com matrigel. Após 4 dias em cultura, as células foram fixadas com 2,5% glutaraldeído fresco em tampão cacodilato 0,1 M e CaCl_2 3 mM por 5 minutos à temperatura ambiente e 1 hora no gelo. Seguiu-se uma etapa de cinco lavagens de 2 minutos com tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM no gelo. As células passaram por um processo de pós-fixação por ósmio 1% tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 30 minutos no gelo. Seguiram-se cinco lavagens com água Milli-Q de 2 minutos no gelo. O contraste foi realizado com Acetato de Uranila 2% aquoso por 1 hora à temperatura ambiente ou em pernoite a 4°C. Seguiram-se cinco lavagens com água Milli-Q de 2 minutos no gelo. Na sequência, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (20%, 50%, 70%, 90% e 2X de 100%) por 3 minutos cada à temperatura ambiente.

As células foram embebidas em resina Epon e etanol (1:1) sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente seguida por 4 a 5 trocas (a cada 1 hora sendo a última troca em pernoite) de resina Epon pura à temperatura ambiente. A polimerização foi realizada em estufa a 60°C por 60-72 horas.

Após polimerização e trimagem dos blocos, cortes ultrafinos de 70 nm foram obtidos no ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica Microsystems, Alemanha), coletados em grades de

cobre e contrastados com acetato de uranila aquoso 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo de Reynolds por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Leo 906-Zeiss. As imagens foram analisadas pelo programa iTEM (*TEM IMAGING PLATAFORM*) da Olympus (EUA) por especialista em morfologia de células cardíacas.

3.12 Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca foi estimulada nas células com quatro semanas através do uso de 10 μ M de Endotelina-1 (Sigma - #E7764). Foi utilizado três poços de placas *multiwell* de 24 ou 12 poços em triplicata para cada situação. O meio de cultura CDM3 foi trocado dois dias antes do início da hipertrofia. No período da tarde, o meio das células foi trocado por CDM3 + 10 μ M de ET-1. Após 18 horas, o RNA foi extraído e os genes *NPPA*, *NPPB* e *NFAT* foram analisados por qRT-PCR. Três comparações foram realizadas: 1- diferença de expressão basal entre indivíduos saudáveis x paciente, 2- Diferença de expressão após hipertrofia indivíduo saudável x indivíduo saudável e paciente x paciente e 3- diferença d expressão após estímulo com hipertrofia entre indivíduo saudável x paciente.

4 RESULTADOS

4.1 Reprogramação de fibroblastos em CTP induzidas

A primeira etapa para o estudo de cardiomiócitos humanos exigia a geração de CTP induzidas. Nesta etapa, foi utilizado o vírus contendo o plasmídeo STEMCCA para gerar estas células. Por se tratar de uma reprogramação viral, foram utilizados dois sub- clones do paciente e um clone de dois indivíduos saudáveis distintos. Os três indivíduos utilizados foram mulheres de 24 e 25 anos (indivíduos saudáveis) e 31 anos (paciente) (Tabela 3).

O processo de reprogramação foi inicialmente padronizado e seguiu o protocolo de Sommers e colaboradores, 2012¹⁶. No período entre 25 e 30 dias após o início da reprogramação, colônias individuais foram coletadas e passadas isoladamente para novos poços. Aquelas que apresentaram morfologia equivalente às das células-tronco embrionárias foram selecionadas para expansão e caracterização para serem utilizadas na diferenciação em cardiomiócitos. Foram selecionadas para esse processo o clone 6 do indivíduo controle TAY e o clone 7 do indivíduo controle SS, denominados, respectivamente TAY6 e SS7. Das CTP induzidas da paciente CH1176 foram selecionados os clone 4 e 6, dos quais foram gerados sub-clones. Para o clone 4, foi selecionado o sub-clone 1 e para o clone 6 foi selecionado o sub-clone 9. A denominação para os sub-clones da paciente ficou como 1176-4.1 e 1176-6.9.

Como controle positivo de células pluripotentes, foi utilizada a linhagem de célula-tronco embrionária BR1. Esta linhagem foi obtida por doação junto ao Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LaNCE), São Paulo, através da Profa. Lygia da Veiga Pereira, do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo.

CTP induzidas e embrionárias foram caracterizadas quanto à sua pluripotência. Os ensaios realizados para tal estão descritos abaixo.

4.1.1 Morfologia

As morfologias das colônias e das células geradas estão representadas na Figura 8 B-E. Nela, podemos observar que as colônias apresentam células justapostas, em monocamada e com margem muito bem definida. Com relação à morfologia das células, fica evidente a composição nuclear abrangendo quase todo o citoplasma, além da presença de diversos nucleossomos ou um único nucleossomo maior. Importante ressaltar que todas essas características são esperadas de CT pluripotentes, como pode ser observado nas CTP embrionárias BR1 (Figura R1-A).

4.1.2 Presença de marcadores moleculares

As CTP induzidas expressam os marcadores moleculares de pluripotência assim como as CTP embrionárias (Figura 9). Importante notar que nenhum desses genes possui expressão em fibroblastos.

Figura 8 - Caracterização morfológica das colônias e células pluripotentes sobre Geltrex®. Cada linha (A-E) representa um clone distinto (BR1, TAY6, SS7, 1176-4.1 e 1176-6.9) visualizado em diferentes aumentos (100X, 400X e 1600X). Aumento de 1600X é digital. As setas verdes evidenciam um núcleo com vários nucleossomos e as setas amarelas evidenciam um nucleossomo grande.

Figura 9 - Caracterização molecular das linhagens de CTP induzidas geradas (TAY6, SS7, 1176-4.1 e 1176-6.9) através de amplificação de genes marcadores de células pluripotentes (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *DPPA4*, *DPPA2*, *TERT* e *REX*). *GAPDH* é um controle de ampliação interno. O Fibroblasto utilizado é do controle SS7.

4.1.3 Presença de marcadores proteicos

As CTP induzidas geradas foram testadas quanto à expressão de proteínas marcadoras de CT Pluripotentes. Num primeiro momento foi verificada a expressão da Fosfatase Alcalina, uma vez que esta proteína está muito presente em células indiferenciadas pluripotentes. Como vemos pela marcação da Figura 10-A, todos os clones de CTP induzidas apresentaram todas as células marcadas em todos os marcadores, assim como as CTP embrionárias.

Também foram analisados outros seis marcadores de pluripotência, sendo três marcadores nucleares: *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*; e três marcadores de membrana: *SSEA4*, *TRA-1-81* e *TRA1-60* (Figura 10-B ao G). Todas as colônias apresentaram marcação equivalente às CTP embrionárias BR1.

Figura 10 - Expressão de marcadores proteicos de pluripotência das CTP induzidas (TAY6, SS7, 1176-4.1 e 1176-6.9) e CTP embrionária (BR1). Em A, marcação para Fosfatase Alcalina em coloração de hematoxilina e eosina. De B a G, cada linha indica um marcador (OCT4, NANOG e SOX2: marcadores nucleares e SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81: marcadores de membrana citoplasmática) visualizado por imunofluorescência. Azul (DAPI) marca os núcleos celulares. Barra de escala: 50µm.

4.1.4 Capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas

Foi utilizada a técnica de formação de corpos embrióides com diferenciação espontânea para se verificar se os clones das CTP induzidas geradas eram de fato pluripotentes, sendo capazes de gerar células derivadas das três linhagens germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) *in vitro*. Como podemos observar na Figura 11 A, todos os clones de CTP induzidas foram capazes de formar corpos embrióides. Através da presença de marcadores moleculares (Figura 11-B) demonstrou-se que estes corpos embrióides apresentaram diferenciação espontânea em endoderme (*AFP* e *SOX17*), mesoderme (*KDR* e *MSX1*) e ectoderme (*PAX6* e *MAP2*). Tanto a formação dos corpos embrióides, quanto à presença dos marcadores foi semelhante às CTP embrionárias BR1.

Digno de nota que o clone SS7 foi utilizado por grupos colaboradores para diferenciação dirigida para tipos celulares específicos e foram capazes de gerar hepatócitos imaturos (endoderme) e neurônios (ectoderme) (Figura 11-C e D, respectivamente), além dos cardiomiócitos (mesoderme) gerados nesse projeto.

Figura 11 – Potencial de diferenciação nas três linhagens germinativas. Em (A), formação de corpos embriões *in vitro* no dia 1. Em (B), marcadores moleculares indicativos de formação de endoderme (AFP e SOX17), mesoderme (KDR e HAND1) e ectoderme (PAX6 e MAP2). Em (C), neurônios e em (D) hepatócitos imaturos.

4.1.5 Integridade cromossômica

Os clones SS7 e TAY6 foram verificados quanto à sua integridade cromossômica nas passagens 10 e 20. Os subclones 1176-4.1 e 1176-6.9 foram verificados apenas na passagem 20. Excetuando-se o subclone 1176-6.9, que apresentou a translocação t(9;15)(q34;q15) de maneira balanceada, nenhum outro clone apresentou mudanças (Figura 12). Uma nova análise

foi feita com o subclone 1176-6.9 em menor passagem (15) e a mesma translocação foi observa ocorrendo de maneira balanceada.

Figura 12 – Cariótipo através de bandeamento GTG das linhagens celulares utilizadas entre as passagens 20-25 (CTP induzidas).

4.2 Diferenciação das CTP induzidas em Cardiomiócitos

Para diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos foram utilizados diferentes protocolos que não dependiam da formação de corpos embrióides (LaFlamme e colaboradores, 2007¹⁰⁵; Zhang e colaboradores, 2012¹⁰⁶ (abstract 2009) e Lian e colaboradores, 2012¹⁰³). Utilizando estes protocolos originais (com todos os reagentes recomendados em cada um deles) nenhum dos protocolos resultou em células contráteis.

Com isso, fez-se necessária a adaptação de um protocolo de diferenciação que fosse eficiente para as condições de nosso laboratório e das CT induzidas por nós geradas. Esta adaptação/desenvolvimento de um novo protocolo foi realizada inicialmente com o clone SS7 e os passos seguidos estão listados abaixo.

4.2.1 Desenvolvimento de um novo protocolo de diferenciação

4.2.1.1 Medida de Eficiência

A medida final de eficiência foi realizada por citometria de fluxo utilizando o anticorpo para Troponina T (Tabela 5 - TNNT2), uma proteína cardio-específica, seguindo os padrões dos melhores trabalhos científicos publicados. Entretanto, como o cardiomiócito é uma célula que contrai e, somado ao alto custo do anticorpo utilizado na citometria, a medida inicial de eficiência foi realizada de maneira relativa, por visualização no microscópio, considerando a quantidade de áreas contráteis no poço da placa de cultura.

