

# Cardiomiócitos humanos para descoberta de drogas

## Human cardiomyocytes for drug discovery

Diogo Gonçalves Biagi<sup>I</sup>

Jéssica Gonçalves<sup>I</sup>

Estela Cruvinel<sup>I</sup>

Renata Damiani<sup>II</sup>

Flavia Valgode<sup>II</sup>

Fabiana Medeiros<sup>III</sup>

Camila G Moreira<sup>III</sup>

Evelyn Santos<sup>III</sup>

Rodrigo Marcon<sup>III</sup>

Calixto João<sup>III</sup>

Gabriela Venturini<sup>IV</sup>

Alexandre Pereira<sup>IV</sup>

Éden Ferreira<sup>V</sup>

Renato Mortara<sup>V</sup>

Marcos C Valadares<sup>I</sup>

<sup>I</sup> PluriCell Biotech, São Paulo, SP, Brazil

<sup>II</sup> Biosíntesis Laboratory, São Paulo, SP, Brazil

<sup>III</sup> Centro de Inovação e Ensaios pré-Clínicos (CIEnP), Florianópolis, SC, Brazil

<sup>IV</sup> Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>V</sup> Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

\* E-mail: [diogo.biagi@pluricellbiotech.com](mailto:diogo.biagi@pluricellbiotech.com)

Recebido: 29 set 2018

Aprovado: 23 jan 2018

### RESUMO

**Introdução:** A descoberta de novas drogas para doenças cardíacas é baseada em métodos antigos que usam animais, células de animais ou células modificadas que não representam fielmente fenótipos cardíacos humanos. **Objetivo:** Neste trabalho, temos o objetivo de mostrar que cardiomiócitos derivados de células iPS humanas representam uma nova ferramenta para a descoberta de drogas cardíacas e poderiam ajudar na diminuição do uso de animais na pesquisa. **Método:** Geração de cardiomiócitos derivados de células iPS e seus usos para avaliação de toxicidade cardíaca e infecção por *Trypanosoma cruzi* para descoberta de drogas. **Resultados:** Definição de um protocolo robusto de reprogramação, manutenção e diferenciação de células iPS. Diferenciação de células iPS em cardiomiócitos com alta pureza que apresentam toxicidade a diferentes doses de doxorubicina foram suscetíveis a infecção com *T. cruzi*. **Conclusões:** Cardiomiócitos humanos derivados de células iPS podem ser uma potente ferramenta para descoberta de novas drogas e podem substituir diversos ensaios feitos em animais ajudando a diminuir o uso de animais em pesquisa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cardiomiócitos Humanos; Descoberta de Drogas; Doxorubicina; Substituição de Animais

### ABSTRACT

**Introduction:** Cardiac drug discovery are based in old methods that use animals, animal cells or modified cells that do not faithfully represent human cardiac phenotypes. **Objective:** Here, we aimed to show that cardiomyocytes derived from human iPS cells represent a new tool for cardiac drug discovery and could contribute do reduce animal use in research. **Method:** Generation of human iPS cells derived cardiomyocytes and its use for cardiotoxicity evaluation and infection with *T. cruzi* for drug discovery. **Results:** Definition of robust protocol for human iPS cells reprogramming, maintenance and cardiac differentiation. Derivation of high purity cardiomyocytes from hiPSCs that presented toxicity to different doses of doxorubicin and were amenable to infection of *T. cruzi*. **Conclusions:** Human cardiomyocytes derived from human iPS cells can be a great tool for drug discovery and can replace several assays done in animals helping to reduce animal use in research.

**KEYWORDS:** Human Cardiomyocytes; Drug Discovery; Doxorubicin; Animal Replacement



## INTRODUÇÃO

Desde o início da década de 1920, animais são usados como modelos para avaliar a toxicidade de compostos antes do uso humano<sup>1</sup>. Isso é importante para impedir graves e perigosos efeitos colaterais devido à administração de drogas desconhecidas em seres humanos. Em mais de 40 anos, o campo toxicológico evoluiu pouco com relação à maneira tradicional de medir a toxicidade de novos compostos em animais, contando basicamente com a administração de diferentes doses (crônicas ou agudas) em muitos animais para observar a distribuição tecidual e as implicações patológicas do uso da droga<sup>1</sup>.

Apesar de bem estabelecidos e com inigualáveis características, os estudos toxicológicos e de segurança pré-clínica *in vivo* permanecem dispendiosos, demorados e, para alguns tecidos (como coração, fígado e cérebro), muito superficiais. Não é de surpreender que problemas no coração e fígado representem quase 50% das causas de insucesso<sup>2</sup>, que é quando drogas falham em testes com humanos (ensaios clínicos), apesar de anteriormente se pensar que eram seguras em testes pré-clínicos. Isso serve para mostrar que precisamos de novas ferramentas capazes de avaliar mais precisamente a toxicidade e a segurança de novas drogas, de preferência de forma eficiente, com alto rendimento e mais barata que experimentos *in vivo* em animais.

Desde o advento das células-tronco humanas de pluripotência induzida (chamadas de iPSCs) por Takahashi et al. em 2007<sup>3</sup>, a comunidade científica tem anunciado as iPSCs como disruptivas. A capacidade de induzir pluripotência a partir de células adultas de diferentes doadores abre as portas para a tão necessária evolução nos modelos celulares de tecidos normais e doentes. A comunidade científica sempre teve problemas com a disponibilidade de vários tipos de tecidos de doadores. Tecidos como os do coração e do cérebro são muito escassos, o que dificulta o avanço do conhecimento científico sobre eles. No entanto, com iPSCs (e protocolos de diferenciação)<sup>4</sup>, os cientistas agora conseguem obter uma grande quantidade de células, a partir de diferentes tecidos e constituições genéticas (doadores), inclusive doentes<sup>5</sup>. Sob essa perspectiva, muitas instituições ao redor do mundo têm financiado a criação de bancos de células-tronco de pluripotência induzida que oferecem acesso a uma grande variedade de materiais<sup>5</sup>.

