



Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Juliana Santana Borsoi

Geração de um modelo de células-tronco pluripotentes
humanas para estudar os mecanismos moleculares de
haploinsuficiência e dominância negativa da Síndrome de
Marfan

A human pluripotent stem cell model to study the
haploinsufficiency and dominant negative molecular mechanisms
of Marfan Syndrome

São Paulo

2020

Juliana Santana Borsoi

Geração de um modelo de células-tronco pluripotentes
humanas para estudar os mecanismos moleculares de
haploinsuficiência e dominância negativa da Síndrome de
Marfan

A human pluripotent stem cell model to study the
haploinsufficiency and dominant negative molecular mechanisms
of Marfan Syndrome

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutora em Ciências, na Área de
Biologia (Genética).

Orientadora: Profa Dra Lygia da
Veiga Pereira Carramaschi
Coorientador: Dr Luis Ernesto
Farinha-Arcieri

Exemplar corrigido.

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário: '<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Borsoi, Juliana Santana
Geração de um modelo de células-tronco pluripotentes humanas para estudar os mecanismos moleculares de haploinsuficiência e dominância negativa da Síndrome de Marfan / Juliana Santana Borsoi ; orientadora Lygia da Veiga Pereira ; coorientador Luis Ernesto Farinha-Arcieri -- São Paulo, 2020.
229 p. + anexo

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. hiPSCs. 2. Síndrome de Marfan. 3. FBN1. 4. edição gênica. 5. cardiomiócitos. I. Pereira, Lygia da Veiga, orient. II. Farinha-Arcieri, Luis Ernesto, coorient. III. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228



Nome: BORSOI, Juliana Santana

Título: Geração de um modelo de células-tronco pluripotentes induzidas humanas para estudar os mecanismos moleculares de haploinsuficiência e dominância negativa da Síndrome de Marfan

Title: A human pluripotent stem cell model to study the haploinsufficiency and dominant negative molecular mechanisms of Marfan Syndrome

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutora em Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Data da aprovação:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha mãe Tânia, ao meu pai
Wandecler, às minhas amadas tias
e ao meu companheiro Raphael,
por acreditarem que eu poderia
voar até quando eu mesma achei
que não conseguiria.

“Qual a utilidade de fazermos todo esse trabalho se não nos divertirmos um pouco?”

Rosalind Franklin

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2015/01339-7, 2016/16076-4, 2017/17186-0 e 2017/08014-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro para a realização deste projeto.

À minha orientadora, Professora Lygia Pereira, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no laboratório, desde a iniciação científica, e por ter confiado em mim para a realização deste projeto, sempre me dando liberdade para criar e o suporte necessário para enfrentar todos os desafios. Aprendi muito no LaNCE e tive experiências muito felizes nesses sete anos de convivência, muito obrigada, de verdade.

Ao meu coorientador, Luis Farinha, por ter me ensinado tanto durante todos esses anos e por também ter confiado muito em mim, em todos os momentos. À Mariana Morato, minha coorientadora não oficial, também por ter me ensinado muito desde o começo. Vocês foram essenciais para a realização deste projeto e foram os melhores mentores e conselheiros que eu poderia ter, muito obrigada.

Ao Professor Chris Denning da University of Nottingham por ter me orientado e me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e também à Dra Cathy Merry, Dr Diogo Mosqueira e Dr James Smith pela coorientação. Aprendi muito com todos vocês. A todos os amigos e amigas que fiz em Nottingham, em especial Aishah, Kate, Diogo e Sara pelo companheirismo e apoio diários.

A todos os funcionários do Departamento de Genética e do Instituto de Biociências, em especial Tatiana Corrêa, Thiago Alegria, Mara Pinheiro e Waldir Caldeira por todo o suporte e à Professora Irene Yan do ICB-USP por me receber de portas abertas sempre que precisei. Agradeço também ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP) pelas contribuições por meio dos serviços FLUIR e CONFOCAL.

A todos os membros do LaNCE, atuais e egressos, em especial aos amigos e amigas Luis, Mariana, Fabiano, Yordanka, Raquel, Isabela, Ana Luíza, Elisa, Rodrigo, Patrícia, Carolina, Alexandre, Bianca e Daniel pela convivência que fez meus dias sempre melhores; obrigada pelo companheirismo e pelos ensinamentos. À Ana Patrícia por seu suporte essencial de todos os dias.

Às amigas que a USP me deu para sempre: Raquel, Isabela, Mariana e Tatiane. Palavras não seriam suficientes para agradecer por todo apoio de vocês. Vocês sabem que também são parte disso, obrigada por caminharem sempre comigo. Aos colegas de departamento que também viraram grandes amigos: Allysson, Thiago, Ana, Carlos, Renan e Rodrigo pelo suporte e amizade. Aprendi muito com vocês sobre o que é ser cientista. Às minhas amigas de Vitória, Carolina, Marihá, Anne e Nayara, por acreditarem em mim, por me apoiarem e por me inspirarem desde sempre.

À minha família emprestada, Ricomini Piccelli, em especial à Márcia e ao Roberto, por também acreditarem em mim e por me oferecerem o melhor ambiente para que eu pudesse escrever esta tese. Muito obrigada por todo o suporte e carinho. Ao meu companheiro Raphael pela parceria diária e por toda compreensão e amor, sem os quais teria sido muito mais difícil chegar até aqui.

Aos meus tios, tia e primos paternos pelo carinho e também por todo apoio de sempre. À minha avó por todo amor e cuidado.

