

Jennifer Adriane dos Santos

**Avaliação das propriedades fenotípicas de
células cardíacas cultivadas em micropadrões**

São Paulo

2023

Jennifer Adriane dos Santos

**Avaliação das propriedades fenotípicas de
células cardíacas cultivadas em micropadrões**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Jennifer Adriane dos
Avaliação das propriedades fenotípicas de células
cardíacas cultivadas em micropadrões / Jennifer
Adriane dos Santos. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: Adriano Mesquita Alencar.

Descritores: 1.Cardiomiócitos 2.Célula-tronco
pluripotente induzida 3.Reologia 4.Microtecnologia
5.Fenótipo 6.Microscopia de força de tração

USP/FM/DBD-086/23

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por me guiar, iluminar e me dar forças para seguir em frente com os meus objetivos.

À minha mãe Maria Célia dos Santos, uma mulher forte e guerreira, minha fonte de admiração, cujo incentivo e apoio constantes me motivam em todas as minhas conquistas, e pela qual sou eternamente grata, pela educação e amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar, que muito me ensina, e abriu as portas do seu laboratório - LabM². Sempre motivando a ampliação de meu conhecimento, proporcionando novas perspectivas científicas e intelectuais. Agradeço por todo apoio e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe.

À minha Família e Amigos, que acreditaram e me incentivaram desde o início, acompanhando minhas vitórias, derrotas e aprendizado. Agradeço a todos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

Às queridas amigas Adriana Valerio, Isis Vasconcelos e Mariana Sacrinni, que prestaram grande apoio e estiveram sempre ao meu lado, em todos os momentos.

À toda equipe do Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular: Alveriane, Natalia, Rodrigo, Alexandre, Marcel, Juan, Diogo, Christopher, Julia, Yan, Arthur, Luiz, Matheus, Ricardo, e em especial ao Antonio pela contribuição pessoal, profissional, intelectual e humana acima de tudo. Agradeço ainda pela amizade, apoio, cumplicidade e harmonia de nossa equipe.

À Professora Ligia Ferreira Gomes, que sempre me apoiou e me ajudou, me apresentou ao laboratório e contribuiu no meu desenvolvimento científico e pessoal.

Agradeço aos pesquisadores Diogo Biagi e Estela Cruvinel, da empresa Pluricell Biotech e seus colaboradores Marcos, Juliana, Sirlene, Carla, Rafaella pela parceria e apoio no fornecimento das células e as discussões científicas.

Agradeço aos pesquisadores do InCor que nos forneceram materiais e células de músculo cardíaco para alguns trabalhos desenvolvidos no laboratório LabM²: Élida Neri, Prof. J. E. Krieger. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por aceitar ser meu orientador provisório, quando ingressei no programa de pós graduação de Ciências Médicas da FMUSP, pela atenção e apoio durante todo processo.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Agradeço às secretárias do Programa de Pós Graduação, Angelica e Rose, pela seriedade, compromisso e suporte dado a mim, ao longo desses anos.

Agradeço ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, e seus funcionários: Valdir, Fátima, Bianca, Edineusa e Evandro, por todo o suporte dado a mim e ao grupo ao longo desses anos de trabalho, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

Agradeço às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento concedido ao laboratório.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), responsável pelo suporte financeiro, concedendo a bolsa de doutorado, processo nº 2018/20910-5 e os recursos necessários ao desenvolvimento deste projeto, bem como outros do laboratório.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Santos JA. Avaliação das propriedades fenotípicas de células cardíacas cultivadas em micropadrões [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Dentre os diversos problemas considerados quando estudamos as propriedades reológicas de células vivas, podemos citar a caracterização mecânica e a resposta das células cardíacas, em especial, os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CMs), tema com forte apelo científico e poucos trabalhos encontrados na literatura. É conhecido que a regulação ativa das forças celulares durante a adesão, desempenha um papel importante na determinação do tamanho, forma e estrutura interna das células. Para isso, foi criado um protocolo geral de aplicação, onde foram realizadas medidas de força de tração através de técnicas reológicas como a Microscopia de Força de Tração (TFM) e a aplicação de estimulação elétrica (EE) para sincronizar a contração dos hiPSC-CMs aderidos sobre os micropadrões (MPs), que consiste em um método de produção de padrões microscópicos para o confinamento de células, com o objetivo de entender os mecanismos funcionais nos quais as células comportam-se e respondem ao microambiente que a circunda. Para tanto, utilizamos substratos de poliacrilamida para produzir micropadrões de Geltrex (GTX) e Laminina (LAM), incorporados através de um molde de Polidimetilsiloxano (PDMS) para caracterizar o efeito desses estímulos aplicados nos hiPSC-CMs com o objetivo de avaliar a mecânica do fenótipo celular, através da determinação das propriedades de força de tração, poder de contração e morfologia dessas células. Neste estudo, foram estudadas um total de 72 células divididas em 8 grupos a seguir: (1) células cultivadas em MPs utilizando a matriz de LAM; (2) cultivadas em MPs utilizando GTX; (3) cultivadas em LAM sem MPs; (4) cultivadas em GTX sem MPs. Adicionalmente, foi utilizado o estimulador elétrico em cada grupo, perfazendo ao final, um total de 8 grupos estudados. O uso dos MPs ocasionou um aumento no grau de alinhamento dos hiPSC-CMs e após aplicar os estímulos elétricos a tração quadrática média dos hiPSC-CMs diminuiu em 87 % das células analisadas.

Palavras-chave: Cardiomiócitos. Célula-tronco pluripotente induzida. Reologia. Microtecnologia. Fenótipo. Microscopia de força de tração.

ABSTRACT

Santos JA. Evaluation of the phenotypic properties of cardiac cells cultured in micropatterns [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Among the various problems considered when studying the rheological properties of living cells, we can mention the mechanical characterization and response of cardiac cells, in particular, cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC-CMs), a topic with strong scientific appeal and few papers found in the literature. It is known that the active regulation of cellular forces during adhesion plays an important role in determining the size, shape, and internal structure of cells. To this end, a general application protocol was created, where tensile force measurements were performed using rheological techniques such as Traction Force Microscopy (TFM) and the application of electrical stimulation (EE) to synchronize the contraction of the adhered hiPSC-CMs on micropatterns (MPs), which consists of a method of producing microscopic patterns for the confinement of cells, to understand the functional mechanisms in which the cell behaves and responds to the surrounding microenvironment. To this end, we used polyacrylamide substrates where Geltrex (GTX) and Laminin (LAM) micropatterns were produced and incorporated through a Polydimethylsiloxane (PDMS) mold to characterize the effect of these stimuli applied to hiPSC-CMs to evaluate the mechanics of the cell phenotype by determining the tensile strength properties, contraction power and morphology of these cells. In this study, a total of 72 cells divided into 8 groups were studied as follows: (1) cells cultured in MPs using LAM matrix; (2) cultured in MPs using GTX; (3) cultured in LAM without MPs; (4) cultured in GTX without MPs. In addition, the electrical stimulator was used in each group, making a total of 8 groups studied. The use of MPs caused an increase in the degree of alignment of hiPSC-CMs and after applying the electrical stimuli the mean quadratic traction of hiPSC-CMs decreased in 87 % of the analyzed cells.

Keywords: Cardiomyocytes. Induced pluripotent stem cell. Rheology. Microtechnology. Phenotype. Traction force microscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da técnica de MPs em gel de poliacrilamida. A matriz de proteína é depositada no molde de PDMS. Em seguida, remove-se o excesso de matriz e elas são impressas na lamínula. Após a impressão, a matriz é transferida para a superfície de gel de poliacrilamida preparada na placa de fundo de vidro silanizada com microesferas fluorescentes incorporadas. Quando o gel de poliacrilamida estiver polimerizado, a lamínula é removida com cuidado e o MP está pronto para o cultivo celular. Figura adaptada de Ribeiro *et al.*, 2015. (a) Imagens de microscopia de campo claro do molde de PDMS com as geometrias retangular, (b) Imagem fluorescente do MP impresso no gel de poliacrilamida com a matriz. *Scale bar* 100 μm5
- Figura 2:** Esquema da técnica de desenvolvimento dos hiPSC-CMs. Imagem adaptada de Murata *et al.*, 2010.....6
- Figura 3:** Esquema da morfologia da sinalização de cálcio em cardiomiocitos adultos (CM) comparados a hiPSC-CMs. Adaptado dos artigos Robertson *et al.*, 2013 e Li *et al.*, 2013.....7
- Figura 4:** Esquema de técnicas de Microrreologia adaptado de Marita L. Rodriguez, Patrick J. McGarry, Nathan J. Sniadecki 2013.8
- Figura 5:** Esquema representativo do experimento de TFM adaptado de Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Aguilar-Cuenca, R. *et al.*, 2017.....9
- Figura 6:** Delineamento das estratégias experimentais para criação de um protocolo de produção dos MPs e aplicação de métodos reológicos para quantificar a força de contração, amplitude e avaliar o alinhamento das fibras dos hiPSC-CMs.....13
- Figura 7:** Molde confeccionado em superfície de PDMS. (a) Desenhos dos diferentes padrões realizados no AutoCAD® (b) molde inicial, (c) moldes individualizados (d) imagens de microscopia de campo claro (ampliação de 10x) do molde de PDMS com as geometrias do micropadrão retangular 7:1. A área total é de 2000 μm^2 para cada padrão e o espaçamento entre um padrão e outro é de 100 μm . (e) carimbos de apoio dos moldes desenvolvidos no software AutoCad®, impressos em uma impressora 3D e (f) molde de PDMS acoplado no carimbo..... 14

Figura 8: Esquema do preparo do MPs. Após o preparo, as matrizes de LAM e GTX foram pipetadas nos moldes de PDMS e permaneceram por 60 min, em seguida os moldes foram lavados 2 vezes com PBS e secados com N₂. Após a secagem, os moldes foram carimbados nas lamínulas de vidro e transferidos para o gel de poliacrilamida, que foi preparado e adicionado na placa de petri com fundo de vidro e as lamínulas carimbadas com LAM e GTX foram invertida e colocadas em cima do gel de camada única. As placas foram centrifugadas por 20 min a temperatura de 10 °C com uma rotação de 78 G por 20 min e por mais 20 min a temperatura de 20 °C. Após a centrifugação, as placas foram levadas para o fluxo laminar, as lamínulas foram retiradas e o gel foi lavado 2 vezes com PBS e em seguida foi realizada a ativação do gel com Sulfo-SANPHA por 20 min na luz UV. Após a ativação, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS e levadas para a incubadora por 60 min.....17

Figura 9: Esquema do plaqueamento e manutenção dos hiPSC-CMs e das técnicas experimentais utilizadas.....18

Figura 10: Microscópio de TFM. Aparato experimental de TFM que foi utilizado para avaliar as tensões aplicadas por hiPSC-CMs cultivados sobre um substrato flexível. O TFM consiste de um microscópio Leica DMI4000 com incubadora associada, o que permite a reproduzir as condições essenciais para manutenção das células (ambiente com 5 % de CO₂ e temperatura de 37° C).21

Figura 11: Estimulador elétrico desenvolvido no LabM², que foi utilizado para avaliar as tensões aplicadas por cardiomiócitos cultivados sobre um substrato flexível. (a) Estimulador elétrico, (b) suas conexões com os componentes eletrônicos e (c) esquema simplificado da comunicação do sistema do estimulador elétrico.22

Figura 12: Estimulador elétrico acoplado no microscópio do TFM Leica DMI4000, com incubadora associada, o que permite a reproduzir as condições essenciais para manutenção das células (ambiente com 5 % de CO₂ e temperatura de 37° C). Em destaque, o suporte de duas placas de aço cirúrgico, montado em impressora 3D, acoplado no microscópio TFM.22

Figura 13: Esquema simplificado da captura das medidas de TFM e EE no tempo.....23

Figura 14: MPs no gel de poliacrilamida, (a) molde impresso no gel de poliacrilamida com a matriz LAM; (b) molde impresso no gel de poliacrilamida com a matriz GTX; (c) molde impresso no gel de poliacrilamida com o formato de pista. *Scale bar* 100 µm.....26

Figura 15: (a) imagem campo claro hiPSC-CMs sem MPs, (b) imagem campo claro hiPSC-CMs aderido no MPs, (c) imagem fluorescente dos MPs. Imagem adquirida no microscópio Leica objetiva 20x. *Scale bar* 100 μm27

Figura 16: Imagens fluorescentes dos hiPSC-CMs, (a) hiPSC-CMs cultivados com LAM em MPs, (b) hiPSC-CMs cultivados em LAM sem MPs, (c) hiPSC-CMs cultivados com GTX em MPs, (d) hiPSC-CMs cultivados com GTX sem MPs. Imagens adquiridas em microscópio Leica, objetiva 40x com óleo de imersão. *Scale bar* 20 μm28

Figura 17: Gráfico do grau de alinhamento das fibras (parâmetros: *box counting* 16 e lim 0,7). Grupos L e G, são estatisticamente diferentes dos grupos LM e GM. Ou seja, os MPs aumentaram o grau de alinhamento ($p < 0,05$).....29

Figura 18: Mapa de tração comparativo entre grupos e gráficos da força de tração quadrática média dos hiPSC-CMs no tempo para avaliar o efeito do MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM comparado com (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE comparado com (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX comparado com (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE comparado com (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagens obtidas do microscópio Leica DMI4000.....32

Figura 19: Mapa de tração comparativo intragrupos e gráficos da força de tração quadrática média dos hiPSC-CMs no tempo para avaliar o efeito do EE. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagens obtidas do microscópio Leica DMI4000.....33

Figura 20: Mapa de tração *presstresed*. Gráficos *boxplot* da média das forças de tração dos hiPSC-CMs para avaliar o efeito da MATRIZ (LAM e GTX), do EE e dos MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem micropadrão após a EE. Imagem obtida do microscópio Leica DMI4000.....35

Figura 21: Mapa de tração normalizado pelo valor mínimo como referência. Gráficos *boxplot* da média das forças de tração dos hiPSC-CMs para avaliar o efeito da MATRIZ (LAM e GTX), do EE e dos MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MP, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagem obtida do microscópio Leica DMI4000.....37

Figura 22: Gráfico do delta de tração após a EE. À esquerda observamos os valores obtidos e à direita a ampliação dos mesmos.....39

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Representativo estatístico dos grupos de acordo com a média da tração quadrática normalizada pela área e pelo valor de tração mínima como referência <i>versus</i> média normalizada pela área..... | 38 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – *Atomic Force Microscopy*

APS – Persulfato de Amônia

CO₂ – Dióxido de Carbono

ECM – *Extracellular Matrix*

EE – Estímulo Elétrico

EOL – *Electronics Optics Lasers for Biological and Medical Research*

GTX – Geltrex

LABM² – Laboratório de Microrreologia

LAM – Laminina

MEC – Matriz Extra Celular

MMS – Meio de Manutenção Suplementado

MP – Micropadrão

N₂ – Nitrogenio

OMTC – *Optical Magnetic Twisting Cytometry*

PBS – Phosphate Buffered Saline

PDMS – Polidimetilsiloxano

PMS – Meio de Plaqueamento Suplementado

RGD – *Arginine-Glycine-Aspartic Acid*

Ri – *Rock inhibitor*

TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TFM – *Traction Force Microscopy*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 Micropadrão (Micropatterning) | 4 |
| 1.2 Cardiomiócitos hiPSC | 5 |
| 1.3 Citoesqueleto | 6 |
| 1.4 Microrreologia | 8 |
| 1.4.1 Microscopia de Força de Tração (TFM) | 9 |
| 2 OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 Objetivos Específicos | 11 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 3.1 Micropadrões (<i>Micropatterning</i>) | 13 |
| 3.2 Preparo do Gel de Poliacrilamida e das matrizes no carimbo de PDMS | 15 |
| 3.3 Obtenção e manutenção dos cardiomiócitos hiPSC-CMs | 17 |
| 3.4 Fluorescência para análise morfológica e quantificação do grau de alinhamento das fibras | 19 |
| 3.5 Microscopia de Força de Tração (TFM) | 20 |
| 3.6 Estímulos Elétricos | 21 |
| 3.7 Análise estatística | 23 |
| 4 RESULTADOS | 25 |
| 4.1 Confecção e impressão dos micropadrões | 25 |
| 4.2 Adesão e manutenção dos hiPSC-CMs | 27 |
| 4.3 Análise morfológica e quantificação do alinhamento das fibras | 28 |
| 4.4 Análise TFM e EE | 30 |
| 5 DISCUSSÃO | 41 |
| 6 CONCLUSÃO | 45 |
| 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 47 |
| 8 REFERÊNCIAS | 49 |
| 9 ANEXOS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O fenótipo celular está intimamente relacionado com as propriedades mecânicas e morfológicas, bem como os aspectos fisiológicos e bioquímicos da célula, sendo objeto de grande interesse científico. A mecânica do fenótipo celular, mais especificamente as propriedades de viscosidade relativas à deformação, ou seja, elasticidade e contração, incluindo a interação da célula com o ambiente extracelular, podem ser estudadas através de técnicas microrreológicas e de microengenharia.

Técnicas de microengenharia fornecem ferramentas para modificar as propriedades químicas de substratos de cultura de células, podendo ser utilizadas para restringir a localização e a forma das regiões de substrato, os chamados micropadrões (MPs - *micropatterning*) (1–3). O recente progresso nas técnicas de micropadrões permitiu o controle da maioria dos parâmetros cruciais do microambiente celular. Os micropadrões podem fornecer um microambiente moldável, tridimensional e dinâmico em escala micrométrica para células individuais ou para estruturas multicelulares. A utilização dessa técnica cria um ambiente mais próximo às condições biológicas, sendo uma ferramenta de estudo rápida e mais exata para a compreensão dos mecanismos biológicos, ação de drogas e pesquisa de reações bioquímicas (4–6). Esta abordagem provou ser fundamental na demonstração da importância da geometria, da forma celular, e do citoesqueleto na distribuição de forças e mecanotransdução (7,8).

Células do músculo cardíaco, ou cardiomiócitos, constituem a estrutura fundamental e unidade funcional do coração, sendo a caracterização de suas propriedades fenotípicas de fundamental importância, uma vez que as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes a nível mundial. Uma característica interessante é o fato de cardiomiócito contrair-se, mesmo em meio de cultura, de forma similar ao que ocorre no coração. Diversos trabalhos foram desenvolvidos na intenção de medir propriedades mecânicas dessas células, como as forças de contração, a frequência e a duração do período de contração (9,10).

Cardiomiócitos são as células responsáveis pela força contrátil do músculo cardíaco e a maioria dos distúrbios cardíacos deve-se à sua redução de atividade. Atualmente, as estratégias terapêuticas são paliativas e têm sucesso limitado em melhorar a morbidade e reduzir a mortalidade (11). Na última década, a geração de modelos de doenças cardíacas baseados em células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CMs) obtidas de células

somáticas, tornou-se de uso comum, proporcionando novas oportunidades para superar a falta de modelos cardíacos apropriados. Por essas razões, a criação de novos modelos de estudo é uma tarefa de suma importância, pois permitirão um melhor entendimento do surgimento, progressão e mecanismos moleculares de diversas doenças, abrindo caminho para novas abordagens terapêuticas (12–14).

