

Título: Otimização de Protocolos para Diferenciação de Células-Tronco Pluripotentes Induzidas em Células Endoteliais Cardíacas: Bases para Modelos Cardíacos 3D

Pesquisador responsável: Cintia Delai da Silva Horinouchi

Unidade: Laboratório Nacional de Biociências – LNBio

Introdução:

A cardiotoxicidade é uma das principais razões para a descontinuação de fármacos em desenvolvimento, seja por inviabilizar sua aprovação clínica ou por levar à retirada do mercado de medicamentos já comercializados. Apesar da obrigatoriedade dos ensaios de segurança cardíaca, os modelos pré-clínicos atuais apresentam baixa capacidade preditiva. Ensaios in vitro com monoculturas 2D de linhagens imortalizadas não mimetizam adequadamente o ambiente celular, enquanto modelos animais possuem limitações devido às diferenças filogenéticas entre espécies, impactando negativamente a validação de novos compostos (1, 2).

Diante dos desafios éticos e econômicos no uso de animais para pesquisa, o princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento e Reutilização) reforça a necessidade de métodos alternativos. Nesse contexto, os sistemas microfisiológicos (SMF) emergem como ferramentas promissoras ao utilizar células humanas em microambientes controlados, proporcionando modelos mais fisiologicamente relevantes e aumentando a previsibilidade dos ensaios toxicológicos (3). Uma das principais vantagens desses sistemas é a capacidade de recriar o microambiente tecidual ao incorporar cultivos tridimensionais (3D) que mimetizam a arquitetura e a unidade funcional dos órgãos. Isso é possível pelo cultivo de organoides ou por sistemas baseados em células humanas cultivadas em condições finamente controladas, permitindo uma performance mais fisiológica e representativa da biologia humana (4). Para o desenvolvimento desses sistemas, o uso de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) tornou-se uma estratégia valiosa. Protocolos de diferenciação de hiPSCs têm sido constantemente aprimorados, tanto em culturas bidimensionais quanto na formação de organoides (5).

Estado da arte:

Nesse contexto, os sistemas microfisiológicos cardíacos (SMF) têm emergido como alternativas promissoras, permitindo a mimetização mais fiel da estrutura e função do coração. Esses modelos integram cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas, fibroblastos e células endoteliais, combinando engenharia de tecidos e microtecnologias para reproduzir propriedades eletrofisiológicas, mecânicas e bioquímicas essenciais do miocárdio (6).

Nos últimos anos, avanços significativos têm sido alcançados na construção de SMF cardíacos, incluindo a incorporação de sensores microeletromecânicos, sistemas microfluídicos e organoides cardíacos para monitoramento em tempo real da contratilidade e da resposta elétrica do tecido (7). Modelos inovadores, como os heart-on-a-chip, combinam plataformas microfluídicas e culturas tridimensionais para simular o microambiente cardíaco sob condições controladas, aumentando a relevância fisiológica dos ensaios de toxicidade (8). Estudos recentes demonstram que a integração de componentes vasculares e o controle preciso do microambiente celular podem modular significativamente a resposta a fármacos, tornando esses sistemas ferramentas estratégicas para a triagem pré-clínica e o desenvolvimento de terapias mais seguras (9, 10). Apesar dos avanços, ainda existem desafios na padronização e validação regulatória desses modelos, evidenciando a necessidade de pesquisas contínuas para aprimorar sua aplicabilidade na avaliação de cardiotoxicidade. Além da otimização dos modelos, é fundamental a padronização de protocolos reprodutíveis, economicamente viáveis e

translacionais, permitindo a efetiva transposição dos achados laboratoriais para o desenvolvimento de novos fármacos.

Objetivos:

Estabelecer protocolos otimizados e reprodutíveis para a diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSC) em células endoteliais cardíacas.

