



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

FERNANDA BARBOSA DE GOUVEIA

**PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO NO RELAXAMENTO DE
CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA
INDUZIDA HUMANAS (hiPSC)**

CAMPINAS

2020

FERNANDA BARBOSA DE GOUVEIA

**PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO NO RELAXAMENTO DE
CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA
INDUZIDA HUMANAS (hiPSC)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Elétrica, na área de Engenharia Biomédica.

Orientador: JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Coorientadora: ROSANA ALMADA BASSANI

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Fernanda Barbosa de Gouveia, orientada pelo Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani e coorientada pela Profa. Dra. Rosana Almada Bassani.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

G745p Barbosa de Gouveia, Fernanda, 1994-
Papel dos transportadores de cálcio no relaxamento de cardiomiócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSC) / Fernanda Barbosa de Gouveia. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani.

Coorientador: Rosana Almada Bassani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Movimentação de cálcio. 2. Miócitos cardíacos. 3. Células-tronco pluripotentes induzidas. I. Bassani, José Wilson Magalhães, 1953-. II. Bassani, Rosana Almada, 1955-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of calcium transporters in the relaxation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem-cells

Palavras-chave em inglês:

Calcium handling

Cardiomyocytes

Induced pluripotent stem cells

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

José Wilson Magalhães Bassani [Orientador]

Leonardo Abdala Elias

Paulo Guimarães Gandra

Data de defesa: 23-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0666-7132>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1728003362547332>

COMISSÃO JULGADORA – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidata: Fernanda Barbosa de Gouveia RA: 211490

Data da defesa: 23 de novembro de 2020

Título da Tese: “Papel dos Transportadores de Cálcio no Relaxamento de Cardiomiócitos Derivados de Células-Tronco de Pluripotência Induzida Humanas (hiPSC)”

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente)

Prof. Dr. Leonardo Abdala Elias

Prof. Dr. Paulo Guimarães Gandra

A Ata de Defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Julgadora, encontra-se no SIGA (Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese) e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

*A todas mulheres fortes e inspiradoras que conheci, em especial, à minha avó,
Maria Aparecida*

AGRADECIMENTOS

No final, é tudo sobre as pessoas e eu queria agradecer àquelas que fizeram a diferença nessa jornada até aqui.

Aos meus orientadores, José Bassani e Rosana Bassani, por tudo que aprendi nesses anos, por compartilharem comigo a sua paixão pela ciência e por toda dedicação na realização desse trabalho.

Aos meus colegas do departamento, em especial, a Nelly, Amanda, Lizandra, Patrícia, Ellen, Erick, Jorge, Ahmad, Jair, pela amizade, pelas trocas e por acreditarem no meu trabalho.

Ao Professor Eduardo que tem o maravilhoso dom de conectar as pessoas. Ao professor Pedro, por sempre estar disposto a ajudar e com quem eu tive minha primeira experiência docente. A Elizângela, por toda paciência ao me guiar pelas práticas do laboratório. A Mauro e Flávio, pelo apoio técnico indispensável. Aos funcionários do CEB, por tornarem o ambiente tão acolhedor, pela gentileza e pela prontidão em ajudar. Ao Laboratório Nacional para Estudo do Cálcio Celular (LabNECC), pela estrutura fornecida para a realização do trabalho.

A Talita Marin, Paula Mafra, Grazielle Vasconcelos e Mariana Rodrigues, do Laboratório Nacional de Biologia (LNBio - CNPEM) por me ajudarem a desbravar o mundo da cultura de células, completamente novo pra mim. Ao Prof. Paulo e à Profa. Elaine pela prontidão em ajudar e por cederem os laboratórios.

A Thomas, por segurar a minha mão em todos os momentos e fazer o que estava no seu alcance, me ajudando a superar os desafios e a rir quando não havia mais nada a fazer. À minha irmã, Barbara, pela cumplicidade da vida toda, por acreditar sempre em mim e no meu trabalho, sendo minha primeira cliente da vida. A Aline e a Laís, pelo apoio e pelas trocas de experiência na vida acadêmica.

Aos meus pais, Fernando e Romilda, por quem eu sou, pelos valores que tenho e que coloco em tudo que faço. Obrigada por todo o suporte e por investirem na minha educação, para que eu tivesse as melhores oportunidades na vida. Agradeço, especialmente, à minha mãe, que quando criança me levava ao laboratório e me mostrou um mundo novo através das lentes de um microscópio.

A todos os meus professores, na escola, na faculdade, no intercâmbio e no mestrado, por despertarem em mim o interesse por aprender e me fazerem desejar inspirar as pessoas como eles me inspiraram. Em especial, agradeço ao meu professor de biologia do ensino médio, Beno Kuehne, que eu muito admiro, por ter me desafiado e me entusiasmado a entender os mecanismos por traz da vida que nos cerca.

A Deus, que criou todas as coisas, em toda sua beleza e complexidade, e nos dotou de inteligência para descobri-las e de curiosidade para querer entendê-las.

Agradeço também a todas as agências de fomento à pesquisa e educação que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho e a minha formação até aqui. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (No. 161225/2018-7 e 304010/2016-2) e da FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos (No. 01.13.0214.00).

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.”*

Fernando Pessoa, sob heterônimo de Ricardo Reis

RESUMO

Cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSC-CM) são obtidos a partir de uma nova tecnologia em que é possível reverter a diferenciação de células somáticas adultas e re-diferenciá-las em outro tipo celular. É grande o possível impacto da aplicação de hiPSC-CM como modelo *in vitro* de CM humano e em terapia celular, mas seu potencial pode ser limitado pela imaturidade morfológica e funcional dessas células, sendo o prolongamento do tempo de cultura uma das estratégias que podem promover a maturação. A elevação transitória da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) do CM (transiente de Ca^{2+}) em resposta à excitação elétrica é o fenômeno que dispara a contração. Dado que a função de transportadores deste íon e sua interação mudam com o desenvolvimento, a análise do transporte de Ca^{2+} é uma abordagem relevante para avaliar a maturidade funcional de hiPSC-CM. Os objetivos desse trabalho foram: a) avaliar quantitativamente a contribuição dos transportadores de Ca^{2+} responsáveis pela fase de queda do transiente de Ca^{2+} (relaxamento) em hiPSC-CM; b) investigar a influência do tempo de cultura sobre variáveis relacionadas ao transporte de Ca^{2+} nessas células; c) avaliar a variabilidade dessas variáveis dentro e entre lotes de hiPSC-CM. Transientes de Ca^{2+} foram registrados em hiPSC-CM adquiridos comercialmente e cultivados por 2 e 3 semanas pós-diferenciação, carregados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} indo-1. A razão da emissão em 410 e 485 nm (sob excitação de 365 nm) foi obtida durante contrações espontâneas e contraturas evocadas por cafeína, e posteriormente convertida a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Foram estimados os fluxos de Ca^{2+} carregados por sistema transportador, integrados durante o relaxamento, bem como a contribuição relativa de cada sistema. Os resultados indicaram que: a) o fluxo integrado total de Ca^{2+} removido no relaxamento de hiPSC-CM ($\sim 30 \mu\text{mol/L}$) é semelhante ao de CM de ratos neonatos e de CM atriais humanos; b) as participações da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, do trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ e do conjunto de ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+} são comparáveis aos de CM de mamíferos neonatos, e diferentes do observado em adultos; c) não houve diferença entre os valores das variáveis estudadas em células cultivadas por diferentes períodos; d) observou-se diferença significativa em todas as variáveis funcionais entre diferentes lotes, mas não dentro do mesmo lote para a maioria das variáveis. Com isso, conclui-se que os hiPSC-CM estudados apresentam um fenótipo imaturo no

transporte de Ca^{2+} , não ocorrendo maior maturação pelo prolongamento do tempo de cultura, o que indica a necessidade de outras estratégias para promover maior diferenciação para o padrão adulto. Conclui-se ainda que há variações importantes entre diferentes lotes, o que requer amostragem de vários deles para a obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis.

Palavras-chave: transporte de cálcio; cardiomiócitos; células-tronco de pluripotência induzida.

ABSTRACT

Cardiomyocytes derived from human induced-pluripotent stem cells (hiPSC-CM) can be obtained with a new technology, in which it is possible to reverse the differentiation of adult somatic cells and redifferentiate them into another cell type. The possible application of hiPSC-CM as an *in vitro* model of human CM and in cell therapy has raised great expectation; however, suitability of these cells for such uses may be limited by the hiPSC-CM morphofunctional immaturity. Prolongation of the culture time has been proposed as a strategy to promote hiPSC-CM maturation. The transient elevation of the CM cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), known as “ Ca^{2+} transient”, in response to electric excitation is the trigger of contraction. Because CM Ca^{2+} transporters and their interaction undergo developmental changes, analyzing Ca^{2+} transport is a relevant approach to evaluate the functional maturity of hiPSC-CM. The goals of the present study were: a) to evaluate quantitatively the contribution of Ca^{2+} transporters involved in the decline of the Ca^{2+} transient (relaxation) in hiPSC-CM; b) to investigate the influence of culture time on variables related to Ca^{2+} transport in these cells; c) to assess the intra- and inter-batch variability of these variables. Ca^{2+} transients were recorded in commercially acquired hiPSC-CM, which were cultured for 2 and 3 weeks post-differentiation, after loading with the Ca^{2+} fluorescent indicator indo-1. The ratio of emission at 410 and 485 nm (under 365 nm excitation) was calculated during spontaneous contractures and caffeine-evoked contractures, and subsequently converted to $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The Ca^{2+} fluxes carried by each transport system were estimated and integrated during relaxation, and the relative contribution of each system was calculated. The results indicated that: a) the total, integrated flux of Ca^{2+} removed from the cytosol during hiPSC-CM relaxation ($\sim 30 \mu\text{mol/L}$) is similar to neonatal ventricular CM and adult human atrial CM; b) the contribution of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger and of the pooled sarcolemmal Ca^{2+} ATPase and mitochondrial Ca^{2+} uniporter are comparable to those in neonatal mammalian CM, and different from those observed in adults; c) there was no significant difference in the studied variables obtained from cells cultured for different periods; d) for all tested functional variables, significant inter-batch variation was detected, while non-significant inter-batch variation was observed for most variables. Thus, it was possible to conclude that the analyzed hiPSC-CM present an immature Ca^{2+} transport phenotype, which was not changed by culture prolongation,

thus showing the need of other strategies to promote further differentiation toward the adult pattern. Important variation was also detected among different cell batches, which indicates that obtaining reproducible, reliable results requires sampling of several hiPSC-CM batches.

Keywords: calcium transport, cardiomyocytes, human induced pluripotent stem cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O Transporte de Ca²⁺ e a Função Contrátil do Coração	15
1.1.1. O acoplamento excitação-contração no cardiomiócito (CM).....	15
1.1.2. Interação dos transportadores de Ca ²⁺ no relaxamento de CM.....	17
1.2. Células-Tronco de Pluripotência Induzida (iPSC)	18
1.2.1. Cardiomiócitos Derivados de hiPSC (hiPSC-CM).....	19
1.2.2. Características Funcionais e Morfológicas de hiPSC-CM.....	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MÉTODOS	24
3.1. Registro de Transientes de Ca²⁺ em hiPSC-CM	24
3.1.1. Células	24
3.1.2. Registro de transientes de Ca ²⁺	25
3.1.3. Soluções	27
3.1.4. Sistema de perfusão	27
3.1.5. Protocolo experimental.....	28
3.2. Conversão da Razão de Fluorescência (R) em [Ca²⁺]	29
3.3. Estimativa dos Fluxos de Ca²⁺ Carreados pelos Diferentes Transportadores	30
3.3.1. Cálculo da concentração total de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _T) a partir de [Ca ²⁺] _i	31
3.3.2. Estimativa do estoque de Ca ²⁺ do RS	31
3.3.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos empíricos dos transportadores de Ca ²⁺	32
3.3.4. Cálculo do fluxo integrado carreado pelos transportadores de Ca ²⁺ durante um <i>twitch</i>	32
3.4. Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	35
4.1. Transientes de Ca²⁺ em hiPSC-CM	35
4.2. Influência do Tempo de Cultura sobre o Transporte de Ca²⁺ em hiPSC-CM	36
4.3. Lotes de hiPSC-CM e Variabilidade de Variáveis Relacionadas ao Transporte de Ca²⁺	37
4.4. Características do transporte de Ca²⁺ em hiPSC-CM	42
5. DISCUSSÃO	45

5.1. Transientes e Transporte de Ca²⁺ em hiPSC-CM	45
5.2. Influência do Tempo de Cultura sobre Variáveis Relacionadas ao Transporte de Ca²⁺ em hiPSC-CM	49
5.3. Variabilidade Interna e Externa a Lotes de hiPSC-CM.....	49
5.4. Limitações	50
5.5. Conclusões.....	51
PUBLICAÇÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Transporte de Ca^{2+} e a Função Contrátil do Coração

1.1.1. O acoplamento excitação-contração no cardiomiócito (CM)

A contração cardíaca que promove o bombeamento de sangue para os vasos arteriais se inicia com uma variação rápida no potencial de membrana (potencial de ação, PA) gerada espontaneamente nas células marca-passo localizadas no nódulo sinoatrial (Figura 1.1). A condução da atividade elétrica entre os CM ocorre por meio das junções *gap* nas regiões de contato entre os CM. O PA é propagado no miocárdio atrial até o nódulo atrioventricular. As células do nódulo atrioventricular conduzem a atividade elétrica com um atraso dos átrios para células cardíacas especializadas na condução da atividade elétrica, que propagam o PA em direção ao ápice do coração (feixe de His) e pela parede dos ventrículos, do ápice em direção à base (fibras de Purkinje).

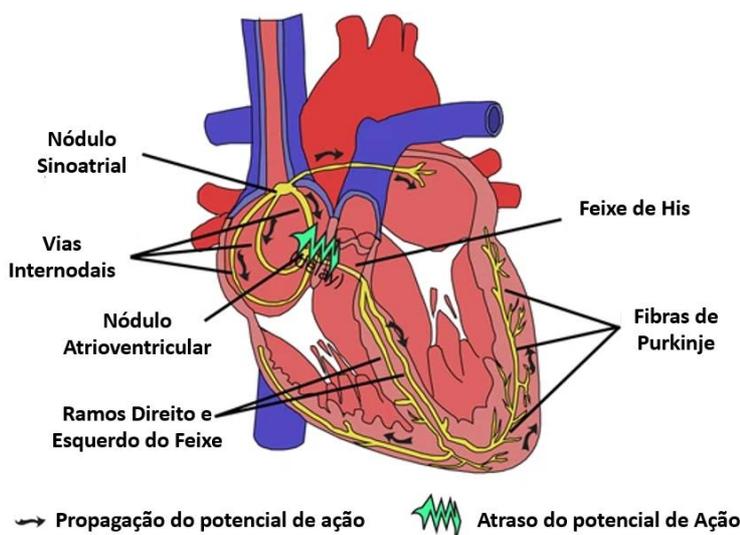


Figura 1.1: Propagação do potencial de ação ao longo do coração. Modificado de Monteiro *et al.*, 2017, sob a licença Creative Commons Attribution 4.0 (creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

O elo entre a excitação elétrica de CM e a sua contração é a variação da concentração de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]$) no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ou transiente de Ca^{2+} (Bers, 2001). O acoplamento excitação-contração se dá quando a despolarização da membrana de CM (sarcolema) durante o PA resulta na abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão (Figura 1.2). Enquanto a $[\text{Ca}^{2+}]$ no meio extracelular é de cerca de 1,2 mM, a

$[Ca^{2+}]_i$ diastólica é de 0,1-0,2 μM (Bers, 2001). Portanto, a abertura dos canais de Ca^{2+} resulta numa corrente de entrada de Ca^{2+} na célula (I_{Ca}) a favor do gradiente eletroquímico transmembrana do íon. Com o aumento de $[Ca^{2+}]$ local na região subsarcolema, aumenta a probabilidade de abertura dos canais de liberação de Ca^{2+} (receptores de rianodina, RyR) do retículo sarcoplasmático (RS), e parte do estoque de Ca^{2+} desta organela é liberado. Este fenômeno é chamado de “liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ” (Fabiato, 1983).