Assim como as propriedades intrínsecas dos cardiomiócitos, as propriedades do microambiente desse tipo celular são cruciais para a regulação de suas funções; além de apresentarem um papel fundamental na configuração da organização intracelular, também atuam na expressão gênica e na diferenciação celular. Composto pela matriz extracelular (MEC) e as células vizinhas, este microambiente impõe condições específicas que influenciam sua estrutura, atividade mecânica, e a função celular. Sua composição bioquímica e rigidez determinam os fatores envolvidos nos mecanismos de adesão e afetam as vias de sinalização intracelulares, bem como a montagem e a dinâmica das redes do citoesqueleto (2,3,15). No entanto, estas propriedades importantes do microambiente celular são anuladas em condições clássicas de cultura de células. Em uma placa de Petri, as células encontram um substrato de adesão homogêneo, plano, rígido e tem poucas semelhanças com o microambiente *in situ*, mesmo com todas essas limitações, tais condições têm sido utilizadas para estimular o crescimento celular e manter as células vivas fora de seu tecido de origem (15).

A comunicação célula-célula é essencial para o crescimento, desenvolvimento e função, e é geralmente atribuída a uma origem química ou elétrica. No entanto, as células podem exercer forças e responder à elasticidade do ambiente e às deformações mecânicas criadas pelas células vizinhas. Todavia, ainda não está claro até que ponto essa capacidade de mecanossensibilização facilita a comunicação intercelular (16–18). Estudos nessa linha envolvem estímulos externos controlados que se dividem em dois grupos: elétricos e mecânicos. A estimulação elétrica em cardiomiócitos pode ser utilizada para direcionar o crescimento celular e promover o alinhamento ao longo da direção do campo elétrico aplicado (19,20). Os parâmetros da estimulação do campo elétrico aplicado, por exemplo, duração, frequência e amplitude, são cruciais na modulação da função contrátil dos hiPSC-CMs. Alguns estudos demonstraram que após receberem um estímulo elétrico, os hiPSC-CMs apresentaram uma melhora na organização intracelular, na tensão intra e extracelular e no comprimento dos microfilamentos. Semelhante aos efeitos da estimulação elétrica, a estimulação mecânica também resulta na diferenciação do desenvolvimento de características dos cardiomiócitos, incluindo organização de sarcômeros, formação de junções célula-célula

(junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos), bem como a produção de força aumentada e potenciais de ação (21,22).

Existem várias questões em aberto que podem ser consideradas, quando se trata de estudar as propriedades microrreológicas de células vivas, no nosso caso específico, hiPSC-CMs. Uma dessas questões que iremos elucidar nesse projeto, é a caracterização mecânica e a resposta dessas células, a um estímulo externo, tema com forte apelo científico e poucos trabalhos encontrados na literatura. Nossa hipótese principal é que os métodos de MPs devem aumentar a sensibilidade, melhorar o nível de automação dos experimentos, controlando melhor os pontos de adesão focal dos hiPSC-CMs padronizando a sua forma. Também acreditamos que a metodologia dos MPs irá facilitar o amadurecimento dos hiPSC-CMs e a análise dos resultados de TFM após a integração dos estímulos elétricos.

1.1 Micropadrão (*Micropatterning*)

As técnicas de microengenharia fornecem ferramentas para modificar as propriedades químicas de substratos de cultura de células em escalas subcelulares. Eles podem ser usados para restringir a localização e a forma das regiões do substrato, nas quais as células podem se fixar, os chamados micropadrões (MPs). O progresso recente nas técnicas de micropadronização permitiu o controle da maioria dos parâmetros cruciais do microambiente celular. MPs podem fornecer um microambiente em escala micrométrica, tridimensional e dinâmico para células individuais ou para estruturas multicelulares. Embora artificial, substratos micropadronizados permitem a reconstituição de condições fisiológicas *in situ* para cultura de células *in vitro* controladas e têm sido usados para estudar processos morfogenéticos celulares fundamentais, tais como, proliferação e diferenciação, migração estrutura do citoesqueleto, dentre outros (3,4,15,23–25).

Ao manipular formas de MPs, as células mostraram que adaptam-se com precisão a arquitetura do seu citoesqueleto à geometria de seu microambiente. A remodelação das redes de actina e microtúbulos participam da adaptação de toda a polaridade celular em relação às restrições externas (6,26,27). Técnicas de micropadronização foram desenvolvidas há mais de 50 anos, porém só popularizaram-se nas últimas décadas, com a tecnologia de impressão por microcontato que consiste na utilização de um carimbo de Polidimetilsiloxano (PDMS), com uma microgeometria de interesse, para imprimir proteínas de matriz extracelular em um

substrato flexível (Fig. 1) (15,28–31). Existem diversos tipos de matrizes que podem ser aplicadas para a confecção dos MPs como a fibronectina, colágeno, matrigel, laminina, geltrex, entre outros. No presente estudo, foram utilizadas as matrizes de laminina (LAM) que é uma glicoproteína de membrana basal e tem como função regular a adesão, a migração, o crescimento e a diferenciação celular, pois interage com receptores de integrinas, e a de geltrex (GTX) que é uma matrix extraída a partir de tumor de murinos Engelbreth-Holm-Swarm, composta por laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicanas, favorecendo a adesão e o crescimento celular.

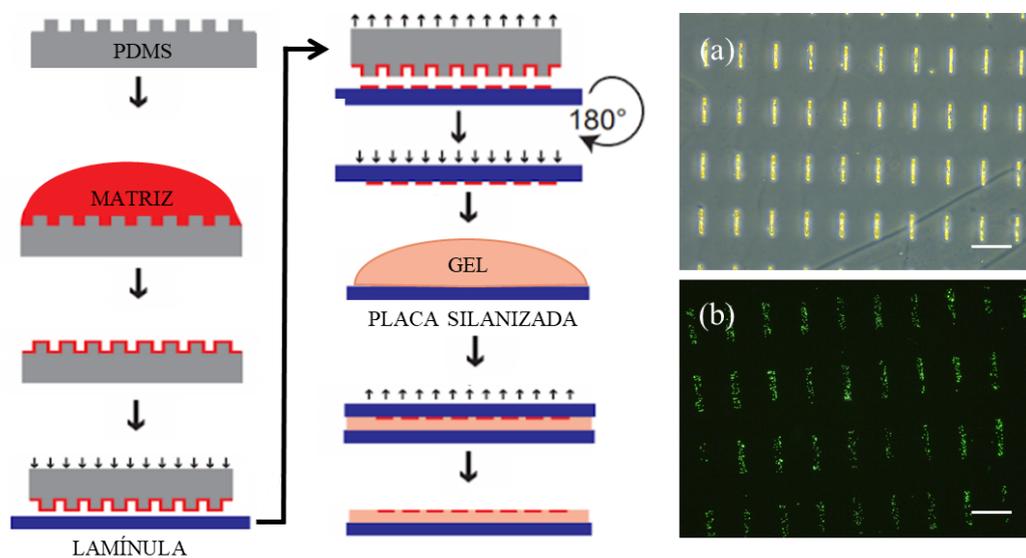


Figura 1: Esquema da técnica de MPs em gel de poliacrilamida. A matriz de proteína é depositada no molde de PDMS. Em seguida, remove-se o excesso de matriz e elas são impressas na lamínula. Após a impressão, a matriz é transferida para a superfície de gel de poliacrilamida preparada na placa de fundo de vidro silanizada com microesferas fluorescentes incorporadas. Quando o gel de poliacrilamida estiver polimerizado, a lamínula é removida com cuidado e o MP está pronto para o cultivo celular. Figura adaptada de Ribeiro *et al.*, 2015. (a) Imagens de microscopia de campo claro do molde de PDMS com as geometrias retangulares, (b) Imagem fluorescente do MP impresso no gel de poliacrilamida com a matriz. Scale bar 100 µm.

1.2 Cardiomiócitos hiPSC

As células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) são células reprogramadas que apresentam características semelhantes às células-tronco embrionárias, como a capacidade de

autorrenovação e diferenciação em vários tipos de células, incluindo cardiomiócitos. As hiPSCs foram descritas por Takahashi e Yamanaka em 2007 onde, demonstraram a possibilidade de reprogramar células somáticas adultas (fibroblastos humanos) para uma condição pluripotente através da superexpressão de quatro fatores de transcrição - OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC (32,33). Os fatores de pluripotência suprimem gradualmente a expressão de genes que estão associados à função das células somáticas, diminuindo a diferenciação e ativando a expressão de fatores de pluripotência de células-tronco endógenas. Dentro de semanas, a expressão do gene alterado reprograma as células somáticas para adquirir características morfológicas, moleculares e funcionais semelhantes às células-tronco embrionárias (Fig. 2)(34).

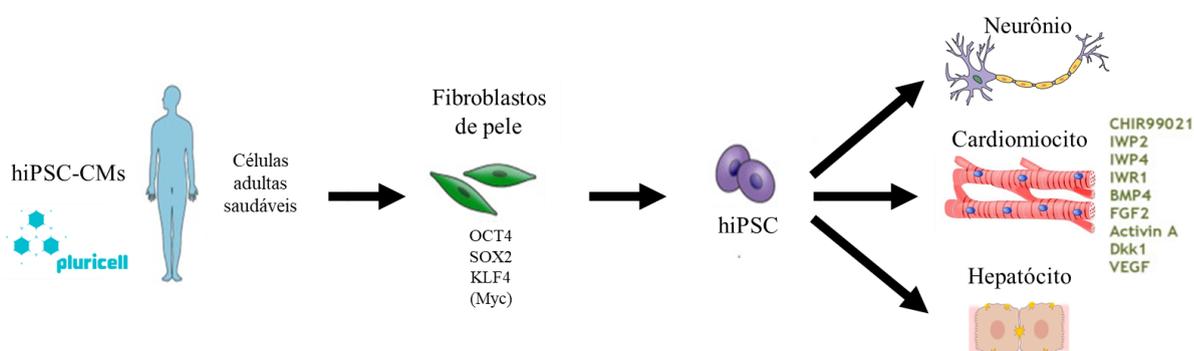


Figura 2: Esquema da técnica de desenvolvimento dos hiPSC-CMs. Imagem adaptada de Murata *et al.*, 2010.

1.3 Citoesqueleto

O citoesqueleto desempenha três funções importantes: organizar espacialmente o conteúdo da célula, conecta a célula fisicamente e bioquimicamente ao ambiente externo, e gerar forças coordenadas que permitem que a célula mova-se e modifique sua forma (35). Para atingir essas funções, o citoesqueleto integra a atividade de uma infinidade de proteínas e organelas citoplasmáticas, regulando a forma da célula e influenciando a migração, função celular e homeostase. Os receptores de integrina transmembrana fornecem uma ligação mecânica direta entre a matriz extracelular (ECM) e o citoesqueleto, através da qual forças físicas externas podem influenciar os processos intracelulares, esses sinais mecânicos provocam uma série de respostas biológicas que vão desde a atividade do canal iônico até a morte celular programada

e, por sua vez, esses processos biológicos podem alimentar as informações de volta para o espaço extracelular por meio da mesma via mecânica (36,37).

Os hiPSC-CMs, apresentam um desenvolvimento imaturo quando comparado com cardiomiócitos adultos (CMs) e morfologicamente, os hiPSC-CMs são semelhantes a cardiomiócitos embrionários. Quando comparamos o amadurecimento, sua morfologia transita de uma forma circular para um forma mais retangular, o sarcômero e as bandas Z aumentam em comprimento, tornando-se alinhado ao longo do eixo celular, mesmo apresentando uma morfologia mais alongada, após um longo tempo em cultura, sua expressão gênica, proteica e o fenótipo permanecem imaturos. (38–41) Os hiPSC-CMs tendem a ser pequenos, mononucleados e arredondados, com sarcômeros mais curtos e desorganizados, o retículo sarcoplasmático está em desenvolvimento, o túbulo transverso ausente e dependentes dos canais do tipo L para o aumento de cálcio (Fig. 3a,b). Os CMs são alongados e multinucleados, possuem sarcômeros organizados, retículo sarcoplasmático e túbulos transversos desenvolvidos e seus discos intercalados, junções mecânicas e elétricas amadurecidas. O transiente de cálcio modula tanto a frequência quanto a força contrátil e o tempo de contração dos CMs, o aumento acentuado e uniforme da concentração intracelular de cálcio em CMs é importante para a contração sincronizada (39,42–45) (Fig. 3c,d)

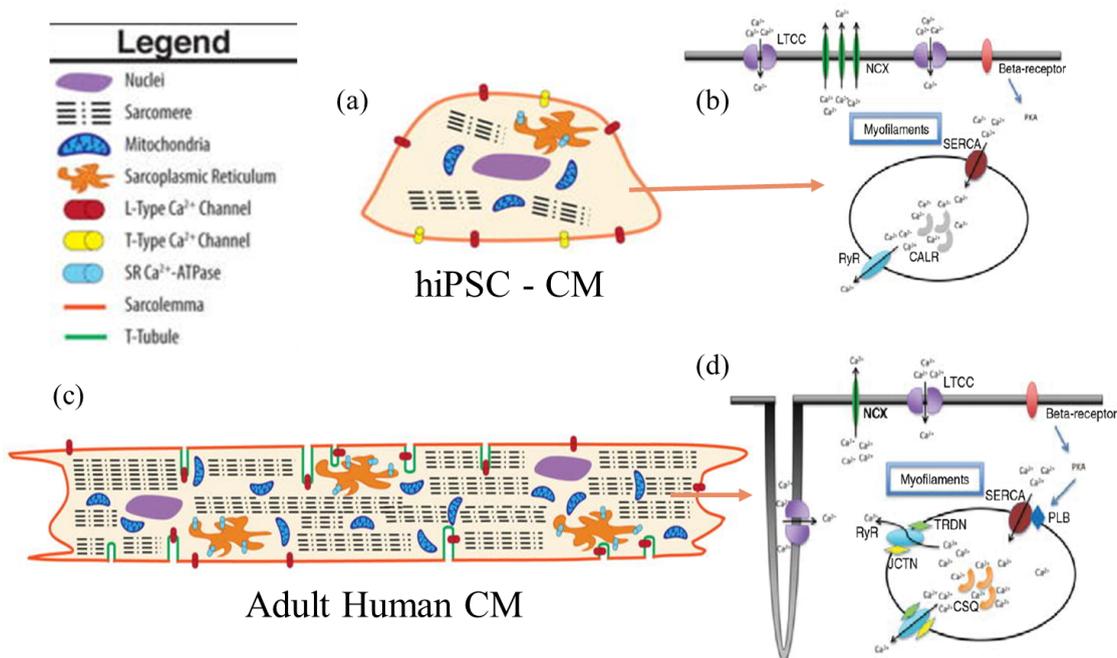


Figura 3: Esquema da morfologia da sinalização de cálcio em cardiomiócitos adultos (CM) comparados a hiPSC-CMs. Adaptado dos artigos Robertson *et al.*, 2013 e Li *et al.*, 2013.

1.4 Microrreologia

Microrreologia é o estudo das propriedades mecânicas em uma escala microscópica, que pode ser realizado utilizando dois tipos de técnicas, ativas e passivas, ou técnicas de aplicação de força e sensíveis a forças (9). Na microrreologia ativa, é aplicada uma distensão, ou pressão, externa no objeto de estudo, e medida a deformação resultante no objeto. Podem-se citar: pinças ópticas, pinças magnéticas e Citometria Óptica de Torção Magnética (*Optical Magnetic Twisting Cytometry* - OMTC) (10,46). Na microrreologia passiva usa-se movimentos espontâneos do objeto em estudo, seja ele termicamente dirigido ou internamente ativado, para avaliar as deformações do meio (Fig. 4). Pode-se citar: difusão de micropartículas, técnicas sensíveis a forças como Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM), Microscopia de Força de Tração (*Traction Force Microscopy* - TFM), dentre outras (9,47).

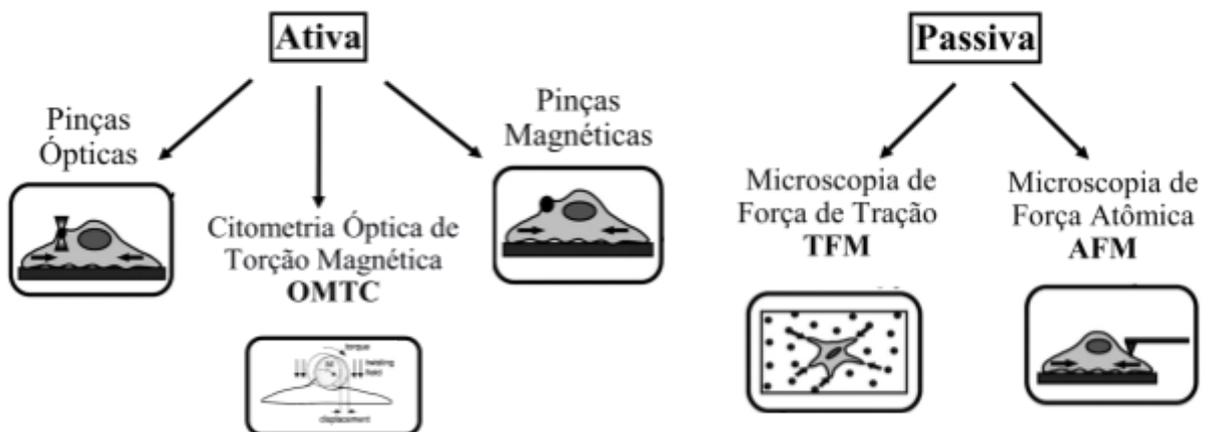


Figura 4: Esquema de técnicas de Microrreologia adaptado de Marita L. Rodriguez, Patrick J. McGarry, Nathan J. Sniadecki 2013.

1.4.1 Microscopia de Força de Tração (TFM)

A interação e comunicação das células umas com as outras é através de forças de tração, conhecida como mecanotransdução, e é fundamental para que a célula sobreviva e consiga realizar suas funções corretamente. Pelas forças de tração, as células são capazes de sentir as propriedades mecânicas do seu microambiente, como por exemplo, células vizinhas e substrato, e ajustar suas adesões focais, morfologia, motilidade, forças contráteis dentre diversas outras funções de acordo com o meio na qual se encontra (48).

Para realizar medidas de TFM, são necessárias duas imagens de fluorescência: uma do substrato com a célula exercendo força e outra de referência, sem a célula com o "gel não tensionado" (Fig. 5). Tratamentos com tripsina-EDTA podem ser utilizados para desprender as células antes da obtenção da imagem de referência (sem forças de tensão). A comparação das fotos das microesferas antes e depois do tratamento de tripsina-EDTA permite a obtenção do campo de deslocamentos no substrato (47,49,50).