À minha mãe Tânia e às minhas tias Regina, Adriana, Elis Ângela, Lourdes, Gerusa e Cristina por me apoiarem sempre e por me darem todas as condições para que eu pudesse vir estudar em São Paulo. Sem vocês nada disso teria sido possível. Obrigada por serem, cada uma a seu modo, minhas maiores inspirações.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfibrilas, fibras elásticas e interação com TGF- β	25
Figura 2. Mecanismos de haploinsuficiência e dominância negativa de fibrilina-1 e suas consequências fenotípicas mais frequentes.....	28
Figura 3. Papel do perlecan na formação das microfibrilas.....	33
Figura 4. Efeito de alterações na fibrilina-1 no músculo cardíaco de um modelo murino para a SMF e importância da MEC na manutenção das funções dos cardiomiócitos. .	36
Figura 5. Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9.....	42
Figura 6. Possíveis gRNAs nas regiões-alvo (éxon 2 e éxon 31) de <i>FBN1</i>	49
Figura 7. Oligonucleotídeos de DNA com as sequências de gRNAs para edição dos éxons 2 e 31 do gene <i>FBN1</i>	50
Figura 8. Análise de restrição do plasmídeo pX330 mod. para verificação de sua integridade.....	52
Figura 9. Detecção de mutações utilizando a nuclease Surveyor®.....	59
Figura 10. Oligonucleotídeos de DNA sintetizados com as sequências dos gRNAs para edição do éxon 4 do gene <i>HSPG2</i>	64
Figura 11. Resultados do sequenciamento de exoma dos pacientes clinicamente diagnosticados com Síndrome de Marfan.	88
Figura 12. Sequenciamento das regiões de localização das variantes patogênicas do gene <i>FBN1</i> nas linhagens de hiPSCs derivadas de pacientes portadores da Síndrome de Marfan.	90
Figura 13. Sequenciamento do éxon 16 do gene <i>FBN1</i> nas linhagens de hiPSCs utilizadas.....	92

Figura 14. Alterações na morfologia celular após diferenciação cardiomiocítica de hiPSCs.....	94
Figura 15. Expressão das proteínas α -actinina e troponina-T cardíaca (cTroponina-T) em cardiomiócitos derivados da linhagem hiPSC ^{WT7}	95
Figura 16. Expressão do marcador troponina-T cardíaca (TNNT2) em cardiomiócitos derivados de hiPSCs após cerca de 15 dias de diferenciação.	95
Figura 17. Expressão do gene <i>FBN1</i> nas linhagens de cardiomiócitos WT16 (selvagem), SMF1 e SMF2, diferenciadas a partir de hiPSCs por 30 dias.....	96
Figura 18. Sequenciamento do cDNA de duas linhagens de cardiomiócitos (SMF1 e SMF2) diferenciadas a partir de hiPSCs.	97
Figura 19. Expressão de marcadores de hipertrofia em iCMs selvagens (WT) e paciente-específicos (SMF) em diferentes matrizes comerciais.	101
Figura 20. Expressão de <i>FBN1</i> em cardiomiócitos derivados de hiPSCs selvagens e SMF.....	103
Figura 21. Sequenciamento dos éxons 2 e 31 do gene <i>FBN1</i> da linhagem de hiPSCs WT16.....	107
Figura 22. RNAs guia (gRNAs) desenhados para geração de quebras de dupla-fita nos éxons 2 ou 31 do gene <i>FBN1</i>	108
Figura 23. Transfecção de células HEK293T com o plasmídeo pX330 mod. não recombinante ou portando os respectivos gRNAs (E2-1, E2-2, E31-1 ou E31-2).....	109
Figura 24. Análise da eficiência de edição do éxon 2 do gene <i>FBN1</i> em células HEK293T por meio de digestão com a nuclease Surveyor®.	111

Figura 25. Análise da eficiência da deleção do éxon 31 do gene <i>FBN1</i> em células HEK293T.	112
Figura 26. Sequenciamento da região-alvo (éxon 2) do gene <i>FBN1</i> de clones heterozigotos da linhagem hiPSC ^{WT16} submetidos à edição gênica.	114
Figura 27. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR da região-alvo para deleção do éxon 31 do gene <i>FBN1</i>	115
Figura 28. Sequenciamento da região-alvo (éxon 31) do gene <i>FBN1</i> de clones heterozigotos da linhagem hiPSC ^{WT16} submetidos à edição gênica.	116
Figura 29. Sequenciamentos das regiões com possível efeito não intencional do gRNA E2-1 em hiPSCs editadas.	118
Figura 30. Sequenciamentos das regiões com possível efeito não intencional dos gRNAs E31-1 e E31-2 em hiPSCs editadas.	119
Figura 31. Expressão de marcadores de pluripotência nos clones de hiPSCs obtidos após edição gênica de <i>FBN1</i>	121
Figura 32. Estratégia para a inserção de um cassete de resistência a blasticidina no éxon 4 do gene <i>HSPG2</i> utilizando o sistema CRISPR/nCas9.	124
Figura 33. Estratégia e genotipagem de clones isogênicos de hiPSCs WT ou mutantes para o gene <i>FBN1</i> após edição do gene <i>HSPG2</i>	126
Figura 34. Expressão de marcadores de pluripotência nos clones de hiPSCs obtidos após edição gênica de <i>HSPG2</i>	128
Figura 35. Estratégia utilizada para caracterização de mutantes HI e DN para o gene <i>FBN1</i>	130