O aparelho contrátil de CM é composto de miofilamentos formados por proteínas contráteis e empacotados em paralelo nas miofibrilas. Com aumento da $[Ca^{2+}]_i$, o íon se liga à troponina C (TnC) nos miofilamentos, o que dispara o processo de contração. O relaxamento de CM ocorre à medida que $[Ca^{2+}]_i$ é reduzida pela ação de transportadores de Ca^{2+} , e Ca^{2+} se dissocia da TnC (Bers, 2001). Um esquema desse processo pode ser visto na Figura 1.2.

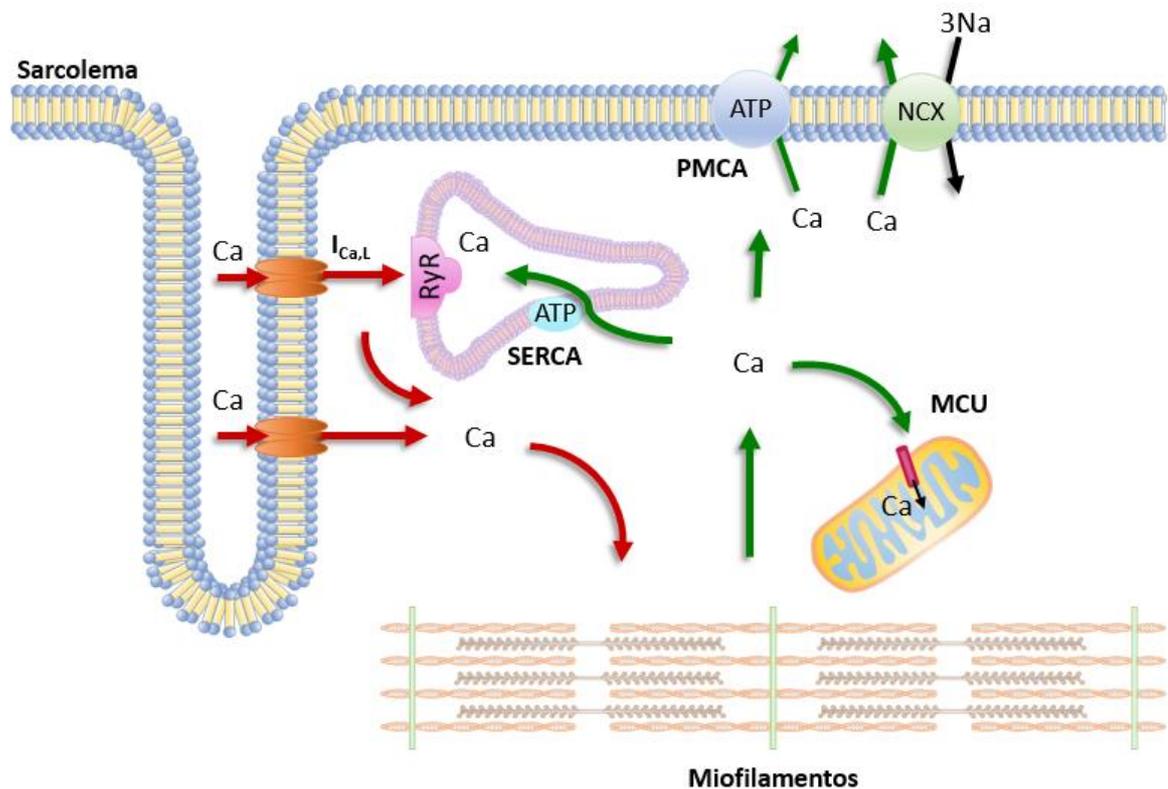


Figura 1.2: Transporte de Ca^{2+} no cardiomiócito. As setas vermelhas e verdes indicam os processos relacionados ao aumento e à diminuição da concentração de Ca^{2+} no citosol durante a contração e relaxamento, respectivamente. $I_{Ca,L}$: Corrente de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} do tipo L; SERCA: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; NCX: trocador Na^+-Ca^{2+} ; PMCA: ATPase de Ca^{2+} do sarcolema; MCU: *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+} ; ATP: ATPase; RyR: receptor de rianodina.

1.1.2. Interação dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento de CM

Os sistemas de transporte envolvidos na remoção de Ca^{2+} durante o relaxamento são a ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA), o trocador Na^+ - Ca^{2+} (NCX), a ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (PMCA) e o *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+} (MCU). NCX e PMCA transportam Ca^{2+} para o meio extracelular, o primeiro à custa do gradiente eletroquímico de Na^+ , e a segunda com gasto de ATP. SERCA transporta Ca^{2+} ativamente para dentro do RS, e MCU medeia o fluxo de Ca^{2+} para a matriz mitocondrial a favor do gradiente eletroquímico. Em regime permanente (*steady state*), assume-se que o influxo total de Ca^{2+} durante a contração seja igual ao efluxo total no relaxamento. Isto significa que a quantidade de Ca^{2+} que entra no citosol via I_{Ca} deve ser igual à quantidade extruída por NCX e PMCA no relaxamento. O mesmo ocorreria para o fluxo de Ca^{2+} para fora e dentro do RS, de modo que SERCA faça a reposição da quantidade de Ca^{2+} liberada através de RyR na contração.

Trabalhos anteriores mostraram que a contribuição relativa de cada transportador para a remoção de Ca^{2+} citosólico, que leva ao relaxamento, varia de acordo com, entre outros fatores, a espécie e a etapa de desenvolvimento do indivíduo (Bassani *et al.*, 1994; 1995a; Bassani & Bassani, 2002). Em 1992, Bassani e colaboradores desenvolveram um protocolo que permitiu avaliar a contribuição dos transportadores, investigando o efeito da inibição seletiva de um ou mais sistemas de transporte sobre o curso temporal do relaxamento de CM ventriculares de coelho. Foi possível concluir que SERCA e NCX são os principais transportadores de Ca^{2+} , enquanto PMCA e MCU juntos têm participação menor que 5%, sendo referidos como transportadores lentos (Bassani *et al.*, 1992). Em 1994, o mesmo grupo desenvolveu um método para quantificar os fluxos de Ca^{2+} e a participação relativa (PR) de cada transportador na mediação do fluxo integrado total durante a fase de declínio de transientes de Ca^{2+} em contrações eletricamente evocadas (*twitch*). Com este método, determinaram que SERCA, NCX e transportadores lentos contribuem para 70%, 28% e 2%, respectivamente, da remoção de Ca^{2+} em CM ventricular de coelho e com 92%, 7% e 1%, respectivamente, em rato (Bassani *et al.*, 1994). Em CM ventricular humano e de furão, a interação dos transportadores é mais semelhante à em coelho, embora as taxas de transporte de Ca^{2+} possam diferir (Bers, 2001; Bassani *et al.*, 1995a).

O estágio de desenvolvimento também influencia na interação dos transportadores de Ca^{2+} numa mesma espécie. A contribuição de SERCA para

remoção de Ca^{2+} aumenta de 78% para 92% em CM de ratos do nascimento até a idade adulta, enquanto a de NCX cai de 17% para 5% (Bassani & Bassani, 2002). Além disso, a quantidade total de Ca^{2+} transportado durante um *twitch*, aumenta de 26 para 80 $\mu\text{mol/L}$. Em CM ventriculares de coelho, também foi observada uma diminuição no transporte por NCX de 3 para 20 dias de idade (Huang *et al.*, 2005).

A interação dos transportadores também pode ser alterada em cardiomiopatias. Em CM ventriculares de coelho com insuficiência cardíaca, foi observada uma redução na PR de SERCA de 71% para 52%, e um aumento na de NCX de 29% para 48%, com base no curso temporal do relaxamento (Pogwizd *et al.*, 1999). Em corações humanos explantados de receptores de transplante, resultados semelhantes foram obtidos em CM ventriculares na vigência de insuficiência cardíaca em humanos: diminuição na PR de SERCA de 76% para 69% e aumento na de NCX de 24% para 31% (Piacentino III *et al.*, 2003). Nos dois trabalhos, relatou-se redução do fluxo total de Ca^{2+} mobilizado durante o relaxamento na insuficiência cardíaca.

1.2. Células-Tronco de Pluripotência Induzida (iPSC)

Após a fecundação, o zigoto começa a se dividir. Na fase de mórula, as células são totipotentes, sendo capazes de originar qualquer tecido embrionário e a parte fetal da placenta (Seydoux & Braun, 2006). Com o avanço do desenvolvimento, parte das células dará origem à placenta (sincício e citotrofoblastos) e outra parte, as chamadas de células-tronco embrionárias (hESC) é pluripotente, i.e., capaz de se diferenciar nas células de qualquer tecido embrionário. Por esta característica, há um grande interesse no uso terapêutico de hESC na regeneração de tecidos. Entretanto, existem questões éticas relacionadas ao uso de embrião humano para estes fins, que dificultam a exploração dessa aplicação.

Até 1962, acreditava-se que células completamente diferenciadas não poderiam retornar a um estado de pluripotência. Isto foi questionado quando Gurdon conseguiu realizar a transferência do núcleo de uma célula de epitélio intestinal de girino para um ovo anucleado de sapo, dando origem a um girino geneticamente idêntico ao doador do núcleo (Gurdon, 1962). Com este experimento, foi demonstrado que a informação genética para dar origem a um indivíduo não se perde com a diferenciação. Em 2006, Takahashi e Yamanaka conseguiram isolar quatro fatores de transcrição (OCT3/4, SOX2, KLF4 e MYC) que juntos foram capaz de induzir

pluripotência em fibroblastos de camundongo por reverter a diferenciação destas células, dando origem às chamadas células tronco de pluripotência induzida (*induced pluripotent stem cells* – iPSC; Takahashi & Yamanaka, 2006). A pluripotência das iPSC geradas foi demonstrada pela formação de um corpo embrióide em cultura, com todos os tecidos embrionários. No ano seguinte, Yamanaka e colaboradores reproduziram o processo com células humanas (hiPSC) usando os mesmos fatores de transcrição (Takahashi *et al.*, 2007). Por demonstrarem que células adultas podem ser reprogramadas em células pluripotentes, Gurdon e Yamanaka receberam o Prêmio Nobel em Medicina em 2012.

Como as hiPSC podem se replicar e dar origem a vários tipos celulares, as suas aplicações são vastas. Elas têm sido fonte quase que ilimitada de modelos para estudo de doenças humanas, permitindo entender mecanismos patológicos e descobrir alvos terapêuticos, além da sua possível aplicação em terapia celular.

1.2.1 Cardiomiócitos Derivados de hiPSC (hiPSC-CM)

Doenças cardiovasculares foram responsáveis por 17,9 milhões de mortes em 2016, correspondendo a quase um terço do total no ano (Organização Mundial da Saúde, 2020). Deste modo, há um interesse especial na diferenciação de hiPSC em CM. O uso de hiPSC-CM como modelo de CM humano, em comparação com modelos animais, permitiria entender melhor mecanismos subjacentes às cardiomiopatias e descobrir alvos terapêuticos (Figura 1.3), dada a existência de diferenças anatomofisiológicas entre espécies. Wu *et al.* observaram que hiPSC-CM obtidos a partir de pacientes com disfunção diastólica foram capazes de reproduzir, em nível celular, o fenótipo da doença e o efeito de medicamentos para o seu tratamento (Wu *et al.*, 2019). Como modelo de miocárdio humano para testes de cardiotoxicidade, hiPSC-CM tem um grande potencial de reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de novos medicamentos não só para tratamento de cardiomiopatias, como também de outras doenças (Greenberg *et al.*, 2018). hiPSC-CM foram capazes de reproduzir *in vitro* efeitos cardiotóxicos de medicamentos semelhantes aos apresentados em pacientes (Burrige *et al.*, 2016), demonstrando também seu potencial no desenvolvimento de terapia personalizada.

Outra aplicação promissora de hiPSC-CM é em terapia celular (Figura 1.3), dada a limitada capacidade de regeneração do tecido cardíaco. Espera-se que hiPSC-CM possam ser usados na recuperação de tecido danificado por isquemia pós-

infarto, oferecendo uma possibilidade de transplante autólogo, o que reduziria o risco de rejeição. Em camundongos, foram observados resultados encorajadores nesta direção, com alta adesão de enxerto de iPSC-CM e outros tipos de células progenitoras derivadas de iPSC, e melhora da função cardíaca após infarto do miocárdio. Entretanto, esses efeitos parecem estar mais relacionados aos efeitos parácrinos do enxerto do que a uma possível reposição do miocárdio (Mauritz *et al.*, 2011; Tachibana *et al.*, 2017).

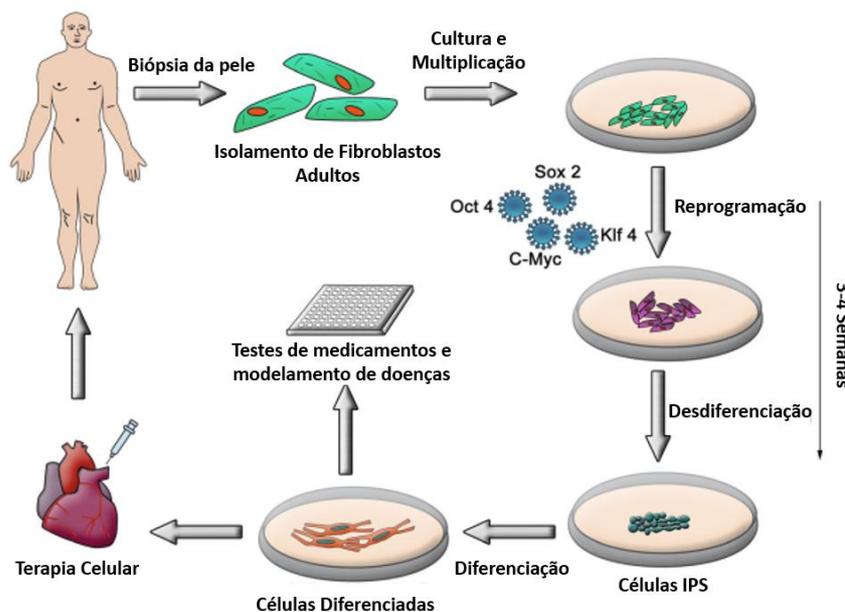


Figura 1.3: Processo de obtenção de hiPSC-CM a partir de células somáticas de adultos e suas possíveis aplicações. Modificado de Abou-Saleh *et al.*, 2018, sob a licença Creative Commons Attribution 4.0 (creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1.2.2 Características Funcionais e Morfológicas de hiPSC-CM

A caracterização de hiPSC-CM é essencial para que seja possível definir os limites da sua aplicabilidade. Diferente de CM adultos, hiPSC-CM se contraem espontaneamente, sugerindo diferenças eletrofisiológicas, entre elas menor densidade de canais retificadores para entrada de K^+ (I_{K1}) e maior densidade da corrente mediada pelo NCX (I_{NCX}) (Zhang & Morad, 2020; Di Baldassarre *et al.*, 2018). Com relação à morfologia, hiPSC-CM são pequenos e esferóides, se assemelhando muito mais a CM de neonatos do que aos de adultos (Di Baldassarre *et al.*, 2018). Funcionalmente, a ausência de túbulos T em hiPSC-CM pode implicar na falta de uniformidade espacial e sincronismo de transientes de Ca^{2+} ao longo do CM (Lee *et al.*, 2011; Di Baldassarre *et al.*, 2018; Pesl *et al.*, 2016). Além disso, análises da ultraestrutura de hiPSC-CM mostraram pouco alinhamento das miofibrilas (Kane *et*

al., 2015; Di Baldassarre *et al.*, 2018). Desse modo, a imaturidade de hiPSC-CM pode limitar seu uso como modelo de CM humano.

Diversas estratégias vêm sendo aplicadas para promover a maturação de hiPSC-CM e superar essa limitação, entre elas cultura tridimensional, estimulação elétrica e/ou mecânica cíclica, e prolongamento do tempo de cultura (Sun & Nunes, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2020).