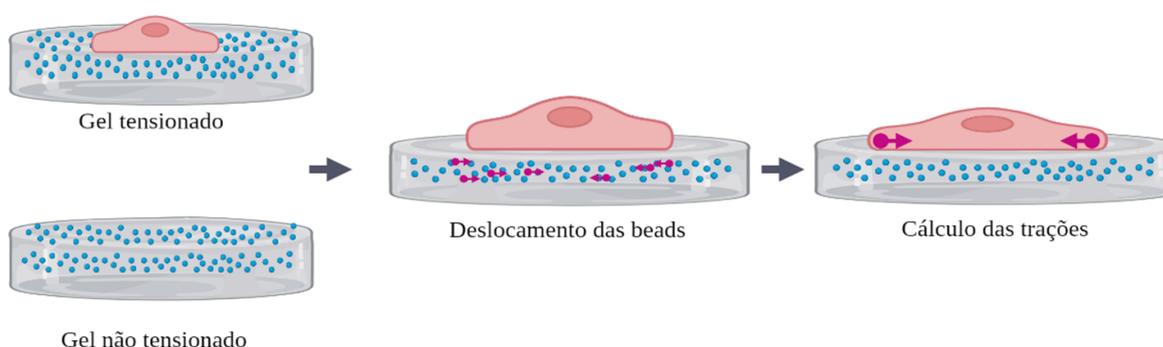


Figura 5: Esquema representativo do experimento de TFM adaptado de Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Aguilar-Cuenca, R. *et al.*, 2017.

A aplicação da estimulação elétrica (EE) em hiPSC-CMs, tem sido amplamente utilizada para favorecer a diferenciação e maturação dessas células. A maioria dos estudos aplicam a EE como uma forma de intervenção, durante alguns dias, tanto no processo inicial de diferenciação quanto na fase de maturação celular. No presente estudo, aplicamos a EE como uma forma de modular e sincronizar a contração celular, visto que os hiPSC-CMs não contraem-se com a mesma magnitude do que os CMs, aplicamos um pulso elétrico com o intuito de padronizar o ritmo de contração celular.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar as propriedades mecânicas de cardiomiócitos hiPSC, cultivados em micropadrões, em comparação com os métodos clássicos utilizados atualmente em nosso laboratório, criando assim um protocolo de análise, que poderá ser amplamente utilizado pelos grupos de pesquisa associados a esse projeto.

2.1 Objetivos Específicos

Para isso, pretendemos atingir os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolver um protocolo experimental para confecção dos micropadrões para diversos tipos celulares, em especial os cardiomiócitos hiPSC;
2. Avaliar o comportamento dos cardiomiócitos cultivados no molde de micropadrões em matrizes de Laminina e Geltrex, e verificar padrão de adesão, morfologia celular e alinhamento das fibras;
3. Avaliar as forças contráteis, amplitude e frequência dos cardiomiócitos por Microscopia de Força de Tração;
4. Avaliar a força de tração das células cardíacas após a estimulação elétrica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas fases (Fig. 6):

- **Fase 1 – Desenvolvimento e aplicação dos MPs:** foram realizados diversos testes para definir qual a melhor geometria, concentração e temperatura das matrizes de GTX e LAM sobre o molde de PDMS;
- **Fase 2 – Avaliar a reologia dos hiPSC-CMs:** foram realizados testes de TFM, EE e fluorescência para avaliar a força de contração, amplitude e morfologia das células.

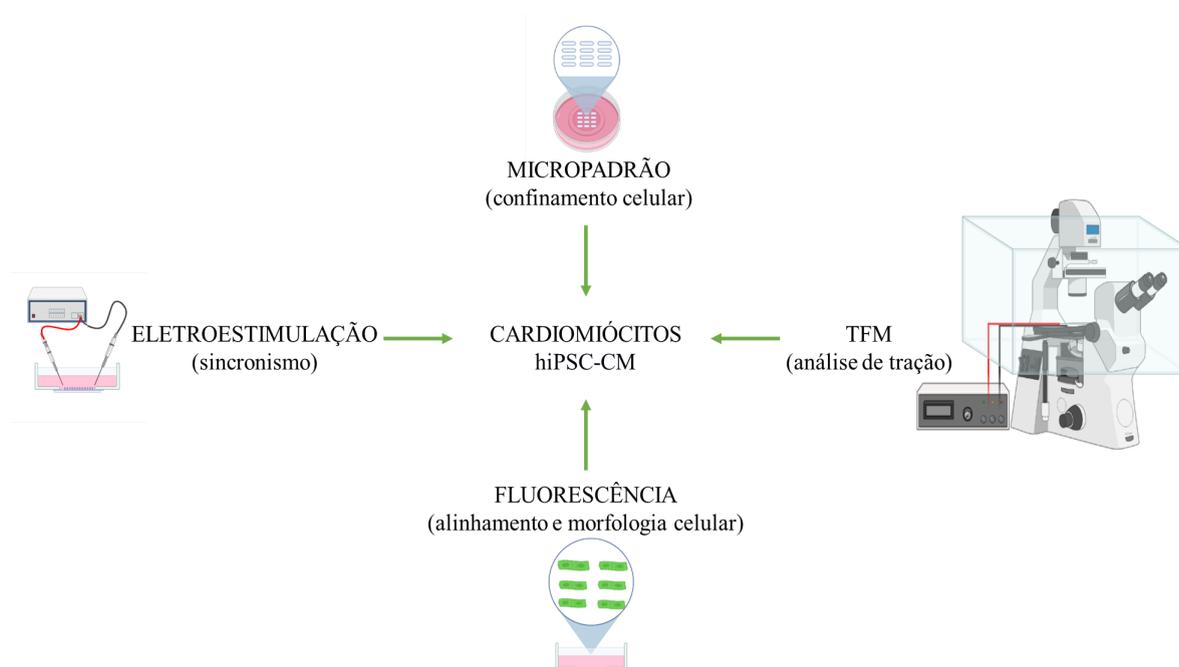


Figura 6: Delineamento das estratégias experimentais para criação de um protocolo de produção dos MPs e aplicação de métodos reológicos para quantificar a força de contração, amplitude e avaliar o alinhamento das fibras dos hiPSC-CMs.

3.1 Micropadrões (*Micropatterning*)

Todos os processos de elaboração e confecção dos MPs foram desenvolvidos no Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular (LabM²). Os desenhos do molde foram elaborados em AutoCAD[®] (Fig. 7a) seguindo os parâmetros descritos por Ribeiro *et al.*, 2015 (31) com uma área de 1,5 cm x 1,5 cm por molde, 2000 μm^2 com proporções de 7:1, espaçados a 100

μm de distância contendo matrizes de características retangulares, para avaliar a conformação estrutural, a distribuição e o alinhamento das fibras contráteis dos cardiomiócitos (Fig. 7b-d). Para confecção dos moldes foi utilizada a técnica de litografia suave, ou do inglês *soft lithography* (25), em um polímero de PDMS que é um biomaterial, biocompatível, inerte quimicamente, transparente, flexível e de baixo custo, a litografia foi realizada pelo aluno Juan Enrique Rivero Cervantes no mestrado no LabM².

Após a confecção do molde de PDMS, que foi realizado em formato circular, com diâmetro de 5 cm e diversas geometrias, os moldes foram recortados, selecionando os formatos retangulares para serem adaptados em um suporte, semelhante a um carimbo (Fig. 7e), desenvolvido no AutoCad[®] e impresso na impressora *3DPrinter da Vinci 1.0 Pro*, para ser utilizado de forma individualizada, podendo variar a área de contato de 1,5 cm para menos (Fig. 7f).

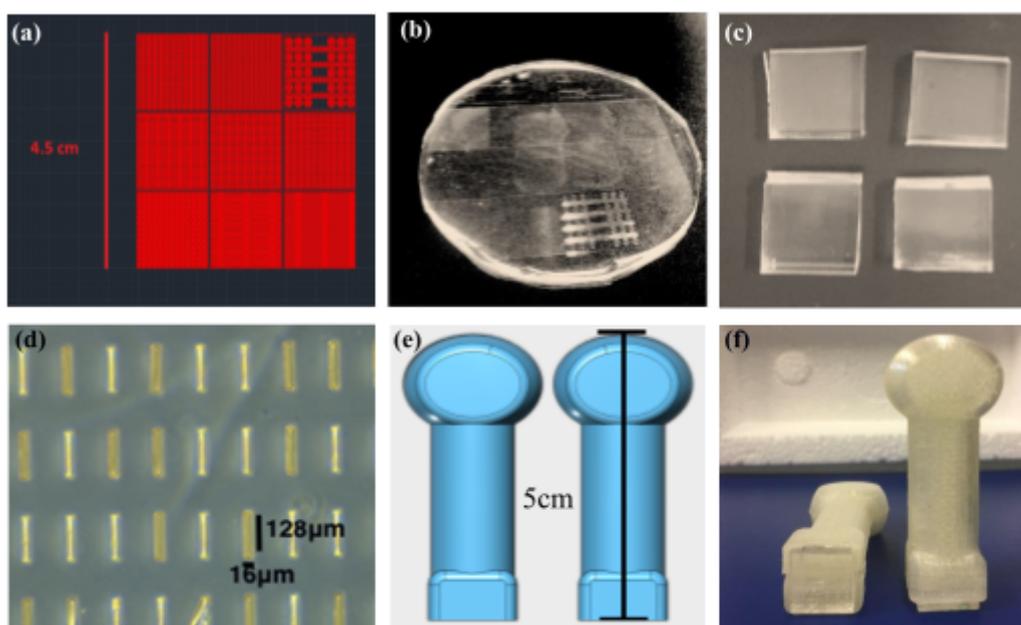


Figura 7: Molde confeccionado em superfície de PDMS. (a) Desenhos dos diferentes padrões realizados no AutoCAD[®] (b) molde inicial, (c) moldes individualizados (d) imagens de microscopia de campo claro (ampliação de 10x) do molde de PDMS com as geometrias do micropadrão retangular 7:1. A área total é de $2000 \mu\text{m}^2$ para cada padrão e o espaçamento entre um padrão e outro é de $100 \mu\text{m}$. (e) carimbos de apoio dos moldes desenvolvidos no software AutoCad[®], impressos em uma impressora 3D e (f) molde de PDMS acoplado no carimbo.

3.2 Preparo do Gel de Poliacrilamida e das matrizes no carimbo de PDMS

Foi criado um protocolo específico para o preparo dos MPs, a partir de algumas adaptações realizadas no protocolo padrão de preparo do gel de poliacrilamida estabelecido no LabM². Foram realizados 15 experimentos independentes, onde foram definidos como critérios de inclusão: hiPSC-CMs aderidos nos MPs, hiPSC-CMs contraindo durante o experimento de TFM, e hiPSC-CMs aderidos no gel em regiões sem aglomeração. Foram excluídos experimentos onde não foram realizados a EE, hiPSC-CMs não aderidos no gel, MPs que não mantiveram sua integridade durante o experimento e MPs de formatos diferentes. Com os critérios de inclusão e exclusão definidos, foram validados 8 experimentos independentes, com um $N_{TOTAL} = 36$ hiPSC-CMs e em cada grupo obtivemos um $N_{REPLICATA} = 9$, onde foram divididas em 4 grupos:

LM – hiPSC-CMs aderidos no MP com a matriz LAM;

GM – hiPSC-CMs aderidos no MP com a matriz GTX;

L – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz LAM e sem MP;

G – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz GTX e sem MP.

Para o tratamento da placa de Petri de 35 mm com fundo de vidro, foram depositados 60 μ L de Silano (*Sigma-Aldrich*), na parte de vidro, por 6 min e em seguida, as placas foram lavadas de 3 a 4 vezes com água milli-Q para remoção dos resíduos de Silano. Foi preparada uma solução de 0,5 % de Glutaraldeído (*Sigma-Aldrich*) em *Phosphate buffered saline* (PBS, *Sigma-Aldrich*) e foi adicionado 200 μ L em cada placa por 30 min; em seguida foram lavadas de 3 a 4 vezes com água destilada para remover os resíduos da solução. Após a lavagem, as placas ficaram secando por aproximadamente 40 min.

Para o preparo do gel de poliacrilamida com rigidez de 9,6 kPa (51,52), seguindo os parâmetros já estabelecido no LabM² referente a rigidez apropriada para o cultivo de cardiomiócitos, em um microtubo de 2 mL adicionamos os seguintes reagentes: 600 μ L de água deionizada, 188 μ L de acrilamida 40 % (BIO-RAD), 59 μ L de bisacrilamida 2 % (BIO-RAD) e 20 μ L de *beads* verdes (*Life Technologies*TM). Para finalizar o preparo do gel, foram acrescentados 2 agentes catalisadores: 100 μ L de uma solução de 1 % de Persulfato de Amônia (APS, *Sigma-Aldrich*) em água deionizada e 1 μ L de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED, *BIO-RAD*).

Para realizar o preparo das matrizes, iniciamos com a higienização dos moldes de PDMS, que foram colocados em um becker com 25 mL de Extran 5% por 30 min., após esse período, foi retirado o Extran e adicionado 25 mL água deionizada 3 vezes e por fim foi adicionado 25 mL álcool etílico 70% e mantido sob ação de luz ultravioleta (UV) por 30 min. Após a higienização dos moldes, foram preparadas as matrizes de LAM e GTX em 2 microtubos de 2 mL distintos (devidamente identificados), no primeiro foram pipetados: 50 μ L LAM (*ThermoFisher*), 390 μ L de PBS e 30 μ L de *beads blue* (*Life Technologies*TM), e no segundo, foram pipetados 25 μ L GTX (*ThermoFisher*), 415 μ L de PBS e 30 μ L de *beads blue*, totalizando 0,5 mL de cada solução. Após o preparo das soluções, cada um dos moldes foram colocados em uma placa de petri devidamente identificadas, revestidas com papel alumínio, e sobre cada um dos moldes de PDMS foram adicionados 500 μ L LAM e 500 μ L GTX respectivamente, até que cobrisse toda a superfície da geometria retangular e permaneceram por 60 min. O excesso de LAM e GTX foi retirado cuidadosamente do molde com o auxílio de uma pipeta automática. Em seguida, a região do molde com a matriz foi lavada com PBS e secada com um jato contínuo e suave de gás Nitrogênio (N₂). Depois de seco, foi colocado uma lamínula redonda de vidro de 9 mm dentro de uma placa de petri estéril, para carimbar o molde de PDMS, devidamente acoplado no suporte, exercendo uma pressão constante, com a finalidade de imprimir os MPs na lamínula deixando a face onde foi impresso o padrão de LAM e GTX para cima. Foi adicionado 4,2 μ L de gel no centro das placas de Petri de 35 mm e a lamínula foi colocada invertida com a face de LAM ou GTX direcionada para o gel de poliacrilamida. A placa foi colocada no suporte adaptado na centrífuga *Hettich Universal 320R*, onde foi centrifugada com uma rotação de 78 G por 20 min a 10 °C e por mais 20 min a 20 °C para finalizar o processo de polimerização do gel. Após a centrifugação as placas foram retiradas da centrífuga e levadas para o fluxo laminar e em cada placa foi adicionado 1 mL de água Milli-Q para ajudar a desprender a lamínula do gel. Analisamos se o padrão foi impresso corretamente observando as *beads* no microscópio invertido de fluorescência com o Filtro A4 - ex. 340-380 nm - em. 450-490 nm, e prosseguimos para a ativação do gel e o plaqueamento das células (Fig. 8).

Para o grupo controle, sem o MPs, foi realizado o mesmo protocolo de preparo do gel e as matrizes foram adicionadas após a ativação do gel, em todas as placas foram pipetados 5 μ L do crosslinker Sulfo-SANPHA (*ThermoFisher*) em 5 mL de PBS, e mantidos sob luz UV por 20 min, em seguida foram lavados com PBS e as placas foram mantidas na incubadora por 60 min. Após a incubação das matrizes, as placas foram retiradas da incubadora, lavadas 2 vezes com PBS para o plaqueamento dos hiPSC-CMs (Fig. 8).

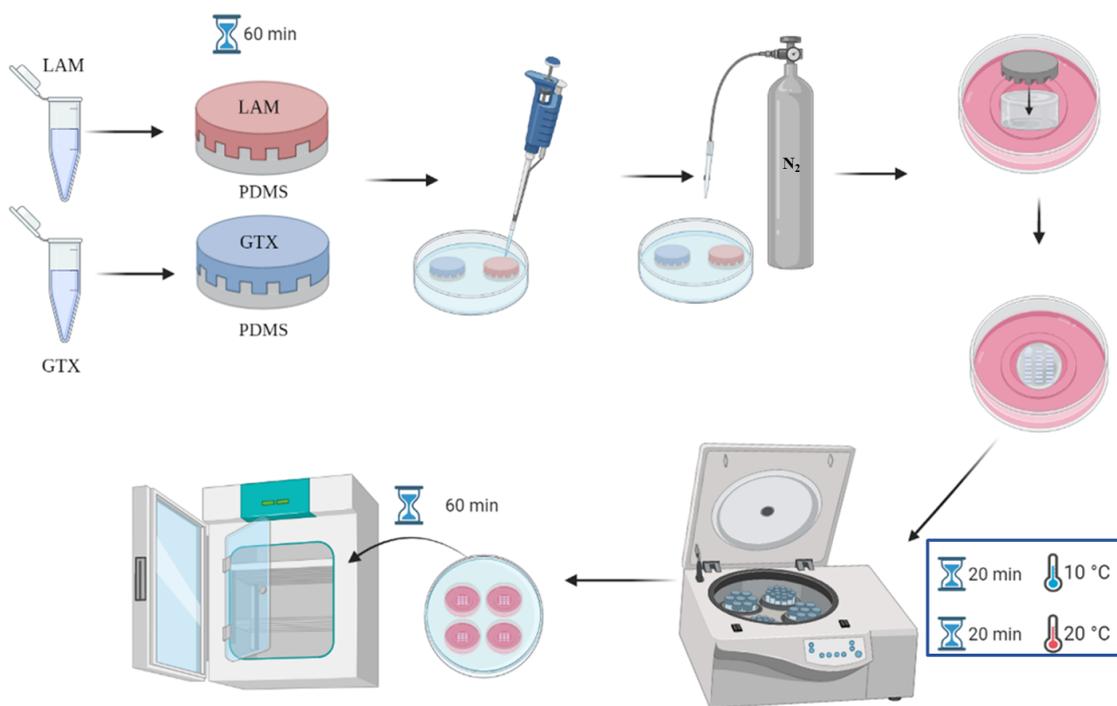


Figura 8: Esquema do preparo do MPs. Após o preparo, as matrizes de LAM e GTX foram pipetadas nos moldes de PDMS e permaneceram por 60 min, em seguida os moldes foram lavados 2 vezes com PBS e secados com N₂. Após a secagem, os moldes foram carimbados nas lamínulas de vidro e transferidos para o gel de poliacrilamida, que foi preparado e adicionado na placa de petri com fundo de vidro e as lamínulas carimbadas com LAM e GTX foram invertida e colocadas em cima do gel de camada única. As placas foram centrifugadas por 20 min a temperatura de 10 °C com uma rotação de 78 G por 20 min e por mais 20 min a temperatura de 20 °C. Após a centrifugação, as placas foram levadas para o fluxo laminar, as lamínulas foram retiradas e o gel foi lavado 2 vezes com PBS e em seguida foi realizada a ativação do gel com Sulfo-SANPHA por 20 min na luz UV. Após a ativação, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS e levadas para a incubadora por 60 min.