Considerando essa realidade, o estabelecimento de um protocolo robusto e eficaz de diferenciação de células do coração a partir de iPSCs fornecerá uma nova ferramenta para avaliar perfis cardiotoxícos de novos compostos em desenvolvimento para aplicações terapêuticas. Nosso objetivo foi diferenciar eficientemente células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs) em cardiomiócitos, com robustez e alta pureza, e avaliar sua utilização para cardiotoxicidade de drogas.

## MÉTODO

### Comitê de ética

O protocolo de estudo do presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética para pesquisa médica em seres humanos do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (#2.009.562). O consentimento livre e esclarecido dos participantes foi obtido.

### Reprogramação e manutenção de iPSCs

Eritroblastos foram cultivados em meio de cultura de células mononucleares livres de soro (MNC) contendo as seguintes citocinas diluídas em StemSpan Serum Free Expansion Medium (Stem Cell Technologies, EUA): Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1): 40 ng/ml; Fator de células-tronco (SCF): 100 ng/ml; Interleucina 3 (IL-3): 10 ng/ml; eritropoietina (EPO): 2 U/ml (todas as citocinas são da R&D Systems, EUA). Dois milhões de células foram transfectadas com plasmídeos pEB-C5 e pEB-Tg (Addgene, EUA) contendo os fatores de reprogramação Oct4, Sox2, Klf4, cMyc, Lin28 e SV40-T. Para isso foi usado o kit nucleofector CD34+ humano e o dispositivo Nucleofector II, ambos da Lonza (Basileia, Suíça), seguindo as instruções do fabricante. Eritroblastos reprogramados foram incubados em placas revestidas de MEF em meio de MEF e FBS ES-Cell Qualified (Thermo Fisher, EUA) com fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF; 20 ng/ml) de um dia para o outro. Em seguida, elas foram transferidas para um meio de células-tronco embrionárias (ESC) contendo Knockout DMEM, Knockout Serum Replacement, antibióticos-antimicóticos, Glutamax 200 mM, solução de aminoácidos não-essenciais MEM, 2-mercaptoetanol suplementado com bFGF (20 ng/ml) (todos da Thermo Fisher, EUA) e butirato de sódio (0,25 mM) (Cayman, EUA). As colônias de hiPSC foram passadas a partir de uma placa revestida de MEF com 6 poços para placas revestidas com Matrigel (BD) com meio E8 (Thermo Fisher, EUA) usando Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cell Technologies, EUA) e 10  $\mu$ M de inibidor ROCK Y-27632 (Stemgent, EUA).

Para manutenção, as colônias foram passadas duas vezes por semana com Versene (Thermo Fisher, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e plaqueadas como células únicas em uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. O meio E8 (Thermo Fisher, EUA) foi utilizado durante a semana e o E8 flex (Thermo Fisher, EUA) durante o fim de semana. As hiPSCs foram rotineiramente testadas para micoplasmas e nenhuma contaminação foi detectada.

### Diferenciação cardíaca de hiPSCs

As iPSCs foram diferenciadas usando um método de diferenciação em monocamadas modificado a partir de publicações anteriores<sup>6,7</sup>. As iPSCs foram cultivadas em condições de alimentação livre até que chegassem à confluência de 60%-70%. As células foram isoladas, contadas e plaqueadas ( $2,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) em meio E8 com 5  $\mu$ M de Ri (Cayman, EUA). O meio E8 foi trocado diariamente até que as células atingissem 100% de confluência. Esse foi considerado o dia zero e o meio foi trocado por RPMI suplementado com 1X B27 (Thermo Fisher, EUA) sem insulina (RB-) e 4  $\mu$ M de CHIR99021 (Merck, EUA). Vinte e quatro horas depois, o meio foi trocado por RB suplementado com 10 ng/mL de BMP4 (R&D Systems, EUA). No segundo dia, o meio foi renovado com RB suplementado com 2,5  $\mu$ M de KY2111 e XAV939 (ambos da Cayman,



EUA). No quarto dia e a cada dois dias, o meio foi renovado com CDM37. As células foram cultivadas por 30 dias até serem passadas em células únicas para experiências específicas.

### Formação de corpos embrioides

Corpos embrioides (EB) foram gerados conforme descritos por Lin e Chen<sup>8</sup> com pequenas modificações. As células foram cultivadas brevemente até que atingissem 90% de confluência e que fossem passadas com Dispase (StemCell Technologies, EUA). Após a dissociação completa, PBS (LGC Technologies, Brasil) foi adicionado e as placas foram delicadamente pipetadas para cima e para baixo para quebrar grandes colônias. As células foram transferidas para tubos de 15 mL lavados duas vezes com PBS após centrifugação a 100 xg por dois minutos. Pellets foram delicadamente ressuspendidos no meio E8 suplementado com 4 µg/ml de PVA (Sigma, EUA) e cultivados em placas não aderentes (Sarstedt, Alemanha) por um dia. O meio foi trocado por E6 (Thermo Fisher, EUA) com cuidado para não remover os EB em suspensão. Metade do meio foi trocada a cada três dias até o décimo terceiro dia, quando o RNA foi coletado usando Trizol (Thermo Fisher, EUA).

### rt-PCR e qPCR

Todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi usado GoScript Reverse Transcription System #A5001 (Promega Corporation, EUA). As amostras foram diluídas para 10 ng/ml. Para a PCR endpoint foi usada a Polimerase de DNA GoTaq DNA #m3008 (Promega Corporation, EUA) e para o PCR quantitativo foi usado Power Syber Green Master Mix PCR #4367659. Sequências de iniciadores estão disponíveis mediante solicitação.