O efeito do prolongamento do tempo de cultura sobre a maturação de hiPSC-CM foi investigado por vários grupos. Lundy e colaboradores compararam as características funcionais e morfológicas de CM derivados de hESC (hESC-CM) e hiPSC-CM cultivados por curto prazo (20-40 dias) com cultivados por longo prazo (80-120 dias). O cultivo por mais tempo resultou em abreviação do transiente de Ca^{2+} , acompanhado de aumento da amplitude e prolongamento de contração dos dois tipos de CM, mas não foi observada diferença na frequência de contrações espontâneas. Morfologicamente, observou-se maior densidade e alinhamento de miofilamentos (Lundy *et al.*, 2013; Kamakura *et al.*, 2013). Trabalhos mais recentes relataram as mesmas modificações nos transientes de Ca^{2+} de hiPSC-CM após 4 vs. 1 semana de cultura (Kumar *et al.*, 2019).

Hwang e colaboradores compararam a evolução do transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM cultivados em meio de diferenciação por 15, 21 e 30 dias, utilizando o mesmo protocolo desenvolvido por Bassani *et al.* (1992). Também foi observado, com o prolongamento da cultura, aumento da amplitude e aceleração da queda de transientes de Ca^{2+} , e maior impacto da inibição do acúmulo resultante de Ca^{2+} pelo RS, efeitos que saturaram aos 21 dias de cultura. Uma estimativa das contribuições dos transportadores mostrou um padrão semelhante ao descrito em CM de coelhos adultos, mas não ao de camundongos (o qual se aproxima do padrão visto no rato) (Hwang *et al.*, 2015). No entanto, os autores se basearam na razão de constantes de tempo de declínio de transientes de Ca^{2+} não calibrados, e não em estimativa dos fluxos de Ca^{2+} . Portanto, os resultados são aproximações que não levam em conta a relação entre velocidade de transporte e valores de $[Ca^{2+}]_i$ (cinética de Michaelis-Menten), podendo, assim, conter imprecisões resultantes do excesso de simplificações e da não linearidade da relação entre o sinal de fluorescência do indicador de Ca^{2+} e $[Ca^{2+}]_i$.

Considerando a importância do transporte de Ca^{2+} na função e fisiopatologia do miocárdio, o grande impacto da possível utilização de hiPSC-CM em terapia

cardiológica e como modelo experimental, e a falta de dados quantitativos que permitam melhor caracterização do transporte de Ca^{2+} neste tipo de células, buscou-se, no presente estudo, quantificar a PR dos transportadores de Ca^{2+} na remoção deste íon do citosol em hiPSC-CM, por meio da estimativa dos fluxos de Ca^{2+} individuais, integrados no período de declínio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Foram também analisados outros aspectos para melhor caracterização desta preparação, como o tempo de cultura e variabilidade entre lotes de células.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a interação dos transportadores de Ca^{2+} em hiPSC-CM, caracterizando quantitativamente a sua contribuição na remoção do Ca^{2+} citosólico durante o relaxamento de um *twitch*.

2.2. Objetivos específicos

- a) Determinar a amplitude e curso temporal de transientes de Ca^{2+} em hiPSC-CM durante contrações espontâneas e durante a inibição seletiva de transportadores de Ca^{2+} .
- b) Estimar os parâmetros cinéticos empíricos da SERCA, do NCX e do conjunto dos transportadores lentos (PMCA e MCU).
- c) Estimar os fluxos de Ca^{2+} total e carregado por transportadores individuais, e a PR destes na remoção de Ca^{2+} do citosol nessas células.
- d) Comparar transientes de Ca^{2+} e a interação entre os transportadores em hiPSC-CM cultivados por duas e por três semanas.
- e) Investigar a variabilidade de variáveis relativas ao transporte de Ca^{2+} dentro de um lote e entre lotes diferentes de hiPSC-CM.

3. MÉTODOS

3.1. Registro de Transientes de Ca^{2+} em hiPSC-CM

3.1.1. Células

Cardiomiócitos derivados de hiPSC foram adquiridos da empresa PluriCell Biotech (São Paulo, SP). Segundo informação do provedor, as hiPSC foram produzidas por reprogramação de eritroblastos de um homem adulto. Para diferenciação em CM, as hiPSC foram mantidas em meio de diferenciação durante 5 dias, e depois em um meio de manutenção (meio RPMI 1640, Gibco Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA; suplementado com 0,73 mM ácido ascórbico e 0,5 g.L⁻¹ de albumina de soro bovino; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Ainda segundo o provedor, dados de citometria de fluxo indicaram que esse processo de diferenciação resulta em ~54% de CM com a isoforma ventricular de cadeia leve de miosina após 13 dias em cultura com meio de manutenção, i. e., no dia 13 pós-diferenciação (PD). Foi dispensada avaliação pelo sistema CEP/CONEP por se tratarem de células modificadas, adquiridas comercialmente (Ofício 17/2019 CEP/PRP/UNICAMP).

A cultura de hiPSC-CM foi feita em cooperação com a Dra. Talita Miguel Marin no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas, SP). Os lotes de células foram recebidos no dia 13 PD e mantidos em cultura por 24 h em meio de manutenção. A seguir, a cultura foi lavada com meio Dulbecco sem cálcio e magnésio (DPBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.), e os hiPSC-CM foram dissociados por incubação em solução de tripsina-EDTA (0,25%, Thermo Fisher Scientific Inc.) a 37°C por até 12 min. A digestão foi interrompida pela adição de DPBS com 15% de soro fetal bovino (VibroCell Embriolife, Campinas, SP). A suspensão de células foi centrifugada a 1000 rpm a 25°C. Removeu-se a solução e o sedimento de células foi ressuspensão em meio específico para semeadura (PluriCell Biotech). As células foram coradas com azul de tripan e contadas em hemocítmetro e, a seguir, semeadas na densidade de $1 \cdot 10^5$ células/cm² em duas câmaras de perfusão, sendo o restante das células semeado num poço de 4 cm². Ambos os substratos foram tratados com matriz extracelular Geltrex (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc). Antes da semeadura, as câmaras de perfusão foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta por 8 h. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂.

O meio de cultura do poço foi trocado a cada 3 dias e os mesmos protocolos de dissociação e sementeira nas câmaras de perfusão foram repetidos no dia 19 PD. Experimentos de registro de fluorescência foram realizados 24-48h após a sementeira nas câmaras de perfusão. A Figura 3.1 ilustra os protocolos de preparação e cultivo dos hiPSC-CM para os experimentos realizados nas semanas 2 (dias 15-17) e 3 (dias 20-21) PD.

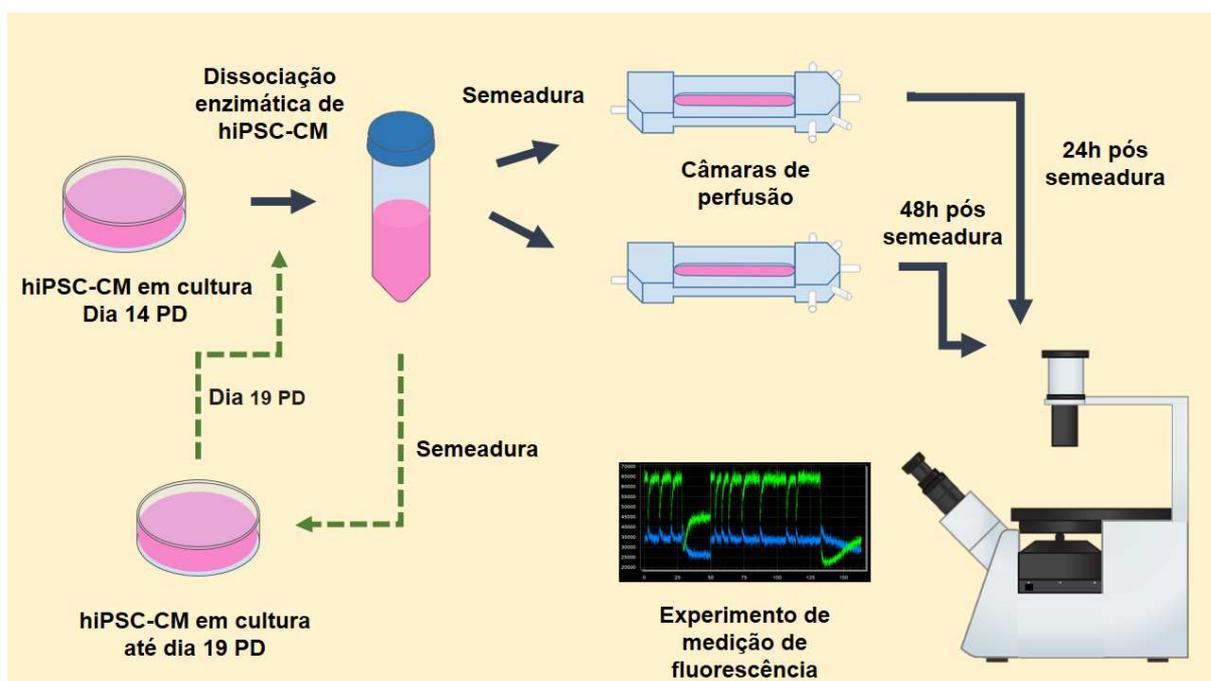


Figura 3.1: Protocolos de dissociação, sementeira e cultivo de hiPSC-CM para os experimentos realizados após nas semanas 2 e 3 pós-diferenciação (PD).

3.1.2. Registro de transientes de Ca^{2+}

O registro de transientes de Ca^{2+} foi realizado por meio da medição de fluorescência emitida pelo indicador de Ca^{2+} ratiométrico indo-1. Sob excitação com 365 nm, a intensidade de luz emitida a 410 nm por indo-1 ligado a Ca^{2+} aumenta, enquanto a emissão em 485 nm diminui (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Portanto, a $[\text{Ca}^{2+}]$ guarda relação com a razão da emissão nesses dois comprimentos de onda ($R = F_{410}/F_{485}$).

A fluorescência emitida pelo indo-1 foi medida com o microfluorímetro (PTI RatioMaster™, Horiba Ltd, Quioto, Japão), cujo diagrama simplificado é mostrado na Figura 3.2. O controle de iluminação e da aquisição dos sinais foi feito com o programa PTI Felix GX (Horiba, versão 4.9.0.10213). A excitação foi feita com uma lâmpada de

arco de xenônio, no comprimento de onda de 365 nm ajustado com um monocromador. A luz de excitação é transmitida por um cabo de fibra óptica da saída do monocromador até o microscópio.

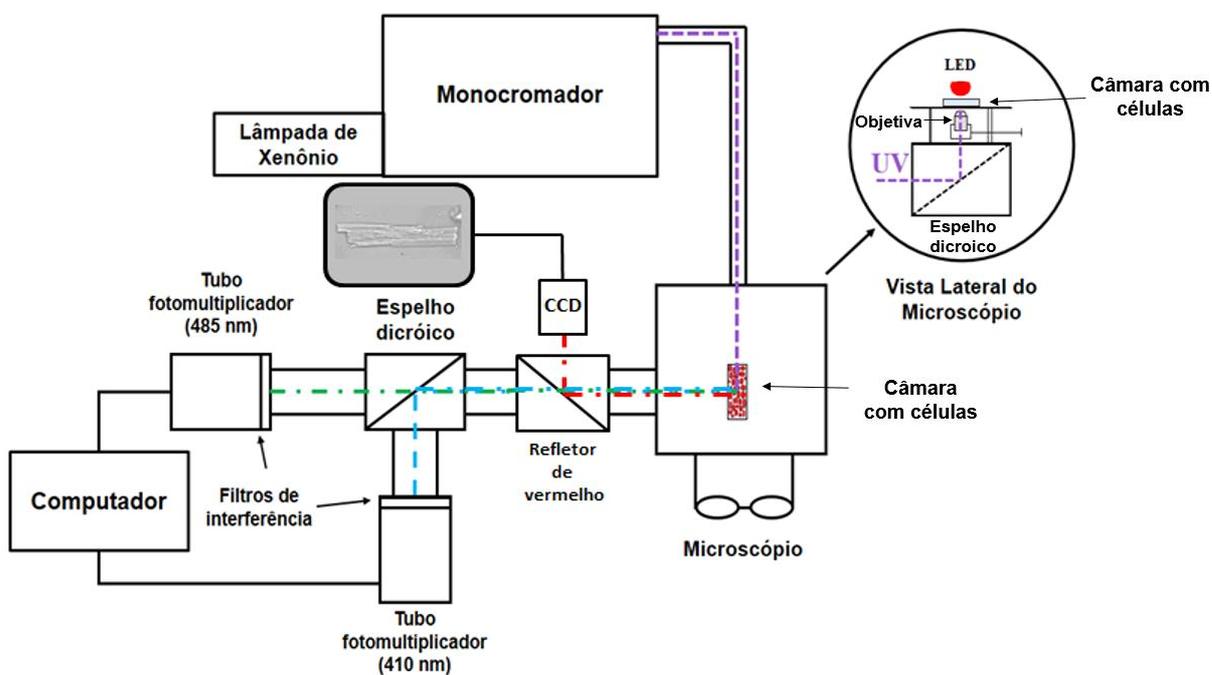


Figura 3.2: Esquema simplificado do equipamento de microfluorimetria PTI RatioMaster™. CCD: câmera que permite a visualização das células.

Na entrada do microscópio, há um espelho dicróico (mostrado no detalhe superior à direita na Figura 3.2) que reflete para a lente objetiva (portanto, para as células) a luz em comprimentos de onda menores que 380 nm. A fluorescência emitida pelo indo-1 (> 380 nm) é transmitida por este espelho dicróico e segue para um tubo transversal, em cuja extremidade estão dois tubos fotomultiplicadores. As células recebem iluminação do microscópio com luz vermelha, que é transmitida pelo espelho dicróico e, a seguir, refletida por um filtro de 620 nm para uma câmera CCD, permitindo a visualização. Um espelho dicróico disposto no tubo transversal transmite luz em comprimentos de onda maiores que 455 nm para um dos tubos fotomultiplicadores e reflete comprimentos de onda menores para o outro tubo. À frente de cada tubo fotomultiplicador, há um filtro de interferência com banda passante de 10 nm (filtros de 405 nm e 485 nm). Estes tubos convertem a contagem de fótons incidentes em tensão elétrica, e seu sinal de saída é adquirido no computador pelo programa PTI FelixGX. Foram mantidas constantes para todos os experimentos a altura e a largura da janela de medição de fluorescência, bem como a banda do

monocromador e a tensão de alimentação da lâmpada de xenônio e dos tubos fotomultiplicadores.

3.1.3. Soluções

Durante os experimentos foram utilizadas as seguintes soluções, com a respectiva composição (em mM).

- Solução de Tyrode modificada (NT): 140 NaCl, 6 KCl, 1,5 MgCl₂.6H₂O, 1 CaCl₂, 11,1 glicose e 5 ácido N-2-hidroxiethyl piperazina-N'-2etanosulfônico (HEPES); pH ajustado a 7,4 com NaOH a 23°C.
- Solução de Tyrode com cafeína (solução Caf): composição semelhante a NT, porém com omissão de CaCl₂ e adição de 10 mM cafeína.
- Solução de Tyrode sem Ca²⁺ e sem Na⁺ (Tyr00): composição semelhante a NT, porém com substituição equimolar de NaCl por LiCl, e de CaCl₂ por MgCl₂, com adição de 1 mM etilenoglicol bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA). Neste caso, usou-se KOH para ajuste de pH.
- Solução de Tyrode sem Ca²⁺ e sem Na⁺ com cafeína (solução Caf00): Tyr00 após adição de 10 mM cafeína.

3.1.4. Sistema de perfusão

As células foram perfundidas em uma câmara projetada por Gomes (1997) para permitir a troca rápida das soluções e fluxo laminar. O sistema de perfusão consistiu em quatro seringas conectadas à câmara por tubos de silicone, com a saída da câmara ligada a uma bomba de vácuo (Figura 3.3). O fluxo de cada solução foi liberado com uma torneira de 3 vias, e regulado por variação da altura das seringas.