3.3 Obtenção e manutenção dos cardiomiócitos hiPSC-CM

Os hiPSC-CMs e os meios de cultura, foram fornecidos pela empresa PluriCell Biotech através de uma parceria com o LabM² para identificar as propriedades mecânicas das células cardíacas. Os processos de extração, purificação e diferenciação dos hiPSC-CMs, foram realizados na empresa PluriCell e recebemos as células diferenciadas e prontas para o plaqueamento seguindo o protocolo descrito por Cruvinel *et al.*, 2020 (53). O preparo e a manutenção dos hiPSC-CMs em cultura, foram realizados de acordo com o guia disponibilizado pela PluriCell, o qual é resumido a seguir:

Os hiPSC-CMs foram coletados no laboratório da Pluricell, nos dias em que cada experimentos foram realizados, em um tubo falcon de 15 mL contendo aproximadamente 1×10^6 células em suspensão com 2 mL de meio de plaqueamento e transportado em uma caixa térmica. Além das células, foram coletados também 15 mL de Meio de Plaqueamento Suplementado (PMS - Meio RPMI com L-Glutamina + 1X de B27 sem Insulina + Ri) e 90 mL de Meio de Manutenção Suplementado (MMS - Meio RPMI com L-Glutamina + 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Albumina + 213 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ácido Ascórbico), para manutenção dos hiPSC-CMs durante todo o cultivo. Em seguida, foi realizado o plaqueamento de aproximadamente 83×10^4 de hiPSC-CMs por placa para análises de TFM e aproximadamente 25×10^4 células por placa para o experimento de fluorescência. As placas foram mantidas na incubadora de cultura celular a 37°C , 5 % CO_2 com 2 mL de meio PMS por 24 horas. Após 24 horas do plaqueamento, foi realizada a troca do meio PMS para o MMS onde foi retirado completamente o PMS e acrescentado 2 mL de MMS e assim foi sucessivamente, realizando a troca do MMS a cada 24 h até o dia das análises. Após 3 dias do plaqueamento, os hiPSC-CMs estão pulsando e devidamente aderidos para iniciar os experimentos (Fig. 9).

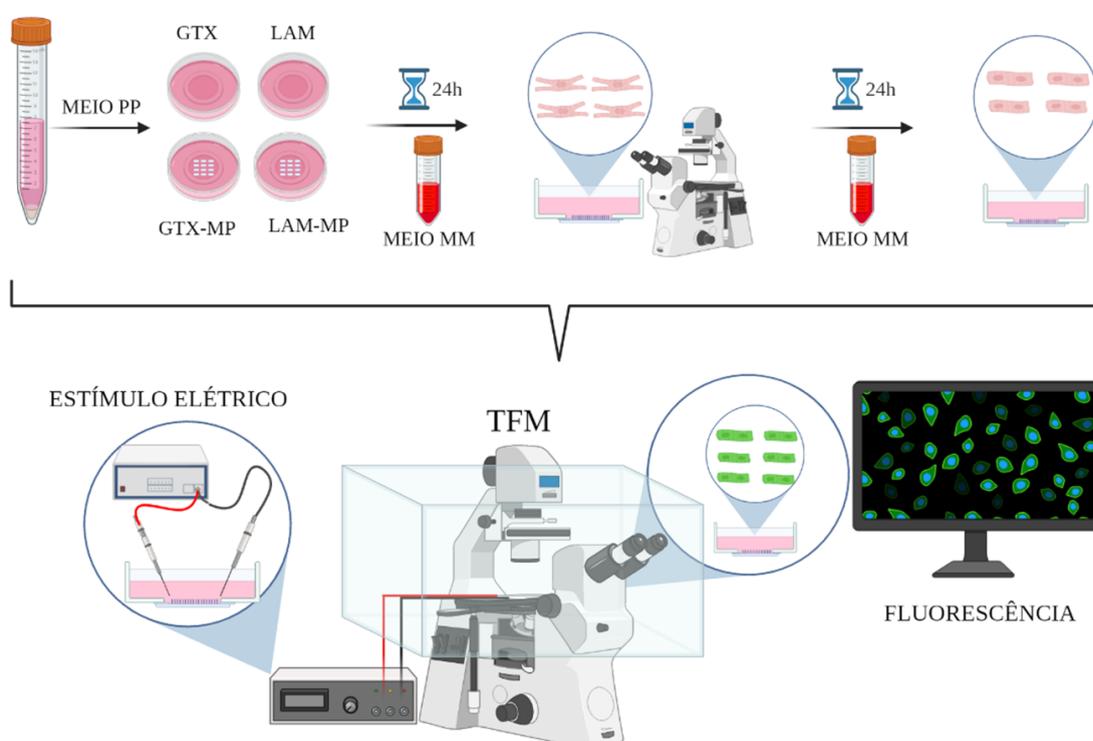


Figura 9: Esquema do plaqueamento e manutenção dos hiPSC-CMs e das técnicas experimentais utilizadas.

3.4 Fluorescência para análise morfológica e quantificação do grau de alinhamento das fibras

Foi realizada a análise morfológica dos hiPSC-CMs cultivados com e sem MPs, a fim de observar os pontos de adesão focal, analisar o grau de alinhamento das fibras e avaliar se os dados obtidos correspondem com os resultados da análise de força de tração. Para realizar a quantificação do grau de alinhamento das células utilizamos as imagens no formato .Tiff, obtidas em microscópio invertido de fluorescência com objetiva de 40x, em tons de cinza, e analisamos no Matlab[®] utilizando um algoritmo desenvolvido pelo Dr. Marcel Philippi Dorta durante seu mestrado e doutorado no LabM², a fim de compreender as alterações estruturais dos hiPSC-CMs (54). Foram realizados 3 testes para caracterizar as melhores concentrações dos reagentes para fixação e marcação das células. Após a padronização e adequação do protocolo, foram realizados 3 experimentos independentes validados, com um $N_{TOTAL}=40$ de imagens obtidas, sendo que para cada grupo foram obtidos um $N_{REPLICATA}=10$.

Para a análise do grau de alinhamento e fluorescência dos hiPSC-CMs, foram utilizadas as mesmas concentrações das matrizes de LAM e GTX, após o preparo dos MPs, o molde foi carimbado diretamente na placa de petri com fundo de vidro. As placas foram mantidas em luz UV por 30 min e em seguida os hiPSC-CMs foram plaqueados. Nos grupos sem o MPs, foi realizado um *coach* com as matrizes LAM e GTX para a adesão dos hiPSC-CMs nas placas. Após serem cultivados por 3 dias, os hiPSC-CMs foram fixados e marcados para análise do citoesqueleto seguindo o protocolo abaixo:

Os hiPSC-CMs foram plaqueados em placas de petri de 35 mm com fundo de vidro, lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 3,7 % de Metanol em PBS durante 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas novamente com PBS e permeabilizadas com Triton 1 % (*Sigma-Aldrich*) por 15 min e lavadas com PBS antes de receber a marcação com a solução estoque de *Phalloidin* (*Life Technologies*TM), que consiste na diluição da solução de *Phalloidin* em 1,5 mL de Metanol, diluindo 5 μ L da solução estoque em 200 μ L de PBS e adicionar 1 % de albumina de soro bovino (BSA - *Thermo Fisher*) para reduzir a marcação inespecífica. Após o preparo da solução de marcação, adicionar 200 μ L em cada placa e incubar por 60 min. Seguinte a incubação, lavar as placas e observar as marcações no microscópio. Após 24 horas, foi realizada a marcação do núcleo dos hiPSC-CMs com o reagente *SlowFade Diamond Antifade Mountant with DAPI*[®] (*Life Technologies*TM), foi adicionado 50 μ L em cada placa e após 15 min foram realizadas as capturas das imagens

fluorescentes em microscópio invertido utilizando os Filtro A4 - ex. 340-380 nm - em. 450-490 nm e Filtro L5 - ex. 460-500 nm - em. 512-560 nm.

3.5 Microscopia de Força de Tração (TFM)

Para quantificar as forças contráteis dos hiPSC-CMs cultivados nos MPs, foi utilizada a técnica conhecida como Microscopia de Força de Tração (TFM) (55),(47). Nessa técnica, as células são aderidas em um substrato flexível que possui marcadores fluorescentes, no caso, microesferas de poliestireno de 0,2 μm de diâmetro, embutidos próximos à superfície do substrato. Os deslocamentos causados pelas células no substrato são visualizados através dos deslocamentos das microesferas e, através de ferramentas computacionais como o Matlab[®], é possível quantificar as tensões mecânicas da célula no substrato. Foi realizado a aquisição de 2500 imagens, que formam um vídeo de 17 seg., para análise de força de tração e amplitude dos hiPSC-CMs, Para a análise dos dados do TFM, utilizamos um algoritmo desenvolvido em parceria com a *Harvard School of Public Health* (Fig. 10).

As análises de TFM foram realizadas após 3 dias do plaqueamento dos hiPSC-CMs. Inicialmente, foi realizada a aquisição da imagem dos hiPSC-CMs em campo claro, seguida da marcação da posição dos hiPSC-CMs na placa para garantir a posição correta e reprodutibilidade dos dados, para realizar a marcação das posições dos hiPSC-CMs e salvar as imagens, utilizamos o software *Micromanager*. Após a marcação, foi realizada a captura de 2500 imagens de fluorescência das *beads* fluorescentes incorporadas no gel de poliacrilamida com o Filtro L5 - ex. 460-500 nm - em. 512-560 nm. e seguimos para o protocolo de aplicação da EE.

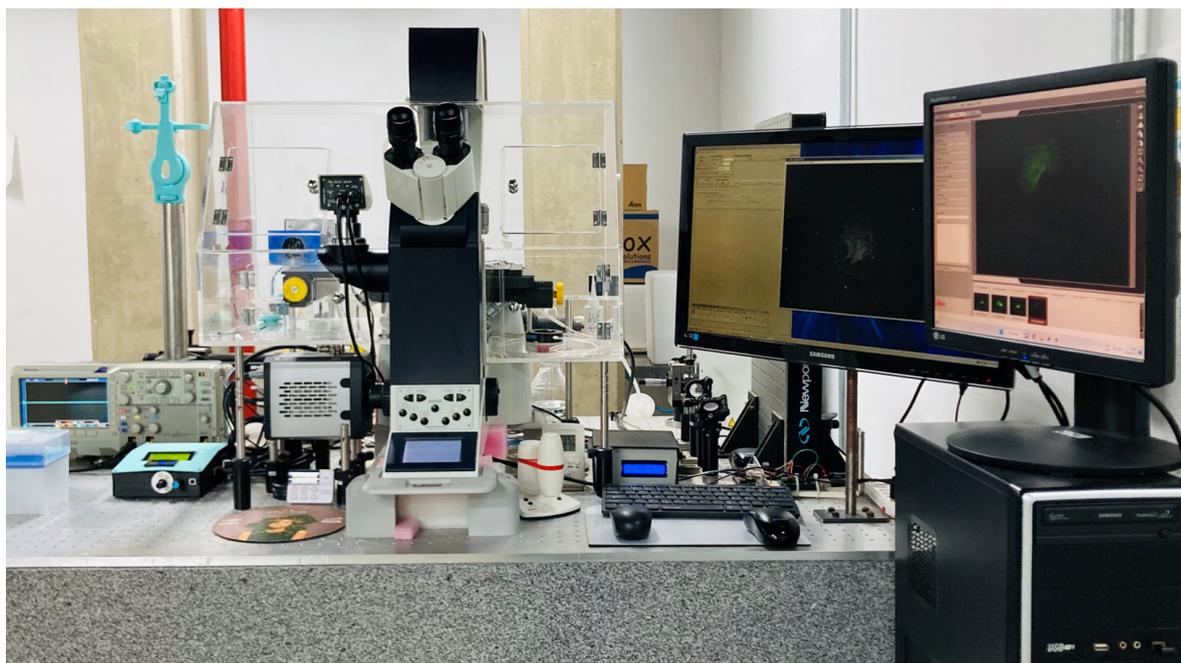


Figura 10: Microscópio de TFM. Aparato experimental de TFM que foi utilizado para avaliar as tensões aplicadas por hiPSC-CMs cultivados sobre um substrato flexível. O TFM consiste de um microscópio Leica DMI4000 com incubadora associada, o que permite a reproduzir as condições essenciais para manutenção das células (ambiente com 5 % de CO₂ e temperatura de 37° C).

3.6 Estímulos Elétricos

Para estimular eletricamente os hiPSC-CMs, foi utilizado um estimulador elétrico que foi desenvolvido durante este projeto no LabM², no qual teve todo o sistema aprimorado desde o primeiro protótipo apresentado. Toda a parte eletrônica, arcabouço em impressão 3D e códigos com parâmetros que foram desenvolvidos no próprio LabM², o que nos permitiu ter total autonomia com os parâmetros e os designs necessários para o andamento do projeto conforme exemplificado na Figura 11, o aparelho de estimulação elétrica e suas conexões com o microcontrolador e a ponte H exemplificada por um esquema.

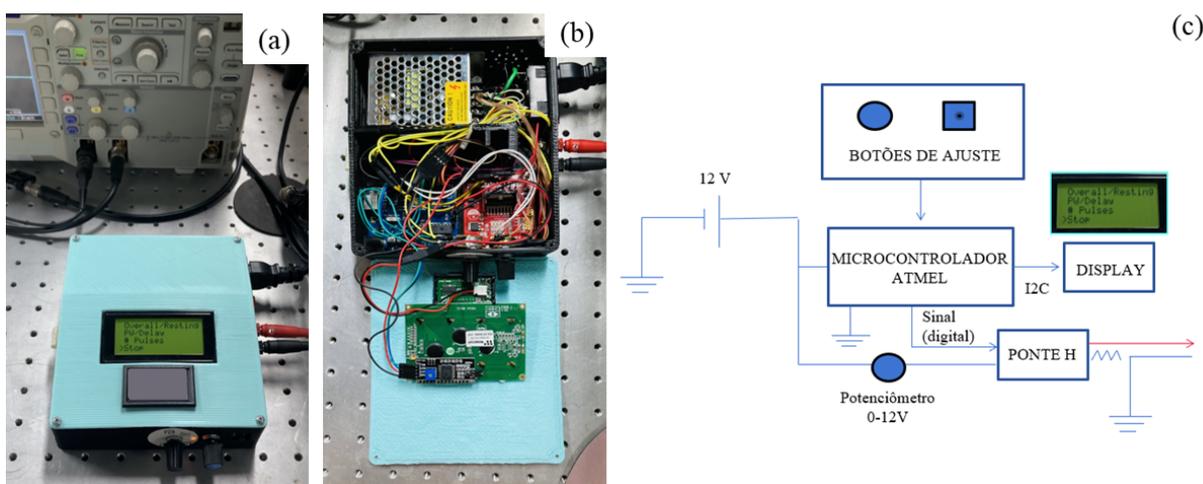


Figura 11: Estimulador elétrico desenvolvido no LabM², que foi utilizado para avaliar as tensões aplicadas por cardiomiócitos cultivados sobre um substrato flexível. (a) Estimulador elétrico, (b) suas conexões com os componentes eletrônicos e (c) esquema simplificado da comunicação do sistema do estimulador elétrico.

O estimulador produz um campo elétrico uniforme entre duas placas de aço cirúrgico e se acopla na placa de fundo de vidro com um suporte que foi projetado em impressora 3D (Fig. 12). O código foi utilizado inicialmente para testar diferentes frequências de pulsação, tamanhos e amplitudes de pulsos de estimulação (num intervalo de 5 V até 12 V). Após os testes iniciais, foram definidos os seguintes parâmetros de estimulação: *pw* de 5 ms (largura do pulso), *delay* de 700 ms, ciclos de 20 pulsos com *rest* de 3 s (tempo de descanso) e voltagem de 12 V.

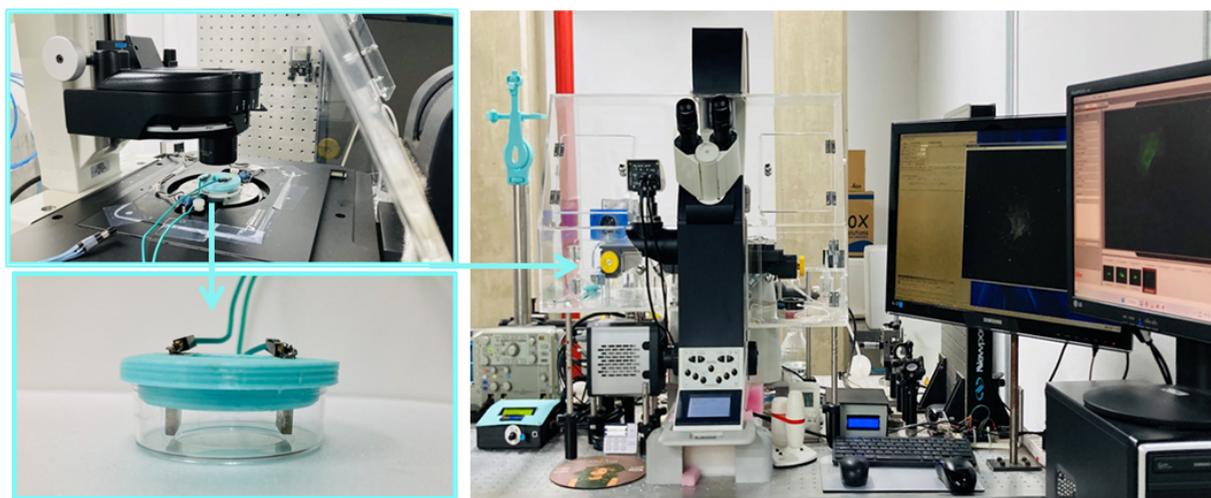


Figura 12: Estimulador elétrico acoplado no microscópio do TFM Leica DMI4000, com incubadora associada, o que permite a reproduzir as condições essenciais para manutenção das células (ambiente com 5 % de CO₂ e temperatura de 37° C). Em destaque, o suporte de duas placas de aço cirúrgico, montado em impressora 3D, acoplado no microscópio TFM.

Foi realizado o experimento de TFM, mapeando os cardiomiócitos e realizando a captura das imagens, em seguida foi aplicado o estímulo por 10 min. e realizada novamente a captura das 2500 imagens no campo de fluorescência, após a aplicação do estímulo para avaliar a influência da estimulação na força de tração dos hiPSC-CMs (Fig. 13). Após a EE, os hiPSC-CMs foram retirados do substrato com 2 mL de solução de tripsina - EDTA 10x (0,5 % tripsina e 0,2 % EDTA, *Sigma-Aldrich*) para uma nova captura de imagem de fluorescência das microesferas, agora com o “gel não tensionado”. Após a aquisição das imagens, os dados foram coletados e transferidos para o Matlab® onde realizamos o todo o processamento.