4.2.1.2 Definição do protocolo base para diferenciação

Os principais problemas dos protocolos descritos na literatura e utilizados inicialmente neste projeto estavam relacionados à intensa morte celular. Dos três protocolos iniciais testados, o de Lian e colaboradores (Figura 13-A) foi o menos agressivo às células e sobre ele foi realizado uma variação de troca diária de meio, ao invés de troca a cada dois dias (Figura 13-B). Apesar de resultar num protocolo mais caro e mais laborioso, com esta modificação alcançou-se cardiomiócitos contráteis. Em um dos melhores ensaios, alcançou-se uma eficiência de 70% (Figura 14). Entretanto, este protocolo possuía baixa reprodutibilidade. Este fato dificultava a continuação do projeto, pois, para se obter um pequeno número de células, era necessária a realização de diversos experimentos. Além disso, por não existir uma proteína de membrana específica de cardiomiócitos, não era possível fazer uma purificação da população de células, logo, qualquer ensaio que viesse a ser realizado analisando a população

total de células no poço da placa de cultura (como, por exemplo, àquelas derivadas da extração de RNA) não apresentariam resultados exclusivos de cardiomiócitos.

Por isso, um grande esforço foi realizado para a obtenção de um protocolo que fosse robusto, apresentando alta eficiência e reprodutibilidade. Os valores de eficiência foram considerados alto quando acima de 80% de acordo diferentes publicações da literatura. O valor de reprodutibilidade foi considerado alto quando, pelo menos, quatro em cinco diferenciações apresentam eficiência alta.

A - Protocolo original de Lian e colaboradores, 2012.

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7		
drogas	-	iGSK3	-	-	iWNT	-	-	-	-		
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB+		
	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15 em diante			
drogas	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
meio de cultura		RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	Dia sim dia não			
										Eficiência	Reprodutibilidade
										85-90%	alta

B - Protocolo modificado utilizado inicialmente neste projeto

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7		
drogas	-	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	-	-	-		
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB+	RB+	RB+		
	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15 em diante			
drogas	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
meio de cultura	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	Dia sim dia não		
										Eficiência	Reprodutibilidade
										70%	baixa

Figura 13 - Protocolos de diferenciação – Em (A), protocolo original descrito por Lian e colaboradores, 2012. Em (B), o protocolo modificado até esta etapa. **D** representa Dia, RB- representa meio RPMI adicionado com 1X suplemento B27 sem insulina, RB+ representa meio RPMI adicionado com 1X suplemento B27. Cada retângulo de menor tamanho representa 24 horas, ou seja, que houve troca de meio após 24 horas. O retângulo maior representa 48 horas, ou seja, que só houve troca de meio após 48 horas.

Figura 14 - Citometria para eficiência de diferenciação medida pela marcação da proteína Troponina T. Em (A), marcação das células somente com anticorpo secundário e, em (B), marcação obtida.

4.2.1.3 As variações do protocolo

As variações realizadas para obtenção de um protocolo robusto consideram o seguinte racional (Figura 13-B): as células são plaqueadas sem contagem e cultivadas com o meio para células-tronco pluripotentes (E8). Ao atingirem 90-100% de confluência, é considerado dia -1 (D-1) do protocolo que se inicia no dia seguinte. O dia de início do protocolo é considerado dia 0 (D0), nele é trocado o meio E8 pelo meio de diferenciação RB- (composto do meio RPMI + suplemento B27 sem insulina) associado a um **inativador da GSK3** (iGSK3) que leva à **ativação da via da WNT**. Esta etapa dirige a células pluripotentes para o estágio de mesoderme. Após 24 e 48 horas, é trocado o meio de cultura sem nenhuma droga. No dia 3 (D3) e 4 (D4) é trocado o meio de diferenciação RB- adicionado de um **inativador da via da WNT** (iWNT). Nesta etapa, a mesoderme é dirigida para progenitores cardíacos. Do quinto dia em diante, troca-se o meio diariamente para o meio RB+ (meio RPMI + suplemento B27 com insulina) sem adição de drogas. Nesta etapa, há a diferenciação das células progenitoras para cardiomiócitos imaturos, as primeiras células começam a contrair no dia 7 a 9 e a contração aumenta com o passar dos dias até o dia 15, quando se espera que todo o processo esteja concluído. A partir do dia 15, troca-se o meio RB+ a cada dois dias até o dia 30, quando as células terão amadurecido e apresentarão um perfil de expressão genético/proteico semelhante a um cardiomiócito maduro (adulto).

Utilizando-se o protocolo com troca de meio diárias como base (Figura 13-A), a melhora de eficiência foi perseguida através da comparação, em diferentes fases dos protocolos, de moléculas descritas por outros trabalhos científicos, comunicação pessoal com colaboradores internacionais ou experiência prévia do grupo. Para aumentar a eficiência e a reprodutibilidade do protocolo, muitas variações foram testadas. O que foi testado, a justificativa e a referência estão representados na Tabela 6 e estão listadas na ordem temporal em que foram testadas, apesar de algumas delas terem acontecido concomitantemente.

Tabela 6 - Lista de modificações ao protocolo que foram testadas.

O que foi testado	Justificativa	Referência
Inibidores de GSK3	Há diferença na eficiência do protocolo entre diferentes marcas	Comunicação pessoal
DMSO	Traz todas as células para o mesmo estágio de ciclo celular.	Chetty e cols, 2013 ¹⁰⁷
Tempo de inibição da WNT	Indicações pessoais e de trabalhos científicos sugeriam que fazia diferença	Experiência prévia; Lian e cols, 2012 ^{103,104}
BMP4	Aumenta a eficiência de formação de mesoderme	Tan e cols, 2013 ¹⁰⁸
Inibidores da WNT	Diferentes inibidores funcionam de maneira distinta	Lian e cols, 2012 ¹⁰³ Comunicação pessoal Minami e cols, 2012 ¹⁰⁹
Meio de cultura CTP	Usar mTeSR na expansão das CTP pré-diferenciação aumenta eficiência	Comunicação pessoal
Concentração de células no dia 0 da diferenciação	Concentração de células inicial faz diferença	Comunicação pessoal
Concentração de iGSK3	Variável conforme o clone utilizado	Lian e cols, 2012 ^{103,104} Experiência prévia Comunicação pessoal

Nota: Comunicação pessoal de pesquisador parceiro da Universidade de Wisconsin – Madison.

4.2.1.4 Inibidores de GSK3

Segundo nosso pesquisador colaborador, nem todos os inibidores de GSK3 de fabricantes diferentes agem da mesma forma, por isso, decidimos testar o inibidor do fabricante que ele utilizava e recomendou (Selleck Chemicals - #2924), além daquele que já utilizávamos (Merck). Em nenhum teste realizado, independente da concentração utilizada, a droga da Selleck teve melhor eficiência ou reprodutibilidade do que a da Merck. Decidimos manter o uso do iGSK3 da Merck nas análises seguintes.

4.2.1.5 DMSO

Segundo o trabalho de Chetty e colaboradores, 2010¹⁰⁷, o uso de 1 a 2% de DMSO (Sigma - # D8418) no cultivo CTP induzidas no momento pré-diferenciação aumentaria a eficiência do processo pois faria com que todas as células estivessem no mesmo estágio do ciclo celular (no início do G1). Por isso, testamos o uso do DMSO não só na pré-diferenciação, mas também nos primeiros dias da diferenciação. Todas as condições testadas estão representadas na Figura 15 abaixo.

A

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5
drogas	-	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	

B

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5
1 ou 2 % de DMSO	DMSO	-	-	-	-	-	-
	-	DMSO	-	-	-	-	-
	DMSO	DMSO	-	-	-	-	-
	-	-	-	DMSO	-	-	-
	-	-	-	DMSO	DMSO	-	-
	DMSO	-	-	DMSO	-	-	-
	DMSO	DMSO	-	DMSO	-	-	-
	DMSO	DMSO	-	DMSO	DMSO	-	-

Figura 15 - Esquema demonstrativo dos testes de DMSO realizados. Em (A), o protocolo base até o dia 5. Em B, os dias em que foi adicionado DMSO. Cada retângulo de menor tamanho representa 24 horas, ou seja, que houve troca de meio após 24 horas.

Em nenhuma situação testada, independente da concentração de DMSO (1% ou 2%), foi obtida eficiência relativa maior que 10% e, por isso, decidiu-se não usar mais o DMSO.

4.2.1.6 Tempo de inibição da WNT e BMP4

O protocolo original de Lian e colaboradores, 2012, mostrava que iniciar a inibição da WNT com 48 horas após o dia 0 também gerava cardiomiócitos, mas que na experiência deles com 72 horas foi melhor. Decidiu-se comparar diferentes tempos de início e duração da inativação da via da WNT. A Figura 16-B abaixo representa todas as comparações realizadas.

A

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
drogas	-	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	-	-	-
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB+

B

		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
	1	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	iWNT	-	-
	2	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	iWNT	iWNT	-
	3	iGSK3	-	iWNT	iWNT	-	-	-	-
	4	iGSK3	-	iWNT	iWNT	iWNT	-	-	-
	5	iGSK3	-	iWNT	iWNT	iWNT	iWNT	-	-
	6	iGSK3	-	iWNT		-	-	-	-
	7	iGSK3	-	iWNT		iWNT	-	-	-
	8	iGSK3	-	iWNT		iWNT		-	-

Figura 16 - Em (A), protocolo padrão inicial. Em (B), variações do momento de iniciação e tempo de duração da inibição da via da WNT. Cada retângulo de menor tamanho representa 24 horas, ou seja, que houve troca de meio após 24 horas. O retângulo maior (linhas 6, 7 e 8) representa 48 horas, ou seja, que só houve troca de meio após 48 horas.

Junto com alguns testes de inativação da via da WNT, foram realizadas comparações utilizando-se o BMP4 (R&D Systems - # 314-BP-010/CF). Essas comparações foram baseadas no trabalho de Tan e colaboradores, 2013¹⁰⁸, onde se mostrava que após formação de mesendoderme (células que se diferenciam de CTPs e que darão origem tanto à endoderme quanto mesoderme) através da inativação da GSK3, o uso de BMP4 dirigia à formação de mesoderme em detrimento à formação de endoderme, desta maneira, aumentando a pureza de mesoderme nos estágios iniciais de diferenciação. A Figura 17 - B abaixo representa todas as comparações realizadas.

A

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
drogas	-	iGSK3	-	-	iWNT	iWNT	-	-	-
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB-	RB+	RB+	RB+

B

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
1		BMP4			Diferentes condições de inativação da via da WNT				
2		BMP4	BMP4						
3		BMP4	BMP4	BMP4					
4			BMP4						
5			BMP4	BMP4					

C

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
drogas	-	iGSK3	BMP4		iWNT	iWNT	-	-	-
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB-	RB+	RB+	RB+	RB+

Figura 17 - Em (A), protocolo padrão inicial. Em (B), variações do momento de inserção e tempo de tratamento de BMP4. Em (C), novo protocolo definido após teste de inativação da WNT e adição de BMP4. Cada retângulo de menor tamanho representa 24 horas, ou seja, que houve troca de meio após 24 horas. O retângulo maior representa 48 horas, ou seja, que só houve troca de meio após 48 horas.

Após estas comparações, encontrou-se uma combinação que levou a uma porcentagem relativa alta de células contraindo. Essa combinação (Figura 17-C) resulta da comparação 7 da Figura 16-B e da comparação 4 da Figura 17-B, nela foi utilizado o BMP4 um único dia após a remoção do iGSK3 (D1) e iniciou-se a inativação da WNT um dia antes (D2) do normal (D3), sem troca de meio por dois dias e uma troca no dia 4 usando o meio RB+. Por este protocolo ter resultado em uma alta eficiência relativa, decidiu-se adotá-lo para os ensaios com as demais variações.