Figura 36. Expressão de <i>FBN1</i> em uma linhagem de fibroblastos adultos (ReBl), em hiPSCs e corpos embrioides (EBs) após 10 dias de diferenciação espontânea.....	132
Figura 37. Expressão de <i>FBN1</i> total e alelo-específica em EBs selvagens e mutantes após 10 dias de diferenciação espontânea.	133
Figura 38. Análise da expressão alelo-específica dos mutantes com deleção do éxon 31 do gene <i>FBN1</i> por RT-PCR.	135
Figura 39. Sequenciamento dos cDNAs obtidos por amplificação da região do éxon 31 de <i>FBN1</i> das linhagens DN1, DN2 e DN/DN.	135
Figura 40. Análise da expressão de fibrilina-1 em corpos embrioides após 10 dias de diferenciação espontânea por Western Blot.....	136
Figura 41. Expressão de <i>FBN1</i> em corpos embrioides (EBs) diferenciados espontaneamente por 25 dias.....	138
Figura 42. Análise da expressão de fibrilina-1 em corpos embrioides após 25 dias de diferenciação espontânea por Western Blot (A) ou imunofluorescência (B).	139
Figura 43. Expressão de <i>HSPG2</i> em corpos embrioides (EBs) de clones selvagens e editados após 10 dias de diferenciação espontânea.....	141
Figura 44. Quantificação do número total e do tempo de duplicações populacionais de hiPSCs selvagens e editadas.	142
Figura 45. Expressão de KI67 em hiPSCs.	143
Figura 46. Análise da eficiência das diferenciações de hiPSCs em cardiomiócitos por imunofluorescência (IF) ou citometria de fluxo (CF).	144
Figura 47. Expressão de KI67 em diferentes estágios da diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos.	146

) L J X U D	3 D G U m R G H a t i f a U e r v i c u l i n a P e n G C M s	isogênicos com e sem
mutação no gene FBN1.		148
Figura 49. Expressão do peptídeo natriurético tipo B (BNP) em cardiomiócitos derivados de hiPSCs no dia 30 de diferenciação.		150
Figura 50. Expressão do peptídeo natriurético tipo B (BNP) em cardiomiócitos derivados de linhagens de hiPSCs (iCMs) selvagens e mutantes para o gene FBN1.		151
Figura 51. Expressão de marcadores de hipertrofia em iCMs isogênicos selvagens e mutantes para o gene FBN1 no dia 30 de diferenciação.		153
Figura 52. Expressão de FBN1 em iCMs isogênicos selvagens e mutantes no dia 30 de diferenciação e em uma linhagem de fibroblastos adultos (ReBI).		155
Figura 53. Percentual de cardiomiócitos derivados de hiPSCs positivos quanto à expressão de FBN1 ou FBN2 no dia 30 de diferenciação (FRIEDMAN et al., 2018)..		157
Figura 54. Expressão de FBN1 e FBN2 em fibroblastos dermais adultos (ReBI) e iCMs cultivados em diferentes matrizes e como cardioesferas.		159
Figura 55. Expressão de FBN1 e FBN2 em fibroblastos primários e em diferentes tipos celulares derivados de hiPSCs cultivados em monocamada ou como microtecidos (GIACOMELLI et al., 2020).		160
Figura 56. Expressão de FBN1 e FBN2 em diferentes estruturas do coração humano adulto e em amostras de fibroblastos cardíacos fetais e adultos.		161
Figura 57. Correlação entre a expressão de FBN1 e ELN em câmaras e valvas cardíacas.		162
Figura 58. Expressão de FBN1 e FBN2 durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos.		165

Figura 59. Estratégia utilizada para a análise da expressão de genes específicos em cardiomiócitos e células semelhantes a fibroblastos de ventrículos esquerdos (<i>Left ventricle – LV</i>) de corações humanos em desenvolvimento (5 a 25 semanas).	167
Figura 60. Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> em cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de embriões em diferentes estágios, de cinco a 24 semanas (<i>weeks – W</i>).....	170
Figura 61. Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> em células semelhantes a fibroblastos de ventrículo esquerdo de embriões em diferentes estágios, de cinco a 24 semanas (<i>weeks – W</i>).....	172
Figura 62. Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> em corações humanos em diferentes estágios do desenvolvimento (CARDOSO-MOREIRA et al., 2019).....	174
Figura 63. Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> em cardiomiócitos derivados de uma linhagem de hESCs (RUES2) e em corações humanos em diferentes fases do desenvolvimento (ENCODE).	176
Figura 64. Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> nos diferentes grupos celulares de corações humanos adultos (TUCKER et al., 2020).	177
Figura 65. Expressão de <i>FBN1</i> e <i>FBN2</i> em cardiomiócitos (vCMs) e fibroblastos (vFBs) ventriculares de corações humanos adultos (LITVIŇUKOVÁ et al., 2020).	178
Figura 66. Expressão de <i>Fbn1</i> , <i>Fbn2</i> e <i>Eln</i> em cardiomiócitos e fibroblastos de corações murinos perinatais (HU et al., 2018).....	180
Figura 67. Expressão de <i>Fbn1</i> , <i>Fbn2</i> e <i>Eln</i> em células de corações murinos de três meses de idade (Tabula Muris – SCHAUM et al., 2018).	181

LISTA DE PRINCIPAIS ABREVIações E NOMENCLATURAS

SMF – Síndrome de Marfan

hiPSCs – células-tronco pluripotentes induzidas humanas (do inglês, *human induced pluripotent stem cells*)

MEC – matriz extracelular

HI – haploinsuficiente/haploinsuficiência

DN – dominante negativo/dominância negativa

PTC – códon de término prematuro (do inglês, *premature termination codon*)

DCM – miocardiopatia dilatada (do inglês, *dilated cardiomyopathy*)

HCM – miocardiopatia hipertrófica (do inglês, *hypertrophic cardiomyopathy*)

iCMs – cardiomiócitos derivados de hiPSCs

PAM – motivo adjacente ao protoespaçador (do inglês, *protospacer adjacent motif*)