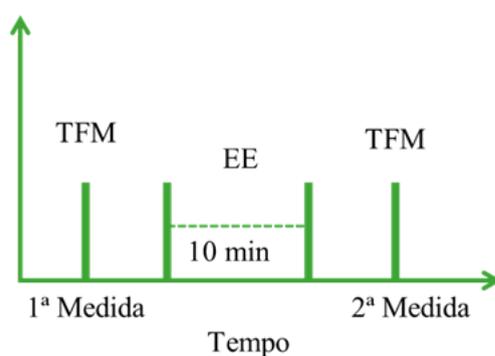


Figura 13: Esquema simplificado da captura das medidas de TFM e EE no tempo.

3.7 Análise estatística

Foi realizado o teste *test -t* (paramétrico) e o *Mann-Whitney* (não-paramétrico) para avaliar se havia diferença dos valores médios obtidos em grupos comparados pareados, sendo considerado valores médios diferentes aqueles cuja a comparação resulta em $p < 0,05$ ($\alpha < 0,05$). Foi realizado o *test -t* e o *Mann-Whitney* para 2 amostras para o comparativo antes e após EE, ANOVA para a comparação entre grupos comparando o uso de micropadrão e a EE. Os resultados com o intervalo de confiança menor que 5 % serão considerados estatisticamente significativos. Variáveis de estudo: força de tração, poder de contração, amplitude de contração, alinhamento das fibras e comportamento do citoesqueleto.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Confeção e impressão dos micropadrões

Os MPs foram confeccionados em PDMS e apresentaram uma boa durabilidade, fácil manuseio, reutilização e esterilização, sendo eficaz para a impressão dos moldes em gel de poliacrilamida. As matrizes utilizadas para a impressão dos moldes foram GTX e LAM. As geometrias utilizadas foram: a retangular de proporção 7:1 (indicada para cultivar os hiPSC-CMs), triangular, quadrada e pista. A impressão das geometrias triangular e quadrada não foram eficazes com isso foram excluídas do presente estudo, em comparação com a impressão dos formatos retangulares (Fig. 14 a,b) e pista que apresentaram uma excelente delimitação do padrão (Fig. 14c) e foi determinado o uso da geometria retangular, visto que foi a mais eficaz para o crescimento dos hiPSC-CMs de forma individualizada. Apesar de não ser utilizado nesse estudo, o padrão em formato de pista mostrou-se eficaz no crescimento de células musculares despertando interesse para utilização em projetos futuros.

As matrizes testadas foram LAM, GTX e vitronectina, as mesmas foram avaliadas em diferentes volumes e temperaturas. A matriz LAM e GTX apresentaram o melhor padrão impresso, a vitronectina não apresentou os resultados esperados na impressão dos MPs e foi excluída como matriz de comparação. Os volumes testados foram 5 μ L, 25 μ L, 50 μ L para LAM e GTX e foi definida como melhor volume para LAM em 50 μ L e para GTX 25 μ L.

As matrizes foram testadas em temperaturas a 37 °C e a 20 °C, e durante os testes foi observado que o GTX, por ser uma matriz que “gelifica” em temperaturas mais altas, não mostrou-se eficiente na temperatura de 37 °C quando comparado com a LAM. Quando as matrizes LAM e GTX foram testadas a 18 °C, em um ambiente com temperatura controlada, bancada gelada com o auxílio de “gelo térmico”, ambas apresentaram-se eficazes nessa temperatura para a confecção dos MPs .

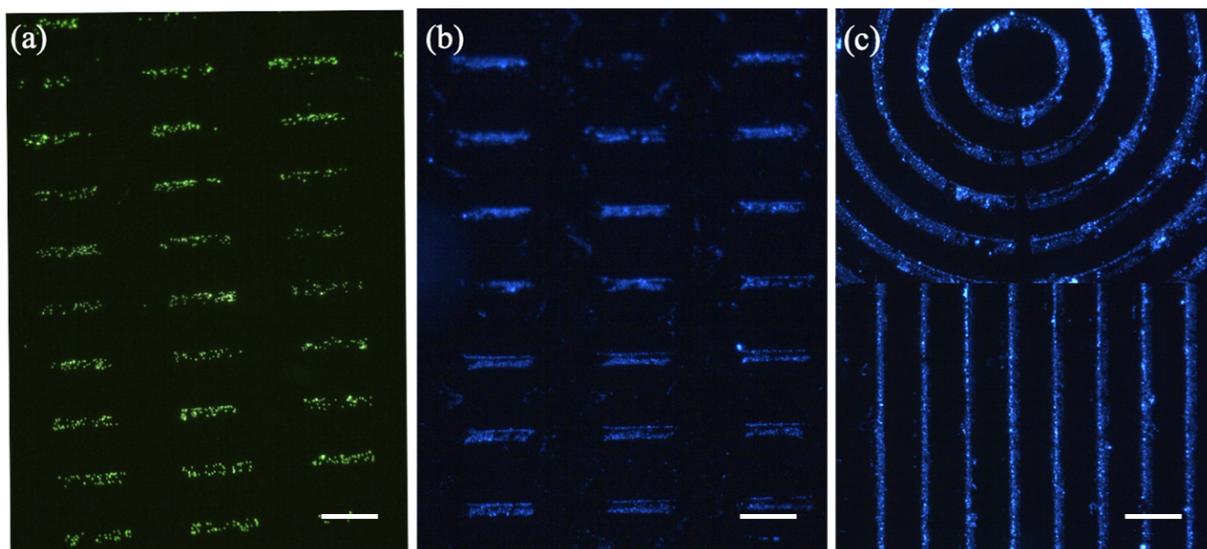


Figura 14: MPs no gel de poliacrilamida, (a) molde impresso no gel de poliacrilamida com a matriz LAM; (b) molde impresso no gel de poliacrilamida com a matriz GTX; (c) molde impresso no gel de poliacrilamida com o formato de pista. *Scale bar* 100 μm .

Para a adesão dos hiPSC-CMs no gel, foi utilizado o protocolo padrão do LabM² sem a ativação do gel com o Sulfo-SANPHA, visto que a matriz já estava incorporada no gel e não teria a necessidade inicial de ativação, mas os hiPSC-CMs não sobreviveram para a realização dos experimentos. Com isso, foram realizados testes incluindo o NHS, que é um *crosslink* que facilita a adesão da matriz no gel, mas esse protocolo também não favoreceu a adesão das células. Foi realizado então apenas a esterilização do gel com UV, mas também não foi eficaz para a adesão dos hiPSC-CMs, então foi realizado o teste com Sulfo-SANPHA e UV por 20 min e esse protocolo foi definido como padrão para adesão das células.

Para o preparo do gel, foram testados o protocolo padrão para uma camada mas a dispersão das *beads* fluorescentes no gel dificultou a análise de TFM, visto que o ideal são as *beads* estarem na mesma camada para capturar as imagens antes e após o experimento, com isso foi realizados teste de centrifugação para adequar a dispersão das *beads* no gel. Inicialmente, o gel foi centrifugado por 20 min a temperatura de 20 °C, porém o gel polimerizou rápido e ressecou, na segunda tentativa o gel foi centrifugado por 20 min a temperatura de 10 °C mas nesses parâmetros o gel não polimerizou adequadamente, então foi realizado um terceiro teste onde a primeira centrifugação foi por 20 min a temperatura de 10 °C em seguida foi alterada a temperatura para 20 °C por mais 20 min e a polimerização e impressão do MP apresentaram o melhor resultado.

4.2 Adesão e manutenção dos hiPSC-CMs

Os hiPSC-CMs chegaram no LabM² em suspensão, com o meio de plaqueamento em temperatura controlada e com a quantidade aproximada de 800 mil a 1 milhão de células para cada experimento independente. Para cada experimento foram utilizadas 12 placas, separadas em 3 placas para cada grupo e mantidas na incubadora por 2 dias até o início dos experimentos. Foram realizados um total de 15 experimentos sendo, que 3 experimentos foram para calibrar a concentração das matrizes LAM e GTX, 3 experimentos foram para calibrar as melhores concentrações e condições para cultivo dos hiPSC-CMs no gel de poliacrilamida e 2 experimentos foram excluídos devido a ausência de hiPSC-CMs contraindo.

Foram testadas diferentes concentrações de plaqueamento dos hiPSC-CMs, inicialmente foram plaqueadas $1,2 \times 10^5$, mas para o grupo sem micropadrão apresentou overconfluência para análise dos dados de TFM, com isso foi reduzido para 5×10^4 e para o grupo com micropadrão foi uma quantidade insuficiente para fazer a aquisição de pelo menos 5 células por placa, com isso foi realizado um último teste e ficou estabelecido que 83×10^4 células por placa é quantidade satisfatória para ambos os grupos. Os hiPSC-CMs apresentaram boa adesão quando cultivados no MPs, porém eles não atingiram o formato total dos MPs devido ao pouco tempo que permaneceram em cultura (Fig.15).

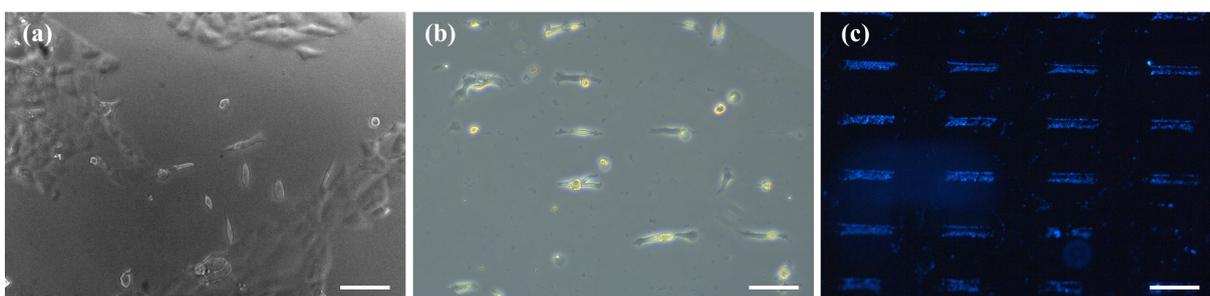


Figura 15: (a) imagem campo claro hiPSC-CMs sem MPs, (b) imagem campo claro hiPSC-CMs aderido no MPs, (c) imagem fluorescente dos MPs. Imagem adquirida no microscópio Leica objetiva 20x. *Scale bar* 100 μm .

4.3 Análise morfológica e quantificação do alinhamento das fibras

As análises de morfologia foram realizadas através da marcação do citoesqueleto e do núcleo dos hiPSC-CMs com *Phalloidin* e *Dapi* respectivamente. Foi observado a adesão dos hiPSC-CMs no MPs tanto para a matriz LAM quanto para GTX, quando cultivados nos MPs os hiPSC-CMs demonstraram maior compactação e alongamento das fibras (Fig. 16a,c) quando comparadas com os grupos que não foram cultivados com os MsP (Fig. 16b,d).

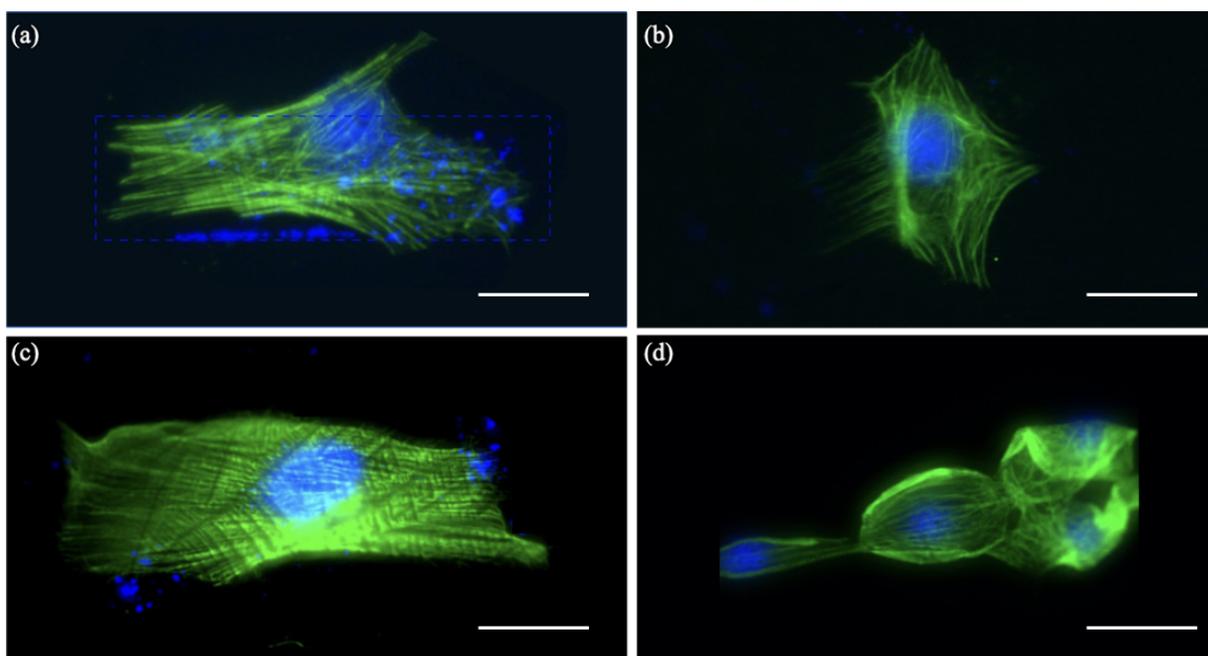


Figura 16: Imagens fluorescentes dos hiPSC-CMs, (a) hiPSC-CMs cultivados com LAM em MPs, (b) hiPSC-CMs cultivados em LAM sem MPs, (c) hiPSC-CMs cultivados com GTX em MPs, (d) hiPSC-CMs cultivados com GTX sem MPs. Imagens adquiridas em microscópio Leica, objetiva 40x com óleo de imersão. *Scale bar* 20 μm .

Foi realizada a quantificação do grau de alinhamento das fibras através do algoritmo desenvolvido no LabM², onde foram analisados n=10 hiPSC-CMs por grupo totalizando um n=40. As imagens foram adquiridas em microscópio invertido de fluorescência, com objetiva de 40x com óleo de imersão, e salvas em formato .TIFF que apresenta uma melhor qualidade para o processamento no Matlab[®]. Durante a inclusão das imagens no algoritmo, foram testados alguns parâmetros para realçar o contraste, melhorar a nitidez da imagem e definir qual o melhor tamanho de *box counting* (quantidade necessária de caixas para recobrir o objeto estudado) e o melhor limiar para redução do ruído (método de *Otsu*).

Foram testados 4 tamanhos de *box counting*: 8, 16, 32 e 64 e o que melhor demarcou os hiPSC-CMs foi o *box counting* de 16, e para a redução do limiar de ruído (lim) foram testados os parâmetros: 0,3; 0,7; 0,9; 1,3; 1,7; 1,9 e o que apresentou melhor redução de ruído e qualidade de imagem para análise foi o lim 0,7.

Foi realizado o teste ANOVA com pareamento *Fisher*, onde os grupos cultivados com MPs apresentaram menor grau de alinhamento quando comparado com os que foram cultivados sem MPs, $p < 0,05$, ou seja, nos hiPSC-CMs cultivados em MPs as fibras estão mais alinhadas e compactadas do que os cultivados sem MPs, mesmo em pouco tempo em cultura foi observado a tendência de crescimento longitudinal demarcando a região do MPs (Fig.17).

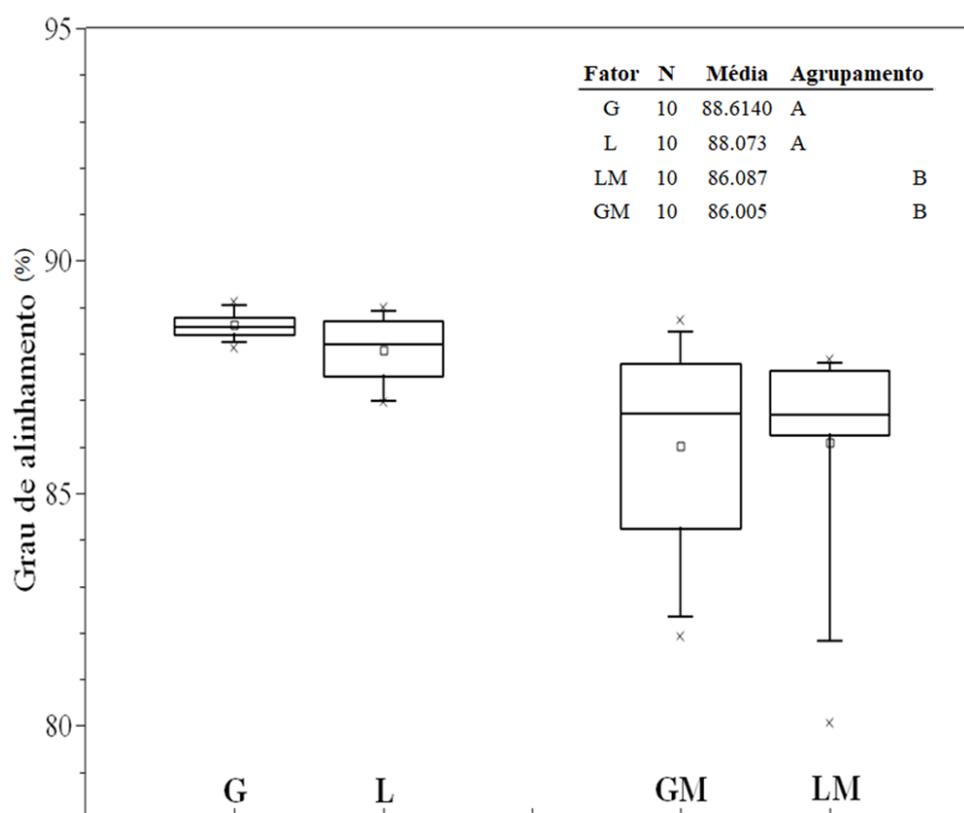


Figura 17: Gráfico do grau de alinhamento das fibras (parâmetros: *box counting* 16 e lim 0,7). Grupos L e G, são estatisticamente diferentes dos grupos LM e GM. Ou seja, os MPs aumentaram o grau de alinhamento ($p < 0,05$).

4.4 Análise TFM e EE

As análises de TFM e EE foram realizadas após 3 dias do plaqueamento dos hiPSC-CMs. Com o deslocamento das microesferas fluorescentes gerado pelos hiPSC-CMs, foi calculada a força de tração exercida por cada hiPSC-CMs antes e após o EE, e os hiPSC-CMs foram divididos em 8 grupos:

LM – hiPSC-CMs aderidos no MPs com a matriz LAM;

LME – hiPSC-CMs aderidos no MPs com a matriz LAM e EE;

GM – hiPSC-CMs aderidos no MPs com a matriz GTX;

GME – hiPSC-CMs aderidos no MPs com a matriz GTX e EE;

L – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz LAM e sem MPs;

LE – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz LAM, sem MPs e EE;

G – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz GTX e sem MPs;

GE – hiPSC-CMs aderidos ao gel de poliacrilamida com a matriz GTX, sem MPs e EE.