### Cariótipo

Células iPSC foram cultivadas em uma placa de 60 mm até atingir 90% de confluência. Nesse momento, as células foram destacadas usando Versene e coletadas em um tubo de 15 mL. As células foram tratadas com E8 suplementado com Colcemid (20 ng/ml) (Thermo Fisher, EUA) por uma hora a 37° C, lavadas com PBS e tratadas por vinte minutos a 37° C com uma solução hipotônica (PBS suplementado com KCl 0,075 M). As células foram lavadas com PBS e uma etapa de fixação foi realizada. A solução de fixação foi metanol: ácido acético (3:1). Todas as etapas de centrifugação foram de 200 xg por quatro minutos. Análise convencional de cromossomos foi realizada em culturas de iPSCs, usando bandeamento GTG com resolução de 400 bandas de acordo com protocolos-padrão. Um total de 10 células metafásicas foram analisadas. As imagens celulares foram capturadas usando o sistema CytoVysion (Applied Imaging Corporation, EUA).

### Imunofluorescência

As células iPSC foram plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com Geltrex e cultivadas por dois dias até 50% de confluência. Elas foram fixadas com PFA 4% e coradas com OCT4 (Santa Cruz # sc5279; diluição 1:100), NANOG (R&D # af1997; diluição 1:25) e anticorpos TRA1-81 (Stemgent # 09-0006; diluição 1:100) e DAPI (Sigma, EUA) para mostrar os núcleos. A imagem foi gerada no EVOS FL (Thermo Fisher, EUA).

### Citometria de Fluxo

Para citometria de iPSC, as células foram cultivadas até chegarem à confluência de 70-80% e passadas com Versene. BD Stemflow #560589 foi utilizado seguindo as instruções do fabricante.

Os cardiomiócitos foram plaqueados em placas de 96 poços revestidas com Geltrex e cultivados por sete dias. Após a dissociação celular, eles foram fixados com PFA 4% e corados com troponina T anticardíaca (Fritzgerald # 20R-3024, diluição 1:10000), mio-sina (AbCam # ab207926, diluição 1: 4000), α-actinina (AbCam # AB9465, diluição 1: 4000) e anticorpos troponina I cardíaca (BD # 564409, diluição 1: 400). Foi feita a titulação de anticorpos até nenhuma coloração ser encontrada em células iPSC. Para iPSCs e os cardiomiócitos, os dados foram adquiridos usando o equipamento Canto BD e analisados pelo software FlowJo, considerando 2% de eventos falsos positivos.

### Ensaio de cardiotoxicidade

No teste de toxicidade do Laboratório Biosíntesis, três diferentes lotes de cardiomiócitos (05C146, 05C138, 05C146) foram expostos a DMSO (20%) e doxorubicina (1 e 10 µM) em placas de 96 poços. A toxicidade das substâncias foi avaliada após 48 horas de exposição usando corante Vermelho Neutro.

No Ensaio de toxicidade do CIEnP (Centro de Inovação e Ensaio Pré-clínicos), três diferentes lotes de cardiomiócitos (05C022, 05C014, 05C065) foram expostos a doxorubicina (1 e 10 µM) em placas de 96 poços. A toxicidade das substâncias foi avaliada após 48 horas de exposição usando MTT<sup>9</sup> e corante Vermelho Neutro<sup>10</sup>. A absorbância foi medida usando SpectraMax i3X (Molecular Devices, EUA). Os resultados foram mostrados usando a porcentagem de células vivas com relação ao grupo controle tratado com o veículo.

### Estatísticas

Dados do CIEnP: os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para avaliar as diferenças significativas entre os grupos, foi realizada uma ANOVA *one way* seguida de um teste de NEWMAN-Keuls. Valores abaixo de 0,05 foram considerados como indicação de significância. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, EUA).

Dados do Laboratório Biosíntesis: O cálculo da viabilidade celular em porcentagem (CV%) foi feito de acordo com a fórmula:

$$CV\% = \frac{\text{Média de densidade óptica leituras da substância teste/substância de referência}}{\text{Média de densidade óptica leituras das células controle}} \cdot 100$$

Os resultados de cardiotoxicidade foram submetidos a uma ANOVA *one way*. A diferença estatística entre os grupos foi verificada no teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%.

### Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Infecção por tripomastigotas: tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y rotulada com GFP)<sup>11</sup> foram obtidos a partir dos sobrenadantes de culturas de células LLC-MK2 infectadas (ATCC CCL-7; American