TA – temperatura ambiente

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism*)

RESUMO

O gene *FBN1* codifica a proteína de matriz extracelular (MEC) fibrilina-1, principal componente estrutural das microfibrilas que compõem as fibras elásticas. Mutações neste gene foram relacionadas à ocorrência da Síndrome de Marfan (SMF), uma condição genética de caráter autossômico dominante, em que os sistemas cardiovascular, ósseo e ocular são afetados. Apesar de mais de 3.000 variantes patogênicas em *FBN1* já terem sido descritas, não existem ainda muitas correlações genótipo-fenótipo bem estabelecidas para a síndrome, e dois mecanismos moleculares foram propostos e validados para explicar sua ocorrência: a haploinsuficiência (HI – i.e. baixa produção de fibrilina-1 selvagem) e a dominância negativa (DN – i.e. secreção e incorporação de uma proteína aberrante à MEC comprometendo a função da proteína normal) de fibrilina-1. Diferenças fenotípicas entre pacientes portadores de variantes HI ou DN foram reportadas, mas devido a diferenças de *background* genético entre os indivíduos e possível contribuição de genes modificadores na variabilidade fenotípica da síndrome, ainda não está claro o mecanismo de patogênese de cada classe de mutações. Diante disso, no presente trabalho geramos um modelo isogênico de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) portando alterações em *FBN1* do tipo HI ou DN e avaliamos suas consequências fenotípicas em cardiomiócitos diferenciados (iCMs). Conseguimos demonstrar que as alterações classificadas como HI levam ao decaimento do mRNA mutante e à ausência de produção de proteína, enquanto a alteração DN acarreta a produção e secreção de uma forma mutante da fibrilina-1, corroborando nossas expectativas. Apesar de não termos observado diferenças entre iCMs selvagens e mutantes provavelmente devido à imaturidade destas células, as linhagens geradas no presente trabalho podem ser utilizadas para que as consequências fenotípicas das diferentes classes de mutações em *FBN1* em múltiplos tipos celulares possam ser investigadas.

Palavras-chave: hiPSCs, Síndrome de Marfan, *FBN1*, edição gênica, cardiomiócitos

ABSTRACT

The *FBN1* gene encodes the extracellular matrix (ECM) protein fibrillin-1, the major structural component of the microfibrils that form the elastic fibers. Mutations in this gene were related to the occurrence of Marfan Syndrome (MFS), a pleiotropic autosomal dominant connective tissue disorder whose clinical manifestations affect the cardiovascular, skeletal and ocular systems. Although more than 3,000 pathogenic variants in *FBN1* have been described, there are no well-established genotype-phenotype correlations for the syndrome, with few exceptions, and two molecular mechanisms have been proposed and validated to explain its development: haploinsufficiency (HI – i.e. the lack of the regular amount of wild-type fibrillin-1) and dominant-negativity (DN – i.e. the disturbance of the ECM by an incorporated aberrant protein), and differences between groups of patients classified as HI or DN have been reported. Because patients have different genetic backgrounds and gene modifiers may play a role in the pathogenesis of the syndrome, the specific consequences of each group of mutations are not clear. To overcome these issues, we have successfully edited a hiPSC line from a healthy donor using CRISPR/Cas9 to generate isogenic HI and DN mutants for *FBN1*. We showed that the predicted HI mutations lead to mRNA decay and no protein production and that the DN variant result in the secretion of an aberrant fibrillin-1, as expected. Although we did not observe any distinct phenotypes when we compared hiPSC-derived cardiomyocytes from the different groups, possibly due to their immaturity, we can now take advantage of the plasticity of these stem cell lines to better understand the pathogenesis of Marfan Syndrome in different cell types.

Keywords: hiPSCs, Marfan Syndrome, *FBN1*, gene editing, cardiomyocytes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Síndrome de Marfan.....	22
1.1.1. O gene <i>FBN1</i> e a Síndrome de Marfan	22
1.1.2. Mecanismos moleculares da SMF	25
1.1.3. Variabilidade fenotípica na SMF	28
1.1.4. Miocardiopatia dilatada na SMF	34
1.2. Células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs) como modelos <i>in vitro</i> para o estudo de doenças genéticas	37
1.2.1. hiPSCs no estudo da SMF	37
1.2.2. hiPSCs no estudo da miocardiopatia dilatada	39
1.3. O sistema CRISPR/Cas9 e a geração de modelos isogênicos	41
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Linhagens celulares	44
3.2. Cultura celular	45
3.2.1. hiPSCs	45
3.2.2. Fibroblastos primários	46
3.3. Geração de corpos embrioides (EBs).....	46
3.3.1. Método 1	46
3.3.2. Método 2	47

3.4.	Edição do gene <i>FBN1</i> utilizando-se o sistema CRISPR/Cas9.....	47
3.4.1.	Escolha dos sítios de mutação e desenho dos RNAs guia (gRNAs) ...	48
3.4.2.	Anelamento e clonagem das sequências de gRNAs no vetor pX330 mod	50
3.4.3.	Análise <i>in silico</i> de possíveis alvos inespecíficos (<i>off-targets</i>)	54
3.4.4.	Validação em células da linhagem HEK293T	56
3.4.5.	Edição em hiPSCs	60
3.5.	Edição do gene <i>HSPG2</i> em hiPSCs utilizando-se o sistema CRISPR/Cas9.63	
3.5.1.	Desenho dos gRNAs e clonagem no vetor de expressão.....	63
3.5.2.	Construção do vetor doador (pUC57-HSPG2-Blast)	65
3.5.3.	Nucleoporação, seleção e subclonagem de hiPSCs	67
3.5.4.	Triagem dos clones obtidos.....	68
3.6.	Genotipagem das linhagens paciente-específicas.....	69
3.7.	Análise da integridade cromossômica (cariótipo e CGH-array)	69
3.8.	Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos (iCMs).....	70
3.8.1.	Protocolo 1	70
3.8.2.	Protocolo 2 (Denning Lab)	71
3.8.3.	Geração das cardioesferas	72
3.9.	Citometria de fluxo	73
3.10.	Imunocitoquímica de fluorescência (IF)	74
3.11.	Western Blot (WB)	77
3.11.1.	Extração de proteínas e quantificação	77
3.11.2.	SDS-PAGE e transferência gel-membrana	77