Para cada grupo, foram processados 9 imagens de hiPSC-CMs antes e após a estimulação elétrica totalizando 72 células analisadas. Durante o processamento, foi observado que algumas amostras apresentaram *outliers* e a fim de reduzir os vieses, foi realizada a normalização dos dados aplicando o menor valor de tração como imagem de referência. Com isso, obtivemos um total de 144 análises antes e após a normalização dos dados pela área de cada célula. Esses *outliers* podem ocorrer devido a um *prestress* que ocorreu com os hiPSC-CMs durante a aquisição das imagens, e também devido a um aumento do estresse celular durante a aquisição das imagens quando comparado com o gel não tensionado pode apresentar maior intensidade na hora de avaliar a força de tração camuflando os valores reais de tração. Os dados brutos e os dados normalizados, tanto pela área dos hiPSC-CMs quanto pelo valor de mínimo como referência, foram analisados e serão descritos a seguir:

Ao avaliar os dados não normalizados, *prestress*, imagens com a imagem de tripsina de referência, foi observado que os hiPSC-CMs aderidos no substrato, produziram uma tração mecânica que deslocaram as microesferas, resultando em uma alteração de suas posições iniciais. Nas figuras 18 e 19, foi observado que o mapa de tração de cada grupo comportou-se de maneira diferenciada, quando os hiPSC-CMs são cultivados ou não com MPs, também apresentaram padrões de forças diferentes após a EE. Os hiPSC-CMs cultivados com LM e L apresentaram maior força de tração quando comparados com os cultivados com GM e G (Fig.18). Os dados demonstraram que utilizar os MPs influencia na força de contração dos hiPSC-CMs e que após a aplicação da EE, todos os grupos apresentaram uma menor flutuação da amplitude de contração mantendo um sincronismo com o pulso aplicado.

Foi realizado teste ANOVA com pareamento de *Fisher* com $p < 0.05$ e $\alpha = 95\%$, nos dados sem normalização e observamos que todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados uns com os outros, mas quando comparados com seus respectivos grupos, antes e após a EE, somente o LM apresentou diferença estatística evidenciando que o LME tem uma tração quadrática média superior ao LM (Fig.19).

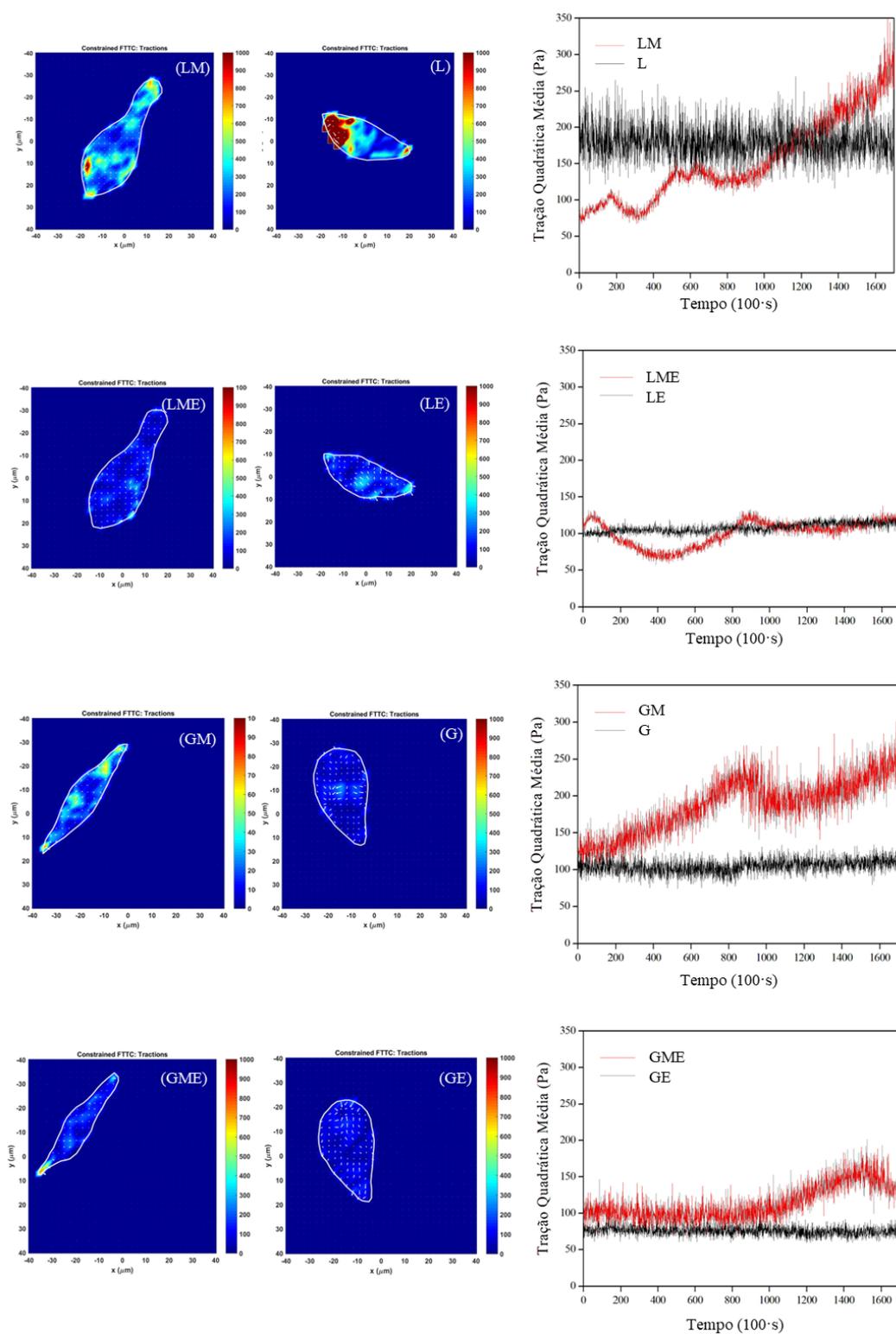


Figura 18: Mapa de tração comparativo entre grupos e gráficos da força de tração quadrática média dos hiPSC-CMs no tempo para avaliar o efeito dos MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM comparado com (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE comparado com (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX comparado com (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE comparado com (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagens obtidas do microscópio Leica DMI4000.

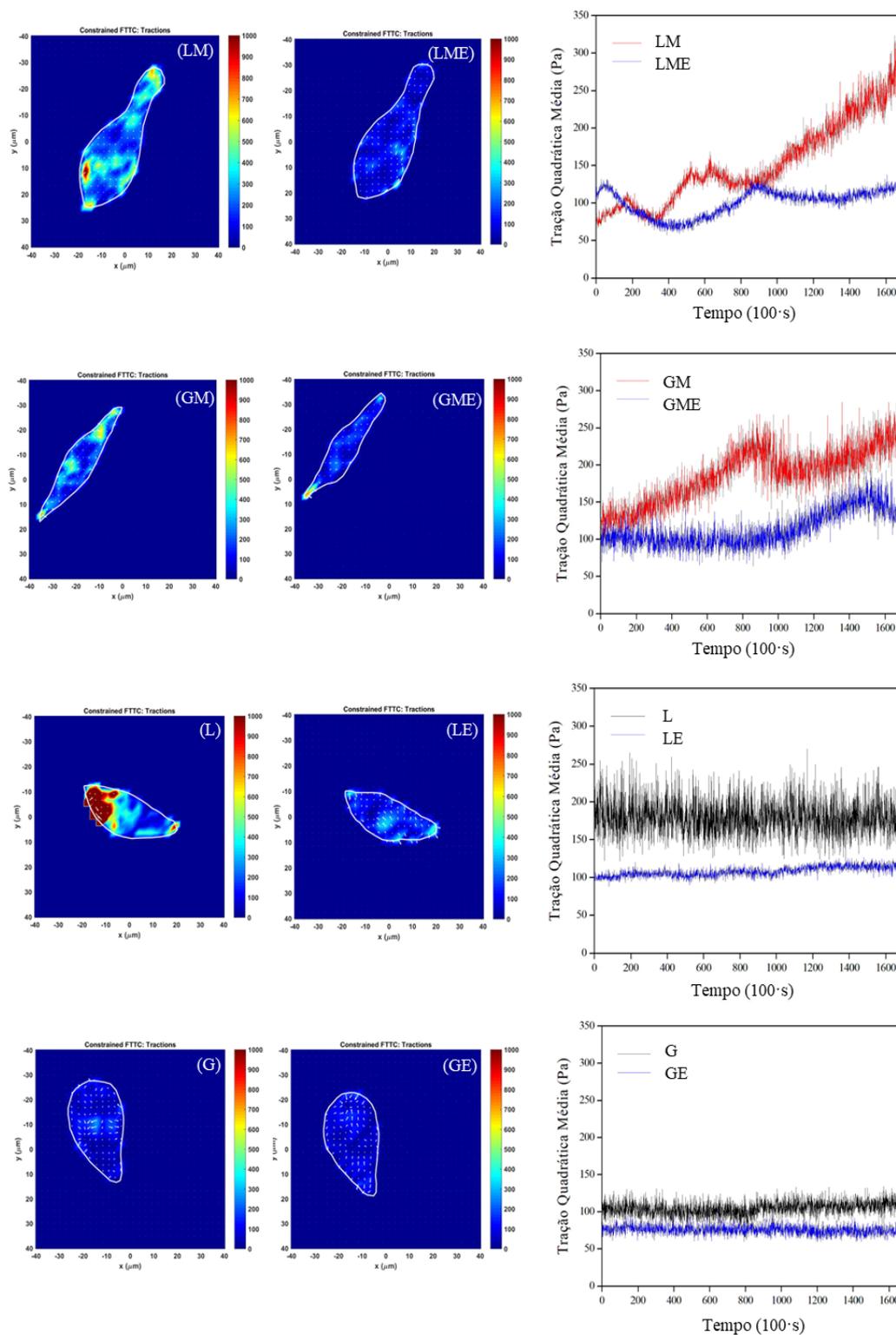


Figura 19: Mapa de tração comparativo intragrupos e gráficos da força de tração quadrática média dos hiPSC-CMs no tempo para avaliar o efeito do EE. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagens obtidas do microscópio Leica DMI4000.

Para a análise dos dados normalizados pela área, com a imagem de tripsina de referência, foram realizadas testes estatísticos de *Mann-Whitney* (não paramétrico) para avaliar três efeitos decorrentes dos dados obtidos: primeiro foi avaliado o efeito do tipo de Matriz utilizada, comparando os hiPSC-CMs cultivados com LAM, com os hiPSC-CMs cultivados com GTX, com e sem MPs, e antes e após o EE, e a comparação entre os LE x GE mostrou-se significativamente estatístico com $p < 0,05$ onde GE apresenta uma força quadrática média superior do que o LE, os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativa. Para a avaliação do efeito dos MPs, foram comparados os hiPSC-CMs cultivados com GTX com e sem MPs e antes e após o EE e com os hiPSC-CMs cultivados com LAM foram realizadas as mesmas comparações e observou-se que, os hiPSC-CMs cultivados com GTX, sem MPs e com EE, foram estatisticamente significativos onde GE apresentou uma força quadrática média superior ao GME e os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. Ao avaliar o efeito do EE, foi realizada a comparação intragrupos onde o mesmo grupo é comparado antes e após o EE e observamos que o GE apresentou uma força quadrática média superior ao G e os demais grupos não apresentaram resultados estatisticamente significativos (Fig. 20). Dados exemplificados na tabela 1.

Foi aplicado o teste ANOVA com comparação de *Fisher* para verificar o agrupamento das amostras e avaliar quais foram estatisticamente significantes, os grupos se dividiram em: 3 grupos onde LM é diferente estatisticamente de L, LE, GM, LME, que não apresentaram relevância estatística e G, GME, GE são estatisticamente significantes.

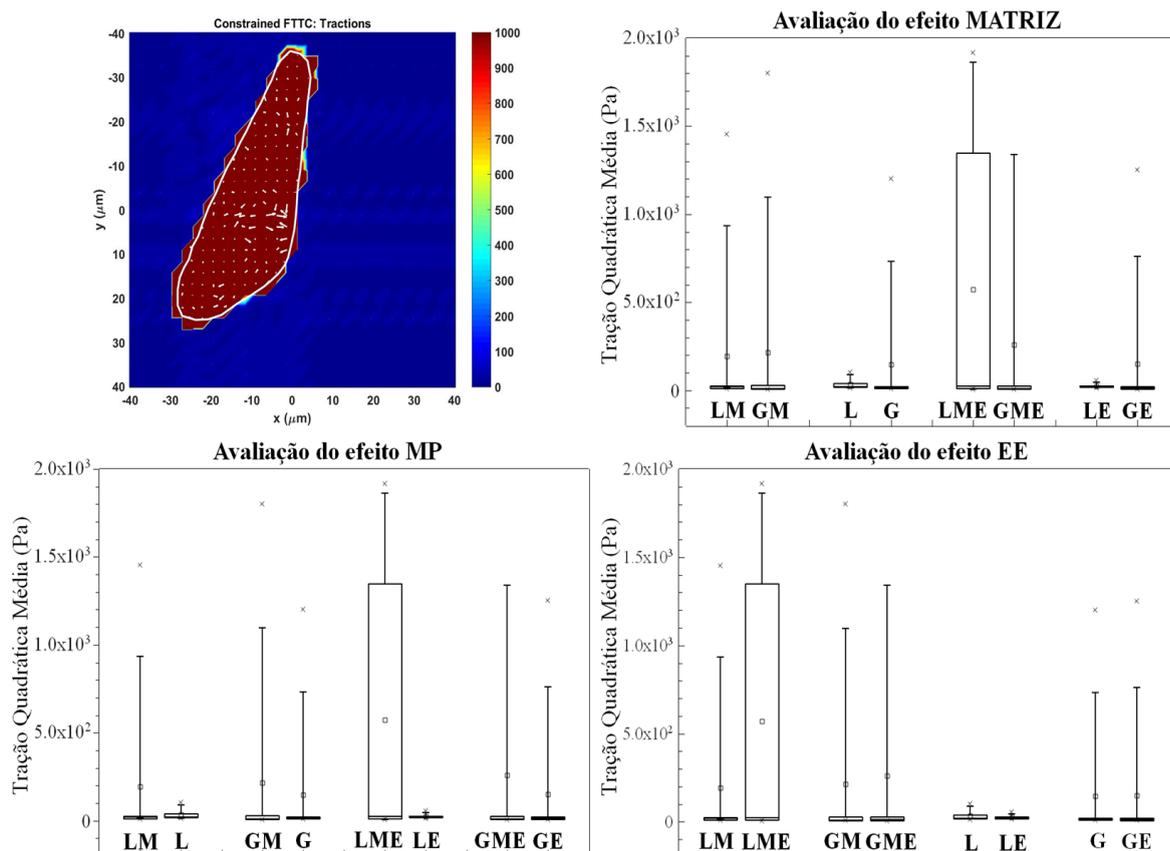


Figura 20: Mapa de tração *presstressed*. Gráficos *boxplot* da média das forças de tração dos hiPSC-CMs para avaliar o efeito da MATRIZ (LAM e GTX), do EE e dos MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MPs, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem micropadrão após a EE. Imagem obtida do microscópio Leica DMI4000.

Para a análise dos dados normalizados pela área e pelo menor valor de tração usado como referência, também foram aplicados testes estatísticos de *Mann-Whitney* para avaliar três efeitos decorrentes dos dados obtidos: primeiro foi avaliado o efeito do tipo de Matriz utilizada e observamos que a comparação entre os LE x GE mostrou-se significativamente estatístico com $p < 0,05$ onde GE apresenta uma força quadrática média superior do que o LE, os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativa. Para a avaliação do efeito dos MPs observamos que, os hiPSC-CMs cultivados com GTX, sem MPs e com EE, nenhum dos grupos apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. Ao avaliar o efeito do EE observamos novamente que nenhum dos grupos apresentaram resultados estatisticamente significativos (Fig. 21) Dados exemplificados na tabela 1.

Foi aplicado o teste ANOVA com comparação de *Fisher* para verificar o agrupamento das amostras e avaliar quais foram estatisticamente significantes, os grupos se dividiram em: 3 grupos onde L é diferente estatisticamente de LM, LE que não apresentaram relevância estatística e G, GM, GME, LME, GE são estatisticamente significantes.

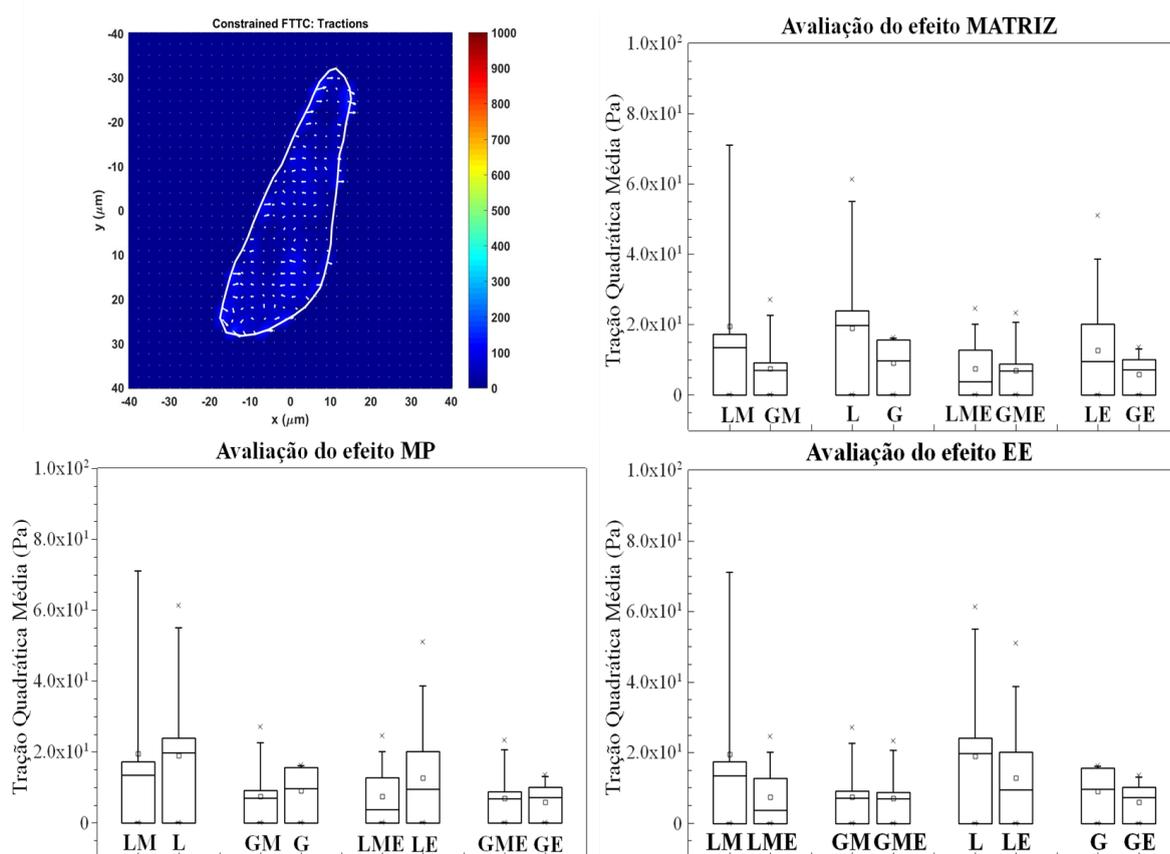


Figura 21: Mapa de tração normalizado pelo valor mínimo como referência. Gráficos *boxplot* da média das forças de tração dos hiPSC-CMs para avaliar o efeito da MATRIZ (LAM e GTX), do EE e dos MPs. Imagem do campo de tração dos hiPSC-CMs em estado contraído; (LM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de LAM, (LME) hiPSC-CMs cultivados em MPs após a EE, (GM) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX, (GME) hiPSC-CMs cultivados em MPs de GTX após a EE, (L) hiPSC-CMs cultivados sem MP, (LE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE, (G) hiPSC-CMs cultivados sem MPs e (GE) hiPSC-CMs cultivados sem MPs após a EE. Imagem obtida do microscópio Leica DMI4000.