Foi realizada uma comparação para se determinar a concentração de BMP4 ideal. Comparou-se 5, 10, 25 e 50 ng/mL de BMP4. Identificou-se que 10 ng/mL (coincidentemente a concentração utilizada nas comparações listadas na Figura 17-B foi a concentração que gerou a maior porcentagem relativa de células contráteis.

4.2.1.7 Meio de cultura: E8 x mTeSR; concentração inicial de células e concentração dos inibidores de GSK3

Neste período, um novo contato com o colaborador na Universidade de Wisconsin trouxe à tona três pontos importantes: 1- O uso do meio mTeSR1 (StemCell Technologies - #05850) ao invés do meio E8 no período pré-diferenciação aumenta a eficiência e reprodutibilidade da mesma; 2- As células deveriam estar muito confluentes no dia de início da diferenciação (D0) e 3- A concentração de iGSK3 utilizada no início deveria ser ajustada para cada clone CTP induzida.

Novos ensaios foram realizados para responder essas questões. Resumidamente, foram realizados experimentos usando os dois meios de cultura e com plaqueamento inicial de células diferentes, de forma que, quando os poços que iniciaram com menor concentração de células estivessem 100% confluentes, os poços da outra situação estariam 100% confluentes com células justapostas (muito apertadas), como exemplificado na Figura 18. Para cada uma destas situações, foram utilizadas as concentrações 4, 6, 8, 10 e 12 μM de iGSK3.

Figura 18 - CTP induzidas no dia 0 de diferenciação. Em (A), células 100% confluentes. Em (B), células 100% confluentes justapostas.

Foram observados efeitos bem variados. Num breve resumo, quando se utilizou E8, as melhores condições foram com alta concentração de iGSK3 (de 8 a 12 μM) nos poços de células muito justapostas; quando se utilizou mTeSR, as melhores condições foram baixa

concentração de iGSK3 (4 e 6 μ M) sem as células estarem justaposta. Isto demonstra a complexidade do processo e como pequenos detalhes podem influenciar de maneira significativa para o sucesso ou não da diferenciação.

Foi observado que o uso do mTeSR realmente levava à melhor eficiência e reprodutibilidade. Esta mesma comparação (meio de cultura x confluência das células x concentração de iGSK3) foi realizada com outros clones CTP induzidas e a situação de uso de mTeSR1, sem as células estarem justapostas e com 6 μ M de iGSK3 gerou maior quantidade de células contráteis.

Neste momento, definimos o protocolo. Entretanto, pelo fato do meio de cultura mTeSR ser muito caro e deixar o processo com um valor elevado foi realizada uma comparação de combinação do mTeSR com E8 para determinar o mínimo de mTeSR necessário para a diferenciação funcionar com a mesma eficiência. Ao meio E8 foi adicionado 25%, 50% e 75% de mTeSR. Percebeu-se que o uso do meio 50% mTeSR 50% E8 levava a porcentagens relativas de células contráteis de maneira equivalente à quando era usado 100% de mTeSR1. Desta maneira, definimos que as células deveriam ser pré-incubadas com essa composição de meios de cultura.

4.2.1.8 Inibidores da via da WNT

Por fim, a última situação em que o protocolo poderia ser melhorado estava relacionada às drogas utilizadas para inativação da via da WNT. Segundo o trabalho de Lian e cols, 2012^{103,104}, o protocolo possuía a mesma eficiência usando tanto o inibidor IWP2 (i2) quanto o IWP4 (i4). Segundo nosso colaborador, o i4 da marca Stemgent Technologies gerava os melhores resultados. Além disso, o protocolo de Minami e colaboradores, 2012¹⁰⁹, reportava que o uso da droga KY2111 (KY) (Cayman - #14315) em combinação com XAV939 (XAV) (Cayman -#13596) foi a melhor situação de inativação do WNT que eles encontraram.

Essas informações nos levaram a comparar essas drogas para determinar qual delas ou combinações delas seriam melhores para o novo protocolo em desenvolvimento.

Foram comparadas mais de 40 combinações utilizando cada inibidor isolado, combinado aos pares, combinados em trios ou todos juntos. Além disso, essas combinações também foram realizadas utilizando-se mais de duas concentrações distintas. Ao final das comparações (que sempre foram avaliadas pelo número de células contráteis) identificou-se que o uso da droga i4 a 7,5 μ M e a combinação KY 5 μ M + XAV 2,5 μ M (denominada KX daqui em diante) foram as que geraram os melhores resultados. Utilizando-se o i4, observou-se um forte batimento, (vídeo 1 – <http://youtu.be/iVxwW6FXcuc> - Anexo 2) mas ainda permaneciam áreas não contráteis nos poços de cultura. Utilizando-se o KX, observou-se um batimento mais sutil, entretanto, homogêneo pelo poço inteiro (vídeo 2 – <http://youtu.be/gP8F-9wvK-k> - Anexo 3).

Pelo fato do protocolo estar funcionando bem, foi comparada a troca de meio de cultura a cada dois dias, após o dia 5 de diferenciação, pois o gasto com meio de cultura quando se faz a troca do meio diariamente é elevado. As duas situações levaram a eficiências semelhantes de células contráteis. Desta maneira, para diminuir os custos da geração das células, foi adotado o protocolo com a troca de meio a cada dois dias.

Este novo protocolo passou a ser reprodutível e, até o momento, já funcionou em sete clones de CTP induzidas distintos de 5 indivíduos (sendo que em 3 indivíduos as CTP induzidas foram geradas com integração viral e ou outros 2 indivíduos sem integração viral). Além disso, este novo protocolo foi eficiente na diferenciação da CTP embrionária BR1. Desta maneira, até este momento do projeto definiu-se este protocolo como sendo o protocolo final (Figura 19-A).

A

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
drogas	-	CH (Merck) 6 uM	BMP4 10ngmL		KY: 5 uM XAV: 2,5 uM	KY: 5 uM XAV: 2,5 uM	-	-	-
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+

	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15 em diante
drogas	-	-	-	-	-	-	-	-
meio de cultura	-	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	RB+	Dia sim dia não

B

	D-1	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
drogas	-	CH (Merck) 6 uM	BMP4 10ngmL		KY: 5 uM XAV: 2,5 uM	KY: 5 uM XAV: 2,5 uM	-	-	-
meio de cultura	E8	RB-	RB-	RB-	RB+	CDM3	CDM3	CDM3	CDM3

	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15 em diante
drogas	-	-	-	-	-	-	-	-
meio de cultura	-	CDM3	CDM3	CDM3	CDM3	CDM3	CDM3	Troca a cada 3 dias

Figura 19 - Em (A), protocolo de diferenciação final utilizando o meio de cultura RB+ para término da diferenciação e manutenção dos cardiomiócitos. Em (B), protocolo de diferenciação final utilizando o meio de cultura CDM3 para término da diferenciação e manutenção dos cardiomiócitos. Cada retângulo de menor tamanho representa 24 horas, ou seja, que houve troca de meio após 24 horas. O retângulo maior representa 48 horas, ou seja, que só houve troca de meio após 48 horas.

Resolvidas as dificuldades de eficiência (relativa) e reprodutibilidade, realizaram-se experimentos de citometria de fluxo em momentos distintos (experimentos e dias diferentes) para se identificar a exata taxa de eficiência do protocolo. Essa medição foi realizada seguindo os padrões publicados nos melhores trabalhos descritos na literatura, ou seja, a porcentagem de células com marcação positiva para Troponina T no dia 15 de diferenciação. Foram utilizadas as CTP induzidas SS7 e CTP embrionárias BR1. Considerando os dados relativos ao meio RB+, a Figura 20 (A e B) mostra a eficiência de diferenciação em mais de 19 poços de diferenciação independentes. Diferente do esperado, o protocolo, que de maneira relativa aparentava ter entre 80-90% de células contráteis, não apresentou porcentagem equivalente de células troponinas T positivas, que se encontra resumida na Figura 20-C e vê-se que a média

A – Diferenciações CTP induzidas **B – Diferenciações CTP embrionárias** **C – Médias Gerais** **D – Fibronectina**

Figura 20 - Eficiência de diferenciação de diferentes linhagens celulares e diferentes experimentos por citometria de fluxo. Em (A), diferenciações de CTP induzidas, DIF_95 e DIF_98 indicam os experimentos diferentes, comparando entre os meios RB+ e CDM3. Em (B), diferenciações de CTP embrionárias, DIF_94 e DIF_97 indicam os experimentos diferentes, comparando entre os meios RB+ e CDM3. Em (C), comparações de todas as diferenciações entre CTP induzidas (CTPis), CTP embrionárias (CTPEs) e das duas juntas (geral) comparando entre os meios RB+ e CDM3. Em (D), diferenciação 92 (D92) utilizando fibronectina junto ao Geltrex como matriz extracelular, comparando entre os todas as outras diferenciações (O) com RB+ e CDM3. * = p valor < 0,05.

de todos os poços de CTP induzidas foi de 65% e CTP embrionárias foi de 74%. Sendo a média geral de 70%.

4.2.1.9 *Meios de cultura de manutenção dos cardiomiócitos*

Recentemente, foi publicado o mais minucioso trabalho de análise comparativa do processo de diferenciação de CTP em cardiomiócitos até o momento. Nele, o grupo de Joseph Wu e Paul Burridge analisam os diversos fatores envolvidos neste processo, desde a matriz extracelular, passando pela composição do meio de diferenciação até as diferentes drogas utilizadas⁴⁵.

Para nossa surpresa, este protocolo também determina que o melhor momento de se iniciar a inativação da via da WNT é no dia 2, assim como nós determinamos. Contudo, a etapa inicial que ele sugere difere um pouco da nossa, nela o inativador da GSK3 permanece por 48 horas ao invés de 24 horas e, além disso, não é utilizado o BMP4. Tentativas de diferenciação foram realizadas utilizando este novo protocolo, mas não se obteve sucesso, pois houve muita morte celular e apenas poucas células batiam (menos de 10%) ao final de 15 dias. Contudo, realizamos um ensaio no nosso protocolo utilizando o meio de cultura que eles determinaram como ideal (denominado CDM3 - RPMI com L-Glutamina suplementado com 500 ug/mL de Albumina e 213 µg/mL de ácido ascórbico) e vimos que a simples troca do meio RB+ pelo meio CDM3 no dia 5 da diferenciação aumentava a eficiência do protocolo e o deixava mais reprodutível. Na Figura 20 (A e B, meio CDM3) vê-se que, com o uso do meio CDM3, a marcação de células troponinas T positivas aumentou de maneira significativa em relação ao meio RB+ em três dos quatro experimento (DIF_95, DIF_98 e DIF 97), ao se avaliar as médias (Figura 20 C, CDM3) vê-se uma mudança estatisticamente significativa tanto para as CTP embrionárias (indo de 74% para 81%) quanto para CTP induzidas (indo de 65% para 92%).