3.11.3. <i>Imunoblotting</i>	78
3.12. PCRs reverso (RT-PCR) e quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	78
3.12.1. Extração de RNA	78
3.12.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)	79
3.12.3. Avaliação da qualidade da transcrição reversa	79
3.12.4. Sequenciamento do DNA complementar	80
3.12.5. Padronização de iniciadores específicos (<i>SYBR™ Green</i>)	80
3.12.6. Reações para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial	83
3.13. Análise de expressão gênica em embriões humanos utilizando dados de RNA-seq publicados	85
3.14. Análises estatísticas	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1. hiPSCs derivadas de pacientes portadores da SMF como modelo de estudo dos fenótipos cardíacos	86
4.1.1. Dados clínicos dos pacientes e caracterização de suas variantes em <i>FBN1</i>	86
4.1.2. Diferenciação em cardiomiócitos	93
4.2. Geração de hiPSCs mutantes para o gene <i>FBN1</i> utilizando o sistema CRISPR/Cas9	105
4.2.1. Identificação das regiões-alvo para edição, desenho e clonagem dos gRNAs	105
4.2.2. Validação da eficiência do sistema de edição em células HEK293T .	109

4.2.3.	Edição das regiões-alvo na linhagem hiPSCWT16	112
4.3.	Geração de hiPSCs mutantes para o gene <i>HSPG2</i> utilizando o sistema CRISPR/Cas9.....	122
4.3.1.	Identificação da região-alvo para edição, desenho dos gRNAs e construção dos vetores	123
4.3.2.	Edição da região-alvo nas linhagens WT1, HI1 e DN1 e genotipagem dos clones obtidos	125
4.4.	Confirmação do caráter haploinsuficiente e dominante negativo das mutações geradas em <i>FBN1</i> por edição gênica e nas linhagens paciente-específicas.....	128
4.4.1.	Geração de corpos embrioides (EBs) e diferenciação espontânea ...	128
4.4.2.	Expressão gênica e proteica de <i>FBN1</i> em EBs no D15	130
4.4.3.	Expressão gênica e proteica de <i>FBN1</i> em EBs no D30	137
4.5.	Expressão de <i>HSPG2</i> em EBs.....	140
4.6.	Análise do padrão proliferativo dos clones editados para <i>FBN1</i> e <i>HSPG2</i>	141
4.7.	Análise fenotípica de iCMs selvagens e mutantes para o gene <i>FBN1</i>	143
4.7.1.	Diferenciação em cardiomiócitos.....	143
4.7.2.	Análise fenotípica de iCMs selvagens e mutantes.....	144
	As células foram dissociadas no dia 15 pós início da diferenciação e replaqueadas para análise da expressão de BNP por imunofluorescência no dia 30.	151
4.7.3.	Expressão de <i>FBN1</i> e <i>FBN2</i> em iCMs e amostras de coração humano adulto	154
4.8.	Expressão de <i>FBN1</i> , <i>FBN2</i> e <i>ELN</i> em conjuntos de dados de trabalhos publicados	166

4.8.1.	Desenvolvimento cardíaco – dados de transcriptoma de células únicas	166
4.8.2.	Desenvolvimento cardíaco – dados de transcriptoma de órgãos inteiros	173
4.8.3.	Transcriptoma de núcleos únicos (snRNA-seq) de corações adultos	176
5.	CONCLUSÕES	182
6.	REFERÊNCIAS	183
7.	APÊNDICES	204
8.	ANEXOS	227

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome de Marfan

1.1.1. O gene *FBN1* e a Síndrome de Marfan

A Síndrome de Marfan (SMF) (OMIM 154700) é uma condição genética de caráter autossômico dominante, pleiotrópica, que acomete cerca de 1 em cada 3.000-5.000 indivíduos, independentemente de sexo ou etnia (JUDGE; DIETZ, 2005; RAMACHANDRA et al., 2015; LOEYS, 2016). O indivíduo afetado apresenta manifestações principalmente nos sistemas cardiovascular, ocular e esquelético, incluindo-se dilatação progressiva e ruptura da aorta (maior causa de mortalidade), miocardiopatia dilatada (DCM), prolapso da valva mitral, subluxação do cristalino, descolamento da retina, crescimento excessivo dos ossos, hiper mobilidade articular e deformidades torácicas (JUDGE; DIETZ, 2005; DEAN, 2007; KEANE; PYERITZ, 2008). Cerca de 75-80% dos casos são herdados, sendo o restante esporádico e causado por variantes “*de novo*” (JUDGE; DIETZ, 2005; RAMACHANDRA et al., 2015).