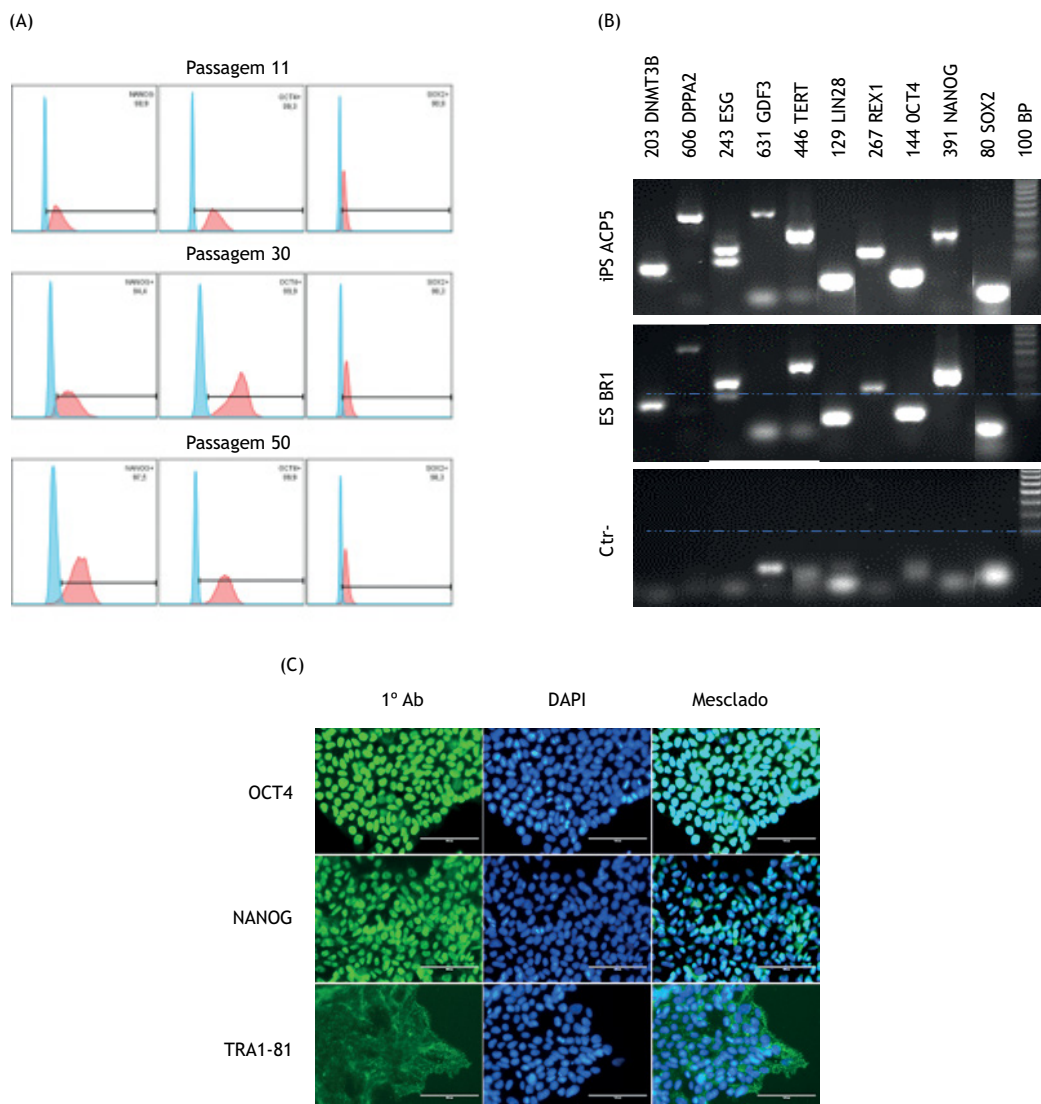
Type Culture Collection, Rockville, MD). As células foram cultivadas no meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Formas livres de tripomastigotas foram encontradas nos sobrenadantes das células diariamente. O sobrenadante foi colhido e centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos e os pellets foram ressuspensos no meio RPMI suplementado com B27 para infecção dos cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram incubados durante 24 horas no meio RPMI suplementado com B27 contendo 2,5 x 10<sup>5</sup> tripomastigotas (MOI 5:1). Após 24 horas de infecção, os parasitas foram descartados e as células foram lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado meio RPMI suplementado com B27 sem parasitas. As células foram cultivadas por mais 24 horas, até 48 horas de infecção.

### Coloração

Após 48 horas de infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com PFA 4% por 30 minutos. O PFA foi

descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS. As células foram incubadas durante uma hora com DAPI (NucBlue, Molecular Probes) para corar núcleos e Alexa Fluor 555 faloidina (Invitrogen) para corar actina. Após a coloração, as células foram lavadas com PBS e mantidas a 4°C até a aquisição de imagens no Cellomics® ArrayScan® VTI High Content Analysis Reader com foco automático e aquisição de 50 imagens por poço com uma ampliação de 40 vezes.

Infecção por amastigotas: cardiomiócitos ligados a lâminas de vidro revestidas com laminina foram infectados com amastigotas extracelulares da cepa G de *T. cruzi* como previamente descrito<sup>12</sup>. Após 72 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS e parasitas rotulados com soro humano chagásico (com Ig anti-humano Alexa 488 (Thermo Fisher, EUA), em verde). Os filamentos de actina foram corados com faloidina-TRITC (Thermo Fisher, EUA) e DAPI (Thermo Fisher, EUA) foi usado para rotular os núcleos e cinetoplastos.



**Figura 1.** Caracterização das iPSCs; (A) Citometria de Fluxo para marcadores nucleares de pluripotência nas passagens 11, 30 e 50; (B) PCR endpoint para marcadores do pluripotência (DNMT3B = 203 bp); (DPPA2 = 606 bp); (ESG = 243 bp); (GDF3 = 631 bp); (TERT = 446 bp); (LIN28 = 129 bp); (REX1 = 267 bp); (OCT4 = 144 bp); (NANOG = 391 bp) (controle 100 bp); (C) Imunofluorescência dos marcadores do pluripotência (OCT4, NANOG e TRA-1-81). Coloração de DAPI do núcleo e imagens mescladas dos marcadores e núcleos corados juntos, barra da escala: 100 µm.