A Figura 21 mostra a marcação de troponina T analisada por citometria de fluxo para uma amostra. Nela, vê-se representada a melhor eficiência dos poços da diferenciação 97 (BR1) e 98 (SS7) (Figura 20). Nesta figura fica evidente como o uso do meio CDM3 leva a uma melhor eficiência de diferenciação, deixando a população de células mais homogênea do que com RB+.

Figura 21 - Histograma de citometria de fluxo para Troponina T cardíaca (cTnT) representativo dos dois melhores experimentos de cada linhagem (SS7 e BR1) dos protocolos com meio de cultura RB+ ou CDM3.

4.2.1.10 Matriz extracelular

No Congresso Internacional de células-tronco de 2013, um trabalho ainda não publicado do grupo de Timothy Kamp trouxe a informação de que adicionar Fibronectina ao protocolo de diferenciação aumentava a eficiência do protocolo de diferenciação daquele grupo¹⁰⁶. Foram realizados alguns ensaios utilizando a fibronectina como única matriz extracelular, mas esses ensaios foram mal sucedidos, uma vez que as células pluripotentes não aderiram bem na matriz de fibronectina. Decidiu-se então mesclar a fibronectina com o Geltrex (que era a matriz utilizada em todos os outros experimentos) e, como mostra Figura 20-D, acima, a adição da fibronectina aumentou significativamente a eficiência do protocolo

tanto quando usado o meio RB+, quanto quando usado o meio CDM3. Quando utilizado o meio RB+, houve aumento de 30% na porcentagem na média de células positivas para troponina T, passando de 65% para 85%. Já com o meio CDM3, o aumento foi menor (5%), isso porque a eficiência já estava alta, a média da eficiência passou de 92% para 96,7%. Independente disso, um ponto importante a ser observado é que o desvio padrão diminuiu quando utilizado a fibronectina (7,4 para 4,2 no meio RB+ e 4,7 para 1,1 no meio CDM3). Isto significa que, além de mais eficiente, o uso da fibronectina deixa a diferenciação menos variável.

A adição da fibronectina não foi considerada como definitiva na determinação do protocolo final, uma vez que ela ainda precisa ser comprovada utilizando-se outros clones de CTP induzidas e embrionárias.

4.2.2 Caracterização dos cardiomiócitos

4.2.2.1 *Caracterização inicial dos cardiomiócitos*

Após a determinação de um protocolo com alta eficiência relativa e alta reprodutibilidade, foram realizados ensaios para determinar os marcadores moleculares das células geradas. Além disso, foram realizados ensaios com marcadores proteicos para confirmação dos fenótipos de células cardíacas.

4.2.2.2 *Marcadores moleculares*

A expressão de marcadores moleculares de cardiomiócitos adultos foi realizada através de RT-PCR em cardiomiócitos com 30 dias de diferenciação. A Figura 22 mostra a análise dos clones SS7 e TAY6 das CTP induzidas e da CTP embrionária BR1. Como se observa na figura, os cardiomiócitos gerados não apresentam mais a expressão de genes de pluripotência (*OCT4*, *DPPA4*, *hTERT* e *GDF3*) e nem marcadores de mesendoderme (*T*).

Entretanto, eles ainda apresentaram expressão de genes marcadores de células progenitoras cardíacas (*ISL1*, *NKX2.5*, *GATA4*, *HAND1* e *MEF2C*). Os cardiomiócitos derivados de CTP apresentaram expressão de marcadores dos três tipos de cardiomiócitos existentes: ventriculares (*MYL2*), atriais (*MYL7*) e nodais (*HCN4*). Estes dados sugerem que o protocolo gera uma população mista de cardiomiócitos.

Figura 22 - PCR de marcadores moleculares de diferentes tipos celulares. Cardio SS7 A e B representam células no dia 30 de duas diferenciações distintas para a linhagem de CTPi SS7. Cardio BR1 A e B representam células no dia 30 de duas diferenciações distintas para a linhagem de CTP embrionárias BR1. Cardio TAY6 representa células no dia 30 de uma diferenciação para a linhagem de CTPi TAY6. Coração adulto representa células de ventrículo esquerdo cardíaco humano. CTPi SS7 representa a linhagem de CTPi SS7 em seu estado de pluripotência. ES BR1 representa a linhagem de CTP embrionárias BR1 em seu estado de pluripotência. Pré-endo SS7 representa células iniciais no estágio de diferenciação em hepatócitos (pré-endoderme) da linhagem de CTPi SS7, quando ainda há expressão de vários marcadores para endoderme e ainda há expressão de alguns marcadores de pluripotência. Ctr- representa um controle negativo para a reação de PCR.

4.2.2.3 Marcadores proteicos

A microscopia confocal de cardiomiócitos derivados da CTP induzidas SS7 e TAY6 com 35 e 30 dias após a diferenciação, respectivamente, mostra a presença de proteínas cardíacas específicas como Troponina C (CTNT), Myosina de cadeia leve ventricular (MYL2v), actina e α -actinina (Figura 23).

Utilizando-se um aumento digital (Figura 23-C), destaca-se o padrão de estriamento característico de células musculares. Através da marcação da actina (sarcômeros) e da α -actinina (disco-Z) vê-se a perfeita organização da estrutura contrátil dos cardiomiócitos compostas por sarcômeros separados por discos-Z. Este padrão estrutural, somado à presença de proteínas cardíacas específicas e à contração celular, nos dá segurança para afirmar que as células geradas por este protocolo são cardiomiócitos verdadeiros.

Figura 23 - Imunofluorescência Confocal de cardiomiócitos no dia 35 de diferenciação. Em (A), marcação de duas proteínas específicas de cardiomiócitos maduros: CTNT representa a Troponina T Cardíaca e MLC2v representa a Miosina de Cadeia Leve ventricular. Em (B), marcação de actina e α -actinina (proteína específica cardíaca). Em (C), aumento digital destacando estrutura contrátil (sarcômero e Disco-Z). Dapi, em azul, representa o núcleo das células. Barra de escala: 50 μ m.

4.2.2.4 Ensaio Funcional

Dada a especialização deste tipo celular, diversos ensaios funcionais podem ser realizados. Foi analisada a capacidade destas células responderem a um estímulo β -adrenérgico através da administração de isoproterenol. O isoproterenol é um conhecido e importante agonista dos receptores β -adrenérgicos e causa um efeito inotrópico (aumento da força de contração) e cronotrópico (aumento da frequência de contração) no coração. Através da medição do encurtamento do sarcômero realizado no equipamento Ion Optix, demonstrou-se, indiretamente, que os cardiomiócitos gerados das CTP induzidas TAY6 apresentavam aumento da força de contração em resposta ao isoproterenol (Figura 24).

A adição do isoproterenol fez com que as células aumentassem em 180% o encurtamento do sarcômero, passando de 0,25 μm na condição basal para 0,7 μm após o estímulo. A droga também gerou uma resposta de encurtamento mais rápida, passando de 0,12 segundos na condição basal para 0,07 segundos após o estímulo. Esta resposta, de acordo com o esperado, demonstra que estes cardiomiócitos possuem toda a maquinaria proteica responsável pela contração celular e sugere certo grau de amadurecimento, assim como torna estas células passíveis de se tornarem excelentes ferramentas para análise de respostas farmacológicas.

Figura 24 - Potencial Inotrópico do estímulo com isoproterenol. O gráfico representa força de encurtamento do sarcômero medido pela variação da largura em relação ao tempo. Linha vermelha representa o encurtamento basal sem estímulo e linha verde representa o encurtamento após estímulo de XX μM de isoproterenol.

Com relação à mudança cronotrópica, todos os clones demonstraram uma modulação positiva em resposta ao Isoproterenol (Tabela 7).

Tabela 7 - Respostas dos diferentes clones ao estímulo com isoproterenol.

Clone	Vídeo	Link para vídeo	Frequência basal	Frequência com estímulo	Aumento
TAY6	Anexo 4	http://youtu.be/YtpiR3snxh4	84	126	50%
SS7	Anexo 5	http://youtu.be/M9UqhNGdpg0	54	135	150%
1176-6.9	Anexo 6	http://youtu.be/49TK2PTASbs	36	63	75%
BR1	Anexo 7	http://youtu.be/HOO5vkyDvUU	60	135	125%

4.3 Avaliação dos fenótipos da CH no modelo celular desenvolvido

Após o estabelecimento do novo protocolo e as caracterizações realizadas com os cardiomiócitos, as CTP induzidas dos indivíduos saudáveis (TAY6 e SS7) e do paciente (subclones 1176-4.1 e 1176-6.9) foram diferenciadas em cardiomiócitos. Os cardiomiócitos apresentaram a expressão de diversos marcadores cardíacos com níveis de expressão diferentes ao nível de expressão de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo humano (Figura 25). Os marcadores de progenitores cardíacos (*GATA4*, *NKX2.5* e *HAND1*), estavam mais expressos em todos os indivíduos com exceção do *HAND1* na TAY6. Todas as células apresentaram expressão de proteínas do aparelho contrátil (*TNNT2*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL7*, *MYOM1* e *LRRC39*) em níveis inferiores ao cardiomiócito adulto exceto os genes da SS7 no gene *MYH6* e 1176-6.9 no gene *MYOM1*. No gene *MYL2* a expressão estava bastante superior ao cardiomiócitos ventriculares adultos. Os cardiomiócitos da CTP induzida TAY6 apresentaram níveis de expressão bem abaixo dos demais para as proteínas do aparelho contrátil.

Além disso, as células apresentaram um padrão bem variável de expressão de genes codificantes de canais iônicos, havendo apenas super-expressão do gene *HCN4*, que também apresentou expressão nas CTP induzidas. De maneira geral, as células apresentaram expressão para canais controladores de potássio (*HCN4*), sódio (*SCN4A*) e cálcio (*PLN*).

Figura 25 - Painel de expressão de genes cardíacos. *GATA4*, *NKX2.5* e *HAND1* são marcadores de progenitores cardíacos. *TNNT2*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL7*, *MYOM1* e *LRRC39* são marcadores do complexo proteico de contração celular. *HCN4*, *SCN4A* e *PLN* são marcadores de canais iônicos.

4.3.1 Expressão de gene marcador de hipertrofia

Foi verificada a expressão do marcador de hipertrofia *NPPB* para se verificar se a paciente naturalmente expressava mais desse gene em relação ao indivíduo saudável. Além da condição basal, as células também foram desafiadas com um estímulo hipertrófico através do uso de 10 uM de endotelina 1 (ET-1)⁵⁰. Através de uma análise comparativa utilizando uma ANOVA de dois caminhos, os dados na Figura 26 mostram que na condição basal, os cardiomiócitos da paciente naturalmente apresentam expressão significativamente maior que o controle ($p = 0,04$ - £). Além disso, vê-se que o estímulo levou à maior expressão do gene nos dois grupos ($p = 0,0001$ - *) e que a diferença de expressão entre paciente e controle foi mantida após o estímulo, continuando significativamente maior na paciente ($p = 0,03$ - \$).

Figura 26 - Comparação da expressão do marcador de hipertrofia cardíaca. Basal significa as células cultivadas em condições normais de cultivo. ET-1 significa células estimuladas com endotelina-1. £ representa diferença estatística entre paciente x controle e * representa diferença entre os grupos basais e estimulados.