Em 1991, o gene *FBN1* (OMIM 134797), que codifica a proteína de matriz extracelular (MEC) fibrilina-1, foi reportado como responsável pela ocorrência da síndrome (DIETZ et al., 1991) e, poucos anos depois, sua estrutura primária foi descrita (PEREIRA et al., 1993). O gene *FBN1* possui 66 éxons (referência NCBI: [NG_008805.2](#)), sendo 65 deles codificantes (CORSON et al., 1993; PEREIRA et al., 1993; BIERY et al., 1999). O primeiro éxon, não codificante, possui três sequências alternativas denominadas A, B e C (CORSON et al., 1993; BIERY et

al., 1999), sendo a sequência A a mais frequentemente transcrita (GUO et al., 2008) e descrita na sequência referência do gene ([NM_000138.5](#)). O gene possui aproximadamente 230 kb, sendo localizado no cromossomo 15, na região q21.1. Variantes patogênicas são encontradas em cerca de 90% dos pacientes portadores da SMF (FRANKEN et al., 2014) e, apesar de mais de 3.000 delas, distribuídas em quase todos os 65 éxons codificantes do gene, já terem sido identificadas como causadoras da síndrome (RAMACHANDRA et al., 2015; LOEYS, 2016), não existem ainda muitas correlações genótipo-fenótipo bem estabelecidas. Algumas exceções, no entanto, já foram descritas, como o fato de grande parte das alterações responsáveis por formas severas ocorrerem na região que compreende os éxons 25-33 – ou 24-32, considerando apenas os éxons codificantes (BOOMS et al., 1999; TIECKE et al., 2001; BOILEAU et al., 2005; FAIVRE et al., 2007) –, a maior prevalência de subluxação do cristalino em pacientes portadores de variantes que alteram resíduos de cisteína e a maior gravidade de fenótipos esqueléticos e cardiovasculares em indivíduos com alterações que acarretam o surgimento de códons de término prematuros (PTCs) (SCHRIJVER et al., 2002; FAIVRE et al., 2007; FRANKEN et al., 2014).

A fibrilina-1 possui 2.871 aminoácidos e peso molecular aproximado de 350 kDa, sendo um importante componente da MEC por constituir as microfibrilas, estruturas com diâmetro médio de 10 nm encontradas em tecidos conectivos e que, quando associadas à tropoelastina, formam as fibras elásticas (RAMIREZ et al., 1993; RAMIREZ; DIETZ, 2007). Essas fibras conferem propriedades físicas específicas aos tecidos conjuntivos, como resiliência e elasticidade. A família das

fibrilinas contém também a fibrilina-2, codificada pelo gene *FBN2* (referência NCBI: [NG_008750.1](#)), e a fibrilina-3, codificada por *FBN3* (referência do transcrito: [NM_001321431.2](#)). As três proteínas são capazes de se multimerizar e formar as microfibrilas (RAMIREZ; DIETZ, 2007) e possuem em sua estrutura mais de 40 domínios cbEGF (fator de crescimento epidermal de ligação ao cálcio – do inglês, *calcium binding epidermal growth factor-like*), normalmente codificados por éxons individuais e separados por módulos de oito cisteínas, conhecidos como domínios de ligação ao fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (revisado por BYERS, 2004). A presença desses motivos de cisteína permite a inclusão das fibrilinas na família de proteínas de ligação ao TGF- β latente. Nos domínios cbEGF, também são observados motivos com seis cisteínas altamente conservadas, importantes na estabilização da estrutura terciária das fibrilinas. A ligação ao cálcio, por outro lado, é importante para a proteção contra proteólise e para seu correto dobramento (FRANKEN et al., 2014). Isso justifica o fato de alterações em cisteínas conservadas e deleções de um único domínio cbEGF da fibrilina-1 interferirem na correta formação das microfibrilas e causarem SMF (LIU et al., 1996).

Além de sua função estrutural, as microfibrilas também são importantes na regulação da biodisponibilidade do TGF- β , que controla diversos processos celulares, como proliferação e diferenciação. O TGF- β é liberado das células como um complexo inativo que contém também um propeptídeo de TGF- β (peptídeo associado à latência – LAP) e uma proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP). Este complexo interage com as microfibrilas por ligação não covalente entre a

fibrilina e a LTBP (ANNES; MUNGER; RIFKIN, 2003; ISOGAI et al., 2003). Desta forma, o TGF- β é mantido sequestrado na MEC, o que impede sua ligação ao receptor, até a degradação proteolítica do LAP (HORIGUCHI; OTA; RIFKIN, 2012). Na SMF, devido ao comprometimento estrutural das microfibrilas por alterações na fibrilina-1, os níveis de TGF- β livre encontram-se aumentados, o que contribui com a patogênese da síndrome (NEPTUNE et al., 2003; HABASHI et al., 2006). A Figura 1 resume a estrutura e as principais funções da fibrilina-1 na MEC.