## RESULTADOS

### Geração de células iPS humanas

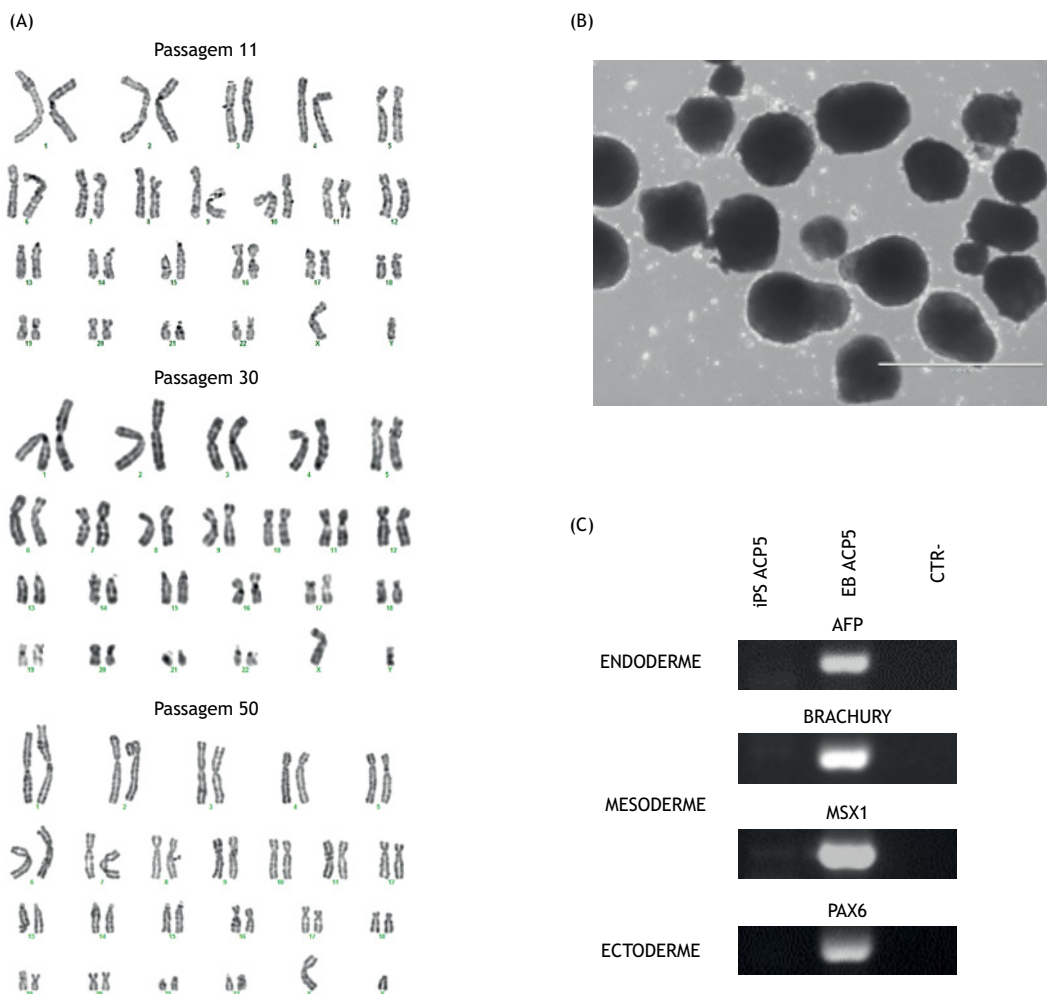
Eritroblastos de um doador saudável (ACP) foram reprogramados usando vetores epissomais. Clones de células iPS ACP5 foram coletados após a formação de colônias durante a reprogramação e expandidas. A Figura 1A mostra a análise de citometria de fluxo de marcadores de fatores de transcrição das hiPSCs. As células mostram alta coloração positiva para todos os marcadores, mesmo após o cultivo a longo prazo (50 passagens). Fatores de transcrição e marcadores de membrana também são mostrados por imunofluorescência na figura 1B. ACP5 mostra a expressão de genes marcadores de pluripotência para hiPSC (Figura 1C). Para validar o nosso método de passar células-únicas, nós fizemos análises de cariótipo durante o cultivo de longo prazo. O clone ACP5 apresentou cariótipo normal até a passagem 50 (Figura 2A).

Finalmente, a capacidade de diferenciação inicial *in vitro* foi avaliada pela diferenciação espontânea de EB após 13 dias em

cultura de suspensão sem compostos para induzir a diferenciação específica. A RT-PCR mostra que as células diferenciadas expressaram marcadores de endoderme (AFP), mesoderme (BRACHURY e MSX1) e ectoderme (PAX6) (Figura 2B), demonstrando que o clone ACP5 pode se diferenciar nas três camadas germinativas *in vitro*. Conjuntamente, esses dados confirmam que nosso processo de reprogramação e cultivo de hiPSCs apresenta alta reprodutibilidade, gerou células com boa qualidade e capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula.

### Diferenciação cardíaca de hiPSCs e seu uso para a descoberta de drogas

O clone iPS ACP5 foi então usado para gerar cardiomiócitos humanos derivados de iPSCs (iPSC-CM). As células das passagens 20 a 60 foram usadas e a diferenciação em cardiomiócitos foi igualmente eficiente. (<https://youtu.be/07Thu63V-5o>). Mostramos por citometria de fluxo a porcentagem de expressão de Troponina T cardíaca específica (gene TNNT2) em diferentes passagens (Figura 3A). Uma população altamente pura de iPSC-CM



**Figura 2.** Caracterização das células iPS. (A) Cariótipos normais durante o cultivo de longo prazo nas passagens 11, 30 e 50. (B) Formação de corpos embrioides, barra da escala: 1000  $\mu$ m. (C) PCR endpoint para os três marcadores de derivados de linhagens: Endoderma - marcador AFP; Mesoderma - marcadores BRACHURY e MSX1 e Ectoderma - marcador PAX6.



(acima de 90%) foi alcançada independentemente da passagem de hiPSCs. Usando hiPSC-CMs da passagem 60, mostramos também a presença de outras proteínas cardíacas específicas como  $\alpha$ -actinina (ACTN2); miosina de cadeia pesada (MYH7) e a forma adulta de Troponina I (TNNI3) (Figura 3B).