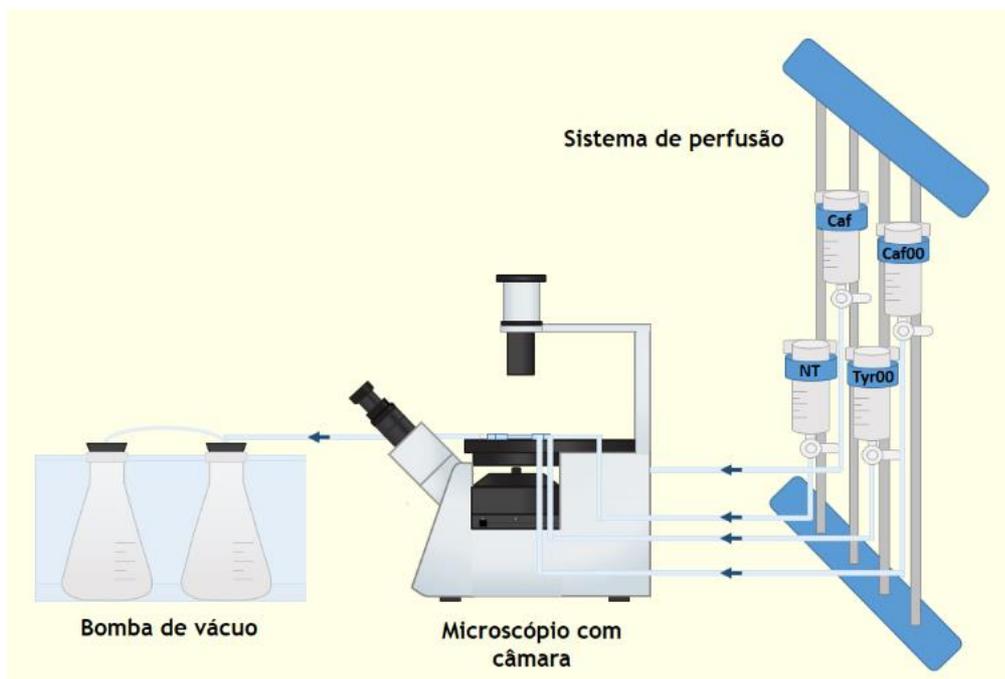


Figura 3.3: Esquema do sistema de perfusão. As entradas da câmara foram conectadas a quatro seringas contendo as diferentes soluções. O perfusato foi aspirado por uma bomba de vácuo conectada à saída da câmara.

3.1.5. Protocolo Experimental

Os experimentos foram realizados no Instituto de Biologia (UNICAMP). A câmara contendo hiPSC-CM foi colocada na mesa do microscópio e perfundida com NT. Os hiPSC-CM foram carregados com indo-1 por incubação por 15 min com 120 μL de solução da forma acetoximetil éster (permeante) do indicador ($\sim 5 \mu\text{M}$, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) a 25°C. Em seguida, os CM foram perfundidos com NT por 30 min para desesterificação do indicador intracelular.

Todas as células estudadas desenvolviam contrações espontâneas. Nos casos incomuns em que as células estavam quiescentes, aplicava-se estimulação elétrica de campo (pulsos quadrados bipolares, 19 V pico a pico, 5 ms de duração, 0,5 Hz) por alguns minutos para indução de atividade espontânea. Transientes foram registrados em pequenos agrupamentos de células, após registro da fluorescência de fundo nos dois comprimentos de onda de emissão (campo microscópico de iguais dimensões, porém sem células).

Utilizou-se o protocolo experimental de Bassani *et al.* (1992), que consiste em perfundir as células com diferentes soluções para inibir seletivamente os transportadores de Ca^{2+} . Foram registrados 3 tipos de transientes de Ca^{2+} :

- a) durante contrações espontâneas (*twitches*, TW), sob perfusão com NT;

- b) durante contraturas evocadas pela rápida aplicação da solução Caf (Caf);
- c) durante contraturas evocadas pela rápida aplicação da solução Caf00 (Caf00), após pré-perfusão com Tyr00 por 20-30 s.

Na situação (a), todos os transportadores contribuem para o declínio do transiente de Ca^{2+} (i.e., remoção do Ca^{2+} citosólico).

Em (b), a cafeína induz a liberação do estoque de Ca^{2+} do RS por causar aumento da sensibilidade dos RyR a Ca^{2+} (Rosseau & Meissner, 1989). Pelo fato dos RyR permanecerem abertos, permitindo o vazamento do Ca^{2+} recaptado para o interior do RS, considera-se que não haja acúmulo de Ca^{2+} no RS (i.e., fluxo resultante via SERCA) enquanto a aplicação de cafeína é mantida (Bassani *et al.*, 1992). Portanto, em (b), SERCA não contribuiria para o declínio do transiente, o qual depende do transporte via NCX e transportadores lentos.

Em (c), espera-se que os fluxos de Ca^{2+} entre RS e citosol se comportem como em (b), porém, a ausência de Ca^{2+} e Na^+ no meio extracelular inibe o efluxo de Ca^{2+} pelo NCX, de modo que a queda do transiente depende somente dos sistemas lentos (PMCA e MCU; Bassani *et al.*, 1992).

Após cada aplicação de cafeína, procedia-se à perfusão com NT por 1-2 min, intervalo durante o qual ocorria a saída do fármaco do meio intracelular e a célula retomava sua atividade espontânea. Aguardava-se, então, um intervalo de 2-3 min para estabilização da atividade contrátil, antes da obtenção de outros transientes. A exposição à luz de excitação foi restrita aos períodos de medição, para minimizar o desbotamento do indicador e fototoxicidade.

3.2. Conversão da Razão de Fluorescência (R) em $[Ca^{2+}]$

Para esta conversão, utilizou-se a seguinte equação (Grynkiwicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \beta \quad (1)$$

onde K_d é a constante aparente de dissociação entre indo-1 e Ca^{2+} ; R_{min} e R_{max} são os valores de R quando $[Ca^{2+}]$ é virtualmente nula e saturante, respectivamente; e β é a razão entre os valores de fluorescência emitidos em 485 nm nestas duas situações.

hiPSC-CM são pobres em miofilamentos e apresentam um fenótipo mais semelhante a CM de neonatos do que de adultos (Di Baldassarre *et al.*, 2018). Os

parâmetros de ligação passiva de Ca^{2+} a sítios intracelulares em hiPSC-CM, descritos por Hwang *et al.* (2015), são comparáveis àqueles estimados em CM de ratos neonatos, nos quais o conteúdo proteico é ~60% menor do que em adultos (Bassani *et al.*, 1998). Como a concentração de proteína afeta de modo importante a K_d do indo-1 (Bassani *et al.*, 1998), considerou-se K_d igual a 0,555 μM em hiPSC-CM, como em CM de ratos neonatos (Bassani & Bassani, 2002), e correspondente a 60% do valor determinado em CM de mamíferos adultos (0,844 μM ; Bassani *et al.*, 1995b).

Os valores de R_{\min} e R_{\max} foram estimados para cada célula segundo a relação entre estes valores e os valores médios de R diastólico e de pico de Caf00, respectivamente, previamente determinada em CM de ratos neonatos (0,784 e 1,834, respectivamente).

O valor de β foi determinado experimentalmente de acordo com a formulação proposta por Gomes *et al.* (1998). Inicialmente, em um conjunto de 10 células, calculou-se a média do coeficiente angular de uma reta ajustada a três pares de valores de fluorescência emitida (410 nm em função de 485 nm) durante um *twitch* médio. A seguir, para cada célula, o valor de β foi calculado por:

$$\beta = \frac{R_{\max} - a}{R_{\min} - a} \quad (2)$$

onde a foi o coeficiente angular médio, e R_{\min} e R_{\max} foram os valores estimados para a célula.

Após a conversão de R para $[\text{Ca}^{2+}]_i$, os três tipos de transientes foram analisados para extração das variáveis de interesse. Os valores diastólico e de pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram obtidos diretamente dos registros, e posteriormente utilizados para a estimativa da constante de taxa de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (K) por meio de ajuste de uma função monoexponencial à fase de declínio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. No caso de TW, foram utilizadas as médias das variáveis de três transientes sucessivos. A frequência espontânea média foi estimada como o inverso do intervalo entre três transientes espontâneos consecutivos.

3.3. Estimativa dos Fluxos de Ca^{2+} Carreados pelos Diferentes Transportadores

Com base no curso temporal de queda dos três tipos de transientes descritos, foram calculados o fluxo de Ca^{2+} carreado por transportador e a sua contribuição

relativa na remoção do Ca^{2+} do citosol durante um *twitch* (Bassani *et al.*, 1992, 1994, 2012). Para isto, foi utilizado o programa *CalciumFlux*, desenvolvido por Goulart (2016).

3.3.1. Cálculo da concentração total de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_T$) a partir de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

A primeira etapa consistiu em simular a fase de queda de cada tipo de transiente com uma função monoexponencial gerada a partir dos parâmetros do transiente previamente obtidos (valores diastólico e de pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e K). A seguir, os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nesta função foram convertidos para valores de $[\text{Ca}^{2+}]_T$, ou seja, a soma de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (livre) e da concentração de Ca^{2+} combinado aos sítios de ligação passiva (*buffers*) endógenos (ex., troponina C, calmodulina) e exógenos (ex., indo-1) à célula, por meio da seguinte equação:

$$[\text{Ca}^{2+}]_T = [\text{Ca}^{2+}]_i + \frac{B_{\text{max-en}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i}{K_{\text{d-en}} + [\text{Ca}^{2+}]_i} + \frac{B_{\text{max-in}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i}{K_{\text{d-in}} + [\text{Ca}^{2+}]_i} \quad (3)$$

onde $B_{\text{max-en}}$ e $K_{\text{d-en}}$ são a concentração dos sítios endógenos de ligação e a constante aparente de dissociação de Ca^{2+} destes sítios, e $B_{\text{max-in}}$ e $K_{\text{d-in}}$ referem-se aos parâmetros da ligação de Ca^{2+} a indo-1. Para os hiPSC-CM, os valores destes parâmetros foram considerados os mesmos que em CM de ratos neonatos (98 e 20 μM para $B_{\text{max-en}}$ e $B_{\text{max-in}}$, respectivamente, e 0,7 e 0,555 μM para $K_{\text{d-en}}$ e $K_{\text{d-in}}$, respectivamente; Bassani *et al.*, 1998; 2012; Bassani & Bassani, 2002), devido à semelhança entre os parâmetros dos *buffers* endógenos nestas células (Bassani *et al.*, 1998) e em hiPSC-CM (Hwang *et al.*, 2015).

3.3.2. Estimativa do estoque de Ca^{2+} do RS

Como concentrações milimolares de cafeína induzem a liberação de todo estoque de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1993; Bassani & Bers, 1995), pode-se considerar que o pico de um transiente evocado por cafeína seja um índice adequado da quantidade de Ca^{2+} armazenada na organela. Para evitar que o NCX abrevie o pico desse transiente, levando à sua subestimativa, tem-se utilizado o pico de Caf00 para estimar o estoque de Ca^{2+} do RS (Bassani *et al.*, 1993). A quantidade de Ca^{2+} armazenada na organela é expressa como a elevação na $[\text{Ca}^{2+}]_T$ citosólica produzida pela liberação do estoque reticular, e calculada como a diferença entre os valores de

$[Ca^{2+}]_T$ no pico desse transiente e imediatamente antes do início da fase de subida de $[Ca^{2+}]_i$ (Bassani & Bers, 1995).

3.3.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos empíricos dos transportadores de Ca^{2+}

O fluxo total de Ca^{2+} removido do citosol no relaxamento (J_{tot}) corresponde à derivada temporal de $[Ca^{2+}]_T$ durante a fase de declínio de um *twitch*, e pode ser representado por:

$$J_{tot} = J_{SERCA} + J_{NCX} + J_{lentos} - J_L \quad (4)$$

onde J_{SERCA} , J_{NCX} , J_{lentos} são os fluxos mediados por SERCA, NCX e transportadores lentos, respectivamente, e J_L representa o vazamento de Ca^{2+} do RS para o citosol.

Como a inibição de todos os transportadores resulta em praticamente abolição do relaxamento (Bassani *et al.*, 1992), e a taxa de vazamento é muito pequena comparada com o fluxo carregado pelos transportadores (Bassani & Bers, 1995), J_L pode ser considerado desprezível.

Para cálculo dos três fluxos, é necessário calcular os parâmetros cinéticos empíricos dos sistemas de transporte em questão. Tais parâmetros são empíricos por serem fruto de estimativa indireta, baseada em modelos simplificados, e não necessariamente refletem os valores reais obtidos por determinação experimental direta. A estimativa desses parâmetros pode ser feita relacionando-se o fluxo de Ca^{2+} carregado por ele (J_x) com $[Ca^{2+}]_i$, de acordo com a função descrita na seguinte equação:

$$J_x = \frac{V_{max}}{\left\{1 + \left(\frac{K_m}{[Ca^{2+}]_i}\right)^n\right\}} \quad (5)$$

onde V_{max} é a velocidade máxima de transporte, K_m é $[Ca^{2+}]_i$ na qual a velocidade é metade de V_{max} , e n é o coeficiente de Hill.

O ajuste da função acima foi feito primeiramente à fase de declínio de $[Ca^{2+}]_i$, durante o transiente Caf00, para estimativa dos parâmetros cinéticos da combinação dos transportadores lentos. Em seguida, foi feito o ajuste para o transiente Caf, no qual a queda de $[Ca^{2+}]_i$ é mediada não só por estes últimos transportadores, mas também pelo NCX. Portanto, o fluxo total de Ca^{2+} pode ser considerado como a soma dos fluxos carregados por estes dois sistemas. Utilizando no termo do fluxo via sistemas lentos os parâmetros cinéticos já calculados, podem ser estimados os parâmetros do NCX. De modo semelhante, utilizando os valores dos parâmetros estimados nas duas

etapas anteriores, os parâmetros da SERCA podem ser determinados na fase de queda do transiente TW, no qual todos os sistemas estão atuantes.

3.3.4. Cálculo do fluxo integrado carregado pelos transportadores de Ca^{2+} durante um *twitch*

O próximo passo foi o cálculo do fluxo integrado no tempo durante o declínio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em um *twitch* em *steady-state*, mediado por cada transportador (Q_x), pela seguinte equação:

$$Q_x = \int_a^b \frac{V_{max}}{\left\{1 + \left(\frac{K_m}{[\text{Ca}^{2+}]_i}\right)^n\right\}} dt \quad (6)$$

onde a e b são os instantes de pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de seu retorno ao valor diastólico, respectivamente. A equação foi aplicada para os 3 conjuntos de transportadores, a partir de uma função monoexponencial para simular o curso temporal da queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

A seguir, os fluxos integrados individuais foram somados para obtenção do fluxo integrado total (que representa a quantidade total de Ca^{2+} mobilizada durante o transiente). A PR de cada transportador na remoção do Ca^{2+} citosólico durante um *twitch* foi calculada como a porcentagem do fluxo integrado total carregada por ele ao final da fase de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3.4. Análise Estatística

Para investigar a influência do tempo de cultura de hiPSC-CM dos mesmos lotes, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon (para amostras pareadas), dado que o número de lotes era pequeno ($N=5$).

Análise de variância bifatorial foi usada para investigar a variabilidade de variáveis de interesse, tanto interna no lote de hiPSC-CM, quanto entre diferentes lotes. Neste caso, foram consideradas apenas células cultivadas por 2 semanas PD.