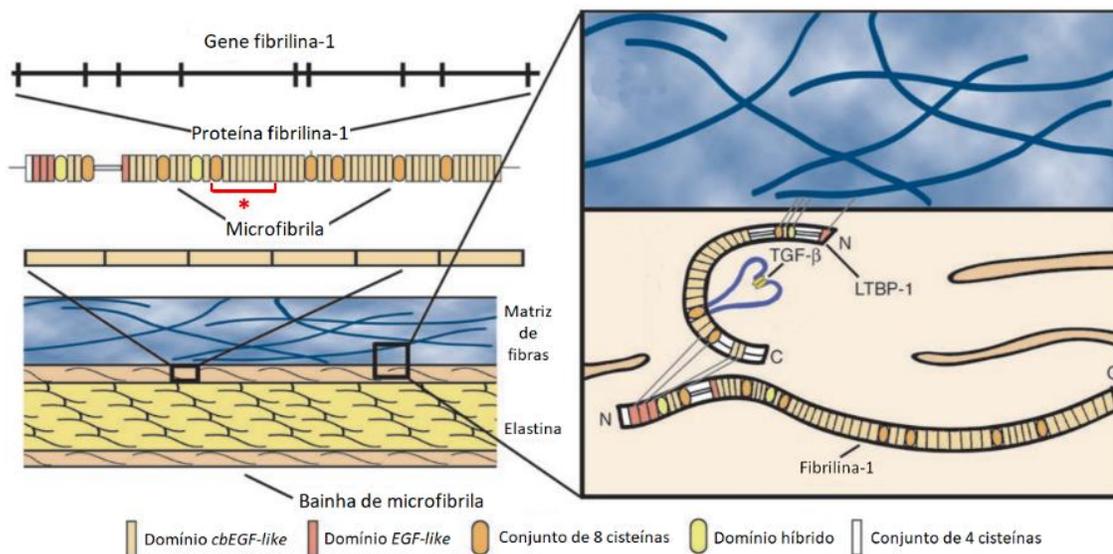


Figura 1. Microfibrilas, fibras elásticas e interação com TGF- β . O gene *FBN1* codifica a proteína fibrilina-1, cuja estrutura contém os domínios/elementos representados na parte inferior do esquema. O (*) em vermelho destaca a denominada “região neonatal” (central – codificada pelos éxons 25-33) da proteína que, quando alterada, normalmente acarreta fenótipos severos da SMF. A partir da multimerização da fibrilina-1 são formadas as microfibrilas que, quando associadas à elastina, compõem as fibras elásticas. Do lado direito, está representada a interação da fibrilina-1 com o TGF- β latente via LTBPs. Por meio desta ligação, a fibrilina-1 controla a biodisponibilidade de TGF- β livre na MEC. Adaptado de BYERS, 2004.

1.1.2. Mecanismos moleculares da SMF

Uma revisão dos dados de 1.511 pacientes que apresentavam fenótipos SMF e alterações descritas em *FBN1* demonstrou que em cerca de 29% (442/1.511) dos casos a variante patogênica (em heterozigose) tinha como consequência o surgimento de um PTC, enquanto 56% (853/1.511) provocavam alteração de aminoácido na proteína (*missense*). Além disso, também se observou que 6,4% (96/1.511) dos indivíduos possuíam deleções ou inserções, 6,1% (92/1.511) alterações intrônicas ou exônicas sem efeito conhecido, 1,3% (19/1.511) deleção do gene inteiro, 2/1.511 alterações em homozigose e que 7/1.511 eram heterozigotos compostos (FRANKEN et al., 2014).

Apesar de as duas principais classes descritas (PTC e *missense*) poderem se adequar ao modelo de dominância negativa (DN) inicialmente proposto para a síndrome, sabe-se que a simples diminuição na produção de fibrilina-1 selvagem (haploinsuficiência – HI) é responsável pelos fenótipos em cerca de um terço dos casos (JUDGE et al., 2004; LOEYS, 2016). Neste modelo (HI), a fibrilina-1 normal produzida por um dos alelos não é suficiente para compensar a ausência de proteína do alelo mutante. No modelo DN, por outro lado, o alelo alterado produz uma proteína aberrante que é secretada e incorporada à MEC. Em ambos os casos, o resultado é a formação de microfibrilas estruturalmente comprometidas (LANDIS; VELDTMAN; WARE, 2017). O mecanismo HI está normalmente relacionado ao surgimento de um PTC (variantes *nonsense* ou de alteração no quadro de leitura), que normalmente causa o decaimento do transcrito mutante (SCHRIJVER et al., 2002; HUTCHINSON et al., 2003), ou ainda a grandes deleções; por outro lado, o DN é mais frequentemente resultante de alterações

missense ou deleções que não alteram o quadro de leitura do gene (Figura 2) (LOEYS, 2016; LANDIS; VELDTMAN; WARE, 2017).

Apesar da alta variabilidade observada entre os portadores da SMF, a descrição dos dois diferentes mecanismos moleculares possibilitou que algumas correlações genótipo-fenótipo fossem estabelecidas. Foi observado que alterações de efeito HI predito estão associadas a um maior comprometimento do sistema esquelético e que os diâmetros da raiz aórtica são maiores nestes pacientes, aumentando o risco de morte por dissecção, o que também evidencia acometimento cardiovascular mais severo; por outro lado, as variantes do tipo DN, especialmente as que causam substituição de/para cisteína, associam-se a maior frequência de subluxação do cristalino e outras manifestações oculares (Figura 2) (FRANKEN et al., 2014, 2016, 2017). Também foi observado que pacientes HI preditos parecem responder melhor ao tratamento com o fármaco anti-hipertensivo Losartan, visto que uma redução significativa da dilatação da raiz da aorta e uma melhora nas funções ventriculares somente foi observada para este grupo (FRANKEN et al., 2015; DEN HARTOG et al., 2016).