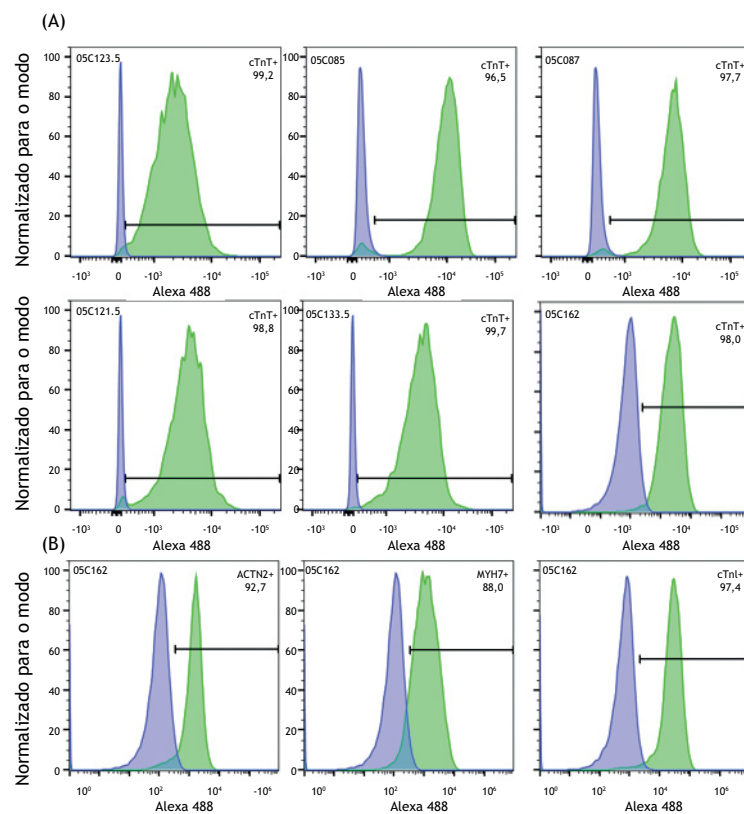
Em seguida usamos cardiomiócitos com pureza acima de 90% para a troponina T cardíaca (figura 4A e C) para verificar se esses cardiomiócitos conseguiriam recapitular a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina. Fizemos análises diferentes em dois laboratórios diferentes, que realizaram os ensaios sob as condições de Boas Práticas de Laboratório (GLP). A Figura 4B (painel superior) mostra o ensaio de toxicidade da doxorubicina realizado pelo Laboratório Biosintesis. A Figura 4D (painel inferior) mostra o ensaio de toxicidade da doxorubicina realizado pelo CIEnP. Em ambas as análises, concentrações diferentes de doxorubicina resultaram em diferentes níveis de cardiotoxicidade. As figuras 4E - 4H mostram o efeito de diferentes drogas sigilosas em desenvolvimento (os nomes são confidenciais) não relacionadas a doenças do coração em cardiomiócitos humanos. Para algumas drogas, foi observada toxicidade em baixas e altas doses; para outras, foi observada toxicidade somente em doses mais elevadas. Conjuntamente, esses dados sugerem que cardiomiócitos gerados a partir do clone ACP5 podem fornecer amostras de células boas e confiáveis para testes de cardiotoxicidade humana.

Finalmente, avaliamos se cardiomiócitos humanos derivados de iPSCs poderiam se infectar com *T. cruzi*. A Figura 5 mostra infecção eficiente independentemente da forma de *T. cruzi* utilizada. Tanto tripomastigotas (A) quanto amastigotas (B) infectaram as células com sucesso. Os cardiomiócitos continuam batendo mesmo após nove dias de infecção (<https://youtu.be/SjRsB0sjd-M>).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos uma reprogramação confiável do sangue de um único paciente usando abordagens não virais e não integrativas (Figura 1). Abordagens não integrativas são desejáveis para evitar modificações genéticas da linhagem celular que poderiam danificar um componente importante da célula. Nossos resultados mostram que a linhagem ACP5 foi reprogramada fielmente, mostrando todas as características básicas de uma linhagem de células pluripotentes relatadas na literatura, como a expressão dos marcadores-chave, morfologia e estabilidade genômica (Figura 2 e Heng e Fussenegger<sup>13</sup>). A análise de cariótipo foi realizada em diferentes passagens até a passagem 50, confirmando a estabilidade genômica, o que está de acordo com a literatura<sup>14</sup>.

Quanto ao protocolo de diferenciação dos cardiomiócitos, conseguimos mostrar que as células obtidas sob nosso processo patenteado são confiáveis e apresentam as características básicas necessárias para a identificação de compostos cardiotóxicos



**Figura 3.** (A) Citometria de fluxo de troponina T cardíaca (cTnT) de diferentes lotes de diferenciação. (B) Citometria de fluxo da  $\alpha$ -actinina (ACTN2), miosina de cadeia pesada (MYH7) e a forma adulta da troponina cardíaca I (cTnI). Números dentro do gráfico na posição superior esquerda indicam o lote. Na posição superior direita, indicam porcentagem de células positivas.