4.3.2 Organização ultra-estrutural

Um dos principais efeitos, no tecido cardíaco, de mutações genéticas em proteínas sarcoméricas que levam à cardiomiopatia hipertrófica é o desarranjo estrutural¹¹⁰, neste sentido, procurou-se responder se este desarranjo poderia ser observado nos cardiomiócitos derivados de CTP induzidas deste pacientes. A Figura 27 mostra que os cardiomiócitos dos indivíduos saudáveis possuem sarcômero bem desenvolvido, com o disco-Z bem definido e contínuo. Já os sarcômeros dos subclones do paciente estão menos desenvolvidos e em diversos locais apresentam disco-Z intermitente ou incompleto.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão. * indicam discos-Z bem definido delimitando sarcômeros bem desenvolvidos. ° indicam discos-Z intermitentes ou incompletos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Geração de CTP induzidas

A identificação de alterações genéticas que podem ser causadoras de doenças cardíacas é um dos principais focos de nosso grupo de pesquisa^{100,111,112}. As sugestões de causalidade são, em sua maioria, baseadas em segregação da mutação na família, ou seja, sua presença ou ausência nos familiares que apresentam ou não a doença ou fenótipo clínico. De maneira complementar, e para os casos onde não é possível a triagem de familiares, são realizadas análises *in silico* para, através de softwares de predição de alteração proteica, sugerir-se a causalidade ou não de uma alteração encontrada¹⁰⁰. Ambos os métodos estão sujeitos a falhas na imputação da causalidade, e, por isso, a verificação de patogenicidade pode ser complementada por análises *in vitro* em cardiomiócitos que possuem tais alterações genéticas. Estes cardiomiócitos podem ser derivados de CTP induzidas dos próprios pacientes ou modificados geneticamente de maneira a se inserir a mutação numa célula de um indivíduo sem fenótipos de doenças cardíacas⁹. As células derivadas de indivíduos com as alterações poderão além da modelagem da doença poderão, em um futuro próximo, ser usadas em terapias celulares (após correção genética da mutação), já as células modificadas geneticamente terão um uso mais direto em modelagem de doenças. Para a realização deste projeto optou-se pela geração de CTP induzidas dos próprios pacientes.

O paciente com Cardiomiopatia Hipertrófica selecionado para este trabalho não possuía um histórico familiar que pudesse confirmar a causalidade da mutação. Ela possuía apenas um irmão e uma filha sem alterações e a mãe que também possuía fenótipo de CH já havia falecido. Desta maneira, a causalidade foi sugerida *in silico* através da triagem por mutações de um painel de genes relacionados com doenças cardíacas, não restrito à CH. Nesta análise, Tabela 1, foram encontradas quatro alterações com predição danosa *in silico*, sendo que duas estavam presentes nos familiares sem fenótipo. Uma alteração era a no gene da

Miosina (*MYH7*), a qual se baseou o estudo, e a outra ocorria no gene *SYNE1*. Na literatura científica, o gene *SYNE1* é um gene relacionado principalmente com distrofia muscular (www.omim.org/entry/608441) e sua associação com a Cardiomiopatia Dilatada foi reportada em um único caso e associado com forte distrofia muscular¹¹³. Além disso, ele é um gene muito grande, onde diversas alterações de troca simples de aminoácidos ocorrem e, assim como no caso da Titina, acredita-se que sua relação com doenças cardíacas esteja associada a alterações de mudança de quadro de leitura e alterações sem sentido⁹⁴. Desta maneira, definimos que a mutação na Miosina foi a única variante encontrada para a qual existiam fortes indícios (*in silico*) de que fosse, de fato, a causadora da doença.

Foram geradas CTP induzidas desta paciente através de reprogramação com integração viral no genoma da célula. O método com integração viral foi utilizado porque era o método padronizado no laboratório na época e apenas se iniciava, à época, o desenvolvimento dos métodos epissomais. Na reprogramação viral com integração genômica, a integração pode ocorrer em diferentes locais no genoma de maneira que não atrapalhe a reprogramação, mas que pode, potencialmente, interferir na posterior capacidade de diferenciação. Isto gera a necessidade de se utilizar mais de um clone para análise de fenótipos e, por isso, foram utilizados dois (sub)clones neste presente projeto. A utilização de reprogramação epissomal não exige o uso de mais de um clone, além de poder ser utilizado um “pool” de células. O grupo já possui padronizada a reprogramação epissomal de fibroblastos através do reagente Lipofectamina 3000 (Life Technologies). Dados prévios de outros projetos do grupo mostram que a variação da eficiência de diferenciação em cardiomiócitos utilizando CTP induzidas livres de integração viral é menor.

As células CTP induzidas geradas foram avaliadas quanto ao seu potencial de pluripotência realizando-se ensaios padrões da literatura científica e comparada com a linhagem de CTP embrionárias BR1. Na expressão de marcadores moleculares e proteicos os

resultados foram como esperados e as células apresentaram todos os marcadores de maneira idêntica à BR1. Esses dados poderiam ser mais detalhados ao se determinar o nível de expressão dos marcadores moleculares através de PCR em tempo real ou um perfil de expressão gênica global. No caso deste último, é utilizado o perfil de expressão de cada clone em comparação com CTP embrionárias. Alternativamente, foi desenvolvido um teste baseado em perfil de expressão global de pluripotência onde o resultado é cruzado com um banco de dados de linhagens sabidamente pluripotentes para se avaliar o potencial de pluripotência¹¹⁴. Este trabalho sugere que esta análise pode substituir ensaios de pluripotência *in vivo* como a formação de teratomas, até hoje considerado o ensaio padrão-ouro.

Neste projeto, a avaliação de pluripotência também foi verificada pela formação de corpos embrióides e sua diferenciação espontânea em células derivadas das três linhagens germinativas. Todas as CTP induzidas geradas neste projeto formaram corpos embrióides que espontaneamente se diferenciaram e apresentaram marcação molecular para endoderme, mesoderme e ectoderme. Apesar de a formação de corpos embrióides ser um teste simples em comparação com a formação de teratomas em camundongos imunodeficientes (teste *in vivo*), o método de formação de corpos embrióides é mais barato e menos laborioso, uma vez que não necessita de equipes técnicas distintas e estrutura física complexas (bioteristas e histogistas); e o tempo para realização do ensaio é de 12 dias x 60-90 dias para formação teratomas. De maneira complementar algumas empresas já apresentam métodos de seleção de CTP induzidas de acordo com o potencial de diferenciação para folhetos embrionários específicos através de painéis de expressão de corpos embrióides em dias iniciais de diferenciação, contudo, estes painéis ainda são caros (ScoreCard - Life Technologies).

Apesar de terem sido realizados poucos testes para a verificação de pluripotência, nós acreditamos que foram testes suficientes para a execução do projeto, uma vez que todas as células selecionadas geraram cardiomiócitos eficientemente.

Outro ponto importante sobre o qual esse projeto se baseia é no método de cultivo adotado. É bastante discutido na literatura como os métodos de cultivo podem influenciar na qualidade e integridade das células^{115,116}. O contato célula-célula é reconhecido como importante fator para manutenção do fenótipo das CTP, por isso, acredita-se que métodos de passagem manuais, sem dissociação enzimática, onde as células mantêm essa interação, seriam menos susceptíveis a alterações cromossômicas. No presente projeto, adotamos o método de dissociação por EDTA, de maneira que as células são dissociadas para ficarem isoladas (células únicas), mas sem o uso de enzimas de digestão. Considerando que apenas um dos cinco subclones utilizados nesse projeto (além de outros cinco clones utilizados em outros projetos do laboratório) não apresentaram modificações cromossômicas, acreditamos que o método de cultivo adotado seja apropriado para o cultivo das células.

A translocação encontrada no subclone 1176-6.9 não está relacionada diretamente com o processo de reprogramação, uma vez que o outro subclone 1176-4.1 do mesmo paciente possuiu cariótipo normal (Figura 12). Isto sugere que ela pode ter sido selecionada ao acaso no momento da subclonagem. Infelizmente, não haviam células congeladas deste clone de antes ou logo após a subclonagem. Este dado reforça a necessidade de verificação de integridade cromossômica logo após haver subclonagem.

Das modificações que poderiam ter ocorrido no genoma, a translocação balanceada é uma das menos impactantes, principalmente comparada a deleções e duplicações (seja de regiões ou cromossomos inteiros), pois não se perdem ou ganham grandes porções de material genético. Neste caso específico, parece não ter resultado em importante modificação, uma vez que este subclone apresentou frequência de crescimento semelhante aos clones controle e as células foram passíveis de gerar derivados dos três folhetos embrionários (Figura 11) e diferenciar de maneira eficiente em cardiomiócitos (Figura 20). Os dados observados e

relacionados aqui à presença da doença devem, no entanto, ser confirmados através da análise do outro subclone da paciente.

5.2 Diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos

Como foi reportado previamente, a tentativa de diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos foi realizada utilizando-se três protocolos diferentes de diferenciação e nenhum dos três protocolos funcionou em nosso laboratório. Isso pode ter ocorrido por diferentes motivos: (i) de preocupante importância, este fato pode estar relacionado com o estado que esses materiais chegam ao Brasil. É comum receber reagentes ou suplementos de meio de cultura congelados na posição horizontal, sugerindo que tenham descongelado ao longo do caminho e posteriormente recongelados nesta posição, possivelmente impactando seu funcionamento/eficiência. Este motivo, se verdadeiro, pode impactar negativamente as pesquisas realizadas no país e cabe aos órgãos governamentais a resolução do problema. Parte do problema pode estar sendo resolvido com o projeto de Lei 4411/2012 do deputado federal Romário (atualmente Senador), que, simplificada, facilita a entrada de materiais estrangeiros quando a destinação for para pesquisa científica.

(ii) Outro importante motivo a se destacar refere-se à variabilidade genética inerente da cada linhagem celular. Apesar da grande similaridade das CTP induzidas com as CTP embrionárias, diferentes grupos de pesquisa reportam maior dificuldade em diferenciar CTP induzidas do que embrionárias (comunicação pessoal). Como cada linhagem apresenta padrão de expressão específico para seus fatores de crescimento, eles possivelmente demandarão diferentes quantidades de reagentes para a diferenciação.

Como demonstrado no trabalho, a eficiência da diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos pode ser influenciada por detalhes mínimos, como a confluência inicial das

células no momento de diferenciação. Isto torna complicada a padronização de um protocolo que sirva para todas as linhagens celulares. Acreditamos que este problema possa ocorrer principalmente nas células reprogramadas com inserção viral, pois o local onde o vírus se integra e seu silenciamento ou não podem influenciar a regulação gênica inerente da diferenciação.