Previamente às análises comparativas, a normalidade da distribuição das amostras de cada variável foi testada com os testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. No caso de rejeição da hipótese de distribuição normal, foi buscada e aplicada aos dados uma transformação que resultasse em não rejeição dessa hipótese, permitindo a aplicação de estatística paramétrica. Os valores de frequência espontânea foram transformados em sua raiz quadrada. Para os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e

de K de *twitch*, utilizou-se transformada logarítmica. Os valores estimados da carga de Ca^{2+} do RS foram transformados elevando-os a quinta potência. Os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de Caf e Caf00 e do fluxo de Ca^{2+} carregado via NCX foram transformados com variações da função logarítmica ($\log(10-x)$, $\log(1,5-x)$ e $\log(100+x)$, respectivamente, onde x é o valor da variável). Por fim, para os valores percentuais da PR, aplicou-se a transformação mostrada na Equação 7, para correção de não-normalidade da distribuição e de heterocedasticidade (Ahrens *et al.*, 1990).

$$Y = \text{arcoseno} \left(\sqrt{\frac{PR}{100}} \right) \quad (7)$$

Os dados estão expressos em média acompanhadas dos limites do intervalo de confiança de 95% (IC95). No caso de variáveis que foram transformadas previamente ao tratamento estatístico, os valores de média e limites do intervalo de confiança apresentados em Resultados são a transformada inversa daqueles calculados na análise estatística descritiva. Os testes estatísticos foram realizados com o programa *Prism 5 for Windows* (GraphPad Software Inc.). Considerou-se o limite de significância estatística de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Transientes de Ca^{2+} em hiPSC-CM

Como pode ser visto na Tabela 4.1 e na Figura 4.1, o valor de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$) estimado foi cerca de $0,07 \mu\text{M}$. Observa-se que a amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, i.e., a diferença entre os valores de pico e diastólico) do transiente gerado pela liberação de todo o conteúdo de Ca^{2+} do RS com cafeína (Caf) foi cerca de 2,5 vezes maior do que aquela do TW, o que sugere que, se o RS contribui com Ca^{2+} para transiente, a quantidade liberada é menor do que o conteúdo armazenado. Por outro lado, a remoção de Na^+ e Ca^{2+} extracelulares elevou em $\sim 40\%$ a amplitude do transiente evocado por cafeína (Caf00 vs. Caf), o que indica que a extrusão de Ca^{2+} pelo NCX abrevia a fase de subida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, reduzindo o pico do transiente.

Com relação ao curso temporal de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, houve prolongamento desta queda à medida que os mecanismos de remoção do Ca^{2+} citosólico foram progressivamente inibidos, como acontece em CM isolados de miocárdio, o que mostra que todos os sistemas bloqueados participam de modo marcante no declínio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

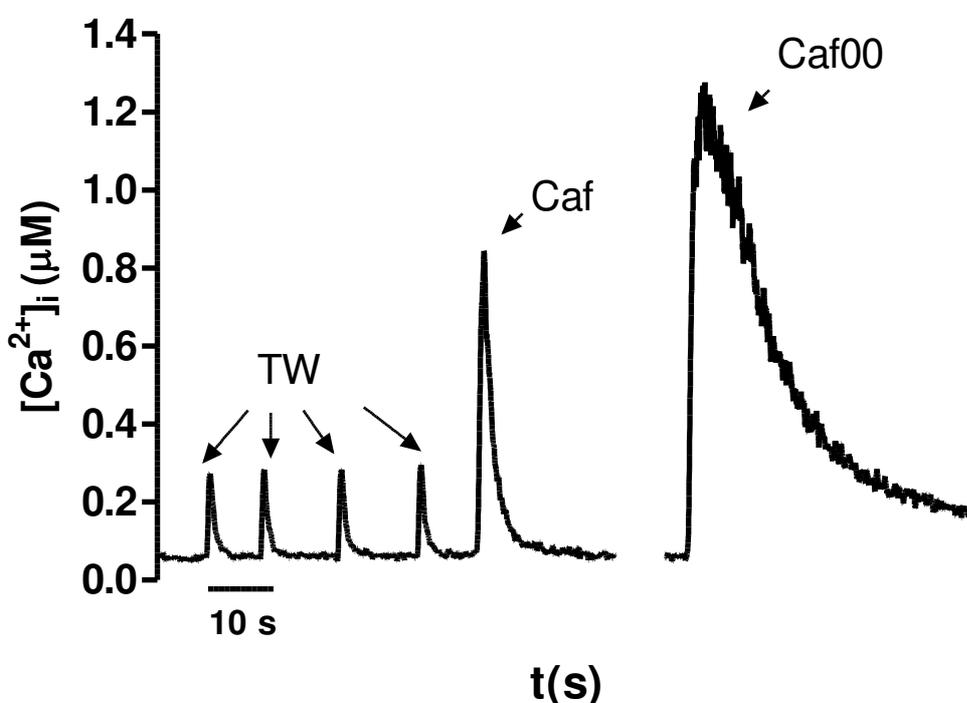


Figura 4.1. Transientes de Ca^{2+} registrados durante contrações espontâneas (TW), contraturas evocadas por 10 mM de cafeína na presença (Caf) e ausência de Na^+ e Ca^{2+} no meio (Caf00), respectivamente.

4.2. Influência do Tempo de Cultura sobre o Transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM

O aumento do tempo de cultura de hiPSC-CM de 2 para 3 semanas PD não resultou em modificações significativas em quaisquer parâmetros dos três tipos de transientes de Ca^{2+} , seja com relação ao valor de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$ e $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, seja nos valores de K (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Parâmetros de transientes de Ca^{2+} em hiPSC-CM cultivados por 2 e 3 semanas pós-diferenciação (PD). A coluna da direita representa os valores de p obtidos no teste de Wilcoxon, em que foram analisados 5 pares de amostras, cada uma representada pela média de 3-8 hiPSC-CM obtidos de 3 lotes diferentes. IC95: limites do intervalo de confiança para 95%; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$ (μM): concentração de Ca^{2+} diastólica; $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM): amplitude de transientes de Ca^{2+} ; K (s^{-1}): constante de taxa queda do transiente; TW: contrações espontâneas; Caf e Caf00: contrações evocadas por 10 mM de cafeína na presença e ausência de Na^+ e Ca^{2+} no meio, respectivamente.

Tempo de Cultura	2 semanas PD		3 semanas PD		p
	Média	IC95	Média	IC95	
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$	0,071	0,062-0,080	0,073	0,045-0,101	0,812
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ - TW	0,299	0,206-0,391	0,330	0,225-0,435	0,812
K – TW	1,809	1,287-2,331	1,583	1,202-1,964	0,438
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Caf	0,757	0,587-0,926	0,780	0,660-0,901	0,625
K – Caf	0,607	0,446-0,768	0,578	0,451-0,704	0,812
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Caf00	1,078	1,012-1,145	1,084	0,931-1,237	1,000
K-Caf00	0,126	0,094-0,158	0,137	0,097-0,178	0,438

O aumento do tempo de cultura de 2 para 3 semanas PD também não resultou em alteração do fluxo total de Ca^{2+} e nos fluxos carregados por SERCA, NCX e transportadores lentos, integrados na fase de queda do transiente do TW (Tabela 4.2). Também não foi observada diferença significativa na frequência de contração espontânea e no conteúdo estimado de Ca^{2+} do RS (Tabela 4.3).

Tabela 4.2: Fluxos de Ca^{2+} total e carregados por transportadores individuais (em $\mu\text{mol/L}$ de citosol), integrados durante a fase de declínio do transiente de Ca^{2+} de um *twitch* em hiPSC-CM cultivados por 2 semanas e 3 semanas pós-diferenciação (PD). A coluna da direita representa os valores de p obtidos no teste de Wilcoxon, em que foram analisados 5 pares de amostras, cada uma representada pela média de 3-8 hiPSC-CM obtidos de 3 lotes diferentes. IC95: limites do intervalo de confiança para 95%. SERCA: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; NCX: trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$; lentos: transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+}).

Tempo de Cultura	2 semanas PD		3 semanas PD		P
	Média	IC95	Média	IC95	
Fluxo total	29,47	23,06-35,88	31,71	24,81-38,61	0,625
Fluxo via SERCA	19,42	14,68-24,16	19,72	12,29-27,15	1,000
Fluxo via NCX	7,87	6,06-9,67	9,02	6,76-11,27	0,312
Fluxo via lentos	2,18	0,97-3,39	2,97	2,03-3,91	0,625

Tabela 4.3: Frequência de contração espontânea (FE, em Hz) e conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Ca^{2+} -RS, em $\mu\text{mol/L}$ de citosol) em hiPSC-CM cultivados por 2 semanas e 3 semanas pós-diferenciação (PD). A coluna da direita representa os valores de p obtidos no teste de Wilcoxon, em que foram analisados 5 pares de amostras, cada uma representada pela média de 3-8 hiPSC-CM. Foram analisadas células de 3 lotes diferentes. IC95: limites do intervalo de confiança para 95%.

Tempo de Cultura	2 semanas PD		3 semanas PD		p
	Média	IC95	Média	IC95	
FE	0,106	0,040-0,171	0,095	0,043-0,148	1,000
Ca^{2+} -RS	61,70	54,55-68,86	64,60	57,49-71,71	0,812

4.3. Lotes de hiPSC-CM e Variabilidade de Variáveis Relacionadas ao Transporte de Ca^{2+}

Os valores das variáveis dos transientes de Ca^{2+} em 8 amostras de hiPSC-CM após 2 semanas de cultura PD estão apresentados na Tabela 4.4 e nas Figuras 4.2 e 4.3.

Tabela 4.4: Média e limites do intervalo de confiança para 95%. (IC95) da concentração de Ca^{2+} diastólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$; em μM), amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$; em μM) e constante de taxa da fase de queda (K; em s^{-1}) do transiente de Ca^{2+} durante um *twitch* (TW) em 8 amostras de hiPSC-CM (6 células/amostra) cultivados por 2 semanas pós-diferenciação.

Amostra	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}} - \text{TW}$		$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{TW}$		K-TW	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
191114	0,134	0,112-0,160	0,197	0,153-0,253	2,257	2,015-2,529
191115	0,059	0,039-0,091	0,387	0,279-0,536	1,484	1,307-1,685
200130	0,056	0,048-0,066	0,224	0,203-0,249	1,332	1,262-1,407
200222	0,075	0,062-0,092	0,406	0,333-0,496	1,159	1,048-1,282
200312	0,098	0,088-0,111	0,228	0,203-0,256	1,740	1,542-1,963
200313	0,080	0,073-0,086	0,380	0,327-0,441	1,663	1,453-1,902
200319	0,066	0,060-0,073	0,220	0,187-0,258	1,706	1,540-1,890
200320	0,080	0,069-0,094	0,318	0,269-0,377	1,929	1,653-2,251

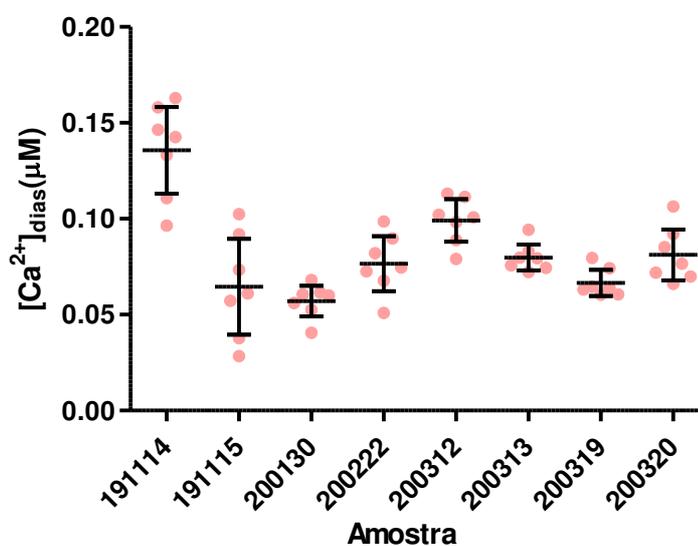


Figura 4.2: Concentração citosólica de Ca^{2+} na diástole ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$) em hiPSC-CM de diferentes lotes, cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. Os pontos representam dados de células individuais, com os valores de média (linhas horizontais) e limites do intervalo de confiança para 95% (linhas verticais).

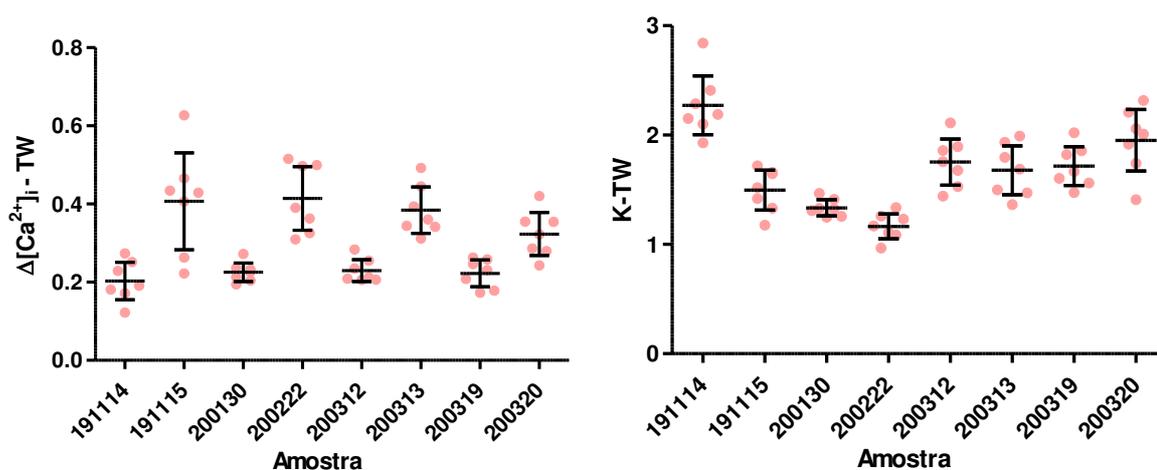


Figura 4.3: Amplitude ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i\text{-TW}$; em μM) e constante de taxa de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($K\text{-TW}$; em s^{-1}) de transiente de Ca^{2+} durante contrações espontâneas em hiPSC-CM de diferentes lotes cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. Os dados estão apresentados como na Figura 4.2.

Os valores de frequência espontânea de contrações, conteúdo de Ca^{2+} do RS e fluxo total de Ca^{2+} integrado na fase de queda do transiente de um *twitch* encontram-se na Tabela 4.5 e Figuras 4.4, 4.5 e 4.6A, enquanto, na Tabela 4.6 e na Figura 4.6B-D, estão mostrados os valores de PR dos diferentes transportadores.

Tabela 4.5: Média e limites do intervalo de confiança para 95% (IC95) da frequência espontânea de contração (FE, em Hz), do conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático ($\text{Ca}^{2+}\text{-RS}$, em $\mu\text{mol/L}$ de citosol) e do fluxo total de Ca^{2+} integrado (em $\mu\text{mol/L}$ de citosol) na fase de queda do transiente cultivados por 2 semanas pós-diferenciação.

Amostra	FE		$\text{Ca}^{2+}\text{-RS}$		Fluxo integrado total de Ca^{2+}	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
191114	0,060	0,038-0,087	40,86	36,40-43,95	18,40	15,11-21,69
191115	0,036	0,011-0,075	68,70	63,47-72,69	37,26	31,09-43,43
200130	0,105	0,065-0,155	67,79	65,46-69,84	25,38	23,28-27,48
200222	0,029	0,013-0,052	61,27	57,22-64,46	37,57	33,67-41,46
200312	0,163	0,128-0,203	56,23	53,81-58,29	22,80	20,84-24,76
200313	0,076	0,052-0,103	62,04	60,48-63,44	34,75	31,53-37,96
200319	0,091	0,064-0,124	64,67	62,42-66,64	23,86	20,77-26,95
200320	0,087	0,066-0,112	64,20	59,31-67,95	30,522	26,87-34,17

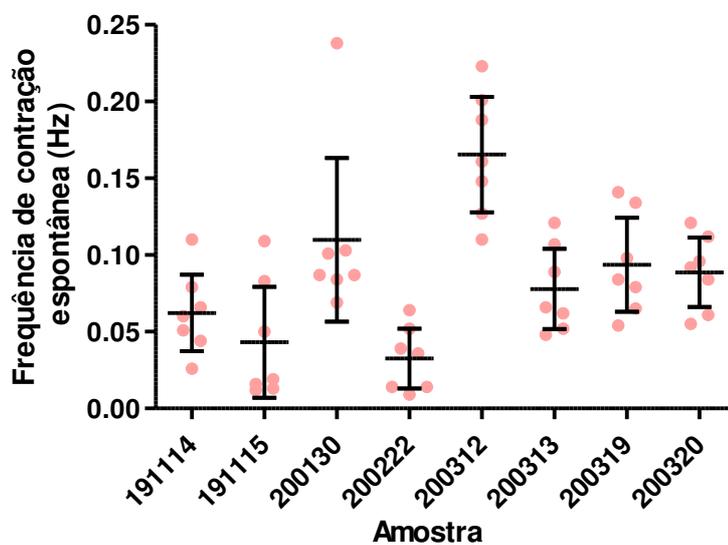


Figura 4.4: Frequência espontânea de contração (em Hz) de hiPSC-CM de diferentes lotes cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. Os dados estão apresentados como na Figura 4.2.