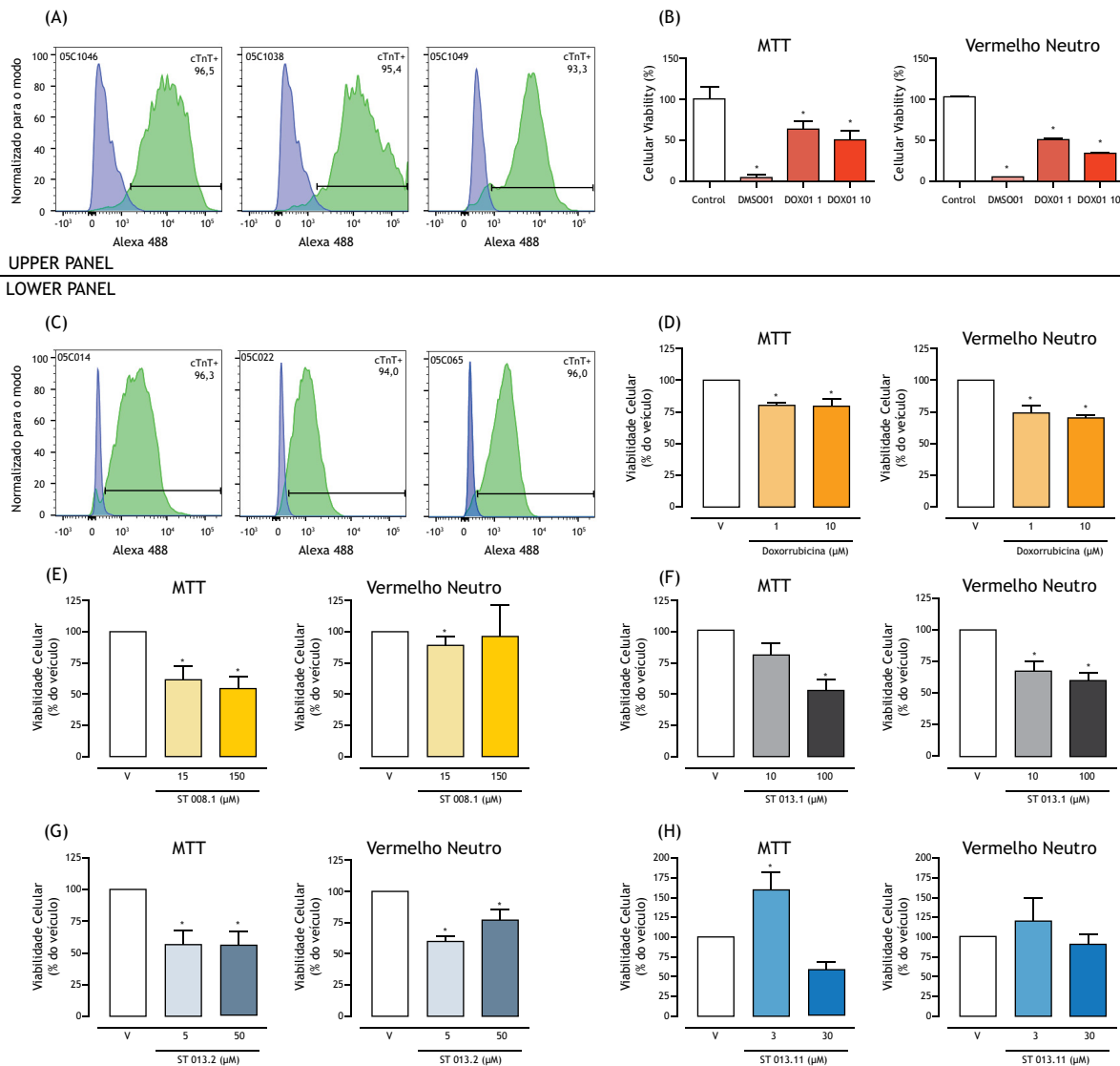


(Figura 4). A doxorubicina é uma antraciclina usada como droga antineoplásica que induz cardiotoxicidade em uma fração dos pacientes tratados<sup>15</sup>. Neste estudo, mostramos que a linhagem de células desse estudo é sensível a doses biologicamente relevantes de doxorubicina. É importante notar que os testes foram feitos por dois parceiros diferentes (CiEnP e Laboratório Biosíntesis), os quais trabalham sob condições de GLP e realizaram o teste de acordo com as diretrizes de referência.

Também mostramos que nossas células são passíveis de infecção por *T. cruzi*, o agente infeccioso da doença de Chagas (Figura 5 e <https://youtu.be/SjRsB0sjd-M>), um assunto de grande interesse da comunidade científica brasileira, devido à sua importância na saúde pública. Ao desenvolver esse novo modelo, nós trouxemos muitas vantagens para agregar ao trabalho da comunidade

científica da doença de Chagas, como: 1) um modelo mais relevante, usando células de coração humano em vez de lidar com as diferenças entre as células do coração humano e animal; 2) substituição do uso de animais, oferecendo um método alternativo que se baseia exclusivamente em células humanas; 3) maior reprodutibilidade experimental, oferecendo as mesmas células e o mesmo doador (background genético); 4) possibilidade de avaliar as diferenças genéticas que poderiam ser a causa da variabilidade clínica dos sintomas da doença; 5) produção de uma quantidade ilimitada de células e adaptação para plataformas de alto rendimento de triagem de drogas.

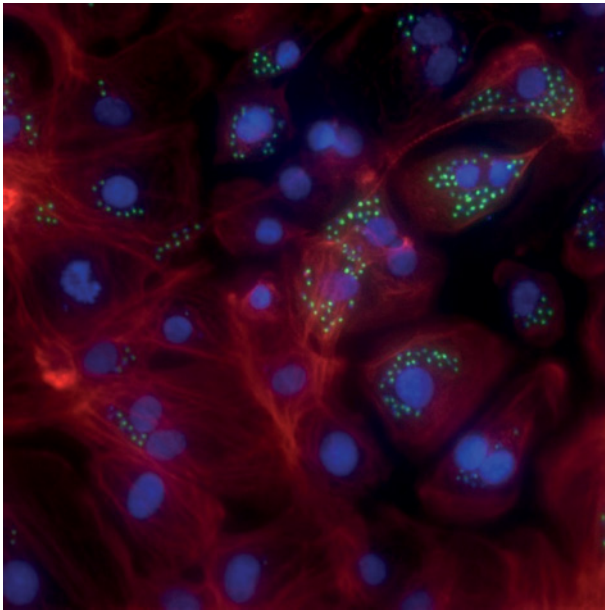
Considerando todas essas informações, podemos concluir que as iPSCs humanas e cardiomiócitos derivados de iPSCs são ótimas ferramentas de pesquisa e devem ser apoiadas não só pela



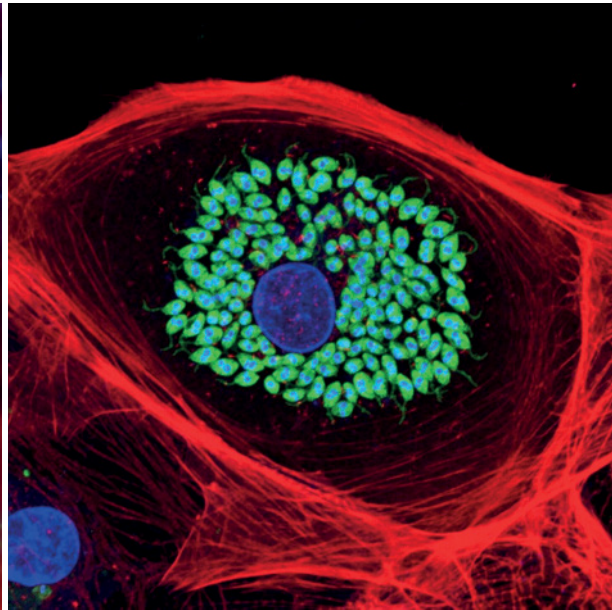
**Figura 4.** Pannel superior; (A) Citometria de fluxo da troponina T cardíaca (cTnT) para diferentes lotes de diferenciação e (B) Análise MTT e Vermelho Neutro de toxicidade da doxorubicina do Laboratório Biosíntesis Doxo 1 e 10 Doxo representam 1 µM e 10 µM de tratamento de doxorubicina. Pannel inferior; (C) Citometria de Fluxo da troponina T cardíaca de diferentes lotes de diferenciação; (D) Análise MTT e Vermelho Neutro de toxicidade da doxorubicina do CiEnP; e (E-H) análise MTT e Vermelho Neutro do CiEnP para possíveis novas drogas não relacionadas com doenças cardíacas. Para a citometria de fluxo, os números na posição superior esquerda dentro do gráfico indicam o lote. Na posição superior direita, indicam porcentagem de células positivas.