Considerando todos os testes realizados, o uso do meio mTeSR1 ao invés do meio E8 e a adição do BMP4 após a inativação da GSK3 foram as modificações mais significativas. O uso do BMP4 já foi descrito diminuindo a quantidade de células que diferenciam em endoderme quando associado à ativação da via da WNT (seja por inibição de pequenas moléculas ou proteínas recombinantes)¹⁰⁸. Essa diminuição estava associada ao aumento de marcadores de mesoderme. Desta maneira, decidiu-se utilizá-lo no protocolo e observou-se importante aumento na eficiência da diferenciação. Já a questão dos meios de cultura no cultivo das CTP induzidas (mTeSR1 x E8) deve ser melhor estudada. É sabido que o meio de cultura E8 tem, pelo menos, 10 componentes a menos que o meio mTeSR¹¹⁷, logo um destes componentes ou a combinação deles pode estar relacionado com essa diferença na eficiência de diferenciação. Caso haja a necessidade de redução de custos envolvidos no método, a identificação de qual(is) componente(s) poderiam estar relacionados com essa diferença seria uma das primeiras tentativas a ser realizada.

No final do desenvolvimento/adaptação do protocolo de diferenciação foi reportado que o uso do meio CDM3 levava à maior eficiência e reprodutibilidade da diferenciação. Esta simples mudança de meio de cultura estaria atuando de duas maneiras: 1- aumentando o número de células que se diferenciam em cardiomiócitos e não param em estágios intermediários da diferenciação sob influência de outros fatores presentes no meio RB+. Isto se justifica, pois o suplemento B27, que compõe o meio RB+, foi inicialmente desenvolvido para neurônios e possui 15 componentes a mais que o meio CDM3, logo, esses componentes

poderiam, de alguma forma, estar interferindo no processo de diferenciação de algumas células. 2- morte de células não diferenciadas. Entre os dias 5 e 12 de diferenciação, o uso do meio CDM3 resulta em discreta morte celular, fato este que não ocorre com o uso do RB+. Essas células podem ser células que, por algum outro motivo, não se diferenciaram em algum progenitor cardíaco e que não conseguem sobreviver no meio de cultura sem tantos suplementos. Após essas adaptações aos protocolos anteriores, alcançou-se eficiência média de diferenciação (87,7%) comparável aos protocolos dos principais grupos que trabalham com esta tecnologia, 80-98% do grupo do Palecek¹⁰⁴ (Wisconsin, EUA) e 95% do grupo de Joseph Wu⁴⁵ (Califórnia, EUA).

O novo protocolo desenvolvido neste projeto foi capaz de eficientemente gerar cardiomiócitos. A Figura 22 permite uma análise superficial dos tipos celulares que compõe essa população de células presentes ao final da diferenciação. A mesendoderme é a primeira mudança que ocorre no protocolo de diferenciação, nesta etapa, as células da mesendoderme podem virar tanto mesoderme como endoderme²⁸. A marcação negativa para mesendoderme (T) mostra que nosso protocolo não permite que células em estágios primários de diferenciação se propaguem em meio às células diferenciadas. Se associarmos esse dado à ausência de expressão de marcadores endodérmicos (*SOX17* e *HNF4A*), pode-se sugerir que este protocolo impede a formação e propagação de células endodérmicas e seus derivados.

Como é descrito na literatura, esses cardiomiócitos são imaturos e precisam de 60 a 180 dias em cultura para amadurecer completamente (expressão de proteínas específicas da banda M)^{35,36}. Por isso, não é estranho que se observem genes marcadores de células progenitoras cardíacas (*ISL1*, *NKX2.5*, *GATA4*, *HAND1* e *MEF2C*), que não são expressos ou possuem baixa expressão em cardiomiócitos maduros, ainda presentes nas células com 30 dias. Entretanto, foi observada a expressão de dois genes marcadores de cardiomiócitos maduros (*MYOM1* e *LCCR39*). Isto evidencia que neste momento do nosso protocolo co-

existem populações de células imaturas e maduras. Para responder melhor essa questão de amadurecimento, o grupo está desenvolvendo ensaios de longa duração para se identificar o momento de amadurecimento total destes cardiomiócitos.

Outro ponto interessante a se destacar e passível de ser inferido através da análise de marcadores moleculares diz respeito à composição celular da população gerada no processo de diferenciação. Três tipos de cardiomiócitos são conhecidos: os ventriculares, os atriais e os nodais. Cada tipo de cardiomiócito possui características específicas, como, por exemplo, proteínas específicas e potenciais de ação de membrana específicos. Os diferentes protocolos de diferenciação geram diferentes proporções de cada um dos tipos, onde o amadurecimento é associado à maior proporção de cardiomiócitos do tipo ventricular^{45 33}. Através da Figura 22, percebe-se que há expressão de marcadores dos três tipos celulares (ventricular: *MYL2*, atrial: *MYL7* e nodal: *HCN4*). Se associarmos a presença de marcadores de progenitores de cardiomiócitos com os dados da Figura 23, onde, em A, vê-se que todas as células marcam para a miosina de cabeça leve ventricular (*MYL2*), o marcador ventricular, acredita-se que este protocolo esteja gerando cardiomiócitos ventriculares em sua grande maioria. Uma análise detalhada da composição da população de cardiomiócitos gerados com este protocolo deverá ser uma das próximas caracterizações a serem realizadas pelo grupo e deverá ser realizada através de citometria de fluxo para os marcadores proteicos específicos para as proteínas ventriculares (*MYL2*, *IRX4* e *Conexina-40*) e para as proteínas atriais-específicas (*SLN*, *ANP* e *Conexina-43*).

Na Figura 24 e Tabela 7, destacam-se ensaios funcionais baseados na resposta ao isoproterenol, um agonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos responsável por aumentar a força e a velocidade de contração. Estes experimentos pontuais demonstraram resposta funcional positiva, mesmo que variável. A análise de função por esta metodologia

deverá ser aprimorada para ser passível de haver comparações entre as diferentes linhagens celulares. Vale lembrar que este não foi o propósito desta avaliação neste projeto.

Dado que os cardiomiócitos gerados neste protocolo exibem resposta funcional, foram realizadas análises para tentativa de modelagem da doença. Desta maneira, foram verificadas características fenotípicas da CH através da comparação dos cardiomiócitos de indivíduos saudáveis x paciente.

Inicialmente foi verificado se os cardiomiócitos dos diferentes clones apresentavam níveis de expressão equivalentes entre si e em comparação com cardiomiócitos adultos de ventrículo esquerdo humano de um indivíduo saudável. Houve grande proximidade na expressão dos clones SS7 e 1176-6.9, coincidentemente os clones que apresentam melhor facilidade diferenciação. Os clones TAY6 e 1176-4.1 apresentaram valores mais variáveis, mas, em todos os casos as células expressavam as proteínas esperadas. Assim como discutido acima sobre a composição celular após a diferenciação, a análise de expressão confirmou a presença dos marcadores dos três tipos de cardiomiócitos, destacando-se: 1- a alta expressão de gene marcador do tipo nodal (*HCN4*) em todos os clones e do tipo atrial/ventricular imaturo (*MYL7*) em todos os clones.

O gene *HCN4* participa do controle da corrente iônica das células pacemakers que regulam o ritmo de contração cardíaca¹¹⁸. Outro gene envolvido com canal iônico e com níveis de expressão próximos aos dos cardiomiócitos ventriculares adultos é o *PLN*, (um regulador da Rianodina) que participa da regulação da entrada do cálcio nas células via retículo sarcoplasmático¹¹⁹.

A figura 25 também confirma a presença de marcadores de cardiomiócitos em desenvolvimento (*GATA4*, *NKX2.5* e *HAND1*) indicando cardiomiócitos imaturos, uma vez que os níveis de expressão destes genes nos quatro clones estão maiores que o de cardiomiócitos

adultos. Estes dados corroboram a hipótese de que com 30 dias de diferenciação há uma mistura de cardiomiócitos imaturos e maduros. A questão de amadurecimento e a composição celular serão estudadas com maior profundidade, posteriormente pelo grupo, utilizando-se técnicas ou compostos já descritos na literatura^{32,33,35,36,120} e utilizando-se mais de um marcador para cada tipo de cardiomiócito.

O primeiro ensaio realizado para visualizar se os cardiomiócitos dos pacientes recapitulavam fenótipos de CH foi a análise de expressão do gene *NPPB* que é sabidamente conhecido como um marcador de hipertrofia cardíaca¹²¹. Assim como em trabalhos anteriores os cardiomiócitos da paciente já apresentava esse marcador aumentado em condições basais^{38,49}. Neste trabalho, também se observou que, mesmo após um estímulo hipertrófico, os níveis de expressão aumentam tanto no indivíduo controle quanto na paciente. Por questões técnicas, foram realizados experimentos apenas em um indivíduo controle (SS7) e um subclone da paciente (1176-6.9). A verificação em todos os (sub)clones, assim como a expansão do painel de marcadores será realizada futuramente. Este tipo de análise permitirá entender mecanismo de ação da doença e permitirá a utilização deste cardiomiócitos como ferramenta para desenvolvimento de novos fármacos.

Por fim, um dos principais fenótipos associados à CH é o desarranjo do sarcômero^{110,122}. Foi verificado que a mutação estudada levava ao desarranjo do sarcômero, visualizada, principalmente, pelos discos-Z malformados ou incompletos. Junto com a análise de expressão de marcadores de hipertrofia, sugerimos que esta ferramenta (cardiomiócitos derivados de CTP induzidas) torna possível recapitular alguns dos fenótipos característicos da CH.

Além disso, esta ferramenta abre diversas oportunidades de aplicações futuras listadas a seguir^{123–125}:

- 1- Determinação da patologia de doenças causadas por alterações genéticas, que poderá ser realizada de duas maneiras: inserindo uma alteração num genoma sem doenças ou corrigindo a alteração no genoma onde ela se encontra.
- 2- Descobrimiento de novos mecanismos da doença. A possibilidade de se gerar grandes quantidades de cardiomiócitos possibilitará que inúmeros ensaios sejam realizados de forma a se avaliar as mais distintas funções cardíacas.
- 3- Determinação de prognóstico e estratificação de risco baseado num fenótipo celular específico e muito bem caracterizado. Entretanto, diversos estudos deverão ser realizados para poder se estabelecer uma correlação confiável entre o fenótipo celular e o fenótipo clínico.
- 4- Descobrimiento e desenvolvimento de novas drogas. Esta aplicação vem sendo chamada de “estudo clínico na placa” ou “estudo clínico *in vitro*”, uma vez que, em posse de diversas células de pacientes com CH, poderiam ser realizados estudos em “high- throughput” para a identificação de novos compostos que agem sobre o fenótipo. Além disso, a eficiência de uma droga poderá ser testada em “diferentes populações” (diferentes background genéticos) numa única placa.
- 5- Uso em medicina regenerativa, que pode ser dividida em teste de drogas ou terapia celular. No teste de drogas, poderia ser testada a resposta dos cardiomiócitos do indivíduo a diferentes remédios de forma a identificar o que traz o melhor efeito. Com relação à terapia celular, estas células poderiam ser utilizadas para reparo cardíaco, entretanto, para isso, faz-se necessário que estas células sejam geradas sem integração viral e de maneira livre de substância de outras espécies.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estabelecido no grupo de pesquisa técnicas de reprogramação de células somáticas em células-tronco pluripotentes induzidas. Posteriormente, foi adaptado um novo protocolo de diferenciação das CTP induzidas em cardiomiócitos. Este protocolo mostrou-se robusto e reprodutível para diferentes linhagens de CTP induzidas além de células-tronco pluripotentes embrionárias.