Tabela 1: Representativo estatístico dos grupos de acordo com a média da tração quadrática normalizada pela área e pelo valor de tração mínima como referência *versus* média normalizada pela área.

| | Imagem referência tripsina | | | Imagem referência tração mínima | | |
|--------|----------------------------|---|-----|---------------------------------|---|-------|
| MATRIZ | LM | = | GM | LM | = | GM |
| | (*)L | > | G | L | = | G |
| | LME | = | GME | LME | = | GME |
| | (*)LE | > | GE | LE | < | (*)GE |
| MP | LM | = | L | LM | = | L |
| | GM | = | G | GM | = | G |
| | LME | = | LE | LME | = | LE |
| | GME | = | GE | GME | < | (*)GE |
| EE | LM | = | LME | LM | = | LME |
| | GM | = | GME | GM | = | GME |
| | L | = | LE | L | = | LE |
| | G | = | GE | G | < | (*)GE |

(*) estatisticamente significativo $p < 0,05$

Após a normalização dos dados, foi calculado o valor do delta quadrático que avalia a diferença da tração antes e após a aplicação do EE em cada célula analisada. Foi observado uma redução da força de tração quadrática média de aproximadamente 87 % em todos os grupos com e sem MPs e alguns *outliers* evidenciando esta diminuição (Fig. 22).

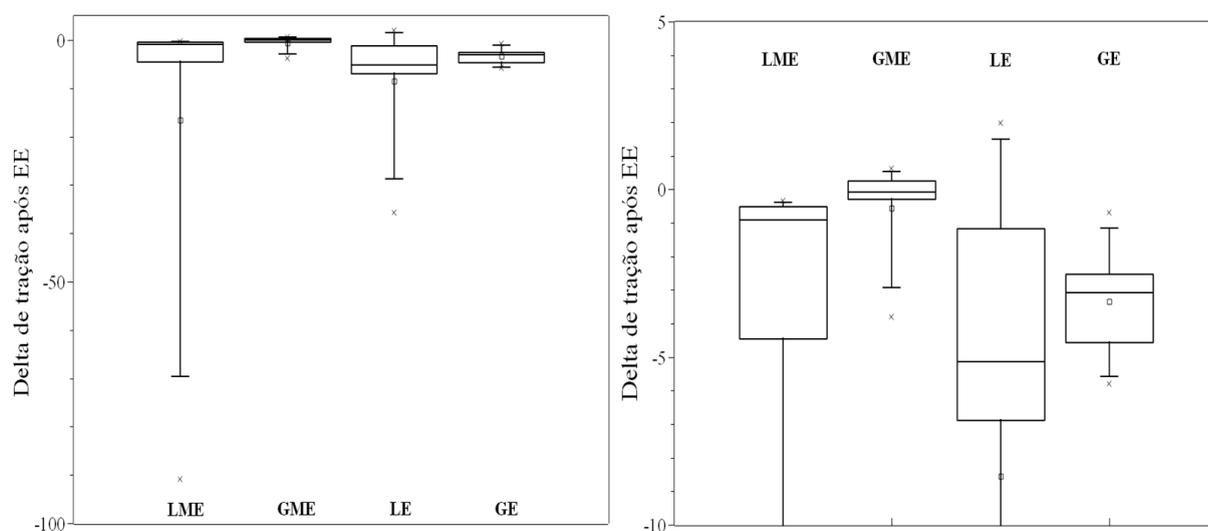


Figura 22: Gráfico do delta de tração após a EE. À esquerda observamos os valores obtidos e à direita a ampliação dos mesmos.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Esse projeto iniciou-se com o intuito de avaliar a relação entre o alinhamento das forças de tração com a morfologia de cardiomiócitos cultivados em MPs para minimizar os vieses morfológicos pois, quando os cardiomiócitos são cultivados livremente apresentam formas e tamanhos diferentes. A partir de uma parceria com a empresa Pluricell, que forneceram os hiPSC-CMs já diferenciados e prontos para o cultivo (53).

Os hiPSC-CMs apresentam imaturidade morfológica, fisiológica e bioquímica, além de exibirem formatos irregulares e desalinhados em cultura (38,39,45), com isso avaliar sua organização estrutural é de suma importância para acompanhar sinais de maturação que possam ocorrer após a aplicação de algumas técnicas como o prolongamento do tempo de cultivo, alterações bioquímicas, rigidez do substrato, estimulação biofísica, entre outras, que foram desenvolvidas a fim de melhorar o metabolismo energético deixando-o mais ativo a fim de obter hiPSC-CMs com perfil eletrofisiológico mais robusto (43,44,56).

A escolha da matriz também é fundamental para o desenvolvimento dos hiPSC-CMs em MPs, visto que, selecionamos e comparamos dois tipos distintos de matrizes para avaliar se a interação do substrato LAM e suas ligações de integrinas com a membrana celular seriam suficientes para o desenvolvimento dos hiPSC-CMs ou uma matriz GTX que, além das ligações de integrinas, tem mais componentes que integram a matriz extracelular se mostraria mais eficaz na adesão e até promover a maturação dos hiPSC-CMs como descrito por Feaster *et al.*, 2015 (26,57).

O uso da técnica de MPs, mostrou-se eficaz para o cultivo individual dos hiPSC-CMs e sua aplicação, tanto em hiPSC-CMs quanto em outros tipos celulares, tem se mostrado promissora para estudos mecânicos, bioquímicos, biofísicos e farmacológicos em células saudáveis ou doentes (26,27,31,58). Em contrapartida, os hiPSC-CMs possuem um citoesqueleto relativamente imaturo e desalinhado o que faz com que eles contraíam-se em diversas direções (27,38,40), e isso pode ter sido um dos fatores nos quais os mapas de força de tração no tempo avaliado, não apresentaram um padrão de contração linear.

O tempo de manutenção dos hiPSC-CMs foi o tempo mínimo recomendado na literatura (27), pois devido alguns fatores intrínsecos, os hiPSC-CMs entravam em apoptose com mais de 5-6 dias em cultura, com isso o melhor período de análise foi determinado entre o 3-4 dias após o plaqueamento. Conforme descrito por Ribeiro *et al.* 2015 e Wheelwright *et*

al. 2018, seria interessante manter os hiPSC-CMs por mais tempo em cultura para avaliar a influência dos MPs no processo de amadurecimento das células e organização dos pontos de adesão focal.

A construção do estimulador elétrico proporcionou a padronização e a definição dos parâmetros para a aplicação tanto da sincronização da contração celular, aplicada no presente estudo, quanto na exposição prolongada que poderá ser aplicada futuramente, em diferentes fases do desenvolvimento celular, intervalos de tempos e ajustes. Como o objetivo inicial do presente estudo era avaliar o sincronismo através da EE, o tempo de estímulo foi menor do que os descritos na literatura que avaliam a EE a longo prazo, iniciando a aplicação desde o processo de diferenciação, até o momento de maturação inicial visto que os hiPSC-CMs não amadurecem completamente mesmo após permanecerem por longos períodos em cultura (43,45,59,60).

Durante o tempo de aquisição das imagens a EE mostrou-se eficaz em manter a contração dos hiPSC-CMs por mais tempo durante a análise, diminuindo a força de tração quadrática média. O GTX mostrou-se estatisticamente mais eficaz do que a LAM, visto que os hiPSC-CMs tem uma afinidade de crescimento maior quando cultivado em GTX e a impressão do GTX no gel de poliacrilamida ficou melhor definido do que a impressão com LAM conforme descrito por Atmanli *et al.*, 2014. Observamos uma menor flutuação na tração quadrática média quando os hiPSC-CMs foram estimulados eletricamente, visto que o padrão aparenta mais uma contração superficial do que uma contração completa quando observamos o mapa de tração em função do tempo.

Após as análises de todos os dados dos grupos normalizados pela área, podemos presumir que os resultados dos grupos com EE foram os que apresentaram maior relevância estatística. Os dados demonstraram que utilizar o MPs influencia na força de contração dos hiPSC-CMs e que após a aplicação da EE, todos os grupos apresentaram uma menor flutuação da amplitude de contração. Isso ocorre devido a diminuição da tração quadrática média que após a aplicação da EE os hiPSC-CMs apresenta uma distribuição mais alinhada das fibras.

Observamos algumas tendências quando os hiPSC-CMs são cultivados em MPs, em relação ao alongamento das fibras durante o desenvolvimento das células, mas será necessário um número amostral maior do que os analisados e maior tempo de cultivo celular para inferir se os dados irão confirmar essas tendências.

O aprimoramento da técnica de impressão do MPs no gel de poliacrilamida foi um processo que demandou um longo tempo de aprendizado até o refinamento da técnica, visto que foram alterados alguns parâmetros para adequar a realidade e as condições do macro e microambiente celular conquistando a reprodutibilidade dos resultados.

Os avanços alcançados com o uso dos MPs na técnica de TFM, serão valiosos para a literatura pois uma das dificuldades encontrada na hora de normalização dos dados e na caracterização das propriedades mecânicas das células está relacionado com o fato de que as células apresentam formas e tamanhos diferentes, e com o uso dos micropadrões conseguimos controlar a maioria dos parâmetros do microambiente celular.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi gerado um protocolo final reprodutível e otimizado da técnica de impressão dos MPs, adequado para aplicação não somente nos hiPSC-CMs utilizados neste estudo, mas também para outras linhagens celulares, como, por exemplo, células musculares (mioblastos). Observamos que o uso da técnica de MPs para cultivo dos hiPSC-CMs, mesmo por um curto período de tempo (aproximadamente 3 dias), favoreceu o alinhamento das fibras, deixando o citoesqueleto dos hiPSC-CMs mais organizado quando comparado com aquelas não cultivadas nos MPs. A matriz GTX propiciou, ainda, aos hiPSC-CMs, uma afinidade de adesão superior quando comparada àquela induzida pela LAM, demonstrando que o uso da GTX tende a favorecer a maturação das células. Também verificamos que a utilização do estimulador elétrico durante a tomada de dados, nas experiências de TFM, resultou em uma tendência geral de minimizar flutuações na contração celular.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Aplicar essa metodologia para outros tipos de células musculares, utilizando outras geometrias e variando a matriz utilizada;
2. Avaliar o perfil metabólico e o grau de alinhamento e correlacionar com as alterações mecânicas;
3. Fazer testes quantitativos para avaliar a adesão focal das células cardíacas;
4. Realizar testes com estimulação elétrica com tempos variados.

8. REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Broughton KM, Russell B. Cardiomyocyte subdomain contractility arising from microenvironmental stiffness and topography. *Biomech Model Mechanobiol*. 2015 Jun;14(3):589–602.
2. Woodcock EA, Matkovich SJ. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Sep;37(9):1746–51.
3. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biol*. 2001;3(May):466–72.
4. D’Arcangelo E, McGuigan AP. Micropatterning strategies to engineer controlled cell and tissue architecture in vitro. *BioTechniques*. 2015 Jan 1;58(1):13–23.
5. Quist AP, Oscarsson S. Micropatterned surfaces: techniques and applications in cell biology. *Expert Opin Drug Discov*. 2010 Jun;5(6):569–81.
6. You C, Piehler J. Functional protein micropatterning for drug design and discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(1):105–19.
7. Wang Z, Millet LJ, Gillette MU, Popescu G. Jones phase microscopy of transparent and anisotropic samples. *Opt Lett*. 2008 Jun 1;33(11):1270–2.
8. Park CY, Tambe D, Alencar AM, Trepate X, Zhou EH, Millet E, et al. Mapping the cytoskeletal prestress. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2010 May;298(5):C1245-52.
9. Rodriguez ML, McGarry PJ, Sniadecki NJ. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Appl Mech Rev*. 2013 Oct 15;65(6):060801.
10. Fabry B, Maksym GN, Butler JP, Glogauer M, Navajas D, Fredberg JJ. Scaling the microrheology of living cells. *Phys Rev Lett*. 2001 Oct 1;87(14):148102.
11. Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol*. 2017 Aug 15;241:379–86.
12. Sacchetto C, Vitiello L, de Windt LJ, Rampazzo A, Calore M. Modeling Cardiovascular Diseases with hiPSC-Derived Cardiomyocytes in 2D and 3D Cultures. *Int J Mol Sci*. 2020 May 11;21(9).
13. Koivumäki JT, Naumenko N, Tuomainen T, Takalo J, Oksanen M, Puttonen KA, et al.

- Structural Immaturity of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes: In Silico Investigation of Effects on Function and Disease Modeling. *Front Physiol.* 2018 Feb 7;9:80.
14. Biagi D, Fantozzi ET, Campos-Oliveira JC, Naghetini MV, Ribeiro AF, Rodrigues S, et al. In Situ Maturated Early-Stage Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Improve Cardiac Function by Enhancing Segmental Contraction in Infarcted Rats. *J Pers Med.* 2021 May 4;11(5).
 15. Théry M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4201–13.
 16. Nitsan I, Drori S, Lewis YE, Cohen S, Tzllil S. Mechanical communication in cardiac cell synchronized beating. *Nat Phys.* 2016 May;12(5):472–7.
 17. Angelini TE, Hannezo E, Trepat X, Fredberg JJ, Weitz DA. Cell migration driven by cooperative substrate deformation patterns. *Phys Rev Lett.* 2010 Apr 23;104(16):168104.
 18. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:677–95.
 19. Tandon N, Cannizzaro C, Chao P-HG, Maidhof R, Marsano A, Au HTH, et al. Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nat Protoc.* 2009;4(2):155–73.
 20. Korolj A, Wang EY, Civitarese RA, Radisic M. Biophysical stimulation for in vitro engineering of functional cardiac tissues. *Clin Sci.* 2017 Jul 1;131(13):1393–404.
 21. Stoppel WL, Kaplan DL, Black LD. Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Jan 15;96:135–55.
 22. Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res.* 2002 Feb 8;90(2):223–30.
 23. Tseng Q, Wang I, Duchemin-Pelletier E, Azioune A, Carpi N, Gao J, et al. A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip.* 2011 Jul 7;11(13):2231–40.
 24. Lehnert D, Wehrle-Haller B, David C, Weiland U, Ballestrem C, Imhof BA, et al. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci.* 2004 Jan 1;117(Pt 1):41–52.

25. Tang X, Ali MY, Saif MTA. A Novel Technique for Micro-patterning Proteins and Cells on Polyacrylamide Gels. *Soft Matter*. 2012 Jul 21;8(27):7197–206.
26. Atmanli A, Hu D, Domian IJ. Molecular etching: a novel methodology for the generation of complex micropatterned growth surfaces for human cellular assays. *Adv Healthc Mater*. 2014 Nov;3(11):1759–64.
27. Jimenez-Vazquez EN, Jain A, Jones DK. Enhancing iPSC-CM Maturation Using a Matrigel-Coated Micropatterned PDMS Substrate. *Curr Protoc*. 2022 Nov;2(11):e601.
28. Harris A. Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Exp Cell Res*. 1973 Mar 15;77(1):285–97.
29. Carter SB. Haptotactic islands. *Exp Cell Res*. 1967 Oct;48(1):189–93.
30. Alom Ruiz S, Chen CS. Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter*. 2007;3(2):168–77.
31. Ribeiro AJS, Ang Y-S, Fu J-D, Rivas RN, Mohamed TMA, Higgs GC, et al. Contractility of single cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells depends on physiological shape and substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Oct 13;112(41):12705–10.
32. 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 30;131(5):861–72.
33. Murata M, Tohyama S, Fukuda K. Impacts of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapies and drug discovery. *Pharmacol Ther*. 2010 May;126(2):109–18.
34. Boudoulas KD, Hatzopoulos AK. Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease. *Dis Model Mech*. 2009;2(7–8):344–58.
35. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton Daniel. *Nature*. 2010;463(7280):485–92.
36. Sheehy SP, Grosberg A, Parker KK. The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012 Nov;11(8):1227–39.
37. Pasqualini FS, Nesmith AP, Horton RE, Sheehy SP, Parker KK. Mechanotransduction

- and metabolism in cardiomyocyte microdomains. *Biomed Res Int*. 2016 Dec 4;2016:4081638.
38. Li S, Chen G, Li RA. Calcium signalling of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol (Lond)*. 2013 Nov 1;591(21):5279–90.
 39. Ahmed RE, Anzai T, Chanthra N, Uosaki H. A Brief Review of Current Maturation Methods for Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Mar 19;8:178.
 40. Rodriguez ML, Graham BT, Pabon LM, Han SJ, Murry CE, Sniadecki NJ. Measuring the contractile forces of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with arrays of microposts. *J Biomech Eng*. 2014 May;136(5):051005.
 41. Robertson C, Tran DD, George SC. Concise review: maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*. 2013 May;31(5):829–37.
 42. Vuorenpää H, Penttinen K, Heinonen T, Pekkanen-Mattila M, Sarkanen J-R, Ylikomi T, et al. Maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes is improved in cardiovascular construct. *Cytotechnology*. 2017 Oct;69(5):785–800.
 43. Ronaldson-Bouchard K, Yeager K, Teles D, Chen T, Ma S, Song L, et al. Engineering of human cardiac muscle electromechanically matured to an adult-like phenotype. *Nat Protoc*. 2019 Oct;14(10):2781–817.
 44. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*. 2018 Apr 4;556(7700):239–43.
 45. Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*. 2014 Jan 31;114(3):511–23.
 46. Puig-De-Morales M, Grabulosa M, Alcaraz J, Mullol J, Maksym GN, Fredberg JJ, et al. Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *J Appl Physiol*. 2001 Sep;91(3):1152–9.
 47. Butler JP, Tolić-Nørrelykke IM, Fabry B, Fredberg JJ. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2002 Mar;282(3):C595-605.
 48. Pelham RJ, Wang Y I. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Dec 9;94(25):13661–5.

49. Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*. 1999 Apr;76(4):2307–16.
50. Suñé-Auñón A, Jorge-Peñas A, Aguilar-Cuenca R, Vicente-Manzanares M, Van Oosterwyck H, Muñoz-Barrutia A. Full L1-regularized Traction Force Microscopy over whole cells. *BMC Bioinformatics*. 2017 Aug 10;18(1):365.
51. Engler AJ, Carag-Krieger C, Johnson CP, Raab M, Tang H-Y, Speicher DW, et al. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3794–802.
52. Jacot JG, McCulloch AD, Omens JH. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 2008 Oct;95(7):3479–87.
53. Cruvinel E, Ogusuku I, Cerioni R, Rodrigues S, Gonçalves J, Góes ME, et al. Long-term single-cell passaging of human iPSC fully supports pluripotency and high-efficient trilineage differentiation capacity. *SAGE Open Med*. 2020 Oct 22;8:2050312120966456.
54. Dorta MP, de Brito IV, Pereira AC, Alencar AM. Quantification of alignment of vascular smooth muscle cells. *Cytometry A*. 2018 May;93(5):533–9.
55. Treppe X, Wasserman MR, Angelini TE, Millet E, Weitz DA, Butler JP, et al. Physical forces during collective cell migration. *Nat Phys*. 2009 Jun;5(6):426–30.
56. Wickramasinghe NM, Sachs D, Shewale B, Gonzalez DM, Dhanan-Krishnan P, Torre D, et al. PPARdelta activation induces metabolic and contractile maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. 2022 Apr 7;29(4):559-576.e7.
57. Feaster TK, Cadar AG, Wang L, Williams CH, Chun YW, Hempel JE, et al. Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2015 Dec 4;117(12):995–1000.
58. Wheelwright M, Win Z, Mikkila JL, Amen KY, Alford PW, Metzger JM. Investigation of human iPSC-derived cardiac myocyte functional maturation by single cell traction force microscopy. *PLoS ONE*. 2018 Apr 4;13(4):e0194909.
59. Yoshida S, Sumomozawa K, Nagamine K, Nishizawa M. Hydrogel Microchambers Integrated with Organic Electrodes for Efficient Electrical Stimulation of Human

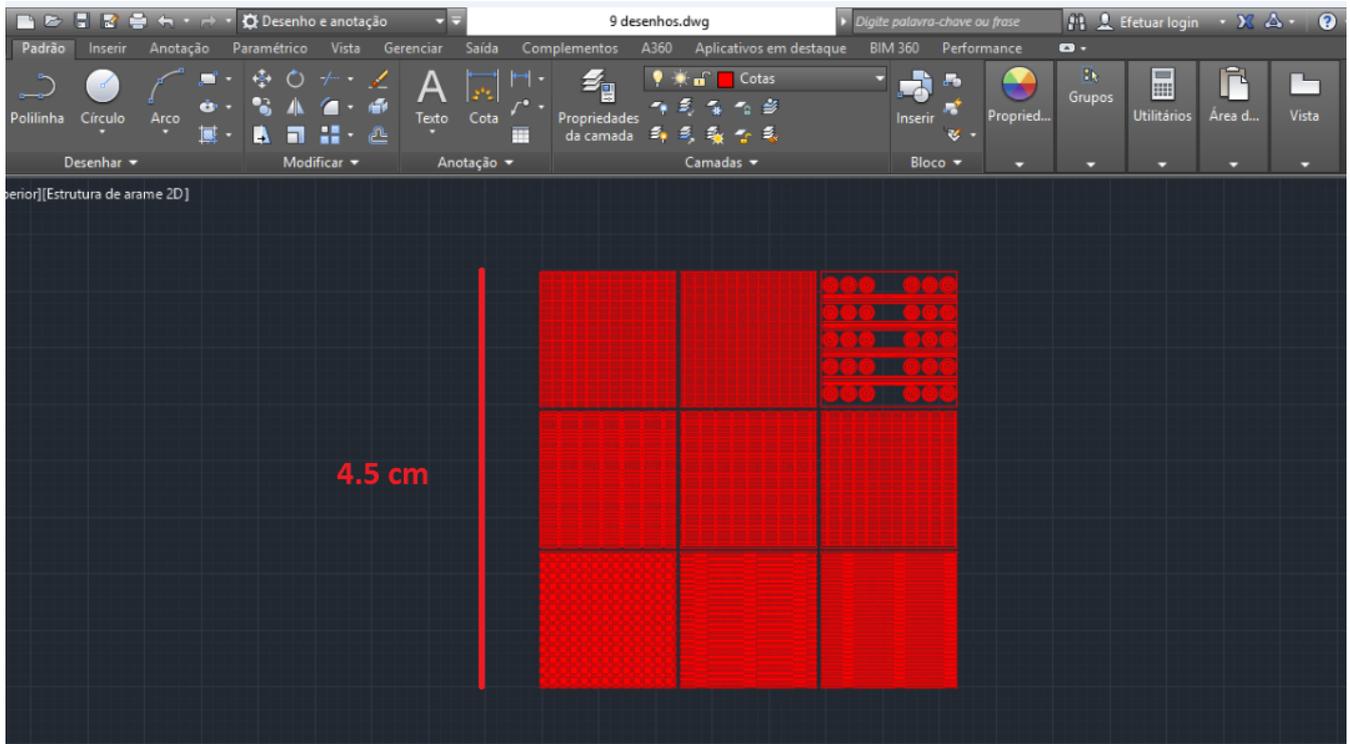
iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Macromol Biosci.* 2019 Jun;19(6):e1900060.

60. Kroll K, Chabria M, Wang K, Häusermann F, Schuler F, Polonchuk L. Electro-mechanical conditioning of human iPSC-derived cardiomyocytes for translational research. *Prog Biophys Mol Biol.* 2017 Nov;130(Pt B):212–22.

9. ANEXOS

9 ANEXOS

Molde PDMS Autocad®



Estimulador Elétrico

```
// *****
// * CHyGen - Cell Hypertrophic Generator *
// *   Software de controle geral   *
// *   Antonio Carlos Bloise Jr   *
// *   Novembro de 2019 - Copyright *
// *****
```

```
// ===== X =====
```

```
// *****
// DEFINIÇÕES
// *****
```

```
// Definições gerais
#define T_MAX      24.0 //Tempo de condicionamento máximo (h)
#define T_MIN      1.0 //Tempo de condicionamento mínimo (h)
#define R_MAX      19.9 //Metade do tempo de descanso máximo (s)
#define R_MIN      0.5 //Tempo de descanso mínimo (s)
```

```

#define W_MAX      10.0 //Metade da largura máxima do pulso de excitação (ms)
#define W_MIN      0.5 //Largura mínima do pulso de excitação (ms)
#define D_MAX      20.0 //Delay máximo entre dois pulsos consecutivos (s)
#define D_MIN      0.1 //Delay mínimo entre dois pulsos consecutivos (s)
#define N_MAX      10.0 //Número máximo de pulsos
#define N_MIN      1.0 //Número mínimo de pulsos
#define BÔTAAO    1.0 //Ligar BOTÃO no pino digital -> 1 <-
#define LED        2.0 //Ligar LED no pino digital -> 2 <-
#define BUZZER     3.0 //Ligar BUZZER no pino digital -> 3 <- (precisa ser pwm)
#define POTENCIOM A0 //Ligar POTÊNCIOMETRO no pino analógico A0 (Arduino
Uno)
#define SPLASH_TIME 3000.0 //Tempo de permanência da tela de inicialização
#define IN1        12 //Direção1 de rotação do Motor-A
#define IN2        13 //Direção2 de rotação do Motor-A
#define BASE_TEMPO 100.0 //Base de tempo geral em mili-segundos (ms)
#define FATOR_REST 2.0 //Fator de correção do tempo de descanso
#define FATOR_PULSE 2.5 //Fator de correção do tempo dos pulsos
#define FATOR_DELAY 1000.0 //Fator de correção do tempo de delay entre pulsos

```

```
// ===== X =====
```

```
// *****
// BIBLIOTECAS
// *****
```

```

#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
#include <DirectIO.h>
LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 2, 1, 0, 4, 5, 6, 7, 3, POSITIVE);

```

```
// ===== X =====
```

```
// *****
// DECLARAÇÕES DE VARIÁVEIS
// *****
```

```

int  botao;      // Determina o nível hierárquico do menu de opções dado pela
pressionamento do botão
int  splash;     // Splash Screen (1=mostra tela, 0=não mostra tela)
int  opcao;     // Determina quais são as opções do menu selecionado (1,2,3,4,5, de acordo
com a lista abaixo)
float overall_time; // (1) Tempo total do processo de condicionamento celular
float rest_time;   // (2) Tempo de descanso das células
float pulse_width; // (3) Largura do pulso de excitação
float pulse_delay; // (4) Intervalo de tempo entre dois pulsos consecutivos (período)
int  pulse_number; // (5) Número de pulsos durante a excitação
int  potenciometro; // Leitura temporária do potenciômetro
int  estimulacao; // Estado da estimulação elétrica: 1=ON e 0=OFF

```

```

int pulsing; // Pulso da estimulação elétrica: 1=ON e 0=OFF
float cont1,cont2; // Contadores gerais 1
float cont3,cont4; // Contadores gerais 2

// ===== X =====
//Splash Screen
void SHOW_SPLACH() {
  lcd.clear();
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print("*****");
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("CellHypertrophic");
  lcd.setCursor(3,2);
  lcd.print("Generator");
  lcd.setCursor(0,3);
  lcd.print("*****");
  splash=0;
  delay(SPLASH_TIME);
  lcd.clear();
}

// ===== X =====

// Mostra o menu principal
void SHOW_MENU0() {
  lcd.home();
  lcd.setCursor(1,0);
  lcd.print("Overall/Resting");
  lcd.setCursor(1,1);
  lcd.print("PW/Delay ");
  lcd.setCursor(1,2);
  lcd.print("# Pulses ");
  lcd.setCursor(1,3);
  if (estimulacao == 0) lcd.print("Run ");
  if (estimulacao == 1) lcd.print("Stop ");
}

// ===== X =====
// Aplica trem de pulsos
void PULSES(int a, int b, int c) {
  for (int i = 1; i <= a; i++) {

    // PW
    // ----
    // | + |
    // | + |
    //----| + |----
    // | - |

```

```

// | - |
// | - |
// ----- x (# Pulses)

digitalWrite(BUZZER,255);
digitalWrite(LED,255);
digitalWrite(IN1,HIGH);
digitalWrite(IN2,LOW);
delay(b/2.0);
digitalWrite(IN1,LOW);
digitalWrite(IN2,HIGH);
delay(b/2.0);
digitalWrite(IN1,LOW);
digitalWrite(IN2,LOW);
digitalWrite(BUZZER,0);
digitalWrite(LED,0);
delay(c);
}
}

// ===== X =====

// *****
// SETUP
// *****

void setup()
{

//Declarações PADRÃO
botao = 0;
splash = 1;
estimulacao = 0;
overall_time= 24; // HORAS
rest_time =3.5; // SEGUNDOS
pulse_width =1.0; // MILI-SEGUNDOS
pulse_delay =0.1; // SEGUNDOS
pulse_number= 5;
pulsing = 1;
cont1 = 0;
cont2 = 0;
cont3 = 0;
cont4 = 0;

pinMode(BOTAO,INPUT_PULLUP);
pinMode(BUZZER,OUTPUT);
pinMode(LED,OUTPUT);
pinMode(IN1,OUTPUT);
pinMode(IN2,OUTPUT);

```

```

Serial.begin(9600);
lcd.begin(16,4);

}

// ===== X =====

// ****
// LOOP
// ****

void loop()
{

//Splash Screen
if (splash == 1) SHOW_SPLACH();

//Menu PRINCIPAL
if (botao == 0) {

    SHOW_MENU0();
    potenciometro=analogRead(POTENCIOM);

    if (potenciometro >= 0 && potenciometro < 256) {
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,2);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,3);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print(">");
        opcao=1; //tempo total e de descanso
    }
    if (potenciometro >= 256 && potenciometro < 512) {
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,2);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,3);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(">");
        opcao=2; //largura e período dos pulsos
    }
    if (potenciometro >= 512 && potenciometro < 768) {
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(0,1);

```

```

    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(0,3);
    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(0,2);
    lcd.print(">");
    opcao=3; //número de pulsos
}
if (potenciometro >= 768 && potenciometro < 1024) {
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(0,2);
    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(0,3);
    lcd.print(">");
    opcao=4; //run...
}
}

//Menu SECUNDÁRIO: "Overall/Resting"
if (opcao == 1 && botao != 0) {
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Overall (h) ");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print("Rest (s) ");
    if (botao == 1) {
        potenciometro=analogRead(POTENCIOM);
        overall_time=map(potenciometro,0,1023,T_MAX,T_MIN);
        lcd.setCursor(12,0);
        lcd.print(" ");
        lcd.setCursor(12,0);
        lcd.print(overall_time);
        lcd.setCursor(13,1);
        lcd.print("?");
    }
    if (botao == 2) {
        potenciometro=analogRead(POTENCIOM);
        rest_time=0.5*map(potenciometro,0,1023,R_MAX,R_MIN);
        lcd.setCursor(12,1);
        lcd.print(rest_time);
        lcd.setCursor(13,0);
        lcd.print("?");
    }
    lcd.setCursor(0,2);
    lcd.print(" Press bottom");
    lcd.setCursor(1,3);
    lcd.print("to CHANGE/EXIT");
}
}

```

```

//Menu SECUNDÁRIO: "PW/Delay"
if (opcao == 2 && botao != 0) {
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print("PW (ms)");
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("Delay (s)");
  if (botao == 1) {
    potenciometro=analogRead(POTENCIOM);
    pulse_width =0.5*map(potenciometro,0,1023,W_MAX,W_MIN);
    lcd.setCursor(12,0);
    lcd.print(pulse_width);
    lcd.setCursor(13,1);
    lcd.print("?");
  }
  if (botao == 2) {
    potenciometro=analogRead(POTENCIOM);
    pulse_delay =0.05*map(potenciometro,0,1023,D_MAX,D_MIN);
    lcd.setCursor(12,1);
    lcd.print(pulse_delay);
    lcd.setCursor(13,0);
    lcd.print("?");
  }
  lcd.setCursor(2,2);
  lcd.print("Press bottom");
  lcd.setCursor(1,3);
  lcd.print("to CHANGE/EXIT");
}

//Menu SECUNDÁRIO: "# Pulses"
if (opcao == 3 && botao != 0) {
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print("Number of pulses");
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("(integer) ");
  if (botao == 1) {
    potenciometro=analogRead(POTENCIOM);
    pulse_number =map(potenciometro,0,1023,N_MAX,N_MIN);
    lcd.setCursor(11,1);
    lcd.print(" ");
    lcd.setCursor(11,1);
    lcd.print(pulse_number);
  }
  if (botao == 2) botao = 0;
  lcd.setCursor(2,2);
  lcd.print("Press bottom");
  lcd.setCursor(4,3);
  lcd.print("to EXIT");
}

```

```

//Menu SECUNDÁRIO: "Run" e "Stop"
if (opcao == 4 && botao != 0) {
  botao = 0;
  estimulacao=estimulacao+1;
  SHOW_MENU0();
  if (estimulacao > 1) {
    cont1 = 0;
    cont2 = 0;
    cont3 = 0;
    cont4 = 0;
    estimulacao = 0;
    pulsing = 1;
    overall_time= 24;
    rest_time =3.5;
    pulse_width =1.0;
    pulse_delay =0.1;
    pulse_number= 5;
  }
}

//Detecta botão pressionado e alterna entre 0 e 1
if (digitalRead(BOTAO) == LOW) {
  botao=botao+1;
  lcd.clear();
  if (botao > 2) botao=0;
}

//CICLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
if (estimulacao == 1) {

  //Estimativas de tempos traduzidas na base de tempo de 100ms (número de ciclos de
  100ms)

  cont2=((3.6E7)*overall_time)/(pulse_number*(pulse_width+(1000*pulse_delay)+(1000*rest
  _time/FATOR_REST)); //número total de repetições (lembrar que a base de tempo é 0.1s!!)
  cont4=(1000*rest_time/FATOR_REST)/BASE_TEMPO; //número total de ciclos de
  descanso na base de tempo geral

  //Inicia aplicando o trem de pulsos e depois espera tempo de descanso
  if (pulsing == 1)
  PULSES(pulse_number,FATOR_PULSE*pulse_width,FATOR_DELAY*pulse_delay);
  pulsing=0;

  //Aguarda um certo número de ciclos de 100ms referentes ao tempo de descanso
  cont3=cont3+1;
  if (cont3 >= (cont4)) {
    cont3 =0;
    pulsing=1;
  }
}

```

//Aguarda um certo número de ciclos de 100ms referentes ao tempo total do tratamento de eletro-choque

```

cont1=cont1+1;
if (cont1 >= (cont2)) {
  cont1    =0;
  cont2    =0;
  cont3    =0;
  cont4    =0;
  estimulacao=0;
  pulsing  =1;
}

```

```

}

```

```

delay(BASE_TEMPO);
//FINAL do código!!

```

```

/*Serial.print("cont1  :");
Serial.print(cont1);
Serial.print("\n");
Serial.print("cont2  :");
Serial.print(cont2);
Serial.print("\n");
Serial.print("cont3  :");
Serial.print(cont3);
Serial.print("\n");
Serial.print("cont4  :");
Serial.print(cont4);
Serial.print("\n");
Serial.print("estimul : ");
Serial.print(estimulacao);
Serial.print("\n");
Serial.print("pulsing : ");
Serial.print(pulsing);
Serial.print("\n");
Serial.print("\n");

```

```

Serial.print("overall : ");
Serial.print(overall_time);
Serial.print("\n");
Serial.print("rest  : ");
Serial.print(rest_time);
Serial.print("\n");
Serial.print("PW: ");
Serial.print(pulse_width);
Serial.print("\n");
Serial.print("delay  : ");
Serial.print(pulse_delay);
Serial.print("\n");
Serial.print("# pulses: ");

```

```
Serial.print(pulse_number);  
Serial.print("\n");  
Serial.print("estímulo: ");  
Serial.print(estimulacao);  
Serial.print("\n");  
Serial.print("\n");  
  
/*Serial.print("botao : ");  
Serial.print(botao);  
Serial.print("\n");  
Serial.print("opcao: ");  
Serial.print(opcao);  
Serial.print("\n");  
Serial.print("\n");*/  
  
}
```

1. Bloise, Antonio Carlos; Dos Santos, Jennifer Adriane; De Brito, Isis Vasconcelos; Bassaneze, Vinicius; Gomes, Ligia Ferreira; Alencar, Adriano Mesquita. Discriminating aspects of global metabolism of neonatal cardiomyocytes from wild type and KO-CSR3 rats using proton magnetic resonance spectroscopy of culture media samples. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 604–613, 2020. DOI: 10.1007/s11626-020-00497-8.
2. Cristofher Victor Vivas Palomares, Jennifer Adriane dos Santos, Yan Borges Barreto, Sérgio Hiroshi Toma, Jonnatan Julival dos Santos, Marco Antonio Stephano, Cristiano Luis Pinto de Oliveira, Koiti Araki, Adriano Mesquita Alencar, Antonio Carlos Bloise Junior. *Biochemical Response of Human Endothelial and Fibroblast Cells to Silver Nanoparticles*. *BioNanoSci.* 13,502–520(2023).<https://doi.org/10.1007/s12668-023-01091-4>

Manuscritos submetidos para publicação

Jennifer Adriane dos Santos, Antonio Carlos Bloise Junior, Adriano Mesquita Alencar. *Mechanical properties analysis of and electrical stimulation in cardiomyocytes cultivated in micropatterning.*