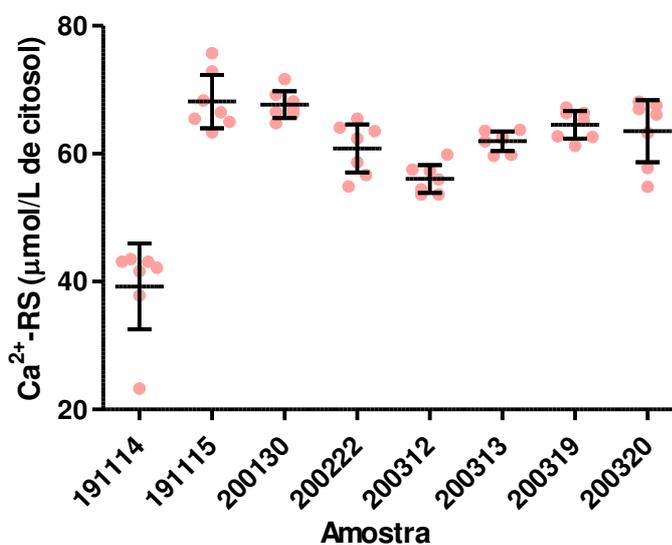


Figura 4.5: Conteúdo de Ca²⁺ no retículo sarcoplasmático (Ca²⁺-RS; em μmol/L de citosol) de hiPSC-CM de diferentes lotes cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. Os dados estão apresentados como na Figura 4.2.

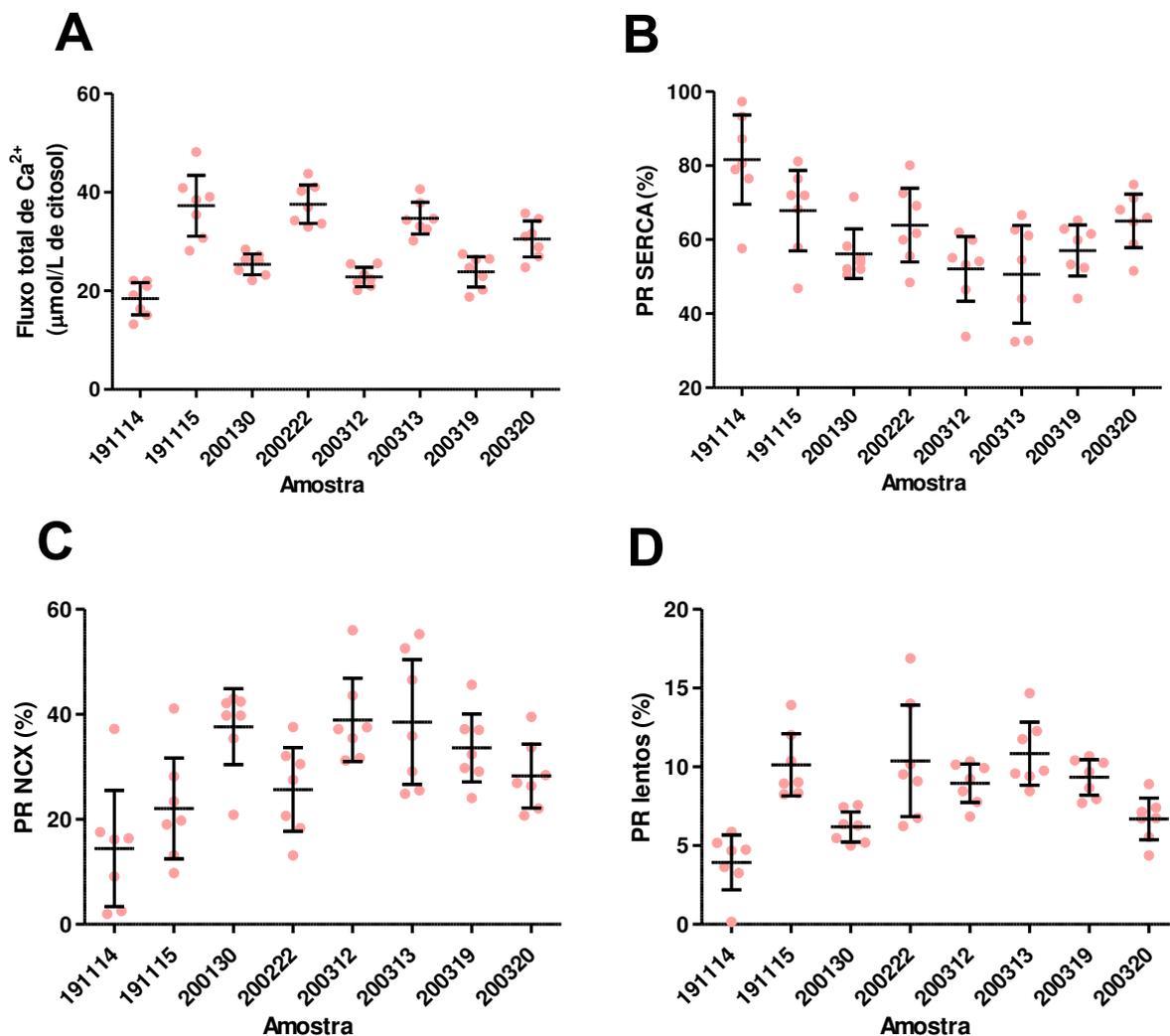


Figura 4.6: A: Fluxo total de remoção de Ca^{2+} do citosol (em $\mu\text{mol/L}$ de citosol) integrado durante a fase de declínio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de um *twitch* em hiPSC-CM cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. B-D: participação relativa (PR) dos transportadores de Ca^{2+} no fluxo total, respectivamente, ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA); NCX: trocador Na^+ - Ca^{2+} (NCX) e transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+}). Os dados estão apresentados como na Figura 4.2.

Tabela 4.6: Média e limites do intervalo de confiança para 95% (IC95) da participação relativa (PR; em %) dos transportadores na remoção de Ca^{2+} durante a fase de declínio do transiente de um *twitch* em 8 amostras de hiPSC-CM (6 células/amostra) cultivados por 2 semanas pós-diferenciação. SERCA: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; NCX: trocador Na^+ - Ca^{2+} ; lentos: transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+}).

Amostra	PR SERCA		PR NCX		PR lentos	
	Média	IC95	Média	IC95	Média	IC95
191114	83,39	69,60-93,60	12,48	3,81-25,18	3,54	1,55-6,29
191115	68,22	57,08-78,36	21,35	12,75-31,46	10,05	8,22-12,04
200130	56,27	49,37-63,07	37,42	29,99-45,17	6,15	5,24-7,13
200222	64,27	53,86-74,02	25,23	17,56-33,79	10,13	6,96-13,81
200312	52,08	43,24-60,84	38,84	31,14-46,84	8,92	7,72-10,20
200313	50,58	37,30-63,82	38,21	26,69-50,44	10,76	8,89-12,79
200319	57,12	50,19-63,91	33,45	27,15-40,07	9,31	8,20-10,48
200320	65,21	57,87-72,25	28,07	22,28-34,24	6,63	5,34-8,04

Os resultados da análise de variância bifatorial para as variáveis apresentadas nas Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6 podem ser encontrados na Tabela 4.7. Para todas elas, detectou-se diferença significativa entre lotes de hiPSC-CM ($p < 0,001$) enquanto apenas a frequência espontânea variou significativamente dentro de um mesmo lote ($p = 0,042$).

4.4. Características do transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM

Como não foi observada influência significativa do tempo de cultura sobre as variáveis aqui analisadas, optou-se por agregar os dados de células cultivadas por 2 e 3 semanas PD no mesmo conjunto para a caracterização geral dos hiPSC-CM utilizados quanto a transientes e transporte de Ca^{2+} . Porém, como houve variação significativa entre lotes, considerou-se como dados individuais os valores médios de cada uma do total de 16 amostras estudadas ($N = 3-10$ células/amostra). Os resultados finais deste estudo (média e intervalo de confiança) encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.7: Valores de F e de p obtidos em análise de variância bifatorial, para avaliar a variabilidade dentro (intra) e entre (inter) lotes de hiPSC-CM, de variáveis relacionadas ao transporte de Ca^{2+} após 2 semanas de cultivo pós-diferenciação. As abreviaturas e unidades são as mesmas definidas nas Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6. O número de graus de liberdade foi 42, 7 e 6 para o resíduo e para os fatores inter e intra, respectivamente.

Variável	F_{inter}	F_{intra}	p_{inter}	p_{intra}
FE	12,20	2,42	<0,0001	0,042
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$	11,58	1,14	<0,0001	0,356
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ -TW	13,52	0,86	<0,0001	0,532
K-TW	17,98	0,47	<0,0001	0,823
Ca^{2+} -RS	18,56	1,11	<0,0001	0,373
Fluxo total de Ca^{2+}	24,79	1,33	<0,0001	0,264
PR SERCA	7,28	1,34	<0,0001	0,261
PR NCX	6,93	1,38	<0,0001	0,246
PR lentos	11,01	1,47	<0,0001	0,212

Tabela 4.8: Caracterização geral dos hiPSC-CM utilizados. IC95: intervalo de confiança de 95% da média; FE (em Hz): frequência de contração espontânea; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$ (em μM): concentração de Ca^{2+} diastólica; $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (em μM): amplitude de transientes de Ca^{2+} registrados durante contrações espontâneas de hiPSC-CM (*twitch* - TW), contrações evocadas pela cafeína (Caf) e contrações evocadas pela cafeína na ausência de Na^+ e Ca^{2+} no meio (Caf00); K (em s^{-1}): constante de taxa da fase de queda de TW, Caf e Caf00; SERCA: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; NCX: trocador Na^+ - Ca^{2+} ; lentos: transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+}). Os fluxos e Ca^{2+} -RS (conteúdo de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático) estão expressos em $\mu\text{mol/L}$ de citosol; PR (em %): participação relativa do transportador na remoção de Ca^{2+} do citosol durante a queda de um *twitch*.

Variável	Média	IC95
Frequência	0,086	0,065-0,110
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dias}}$	0,073	0,063-0,084
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ - TW	0,293	0,254-0,338
K - TW	1,631	1,468-1,813
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Caf	0,725	0,648-0,802
K - Caf	0,606	0,535-0,677
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Caf00	1,066	0,995-1,127
K - Caf00	0,130	0,114-0,146

(cont.)

Ca ²⁺ -RS	63,74	60,67-66,31
Fluxo total de Ca ²⁺	29,81	26,63-33,00
Fluxo via SERCA	18,53	16,03-21,02
Fluxo via NCX	8,64	7,40-10,15
Fluxo via lentos	2,50	1,98-3,03
PR RS	62,35	56,65-67,88
PR NCX	29,11	24,58-33,86
PR slow	7,90	6,44-9,50

5. DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu uma avaliação quantitativa da interação de transportadores de Ca^{2+} em hiPSC-CM. Para isso, foram obtidos transientes de Ca^{2+} durante contrações espontâneas de hiPSC-CM e contraturas evocadas por cafeína. O sinal de emissão do indicador de Ca^{2+} foi convertido a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que foi utilizada para cálculo da concentração total do íon e dos seus fluxos carreados por diferentes sistemas de transporte, a partir da estimativa dos parâmetros cinéticos empíricos dos transportadores. A PR de SERCA e NCX nestas células, bem como o fluxo total de Ca^{2+} integrado durante a queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de uma contração evocada eletricamente mostraram um padrão imaturo, diferente daquele observado em células de mamíferos adultos de várias espécies.

5.1 . Transientes e Transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM

Diferente de CM adultos, hiPSC-CM se contraem espontaneamente. O mecanismo subjacente à atividade espontânea de hiPSC-CM parece não ter relação com a corrente I_f , uma vez que a sua inibição não resulta em alteração na atividade (Kim *et al.*, 2015). Ao invés disso, a menor densidade de I_{K1} e maior densidade de I_{NCX} (Zhang & Morad, 2020; Di Baldassarre *et al.*, 2018; Fabri *et al.*, 2019) contribuiriam para que a extrusão eletrogênica de Ca^{2+} por NCX, em consequência da liberação espontânea de Ca^{2+} do RS, fosse capaz de excitar os hiPSC-CM (Kim *et al.*, 2015; Kane *et al.*, 2015).

A partir da estimativa dos fluxos de Ca^{2+} carreados por diferentes sistemas de transporte de Ca^{2+} , foi possível concluir que SERCA é o principal transportador que medeia a remoção de Ca^{2+} citosólico que leva ao relaxamento de hiPSC-CM cultivados por 2-3 semanas PD, contribuindo com cerca de 60% do fluxo total de Ca^{2+} removido. NCX e o conjunto dos transportadores lentos apresentam, contribuições menores, de ~32 e ~8%, respectivamente.

Embora hiPSC-CM tenham sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, inclusive para avaliação da dinâmica de Ca^{2+} (Hwang *et al.*, 2015; Pioner *et al.*, 2019; Argenziano *et al.*, 2018; Fernández-Morales *et al.*, 2019; Stroik *et al.*, 2020; Baljinnyam *et al.*, 2017; Leonard *et al.*, 2018), este é o primeiro relato que conhecemos no qual o sinal de fluorescência emitida pelo indicador de Ca^{2+} foi calibrado, i.e., convertido para $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o que permitiu a quantificação dos transientes de Ca^{2+} , bem como dos fluxos do íon e o conteúdo de Ca^{2+} do RS nestas células.

Em estudo previamente publicado, Hwang *et al.* (2015) registraram transientes de Ca^{2+} em hiPSC-CM desenvolvidos em diferentes laboratórios, e realizaram uma aproximação da contribuição relativa de transportadores de Ca^{2+} para o relaxamento baseada na razão das constantes de tempo de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em transientes não calibrados durante TW e aplicação de cafeína. No entanto, há duas principais limitações desta abordagem que podem levar a erros: a) a não linearidade da relação entre emissão do indicador e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver Eq. 1, item 3.2); e b) o impacto da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sobre a velocidade de transporte de Ca^{2+} (lei da ação das massas) e, portanto, sobre a cinética de queda do transiente. Este último fator torna-se especialmente crítico quando se observa a disparidade de amplitude dos transientes de TW e de cafeína, o que não é considerado quando leva-se em conta unicamente as constantes de tempo dos transientes. Por outro lado, a conversão do sinal de fluorescência em $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a consequente possibilidade da estimativa de fluxos, de cuja relação com $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se pode estimar parâmetros cinéticos empíricos dos transportadores, atenua essas limitações, permitindo estimativas mais fiéis. Assim, o presente estudo também é pioneiro no uso desta abordagem quantitativa para calcular a PR dos diversos transportadores. Apesar das diferenças metodológicas, porém, os valores de PR aqui obtidos, com hiPSC-CM diferenciados por 5 dias e cultivados por 2-3 semanas, são consistentes com valores obtidos por Hwang *et al.* (2015) em hiPSC-CM diferenciados por 5-7 dias e cultivados por 21 dias ou mais (SERCA: ~60%; NCX: ~30%; lentos: ~10%), embora não com os encontrados células cultivadas por 2 semanas (SERCA: ~50%; NCX: ~35%; lentos: ~15%).