Metodologia:*Cultivo e manutenção de hiPSC*

As células hiPSC serão cultivadas em meio Stemflex (Thermo Fisher) em placas de cultura pré-tratadas com Geltrex (ThermoFisher). As células serão mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência, com troca de meio a cada 24h e realização das passagens através da dissociação enzimática com Accutase (Invitrogen). A análise do controle de qualidade será realizada periodicamente para avaliar manutenção do estado de pluripotência através da imunomarcagem de OCT4, SSEA4, TRAI-60 e TRAI-81.

Diferenciação em células endoteliais cardíacas (hiPSC-EC)

Conforme previamente descrito (11,12) a diferenciação de hiPSC-EC será realizada com o plaqueamento de 2×10^4 por cm^2 em placas tratadas com Geltrex no dia -1. Em seguida, no dia 0, a formação de células do mesoderma cardíaco será induzida com a troca do meio por BPEL (Bovine Serum Albumin (BSA) Polyvinylalcohol Essencial Lipids) suplementado com 20 ng/ml de BMP4, 20 ng/ml de Activina A humana e 1,5 mM de CHIR99021. No dia 3, o meio será trocado por BPEL suplementado com 50 ng/ml de VEGF e 5 mM de XAV 939 (inibidor da via de Wnt). No 6º dia de diferenciação, será realizado o isolamento das células CD34 positivas através do Kit II de seleção seguindo as recomendações do fornecedor (StemCell Technologies). As células isoladas serão plaqueadas a uma concentração de $20 \times 10^3/\text{cm}^2$ em placa de cultura revestida com fibronectina (1:200) em meio BPEL suplementado com 50 ng/ml de VEGF, com troca de meio a cada dois dias. No dia 9, as células serão dissociadas com tripsina 0,25% e selecionadas de acordo com a porcentagem de expressão positiva de CD31/PECAM-1 determinada através de FACS.

Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

A análise do perfil de expressão gênica será realizada a partir da coleta do RNA total de células com auxílio do kit PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fischer) seguindo as recomendações dos fabricantes. As coletas do mRNA das três linhagens serão realizadas no momento 0 e ao final da diferenciação celular. Após a quantificação do RNA, será realizada a síntese do cDNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fischer), conforme instruções do fabricante.

Após a obtenção do cDNA, a expressão relativa dos genes de interesse será quantificada por RT-qPCR utilizando Sybr Green PCR Master (ThermoFischer) e CFX96 Real Time System (Bio-Rad). Os genes avaliados como marcadores de células endoteliais serão: PECAM1 e CD31.

Imunofluorescência dos marcadores de pluripotência em hiPSC e de diferenciação em células endoteliais cardíacas.

Amostras da cultura serão isoladas e fixadas com formalina 10% durante 20 minutos. Em seguida, será realizada a lavagem com PBS e permeabilização com solução composta por PBS/Triton-X 0,3% por 30 minutos e bloqueio com PBS/BSA 3% por 1h. Para avaliar o padrão de pluripotência, serão utilizados os anticorpos primários Oct4, TRA1-60, TRA1-81, SSEA4 por um período de 16h a 4°C. De maneira semelhante, a imunomarcagem das células endoteliais será realizada com a incubação com o anti-CD31 (Abcam). Após esse intervalo, serão realizadas duas lavagens com PBS 1x e incubação com anticorpos

secundários por 1h. As imagens serão adquiridas em microscópio de fluorescência e analisadas através do software Fiji (ImageJ).

Cronograma de atividades:

	Mês												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Treinamento NB2; apresentação do projeto; treinamento em cultivo de células	■												
Cultivo e caracterização de hiPSC		■	■	■									
Diferenciação de hiPSC-EC				■	■	■	■	■					
Caracterização hiPSC-EC							■	■	■	■	■		
Escrita relatório final													■

Referências:

- 1- Arslan U, Moruzzi A, Nowacka J, Mummery CL, Eckardt D, Loskill P, Orlova VV. Microphysiological stem cell models of the human heart. *Mater Today Bio*. 2022 Apr 14;14:100259. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100259. PMID: 35514437; PMCID: PMC9062349.
- 2- Servick K. A painstaking overhaul for cardiac safety testing. *Science*. 2016 Sep 2;353(6303):976-977. doi: 10.1126/science.353.6303.976. PMID: 27701095.
- 3- Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip*. 2017 Jul 11;17(14):2395-2420. doi: 10.1039/c6lc01554a. PMID: 28617487.
- 4- Mendes M, Morais AS, Carlos A, Sousa JJ, Pais AC, Mihăilă SM, Vitorino C. Organ-on-a-chip: Quo vademus? Applications and regulatory status. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2025 May;249:114507. doi: 10.1016/j.colsurfb.2025.114507. Epub 2025 Jan 8. PMID: 39826309.
- 5- Arslan U, Orlova VV, Mummery CL. Perspectives for Future Use of Cardiac Microtissues from Human Pluripotent Stem Cells. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 Nov 14;8(11):4605-4609. doi: 10.1021/acsbomaterials.1c01296. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35315663; PMCID: PMC9667465.
- 6- Ewart L, Fabre K, Chakilam A, Dragan Y, Duignan DB, Eswaraka J, Gan J, Guzzie-Peck P, Otieno M, Jeong CG, Keller DA, de Morais SM, Phillips JA, Proctor W, Sura R, Van Vleet T, Watson D, Will Y, Tagle D, Berridge B. Navigating tissue chips from development to dissemination: A pharmaceutical industry perspective. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017 Oct;242(16):1579-1585. doi: 10.1177/1535370217715441. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28622731; PMCID: PMC5661770.
- 7- Polonchuk L, Chabria M, Badi L, Hoflack JC, Figtree G, Davies MJ, Gentile C. Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment. *Sci Rep*. 2017 Aug 1;7(1):7005. doi: 10.1038/s41598-017-06385-8. PMID: 28765558; PMCID: PMC5539326.
- 8- An L, Liu Y, Liu Y. Organ-on-a-Chip Applications in Microfluidic Platforms. *Micromachines (Basel)*. 2025 Feb 10;16(2):201. doi: 10.3390/mi16020201. PMID: 40047688; PMCID: PMC11857120.
- 9- Oleaga C, Riu A, Rothemund S, Lavado A, McAleer CW, Long CJ, Persaud K, Narasimhan NS, Tran M, Roles J, Carmona-Moran CA, Sasserath T, Elbrecht DH, Kumanchik L, Bridges LR, Martin C, Schnepfer MT, Ekman G, Jackson M, Wang YI, Note R, Langer J, Teissier S, Hickman JJ. Investigation of the effect of hepatic metabolism on off-target cardiotoxicity in a multi-organ human-on-a-chip system. *Biomaterials*. 2018 Nov;182:176-190. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.062. Epub 2018 Aug 4. PMID: 30130706; PMCID: PMC6126670.
- 10- Lind JU, Yadid M, Perkins I, O'Connor BB, Eweje F, Chantre CO, Hemphill MA, Yuan H, Campbell PH, Vlassak JJ, Parker KK. Cardiac microphysiological devices with flexible thin-film sensors for higher-throughput drug screening. *Lab Chip*. 2017 Oct 25;17(21):3692-3703. doi: 10.1039/c7lc00740j. PMID: 28976521; PMCID: PMC5810940.
- 11- Campostrini G, Meraviglia V, Giacomelli E, van Helden RWJ, Yiangou L, Davis RP, Bellin M, Orlova VV, Mummery CL. Generation, functional analysis and applications of isogenic three-dimensional self-aggregating cardiac microtissues from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2021 Apr;16(4):2213-2256. doi: 10.1038/s41596-021-00497-2. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33772245; PMCID: PMC7611409.
- 12- Orlova VV, van den Hil FE, Petrus-Reurer S, Drabsch Y, Ten Dijke P, Mummery CL. Generation, expansion and functional analysis of endothelial cells and pericytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2014;9(6):1514-31. doi: 10.1038/nprot.2014.102. Epub 2014 May 29. PMID: 24874816.