(A)



(B)



**Figura 5.** (A) Infecção de cardiomiócitos por *T. o. cruzi* na forma tripomastigota, zoom 20x. (B) Infecção de cardiomiócitos pela forma amastigota, zoom 100x. Actina corada em vermelho, verde são *T. cruzi* modificados e o azul são os núcleos e cinetoplastos corados.

comunidade científica brasileira, mas também por seu marco regulatório. Como mencionado anteriormente, estamos lidando com material biológico humano (células) que passou por extensas manipulações em laboratório para adquirir as propriedades específicas discutidas nesta publicação. Internacionalmente, esses reagentes biológicos são interpretados por agências reguladoras, como PRODUTOS DE USO EXCLUSIVO EM PESQUISA (RUO), ou seja, não precisam de nenhum registro de mercado ou liberação da agência reguladora para serem comercializados. A etiqueta RUO pressupõe que o produto não é permitido para uso humano ou diagnóstico. É de responsabilidade do vendedor fornecer essas informações e do comprador cumpri-las e fazer o uso correto do produto. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) já emitiu uma Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) que permite que PRODUTOS DE USO EXCLUSIVO EM PESQUISA sejam comercializados no país sem a necessidade de registro<sup>16</sup>. É de clara compreensão que os reagentes biológicos relatados nesta publicação se encaixam exatamente na descrição acima mencionada.

É importante destacar a importância de considerar esses reagentes biológicos (células humanas) como um produto comercial também. Pode-se argumentar que as células humanas não podem ser comercializadas no Brasil, pois nossa Constituição proíbe tal ato (art. 199, #4). Sugerimos aqui que esse entendimento da Constituição foi superado e deve ser atualizado para refletir os avanços recentes no campo científico, como o advento das iPSCs, discutidos nesta publicação. A Advocacia Geral da União declarou publicamente que não é proibido comercializar produtos biológicos (células humanas) que foram submetidos a extensas manipulações em laboratório (de modo a evitar a intenção de mercantilização de partes do corpo) porque, devido aos avanços tecnológicos, a comercialização destes produtos biológicos

poderia levar, no futuro, a excelentes aplicações médicas e terapêuticas ([http://bit.ly/AGU\\_parecer](http://bit.ly/AGU_parecer)). Nós reforçamos e ecoamos este raciocínio, pois isso abriria as portas para um grande progresso biotecnológico em nosso país, trazendo segurança jurídica e oportunidades de investimento.

A comunidade científica brasileira sabe bem que não existem impedimentos (éticos ou regulatórios) para importar células humanas do exterior, exigindo-se do pesquisador apenas que apresente o Termo de Consentimento do doador do material biológico (células) usado em seu projeto para o Sistema de Comitês de Ética em Pesquisa e para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa □ CEP/Conep. Em uma relação comercial (compra das células), este documento é entregue ao pesquisador (comprador) pela empresa (vendedora) que vende as células, provando que a empresa adquiriu o material biológico sob um Termo de Consentimento eticamente aceito. Sugerimos que, ao aplicar o mesmo raciocínio às empresas brasileiras, estamos, de fato, aplicando o princípio da isonomia, um princípio básico e altamente apreciado de nossa Constituição.

## CONCLUSÕES

Nesta publicação, mostramos que temos capacidade para produzir reagentes biológicos tecnicamente avançados e confiáveis para a comunidade científica brasileira e que o quadro regulamentar para a comercialização de tais produtos já está estabelecido sob exigências éticas (termo de consentimento) consultáveis. Este é um passo importante em direção à independência biotecnológica e mostra que a competência da tecnologia brasileira vem aumentando. Os resultados relatados aqui estão de acordo com a literatura, e mais dados usando essas células estão sendo coletados para futura publicação em revistas científicas com revisão por pares.





## REFERÊNCIAS

1. Parasuraman S. Toxicological screening. *J Pharmacol Pharmacother.* 2011;2(2):74-9. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>
2. Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I et al. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(11):904-16. <https://doi.org/10.1038/nrd2423>
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
4. Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol.* 2017;241:379-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.099>
5. Solomon S, Pitossi F, Rao MS. Banking on iPSC—is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev.* 2015 Feb;11(1):1-10. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9574-4> PMID:25516409
6. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc.* 2013;8(1):162-75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>
7. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods.* 2014;11(8):855-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
8. Lin Y, Chen G. Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media. CaMBRIDGE: Harvard Stem Cell Institute; 2008.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
10. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3):119-24. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
11. Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas LH Jr, Uemura H, Schenkman S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;111(1):235-40. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00309-1)
12. Bonfim-Melo A, Zanetti BF, Ferreira ÉR, Vandoninck S, Han SW, Van Lint J et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. *Cell Microbiol.* 2015;17(12):1797-810. <https://doi.org/10.1111/cmi.12472>
13. Heng BC, Fussenegger M. Integration-free reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) without viral vectors, recombinant DNA, and genetic modification. *Methods Mol Biol.* 2014;1151:75-94. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6_6)
14. Natalwala A, Kunath T. Preparation, characterization, and banking of clinical-grade cells for neural transplantation: scale up, fingerprinting, and genomic stability of stem cell lines. *Prog Brain Res.* 2017;230:133-50. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.02.007>
15. Burridge PW, Li YF, Matsa E, Wu H, Ong SG, Sharma A et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2016;22(5):547-56. <https://doi.org/10.1038/nm.4087>
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 ago 2015.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESP no âmbito da concessão PIPE fase II # 2015/50224-8.

## Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).