Há diferenças na dinâmica do transporte de Ca^{2+} e na interação dos transportadores de Ca^{2+} dependentes da espécie animal e da câmara cardíaca (Bassani *et al.*, 1994, 1995a, 2004; Bers *et al.*, 1993; Sham *et al.*, 1995; Piacentino III *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Tanaami *et al.*, 2005; Walden *et al.*, 2009; Goulart *et al.*, 2015; Goulart 2016). Também ocorre mudança nestes fatores com o desenvolvimento do animal. Em CM de neonatos, a contração depende mais da entrada de Ca^{2+} do meio extracelular e menos do Ca^{2+} liberado do RS do que em CM de adultos (Chin *et al.*, 1990; Balaguru *et al.*, 1997; Bers, 2001; Huang *et al.*, 2008; Ziman *et al.*, 2010), embora, em ratos em ambas as fases de desenvolvimento, a SERCA seja o transportador mais importante para o relaxamento (Bassani & Bassani, 2002). Em CM de ratos neonatos, comparado com adultos, observa-se menor PR da SERCA e maior PR de NCX e transportadores lentos (Tabela 5.1; Bassani & Bassani, 2002).

Como se pode ver na Tabela 5.1, a diferença na interação dos transportadores de Ca^{2+} (SERCA e NCX) observada em hiPSC-CM vs. CM isolados de miocárdio humano reproduz aquela observada em CM de ratos neonatos vs. adultos, o que indica um padrão imaturo de transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM cultivados por 2-3 semanas.

É possível também observar outros indicativos de imaturidade funcional nestas células, como a baixa quantidade de Ca^{2+} mobilizada durante um TW (i.e., o fluxo total de Ca^{2+} integrado na queda do transiente), que é apenas ~32 % daquela em CM ventriculares de humanos adultos, à semelhança do que ocorre com CM de ratos neonatos, o que é típico de células pobres em túbulos T, como CM atriais humanos (Herraiz-Martinez *et al.*, 2015) e hiPSC-CM (Lee *et al.*, 2011; Di Baldassarre *et al.*, 2018; Pesl *et al.*, 2016).

Tabela 5.1: Comparação dos valores médios aproximados de variáveis relacionadas; transientes e transporte de Ca^{2+} em hiPSC cultivados por 2-3 semanas PD com dados da literatura obtidos em CM isolados do miocárdio de diferentes câmaras, e em mamíferos de diferentes espécies e fases de desenvolvimento. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (em μM): amplitude de transiente de Ca^{2+} durante contrações espontâneas (TW); $K\text{-TW}$ (em s^{-1}): constante de taxa da fase de queda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no TW; PR: participação relativa de um transportador na remoção de Ca^{2+} citosólico integrado total removido no relaxamento; SERCA: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; NCX: trocador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$; lentos: transportadores lentos (ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+}); $\text{Ca}^{2+}\text{-RS}$ (em $\mu\text{mol/L}$ de citosol): conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Fluxo de Ca^{2+} total, integrado em $\mu\text{mol/L}$ de citosol.

	hiPSC-CM 2-3 semanas PD ^a	CM de rato neonato (0-2 dias) ^b	CM de rato adulto	CM de coelho adulto	CM atrial humano adulto ^e	CM ventricular humano adulto ^f
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{TW}$	0,29	0,30	0,35 ^b	0,38 ^d	0,14	0,80
$K - \text{TW}$	1,6	4,0	5,0 ^b	2,0 ^d	2,9	4,8
Fluxo de Ca^{2+} total, integrado	30	26	80 ^b	75 ^d	33	95
PR SERCA	62 %	78 %	92 % ^b	70 % ^d	88 %	77 %
PR NCX	29 %	18 %	5 % ^b	28 % ^d	8 %	23 %
PR lentos	8 %	4 %	3 % ^b	2 % ^d	4 %	-
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$	64	-	114 ^c	106 ^c	104	85

^aPresentes resultados; ^bBassani & Bassani, 2002; ^cBassani & Bers, 1995; ^dBassani *et al.*, 1994;

^eGoulart, 2016; ^fPiacentino III *et al.*, 2003

Além disso, o menor estoque de Ca^{2+} no RS (o que também acontece em CM de ratos neonatos, nos quais a carga é ~25% menor do que em adultos; Bassani RA, comunicação pessoal) também sugere imaturidade característica de menor diferenciação morfofuncional, uma vez que o volume relativo do RS é menor em CM de neonatos do que em adultos (Olivetti *et al.*, 1980). Mais uma característica de imaturidade estrutural em CM é o baixo conteúdo e nível de organização de miofilamentos (Olivetti *et al.*, 1980; Nassar *et al.*, 1987), e descrita em hiPSC-CM (e.g., Zuppinger *et al.*, 2017). Isto está de acordo com a baixa densidade de sítios de ligação passiva de Ca^{2+} (Hwang *et al.*, 2015), semelhante àquela determinada em miocárdio de rato neonato (Bassani *et al.*, 1996), uma vez que o mais abundante destes sítios é a troponina C, presente nos miofilamentos (Bers, 2001). Assim, com base nas características estruturais celulares e do aparelho contrátil, e das menores quantidades de Ca^{2+} mobilizado em resposta à excitação elétrica, é de se esperar que hiPSC-CM no estado de diferenciação dos usados no presente estudo desenvolvam contrações mais fracas do que CM terminalmente diferenciados. Por fim, a presença de atividade espontânea, comum em células miocárdicas imaturas, mas não após diferenciação terminal, apontam um fenótipo inconsistente com a possibilidade do uso de hiPSC-CM em condições semelhantes às deste estudo como modelo experimental *in vitro* de miocárdio humano.

5.2. Influência do Tempo de Cultura sobre Variáveis Relacionadas ao Transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados em hiPSC-CM cultivados por 2 e 3 semanas PD, o que mostra que o prolongamento do tempo de cultura não resultou em maturação funcional destas células. Estes resultados discordam dos obtidos por Hwang *et al.* (2015), que observaram aumento da PR da SERCA e redução da PR dos demais transportadores, padrão típico de amadurecimento (Bassani & Bassani, 2002), após 3 vs. 2 semanas de cultura, o que não se modificou quando a cultura foi estendida para 30 dias. Uma possível explicação para esta discordância poderia ser a presença do suplemento B-27 no meio de cultura de manutenção, mas não no meio suprido pela Pluricell. Este complemento contém 21 componentes, entre eles hormônios tireoidiano e glicocorticoides, que

comprovadamente favorecem o processo de maturação de hiPSC-CM (Parikh *et al.*, 2017).

A frequência de contração espontânea obtida foi mais de três vezes menor do que a obtida por Kumar *et al.* (~0,3 Hz). Nesse trabalho, também não foram observadas diferenças significativas na frequência de contração espontânea com aumento do tempo de cultura de hiPSC-CM (de 1 para 2 e 4 semanas) e foi observada uma grande variabilidade da frequência de contração entre culturas diferentes (Kumar *et al.*, 2019).

5.3. Variabilidade Interna e Externa a Lotes de hiPSC-CM

Diferentemente da maioria dos estudos, que usam células congeladas de poucos ou mesmo de apenas um lote, no presente estudo cada remessa (com a qual eram feitos 1-4 experimentos) continha um diferente lote hiPSC-CM diferenciados a partir de hiPSC. Em cada lote, por sua vez, as células não são homogêneas, uma vez que algumas se desenvolvem com o fenótipo atrial, outras com o fenótipo ventricular (e possivelmente de outros tipos celulares, como células marca-passo; Zhang & Morad, 2020). Por isto, considerou-se importante testar a variabilidade tanto entre células de um mesmo lote, quanto células de lotes diferentes.

Foi observada neste estudo uma alta variabilidade inter-lote de todas as variáveis analisadas, apesar do uso dos mesmos procedimentos e insumos nos 5 lotes estudados. É possível que esta variabilidade seja devida, pelo menos em parte, a diferenças na porcentagem de cada tipo celular diferenciado nos lotes analisados. O fato de que a única variável a mostrar variabilidade intra-lote significativa foi a frequência espontânea é sugestivo de heterogeneidade entre fenótipos diferenciados dentro de um mesmo lote. Por outro lado, a ausência de significância estatística da variabilidade interna em um dado lote de células para as demais variáveis analisadas indica que não é necessário amostrar um número muito grande de células para se obter resultados representativos de cada lote de hiPSC-CM. Assim, com base nos resultados da análise de variabilidade, considerou-se mais adequado caracterizar as variáveis ligadas a Ca^{2+} nestas células a partir do conjunto dos valores médios de cada lote.

Hwang *et al.* (2015) não observaram diferenças significativas em variáveis ligadas ao transporte de Ca^{2+} em hiPSC-CM de duas semeaduras realizadas com 3

lotes. É possível que nesse estudo tenha havido maior homogeneidade nos processos de dediferenciação da célula somática e posterior diferenciação em CM, ou mesmo pode ter havido influência do tipo celular somático usado, fibroblastos no estudo de Hwang *et al.* (2015) e eritroblastos no presente estudo.

A observação de variabilidade estatisticamente significativa em hiPSC-CM de diferentes lotes têm importância metodológica para o uso destas células como modelo experimental em estudos, pois indica a necessidade de utilizar amostras de diferentes lotes para a obtenção de resultados confiáveis.

5.4. Limitações

Embora tenha sido feita a determinação experimental de R_{\min} , não foi possível obter R_{\max} , uma vez que não conseguimos atingir $[Ca^{2+}]_i$ saturante em hiPSC-CM com os protocolos de calibração usados com sucesso para CM diferenciados. Como hiPSC-CM têm várias características em comum com CM de neonatos, optou-se por estimar R_{\max} em cada célula partir da relação média entre este parâmetro e o valor de R no pico do transiente Caf00 obtida em CM de ratos neonatos. Considerou-se esta uma alternativa aceitável porque o cálculo de R_{\min} usando uma relação semelhante, porém com o valor médio de R durante perfusão com solução Tyr00 em neonatos resultou em valores comparáveis com os de R_{\min} obtidos experimentalmente. Faz-se, portanto, necessário o desenvolvimento de um protocolo experimental para obtenção R_{\max} em hiPSC-CM.

Outra limitação foi a impossibilidade de testar tempos de cultura mais longos devido à deterioração das células. Por fim, não foi possível testar se o suplemento B-27 seria de fato requerido para que as hiPSC-CM atingissem um estágio mais avançado de maturação e/ou que sobrevivessem por mais tempo em cultura. Este suplemento foi desenvolvido pela empresa Gibco para manutenção de culturas primárias de neurônios, e hoje a ele é atribuído um papel também no desenvolvimento morfofuncional e na maturação de células-tronco em geral e seus derivados, como hiPSC-CM (Feyen *et al.*, 2020).

5.5. Conclusões

- a) De acordo com nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a reportar estimativas de concentrações e fluxos de Ca^{2+} em hiPSC-CM, embora seja necessário aprimorar o processo de calibração do indicador do íon.
- b) A interação entre os transportadores de Ca^{2+} envolvidos na remoção de Ca^{2+} citosólico que resulta no relaxamento de hiPSC-CM cultivadas por 2-3 semanas PD reproduziu o padrão observado em CM de mamíferos neonatos, característico de imaturidade funcional. Este padrão não mudou com o prolongamento do tempo de cultura, o que evidencia a inadequação deste tipo celular nas condições deste estudo como modelo de miocárdio humano, e a necessidade de outras estratégias para promover a maturação de hiPSC-CM.
- c) A alta variabilidade dos parâmetros relacionados ao transporte de Ca^{2+} em diferentes lotes de hiPSC-CM indica a necessidade de amostragem de vários deles para resultados confiáveis e reprodutíveis.

PUBLICAÇÃO

Gouveia F. B.; Marin T. M.; Bassani J.W.M. & Bassani R. A. Characterization of Cultured Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cell for Quantitative Studies of Ca^{2+} Transport. XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA. Vitória, ES. 26 a 30 de outubro de 2020.

REFERÊNCIAS

ABOU, S. H.; ZOUEIN, F. A.; EL, Y. A.; SANOUDOU, D.; RAYNAUD, C.; RAO, C.; PINTUS, G.; DEHAINI, H.; EID, A. H. The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 201, 2018. DOI: 10.1186/s13287-018-0947-5

AHMED, R. E.; ANZAI, T.; CHANTHRA, N.; UOSAKI, H. A brief review of current maturation methods for human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 178, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00178

AHRENS, W. H.; COX, D. J.; BUDHWAR, G. Use of the arcsine and square root transformations for subjectively determined percentage data. **Weed Science**, p. 452-458, 1990.

ARGENZIANO, M.; LAMBERS, E.; HONG, L.; SRIDHAR, A.; ZHANG, M.; CHALAZAN, B.; ... ; DARBAR, D. Electrophysiologic characterization of calcium handling in human induced pluripotent stem cell-derived atrial cardiomyocytes. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 6, p. 1867-1878, 2018. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.04.005

BERS, D. M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force**. Springer Science & Business Media, 2001.

BERS, D. M.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M.; BAUDET, S.; HRYSHKO, L. V. PARADOXICAL twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 25, n. 9, p. 1047-1057, 1993. DOI: 10.1006/jmcc.1993.1117

BALAGURU, D.; HADDOCK, P. S.; PUGLISI, J. L.; BERS, D. M.; COETZEE, W. A.; ARTMAN, M. Role of the sarcoplasmic reticulum in contraction and relaxation of immature rabbit ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 10, p. 2747-2757, 1997. DOI: 10.1006/jmcc.1997.0509

BALJINNYAM, E.; VENKATESH, S.; GORDAN, R.; MAREEDU, S.; ZHANG, J.; XIE, L. H.; ... ; FRAIDENRAICH, D. Effect of densely ionizing radiation on cardiomyocyte differentiation from human-induced pluripotent stem cells. **Physiological Reports**, v. 5, n. 15, p. e13308, 2017. DOI: 10.14814/phy2.13308

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 460, n. 1, p. 603-621, 1993. DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019489

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 476, n. 2, p. 279-293, 1994. DOI: 10.1113/jphysiol.1994.sp020130

BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Calibration of indo-1 and resting intracellular $[\text{Ca}]_i$ in intact rabbit cardiac myocytes. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 4, p. 1453-1460, 1995b. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80318-8

BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M.; BERS, D. M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 453, n. 1, p. 591-608, 1992. DOI: 10.1113/jphysiol.1992.sp019246

BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M.; BERS, D. M. Relaxation in ferret ventricular myocytes: role of the sarcolemmal Ca ATPase. **Pflügers Archiv**, v. 430, n. 4, p. 573-578, 1995a. DOI: 10.1007/BF00373894

BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 5, p. 2015-2022, 1995. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80378-4

BASSANI, R. A.; SHANNON, T. R.; BERS, D. M. Passive Ca^{2+} binding in ventricular myocardium of neonatal and adult rats. **Cell Calcium**, v. 23, n. 6, p. 433-442, 1998. DOI: 10.1016/S0143-4160(98)90100-2

BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 6, p. H2406-H2413, 2002. DOI: 10.1152/ajpheart.00320.2001

BASSANI, R. A.; ALTAMIRANO, J.; PUGLISI, J. L.; BERS, D. M. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 559, n. 2, p. 593-609, 2004. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.067959

BASSANI, R. A.; RICARDO, R. A.; BASSANI, J. W. Estimation of the fractional sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in intact cardiomyocytes using integrated Ca^{2+} fluxes. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, p. 401-408, 2012. DOI: 10.4149/gpb_2012_042

BURRIDGE, P. W.; LI, Y. F.; MATSA, E.; WU, H.; ONG, S. G.; SHARMA, A.; HOLMSTRÖM, A.; CHANG, A. C.; CORONADO, M. J.; EBERT, A. D.; KNOWLES, J. W.; TELLI, M. L.; WITTELES, R. M.; BLAU, H. M.; BERNSTEIN, D.; ALTMAN, R. B.; WU, J. C. Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**, v. 22, n. 5, p. 547, 2016. DOI: 10.1038/nm.4087

CHIN, T. K.; PERLOFF, J. K.; WILLIAMS, R. G.; JUE, K.; MOHRMANN, R. Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases. **Circulation**, v. 82, n. 2, p. 507-513, 1990. DOI: 10.1161/01.CIR.82.2.507

DI BALDASSARRE, A.; CIMETTA, E.; BOLLINI, S.; GAGGI, G.; GHINASSI, B. Human-induced pluripotent stem cell technology and cardiomyocyte generation: Progress and clinical applications. **Cells**, v. 7, n. 6, p. 48, 2018. DOI: 10.3390/cells7060048

FABBRI, A.; GOVERSEN, B.; VOS, M. A.; VAN VEEN, T. A.; DE BOER, T. P. Required G_{K1} to suppress automaticity of iPSC-CMs depends strongly on I_{K1} model structure. **Biophysical Journal**, v. 117, n. 12, p. 2303-2315, 2019. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.08.040

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 245, n. 1, p. C1-C14, 1983. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1

FEYEN, D. A.; MCKEITHAN, W. L.; BRUYNEEL, A. A.; SPIERING, S.; HÖRMANN, L.; ULMER, B.; ... ; MERCOLA, M. Metabolic maturation media improve physiological function of human iPSC-derived cardiomyocytes. **Cell Reports**, v. 32, n. 3, p. 107925, 2020. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107925

FERNÁNDEZ-MORALES, J. C.; HUA, W.; YAO, Y.; MORAD, M. Regulation of Ca^{2+} signaling by acute hypoxia and acidosis in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. **Cell Calcium**, v. 78, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1016/j.ceca.2018.12.006

GOMES, P. A. P. **Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de $[Ca^{2+}]$ e limiar de estimulação**. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

GOMES, P. A. P.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. Measuring $[Ca^{2+}]$ with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. **Cell Calcium**, v. 24, n. 1, p. 17-26, 1998. DOI: 10.1016/S0143-4160(98)90085-9

GOULART, J. T. **Fluxos de cálcio carregados por diferentes transportadores em miócitos atriais humanos**. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

GOULART, J.T.; BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R.A. Differences in Ca^{2+} handling in rat atrial and ventricular myocytes. **L Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis 2015)**. Águas de Lindóia, SP. 2 a 5 de agosto de 2015.