Os cardiomiócitos gerados se apresentaram como excelente ferramenta para o estudo de mutações genéticas que sabidamente levam à cardiomiopatia hipertrófica por recapitularem alguns fenótipos da doença *in vitro*.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990 Sep 5;62(5):999–1006.
2. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000 Dec 4;343(23):1688–96.
3. McNally E, Dellefave L. Sarcomere mutations in cardiogenesis and ventricular noncompaction. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 Jan 4;19(1):17–21.
4. Hasenfuß G. Sarcomeric Cardiomyopathies: From Bedside to Bench and Back. *Cardiovasc Res*. 2015 Feb 5;
5. Van der Velden J, Ho CY, Tardiff J, Olivotto I, Knollmann BC, Carrier L. Research priorities in sarcomeric cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 2015 Jan 3;
6. Nonaka M, Morimoto S. Experimental models of inherited cardiomyopathy and its therapeutics. *World J Cardiol*. 2014 Dec 5;6(12):1245–51.
7. From A, Maleszewski J, Rihal C. Current Status of Endomyocardial Biopsy. *Mayo Clinic Proceedings*. sciencedirect; 2011;
8. Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang Y-SS, Lebeche D, Arab S, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med*. 2007 Aug 3;13(8):962–9.
9. Gaj T, Gersbach C, III C. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. sciencedirect; 2013;
10. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 5;131(5):861–72.
11. Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. kluwer; 2007;318(5858):1917–20.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 5;126(4):663–76.
13. Nishikawa S, Goldstein R, Nierras C. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(9):725–9.
14. González F, Boué S, Belmonte J. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet*. nature; 2011;12(4):231–42.
15. Mochiduki Y, Okita K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J*. wiley; 2012;7(6):789–97.
16. Somers A, Jean J, Sommer C, Omari A, Ford C, Mills J, et al. Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette. *STEM CELLS*. 2010;28(10):1728–40.
17. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation research*. 2013;112(3):523–33.
18. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*. 2011;8(5):409–12.

19. Murata M, Tohyama S, Fukuda K. Impacts of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapies and drug discovery. *Pharmacol Ther. sciencedirect*; 2010;126(2):109–18.
20. Thomson J. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145–7.
21. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2006;313(5795):1922–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/313/5795/1922.short>
22. Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007 Jan 1;23:45–68.
23. Zanella F, Lyon R, Sheikh F. Modeling heart disease in a dish: From somatic cells to disease-relevant cardiomyocytes. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2014;24(1):3244.
24. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular Regulation of Cardiomyocyte Differentiation. *Circ Res*. 2015 Jan 5;116(2):341–53.
25. Meganathan K, Sotiriadou I, Natarajan K, Hescheler J, Sachinidis A. Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from in-vivo and in-vitro models for the regulation of cardiac development. *International Journal of Cardiology. sciencedirect*; 2015;
26. Mummery C, Zhang J, Ng E, Elliott D, Elefanty A, Kamp T. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes A Methods Overview. *Circulation Research*. 2012;111(3):344–58.
27. BurrIDGE P, Keller G, Gold J, Wu J. Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming. *Cell Stem Cell. sciencedirect*; 2012;10(1):16–28.
28. Tam P, Behringer R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev. sciencedirect*; 1997;
29. Tan K, Eminli S, Hettmer S, Hochedlinger K, Wagers A. Efficient Generation of iPS Cells from Skeletal Muscle Stem Cells. *PLoS ONE*. 2011;6(10).
30. Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, Baharvand H. Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem cells and development*. 2013;22(9):1419–32.
31. Eschenhagen T, Mummery C, Knollmann B. Modeling sarcomeric cardiomyopathies in the dish – from human heart samples to iPSC cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2015;cvv017.
32. Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, et al. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Jul 2;72:296–304.
33. Yang X, Pabon L, Murry C. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation research*. 2014;114(3):511–23.
34. Chan Y-CC, Ting S, Lee Y-KK, Ng K-MM, Zhang J, Chen Z, et al. Electrical stimulation promotes maturation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013 Dec;6(6):989–99.
35. Lundy S, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme M. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem cells and development*. 2013;22(14):1991–2002.

36. Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, et al. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture. *Circ J*. jstage; 2013;77(5):13071314.
37. Sinnecker D, Laugwitz K-L, Moretti A. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development and toxicity testing. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014;143(2).
38. Lan F, Lee A, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen P, Wang L, et al. Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. sciencedirect; 2013;12(1).
39. Zhang G, Wei H, Lu J, Wong P, Shim W. Identification and Characterization of Calcium Sparks in Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*. plos; 2013;8(2).
40. Lee Y-K, Ng K-M, Lai W-H, Chan Y-C, Lau Y-M, Lian Q, et al. Calcium Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011;7(4):976–86.
41. Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MAF, Fu C, et al. Calcium Transients Closely Reflect Prolonged Action Potentials in iPSC Models of Inherited Cardiac Arrhythmia. *Stem Cell Reports*. 2014;3(2):269–81.
42. Sinnecker D, Goedel A, Dorn T, Dirschinger R, Moretti A, Laugwitz K-L. Modeling long-QT syndromes with iPS cells. *J Cardiovasc Transl Res*. springer; 2013;6(1):31–6.
43. Zhang J, Wilson G, Soerens A, Koonce C, Yu J, Palecek S, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research*. 2009;104(4):e30–e41.
44. Rajamohan D, Matsa E, Kalra S, Crutchley J, Patel A, George V, et al. Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. *BioEssays*. 2013;35(3):281–98.
45. BurrIDGE P, Matsa E, Shukla P, Lin Z, Churko J, Ebert A, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature Methods*. 2014;11(8):855–60.
46. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell stem cell* [Internet]. 2011; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590910007034>
47. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez O, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. highwire; 2012;4(130):130ra47.
48. Tse H-FF, Ho JC, Choi S-WW, Lee Y-KK, Butler AW, Ng K-MM, et al. Patient-specific induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of dilated cardiomyopathy due to a novel DES mutation identified by whole exome sequencing. *Hum Mol Genet*. 2013 Apr 1;22(7):1395–403.
49. Han L, Li Y, Tchao J, Kaplan AD, Lin B, Li Y, et al. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 2014 Nov 6;104(2):258–69.
50. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, et al. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2014 Dec 1;3(6):e001263.

51. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung C, Lam J, Bott-Flügel L, et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med.* *nejm*; 2010;
52. Malan D, Friedrichs S, Fleischmann B, Sasse P. Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro. *Circulation research.* 2011;109(8):841–7.
53. Terrenoire C, Wang K, Tung K. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. *The Journal of ...* [Internet]. 2013; Available from: <http://jgp.rupress.org/content/141/1/61.short>
54. Paşca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nature medicine* [Internet]. 2011; Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2576>
55. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca A, Bernstein J, Hallmayer J, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature.* 2011;471(7337):230–4.
56. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;471(7337):225–9.
57. Lahti A, Kujala V, Chapman H, Koivisto A-P, Pekkanen-Mattila M, Kerkelä E, et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Disease models & mechanisms.* 2012;5(2):220–30.
58. Matsa E, Rajamohan D, Dick E, Young L, Mellor I, Staniforth A, et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *European Heart Journal.* 2011;32(8):952–62.
59. Davis R, Casini S, Berg C, Hoekstra M, Remme C, Dambrot C, et al. Cardiomyocytes Derived From Pluripotent Stem Cells Recapitulate Electrophysiological Characteristics of an Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease. *Circulation.* 2012;125(25):3079–91.
60. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiovascular Medicine. *Stem Cells International.* 2011;2011.
61. Ma D, Wei H, Zhao Y, Lu J, Li G, Sahib NB, et al. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 2;168(6):5277–86.
62. Bellin M, Casini S, Davis RP, D’Aniello C, Haas J, Ward-van Oostwaard D, et al. Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome. *EMBO J.* 2013 Dec 3;32(24):3161–75.
63. Yazawa M, Dolmetsch R. Modeling Timothy syndrome with iPS cells. *J Cardiovasc Transl Res.* *springer*; 2013;6(1):1–9.
64. Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K. The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom. *Journal of medical and dental sciences* [Internet]. 2013;60:17–22. Available from: http://lib.tmd.ac.jp/jmd/6001/03_Okata.pdf
65. Mehta A, Sequiera GL. Re-trafficking of hERG reverses long QT syndrome 2 phenotype in human iPS-derived cardiomyocytes. *Cardiovascular ...* [Internet]. 2014; Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/102/3/497.short>

66. Ma Z, Koo S, Finnegan MA, Loskill P, Huebsch N. Three-dimensional filamentous human diseased cardiac tissue model. *Biomaterials* [Internet]. 2014; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213012969>
67. Cerrone M, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H, et al. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*. 2014 Mar 2;129(10):1092–103.
68. Matsa E, Dixon JE, Medway C, Georgiou O. Allele-specific RNA interference rescues the long-QT syndrome phenotype in human-induced pluripotency stem cell cardiomyocytes. *European heart ...* [Internet]. 2013; Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/early/2013/03/06/eurheartj.eht067.short>
69. Fatima A, Xu G, Shao K, Papadopoulos S, Lehmann M, Arnáiz-Cot J, et al. In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;28(4):579–92.
70. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Gepstein A. Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *Journal of the ...* [Internet]. 2012; Available from: <http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1209812>
71. Jung CB, Moretti A. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO molecular ...* [Internet]. 2012; Available from: <http://embomolmed.embopress.org/content/4/3/180.abstract>
72. Kujala K, Paavola J, Lahti A, Larsson K. Cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia reveals early and delayed afterdepolarizations. *PLoS One* [Internet]. 2012; Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044660.g006>
73. Novak A, Barad L, Zeevi-Levin N. Cardiomyocytes generated from CPVT307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. ... *molecular medicine* [Internet]. 2012; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2011.01476.x/full>
74. Zhang X-H, Haviland S, Wei H, Sarić T, Fatima A, Hescheler J, et al. Ca²⁺ signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects. *Cell calcium*. 2013;54(2):57–70.
75. Pasquale DE, Lodola F, Miragoli M, Denegri M. CaMKII inhibition rectifies arrhythmic phenotype in a patient-specific model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cell death & ...* [Internet]. 2013; Available from: <http://www.nature.com/articles/doi:10.1038%2Fcds.2013.369>
76. Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, Delatycki MB. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Reviews and ...* [Internet]. 2011; Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12015-010-9210-x>
77. Hick A, Wattenhofer-Donzé M. Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Disease models & ...* [Internet]. 2013; Available from: <http://dmm.biologists.org/content/6/3/608.short>
78. Lee Y-K, Ho P, Schick R, Lau Y-M, Lai W-H, Zhou T, et al. Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*