GREENBERG, M. J.; DAILY, N. J.; WANG, A.; CONWAY, M. K.; WAKATSUKI, T. Genetic and tissue engineering approaches to modeling the mechanics of human heart failure for drug discovery. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 120, 2018. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00120

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3440-3450, 1985.

GURDON, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **Development**, v. 10, n. 4, p. 622-640, 1962.

HERRAIZ-MARTÍNEZ, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, J.; LLACH, A.; MOLINA, C. E.; FERNANDES, J.; FERRERO-GREGORI, A.; ... ; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 106, n. 1, p. 76-86, 2015. DOI: 10.1093/cvr/cvv046

HUANG, J.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G. F. Na^{+}/Ca^{2+} exchange activity in neonatal rabbit ventricular myocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C195-C203, 2005. DOI: 10.1152/ajpcell.00183.2004

HUANG, J.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G. F. Ontogeny of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in rabbit ventricular myocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 294, n. 2, p. C516-C525, 2008. DOI: 10.1152/ajpcell.00417.2007

HWANG, H. S.; KRYSHAL, D. O.; FEASTER, T. K.; SÁNCHEZ-FREIRE, V.; ZHANG, J.; KAMP, T. J.; HONG, C. C.; WU, J. C.; KNOLLMANN, B. C. Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 85, p. 79-88, 2015. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.003

JIANG, Y.; PARK, P.; HONG, S. M.; BAN, K. Maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells: Current strategies and limitations. **Molecules and cells**, v. 41, n. 7, p. 613, 2018. DOI: 10.14348/molcells.2018.0143

KAMAKURA, T.; MAKIYAMA, T.; SASAKI, K.; YOSHIDA, Y.; WURIYANGHAI, Y.; CHEN, J.; HATTORI, T.; OHNO, S.; KITA, T.; HORIE, M.; YAMANAKA, S.; KIMURA, T. Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. **Circulation Journal**, v. 77, n. 5, p. 1307-1314, 2013. DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0987

KANE, C.; COUCH, L.; TERRACCIANO, C. Excitation–contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 3, p. 59, 2015. DOI: 10.3389/fcell.2015.00059

KIM, J. J.; YANG, L.; LIN, B.; ZHU, X.; SUN, B.; KAPLAN, A. D.; BETT, G. L. C.; RASMUSSEN, R. L.; LONDON, B.; SALAMA, G. Mechanism of automaticity in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 81, p. 81-93, 2015. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.013

KUMAR, N.; DOUGHERTY, J. A.; MANRING, H. R.; ELMADBOUH, I.; MERGAYE, M.; CZIROK, A.; ISAI, D. G.; BELEVYCH, A. E.; YU, L.; JANSSEN, P. M. L.; FADDA, P.; GYORKE, S.; ACKERMANN, M. A.; ANGELOS, M. G.; KHAN, M. Assessment of temporal functional changes and miRNA profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-49653-5

LEE, Y. K.; NG, K. M.; LAI, W. H.; CHAN, Y. C.; LAU, Y. M.; LIAN, Q.; TSE, H. F.; SIU, C. W. Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 4, p. 976-986, 2011. DOI: 10.1007/s12015-011-9273-3

LEONARD, A.; BERTERO, A.; POWERS, J. D.; BEUSSMAN, K. M.; BHANDARI, S.; REGNIER, M.; ... ; SNIADOCKI, N. J. Afterload promotes maturation of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in engineered heart tissues. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 118, p. 147-158, 2018. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.016

LUNDY, S. D.; ZHU, W. Z.; REGNIER, M.; LAFLAMME, M. A. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 14, p. 1991-2002, 2013. DOI: 10.1089/scd.2012.0490

MAURITZ C.; MARTENS, A.; ROJAS, S. V.; SCHNICK, T.; RATHERT, C.; SCHECKER, N.; MENKE, S.; GLAGE, S.; ZWEIGERDT, R.; HAVERICH, A.; MARTIN, U.; KUTSCHKA, I. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 32, n. 21, p. 2634-2641, 2011. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr166

MONTEIRO, L. M.; VASQUES-NÓVOA, F.; FERREIRA, L.; NASCIMENTO, D. S. Restoring heart function and electrical integrity: closing the circuit. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2017. DOI: 10.1038/s41536-017-0015-2

NASSAR, R.; REEDY, MARY C.; ANDERSON, P. A. Developmental changes in the ultrastructure and sarcomere shortening of the isolated rabbit ventricular myocyte. **Circulation Research**, v. 61, n. 3, p. 465-483, 1987. DOI: 10.1161/01.RES.61.3.465

OLIVETTI, G.; ANVERSA, P.; LOUD, A. V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. **Circulation Research**, v. 46, n. 4, p. 503-512, 1980. DOI: 10.1161/01.RES.46.4.503

PARIKH, S. S.; BLACKWELL, D. J.; GOMEZ-HURTADO, N.; FRISK, M.; WANG, L.; KIM, K.; ... ; LOUCH, W. E. Thyroid and glucocorticoid hormones promote functional T-tubule development in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 121, n. 12, p. 1323-1330, 2017. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311920

PESL, M.; PRIBY, J.; CALUORI, G.; CMIEL, V.; ACIMOVIC, I.; JELINKOVA, S.; DVORAK, P.; STAREK, Z.; SKLADAL, P.; ROTREKL, V. Phenotypic assays for analyses of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 6, p. e2602, 2017. DOI: 10.1002/jmr.2602

PIACENTINO III, V.; WEBER, C. R.; CHEN, X.; WEISSER-THOMAS, J.; MARGULIES, K. B.; BERS, D. M.; & HOUSER, S. R. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. **Circulation Research**, v. 92, n. 6, p. 651-658, 2003. DOI: 10.1161/01.RES.0000062469.83985.9B

PIONER, J. M.; SANTINI, L.; PALANDRI, C.; MARTELLA, D.; LUPI, F.; LANGIONE, M.; ... ; LANDI, S. Optical investigation of action potential and calcium handling maturation of hiPSC-Cardiomyocytes on biomimetic substrates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3799, 2019. DOI: 10.3390/ijms20153799

POGWIZD, S. M.; QI, M.; YUAN, W.; SAMAREL, A. M.; & BERS, D. M. Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. **Circulation Research**, v. 85, n. 11, p. 1009-1019, 1999. DOI: 10.1161/01.RES.85.11.1009

ROUSSEAU, E. R. I. C.; MEISSNER, G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 256, n. 2, p. H328-H333, 1989. DOI: 10.1152/ajpheart.1989.256.2.H328

SEYDOUX, G.; BRAUN, R. E. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 891-904, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.016

SHAM, J. S.; HATEM, S. N.; MORAD, M. Species differences in the activity of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in mammalian cardiac myocytes. **The Journal of Physiology**, v. 488, n. 3, p. 623-631, 1995. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020995

STROIK, D. R.; CEHOLSKI, D. K.; BIDWELL, P. A.; MLECZKO, J.; THANEL, P. F.; KAMDAR, F.; ... ; THOMAS, D. D. Viral expression of a SERCA2a-activating PLB mutant improves calcium cycling and synchronicity in dilated cardiomyopathic hiPSC-CMs. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 138, p. 59-65, 2020. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.11.147

SU, Z.; LI F.; SPITZER K. W.; YAO A.; RITTER M.; BARRY W. H. Comparison of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function in human, dog, rabbit, and mouse ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, n. 7, p. 761-767, 2003. DOI: 10.1016/s0022-2828(03)00119-6

SUN, X.; NUNES, S. S. Bioengineering approaches to mature human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, 2017. DOI: 10.3389/fcell.2017.00019

TACHIBANA, A.; SANTOSO, M. R.; MAHMOUDI, M.; SHUKLA, P.; WANG, L.; BENNETT, M.; GOLDSTONE, A. B.; WANG, M.; FUKUSHI, M.; EBERT, A. D.; WOO, Y. J.; RULIFSON, E.; YANG, P. C. Paracrine effects of the pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes salvage the injured myocardium. **Circulation Research**, v. 121, n. 6, p. e22-e36, 2017. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310803

TANAAMI, T.; ISHIDA, H.; SEGUCHI, H.; HIROTA, Y.; KADONO, T.; GENKA, C.; ... ; BARRY, W. H. Difference in propagation of Ca²⁺ release in atrial and ventricular myocytes. **The Japanese Journal of Physiology**, p. 0504270003-0504270003, 2005. DOI: 10.2170/jjphysiol.R2077

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024

WALDEN, A. P.; DIBB, K. M.; TRAFFORD, A. W. Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 4, p. 463-473, 2009. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.11.003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2020: Monitoring Health for the SDGs Sustainable Development Goals**. World Health Organization, 2020. Disponível em: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2020/en/. Acesso em: 03 de outubro de 2020.

WU, H.; YANG, H.; RHEE, J. W.; ZHANG, J. Z.; LAM, C. K.; SALLAM, K.; CHANG A. C. Y.; MA, N.; LEE, J.; ZHANG, H.; BLAU, H. M.; BERS, D. M.; WU, J. C. Modelling diastolic dysfunction in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from hypertrophic cardiomyopathy patients. **European Heart Journal**, v. 40, n. 45, p. 3685-3695, 2019. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz326

ZHANG, X; MORAD, M. Ca²⁺ signaling of human pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes as compared to adult mammalian cardiomyocytes. **Cell Calcium**, p. 102244, 2020. DOI: 10.1016/j.ceca.2020.102244

ZIMAN, A. P.; GÓMEZ-VIQUEZ, N. L.; BLOCH, R. J.; LEDERER, W. J. Excitation–contraction coupling changes during postnatal cardiac development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 2, p. 379-386, 2010. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.016

ZUPPINGER, C.; GIBBONS, G.; DUTTA-PASSECKER, P.; SEGISER, A.; MOST, H.; SUTER, T. M. Characterization of cytoskeleton features and maturation status of cultured human iPSC-derived cardiomyocytes. **European Journal of Histochemistry**, v. 61, n. 2, 2017. DOI: 10.4081/ejh.2017.2763

ANEXO



UNICAMP

CEPUNICAMP
comitê de ética em pesquisaPRP
pró-reitoria de pesquisa
unicamp

Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 25 de abril de 2019.

Of. CEP/PRP/Nº 017/2019

Fernanda Barbosa de Gouveia
Pesquisadora Responsável

REF.: DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "PAPEL DOS TRANSPORTADORES DE Ca^{2+} NO RELAXAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS HUMANAS (hiPSC)", para fins de dissertação de mestrado da pesquisadora supracitada, sob a orientação do Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani e da Prof.^a Dra. Rosana Almeida Bassani, trata-se de um estudo que busca caracterizar quantitativamente aspectos do transporte de Ca^{2+} por diferentes sistemas em hiPSC-CM. E, para isso, irá obter amostras de material biológico humano comercialmente.

Além do resumo anexado ao documento, para um melhor entendimento da pesquisa, foi encaminhado um email ao CEP/Unicamp, em 25/04/2019, com os seguintes esclarecimentos:

- 1) neste projeto, a extração dos dados será feita a partir de sinais obtidos **exclusivamente** das células a serem adquiridas comercialmente (hiPSC);
- 2) para tal extração, serão usados métodos descritos em trabalhos anteriores de pesquisadores da equipe (orientadores);
- 3) os dados extraídos (estimativas e parâmetros quantitativos) serão comparados com dados obtidos de cardiomiócitos humanos que já foram publicados. No projeto completo, foi citada referência pertinente a essa comparação (última linha da Introdução);



4) ressalta-se que este projeto não envolve uso de material armazenado, obtido em outro projeto da equipe (aprovado pelo CEP). No entanto, caso haja no futuro necessidade de utilização deste material, temos ciência de que deveremos submeter o protocolo ao sistema CEP/CONEP, e apenas iniciar os experimentos com o material armazenado após aprovação pelo CEP.

Deste modo, baseado no resumo encaminhado com os esclarecimentos informados pela pesquisadora, o referido projeto de pesquisa não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, tendo em vista que não envolve seres humanos.

Atenciosamente,


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP



Título do projeto: Papel dos transportadores de Ca^{2+} no relaxamento de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC)

Finalidade: Tese de Mestrado.

Pesquisadora Responsável: Fernanda Barbosa de Gouveia

Orientadores: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

Local: Departamento de Engenharia Biomédica – FEEC – UNICAMP e Centro de Engenharia Biomédica – UNICAMP.

Os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-CM) têm um vasto potencial de aplicação, que inclui o desenvolvimento de modelos de doenças, testes de fármacos e de toxicidade, desenvolvimento de abordagens investigativas e terapêuticas personalizadas, e terapia regenerativa. O balanço e a interação dos transportadores de Ca^{2+} na diminuição da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que permitem o relaxamento das células cardíacas são importantes características da espécie e do estágio de desenvolvimento. Este projeto tem como objetivo caracterizar a atuação destes transportadores em hiPSC-CM para avaliar o grau de maturidade funcional do transporte de Ca^{2+} nestas células. Para isto, a contribuição relativa dos principais transportadores que removem Ca^{2+} do citosol será estimada a partir da extração de dados de transientes de Ca^{2+} obtidos experimentalmente, como descrito em trabalhos anteriores, e comparada com dados obtidos em cardiomiócitos isolados de humanos adultos. Os hiPSC-CM a serem utilizados na pesquisa serão adquiridos comercialmente. Espera-se que os resultados do projeto permitam maior conhecimento sobre a adequação do uso dos hiPSC-CM como modelo experimental do miocárdio humano.

Os experimentos serão realizados nas dependências do Laboratório Nacional para Estudo do Cálcio Celular (LabNECC) e no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv), localizados no Centro de Engenharia Biomédica na Unicamp.

22 de abril de 2019