- [Internet]. Springer; 2014;466(9):1831–44. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00424-013-1414-x>
79. Dudek J, Cheng IF, Balleininger M, Vaz FM. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem cell* ... [Internet]. 2013; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506113000548>
 80. Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I. Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochemical and* ... [Internet]. 2014; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14007359>
 81. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 2012;34(15):1122–33.
 82. Caspi O, Huber I, Gepstein A, Arbel G. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circulation*: ... [Internet]. 2013; Available from: <http://circgenetics.ahajournals.org/content/6/6/557.short>
 83. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013 Feb 4;494(7435):105–10.
 84. Asimaki A, Kapoor S, Plovie E, Arndt AK. Identification of a new modulator of the intercalated disc in a zebrafish model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Science translational* ... [Internet]. 2014; Available from: <http://stm.sciencemag.org/content/6/240/240ra74.short>
 85. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang Y-SS, Schaniel C, Lee D-FF, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 2010 Jun 4;465(7299):808–12.
 86. Huang HP, Chen PH, Hwu WL. Human Pompe disease induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Human molecular* ... [Internet]. 2011; Available from: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2011/09/15/hmg.ddd424.short>
 87. Ho JC, Zhou T, Lai W-HH, Huang Y, Chan Y-CC, Li X, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. *Aging (Albany NY)*. 2011 Apr 5;3(4):380–90.
 88. Siu C-WW, Lee Y-KK, Ho JC, Lai W-HH, Chan Y-CC, Ng K-MM, et al. Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Aging (Albany NY)*. 2012 Nov 4;4(11):803–22.
 89. Raval KK, Tao R, White BE, De Lange WJ, Koonce CH, Yu J, et al. Pompe Disease Results in a Golgi-based Glycosylation Deficit in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2015 Jan 5;290(5):3121–36.
 90. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002 Mar 3;287(10):1308–20.
 91. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation* [Internet]. *Am Heart Assoc*; 1995;92(4):785–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/92/4/785.short>

92. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic Causes of Sarcomeric Cardiomyopathies: State of the Art. *Cardiovasc Res*. 2015 Jan 4;
93. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003 May 2;107(17):2227–32.
94. Marsiglia JD, Pereira AC. Hypertrophic cardiomyopathy: how do mutations lead to disease? *Arq Bras Cardiol*. 2014 Mar 6;102(3):295–304.
95. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2013 Jan 6;381(9862):242–55.
96. Poirier O, Nicaud V, McDonagh T, Dargie HJ, Desnos M, Dorent R, et al. Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. *Eur J Hum Genet*. 2003 Sep 1;11(9):659–64.
97. Vatner SF. FGF induces hypertrophy and angiogenesis in hibernating myocardium. *Circulation research* [Internet]. 2005; Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/96/7/705.short>
98. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2012 Feb 3;9(2):91–100.
99. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human molecular genetics* [Internet]. 2002; Available from: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/11/20/2499.short>
100. Marsiglia J, Credidio F, Oliveira T, Reis R, Antunes M, Araujo A, et al. Screening of MYH7, MYBPC3, and TNNT2 genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J. sciencedirect*; 2013;
101. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec 6;25(4):402–8.
102. Seabright M. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma*. 1972 Jan 6;36(2):204–10.
103. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jul 2;109(27):E1848–57.
104. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013 Jan 2;8(1):162–75.
105. Laflamme M, Chen K, Naumova A, Muskheli V, Fugate J, Dupras S, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol. nature*; 2007;25(9):1015–24.
106. Zhang J, Klos M, Wilson G, Herman A, Lian X, Raval K, et al. Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells The Matrix Sandwich Method. *Circ Res. highwire*; 2012;111(9):1125–36.
107. Chetty S, Pagliuca F, Honore C, Kweudjeu A, Rezania A, Melton D. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nature Methods*. 2013;10(6):553–6.
108. Tan JY, Sriram G, Rufaihah AJ, Neoh KG, Cao T. Efficient derivation of lateral plate and paraxial mesoderm subtypes from human embryonic stem cells through GSKi-mediated differentiation. *Stem Cells Dev*. 2013 Jul 1;22(13):1893–906.

109. Minami I, Yamada K, Otsuji T, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, et al. A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. *Cell Reports*. 2012;2(5).
110. Tashiro A, Masuda T, Segawa I. Morphometric comparison of mitochondria and myofibrils of cardiomyocytes between hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Vichows Archiv A Pathol Anat*. 1989;416(6):473–8.
111. Medeiros A, Biagi DG, Sobreira TJ, de Oliveira PS, Negrão CE, Mansur AJ, et al. Mutations in the human phospholamban gene in patients with heart failure. *Am Heart J*. 2011 Dec 4;162(6):1088–1095.e1.
112. Santos DG, Medeiros A, Brum PC, Mill JG, Mansur AJ, Krieger JE, et al. No evidence for an association between the -36A>C phospholamban gene polymorphism and a worse prognosis in heart failure. *BMC Cardiovasc Disord*. 2009 Jan 4;9:33.
113. Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 6;16(23):2816–33.
114. Müller F-J, Schuldt BM, Williams R, Mason D, Altun G, Papapetrou EP, et al. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nature methods* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;8(4):315–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nmeth.1580>
115. Caisander G, Park H, Frej K, Lindqvist J, Bergh C, Lundin K, et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. *Chromosome Res*. springer; 2006;
116. Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Human Reproduction Update*. highwire; 2007;
117. Chen G, Gulbranson D, Hou Z, Bolin J, Ruotti V, Probasco M, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. nature; 2011;8(5):424–9.
118. Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J*. wiley; 1999;
119. Brittsan A, Kranias E. Phospholamban and Cardiac Contractile Function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. sciencedirect; 2000;
120. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, et al. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Research*. 2011;22(1):219–36.
121. Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. National Acad Sciences; 2000;97(12):6745–50. Available from: <http://www.pnas.org/content/97/12/6745.short>
122. Pearce PC, Hawkey C, Symons C, Olsen EG. Role of calcium in the induction of cardiac hypertrophy and myofibrillar disarray. *Experimental studies of a possible cause of hypertrophic cardiomyopathy*. *British heart journal* [Internet]. BMJ Publishing Group Ltd and British Cardiovascular Society; 1985;54(4):420–7. Available from: <http://heart.bmj.com/content/54/4/420.short>
123. Sarić T, Halbach M, Khalil M, Er F. Induced pluripotent stem cells as cardiac arrhythmic in vitro models and the impact for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2014 Jan 3;9(1):55–76.

124. Sharma A, Wu JC, Wu SM. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for cardiovascular disease modeling and drug screening. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Jan 2;4(6):150.
125. Mercola M, Colas A, Willems E. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular drug discovery. *Circ Res.* 2013 Feb 5;112(3):534–48.

ANEXO 1

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

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

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

2.RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Uso de células iPS (induced pluripotent stem) para compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base genética.

.....

PESQUISADOR : José Eduardo Krieger.....

CARGO/FUNÇÃO: Diretor LGCM – Incor.....INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 61539...

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Cardiologia e Genética Molecular – Incor – HC - FMUSP.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

☒

RISCO MÉDIO

☐

RISCO BAIXO

☐

RISCO MAIOR

☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36.....

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

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa. Este projeto tem como objetivo estudar como mudanças nas células do coração podem interferir em seu bom funcionamento. Essas mudanças nas células podem ocorrer por alterações no material genético (DNA) e estão presentes em 1 a cada 500 indivíduos da população geral. Diferentes alterações podem levar a diferentes problemas cardíacos como Cardiopatia Hipertrófica, Dilatada ou Congênita. Você foi escolhido(a) para participar deste projeto porque teve uma alteração no exame das células que não é encontrado frequentemente. Neste projeto vamos estudar um tipo de célula semelhante às células de seu coração. O objetivo do estudo é saber como a alteração no seu material genético (DNA) vai levar à mudanças na célula do coração e consequentemente à doença do coração.

Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação

dos procedimentos que são experimentais:

Coleta de sangue: a coleta de sangue será realizada no braço com uma pequena agulha própria para o procedimento. O local será anestesiado e cuidadosamente limpo para se evitar infecção.

Biópsia de pele: será feita uma pequena incisão através de uma agulha de ponta arredondada que irá retirar um pequeno fragmento de aproximadamente 3mm da pele da porção anterior do antebraço (região que tem menor quantidade de vasos sanguíneos). Antes da realização dessa punção de pele o local será cuidadosamente limpo para se evitar infecção e a pele será anestesiada no local, para que o Sr(a), não sintam dor.

Tanto as células do sangue, quanto as da pele terão como propósito ser o ponto de partida para uma provável obtenção final de uma célula do coração.

Desconfortos e riscos esperados:

Coleta de sangue: Os desconfortos mais comuns que podem ocorrer são os mesmos de uma coleta de sangue no braço, como, por exemplo, leve dor no local da punção e eventualmente leve hematoma.

Biópsia de pele: O local será anestesiado e limpo durante o procedimento para se evitar infecção, entretanto, poderá ocorrer infecção local, porém caso o Sr(a) manipule o local após o procedimento poderá haver infecção. O Sr(a) poderá sentir um pequeno ardor no momento da aplicação da agulha com anestésico, que passará rapidamente com a infusão do líquido de anestésico na pele. Também pode apresentar uma sensação de formigamento no momento da aplicação da anestesia, que também passará rapidamente. Durante o processo de cicatrização o Sr(a) deve manter o curativo (ponto falso) para que as bordas da cicatriz não se abram e evite tanto infecção, quanto a formação de um tecido fibroso no local (queloide). Uma pequena marca cicatricial, de 3mm, pode aparecer no local. Esse procedimento é considerado de muito baixo risco.

**ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO
SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Este material será encaminhado ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor onde será armazenado somente para a pesquisa. Dados de seus prontuários resgistrado no hospital poderão ser consultados.

2. O senhor terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

3. Sua participação é totalmente voluntária. O senhor terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da sua assistência. Para tal, basta entrar em contato com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (telefone (11) 26615543).

4. Os resultados de seu exame serão guardados e não fornecidos a ninguém, garantindo a sua privacidade.

5. No caso de intercorrências, a equipe envolvida no estudo assumirá a responsabilidade de prestar a assistência médica necessária ao(a) senhor(a). O principal investigador é o Dr Alexandre da Costa Pereira, que pode ser encontrado no endereço Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 44, Instituto do Coração, Bloco 2. 10 andar, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, telefone (11) 2661 5543. As intercorrências que necessitem de intervenções médica no momento da biópsia de pele deverão ser realizadas de imediato pela Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves – Médica Assistente da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração, HC-FMUSP, telefone: 11-26615043.

6. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos,

225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br. Poderá também solicitar a destruição das amostras de DNA que estarão armazenadas no mesmo laboratório.

7. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

8. No momento, não existe previsão institucional de indenização para eventuais danos a saúde do(a) senhor(a) decorrentes do estudo. Entretanto, nos comprometemos a dar assistência médica necessária ao(a) senhor(a) para sanar quaisquer danos à sua saúde decorrente do estudo.

9. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Como este projeto envolve o estudo de alterações que podem estar presentes em outros membros da sua família, estes também poderão ser convidados a participar desta pesquisa. Não há benefício direto para o participante. O material a ser coletado será utilizado apenas para a pesquisa envolvendo o entendimento de como a alteração genética leva ao problema cardíaco. Sua participação nesta pesquisa poderá ajudar no entendimento do funcionamento da doença e possivelmente ajudar no descobrimento de possíveis formas de tratamento. Obrigado!

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Uso de células iPS (induced pluripotent stem) para compreensão de alterações em cardiomiócitos de pacientes com cardiomiopatias de base genética.” Eu discuti com o Dr. José Eduardo Krieger sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____