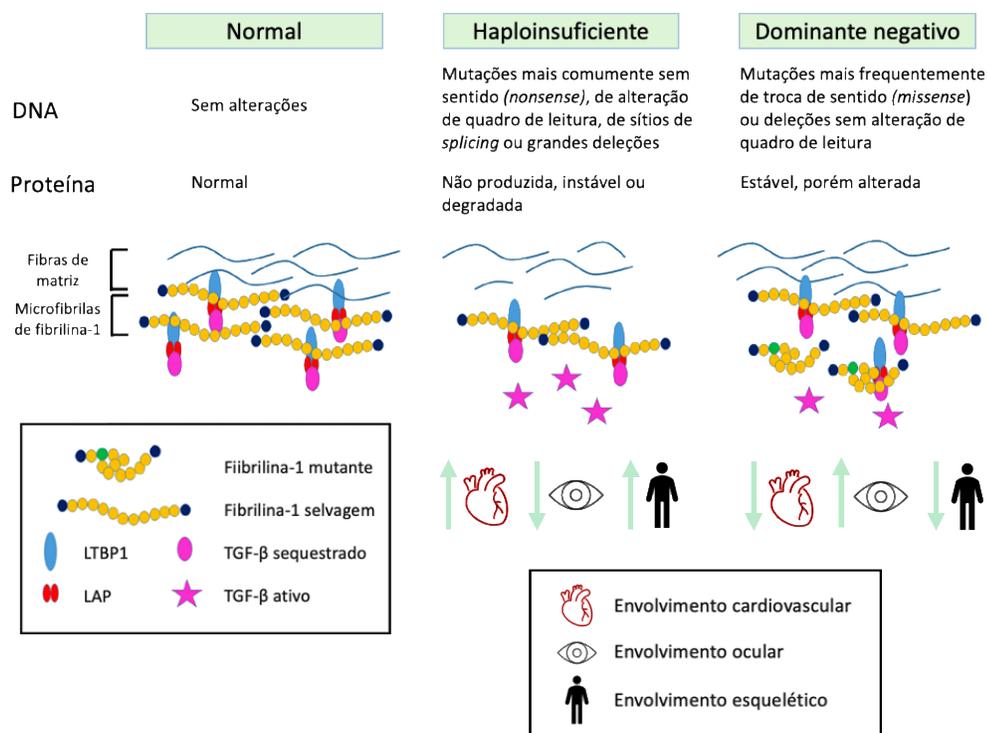


Figura 2. Mecanismos de haploinsuficiência e dominância negativa de fibrilina-1 e suas consequências fenotípicas mais frequentes. Alterações em *FBN1* podem causar SMF tanto por acarretarem níveis diminuídos de fibrilina-1 selvagem (haploinsuficiente – HI) quanto por levarem à produção de uma proteína mutante capaz de integrar as microfibrilas comprometendo sua estrutura (dominante negativo – DN). Além do prejuízo estrutural, os dois mecanismos acarretam o aumento da biodisponibilidade do TGF- β ativo. Os tipos de variantes e os fenótipos mais comumente relacionados aos mecanismos HI e DN estão descritos. LTBP1: proteína de ligação ao TGF- β latente 1; LAP: peptídeo associado à latência. Modificada de LANDIS; VELDTMAN; WARE, 2017 e FRANKEN et al., 2014.

Embora aparentemente bem estabelecidas, essas correlações não são suficientes para explicar toda a variabilidade encontrada entre pacientes portadores da SMF.

1.1.3. Variabilidade fenotípica na SMF

1.1.3.1. Variabilidade inter e intra-familiar

Ainda que a penetrância da SMF seja completa, a expressividade dos fenótipos é bastante variável. Observa-se uma alta variabilidade intra-familiar, ou seja, entre indivíduos de uma mesma família que possuem uma mesma variante patogênica, e inter-familiar, entre indivíduos de famílias distintas. Esta alta variabilidade comumente dificulta o diagnóstico da síndrome, visto que doenças correlatas como Síndrome de Loeys-Dietz e Aracnodactilia contratural congênita possuem características clínicas semelhantes e a triagem de alterações no gene *FBN1* (diagnóstico molecular) não é sempre viável (LOEYS et al., 2010).

Além da influência de fatores ambientais, diversas hipóteses têm sido levantadas para explicar esta alta variabilidade. Uma delas propõe que, ao menos em parte, os diferentes tipos de alterações em *FBN1* e seus respectivos mecanismos moleculares estão associados a consequências fenotípicas distintas, como previamente mencionado. Outra sugere que, sendo a maioria dos pacientes heterozigotos para alterações em *FBN1*, o nível de expressão do alelo selvagem influenciaria a gravidade fenotípica apresentada. Evidências corroborando esta hipótese foram descritas por AUBART et al. (2015) e HUTCHINSON et al. (2003). Os autores do primeiro trabalho conseguiram estabelecer uma correlação negativa significativa entre o nível de expressão do alelo selvagem e um risco aumentado de subluxação do cristalino e deformidades torácicas (pectus) em um grupo de 80 pacientes portadores da SMF. O segundo trabalho mostra diferenças nos níveis de expressão do alelo selvagem mesmo em pacientes de uma mesma família. Em ambos os casos,

os pacientes apresentavam variantes do tipo PTC e as diferenças de *background* genético entre os indivíduos explicariam a maior ou menor expressão de *FBN1* observada entre eles.

Uma outra hipótese que também considera diferenças de *background* genético entre os pacientes é a existência de genes modificadores de fenótipo. Os genes modificadores podem ser descritos como genes que alteram manifestações fenotípicas causadas por um gene em particular, agindo de forma epistática (revisado por RIORDAN; NADEAU, 2017). A modulação diferencial de características clínicas é normalmente causada por polimorfismos nestes genes moduladores que, individualmente, não levam a efeitos patogênicos, mas que quando associadas a uma variante patogênica em um gene com o qual interagem podem interferir na penetrância, expressividade, dominância ou pleiotropia de doenças mendelianas (revisado por NADEAU, 2001). A hipótese já foi investigada em pacientes portadores da SMF (AUBART et al., 2018; GRANGE et al., 2020) e pelo nosso grupo em um modelo murino, o $mg\Delta^{loxPneo}$, que possui uma substituição dos éxons 19 a 24 de *Fbn1* por um cassete de resistência a neomicina flanqueado por dois sítios loxP (LIMA et al., 2010; FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016).

Em pacientes, uma combinação de métodos moleculares tornou possível a identificação de nove *loci* modificadores em uma amostra de 1.070 indivíduos clinicamente bem caracterizados (AUBART et al., 2018) e, utilizando uma abordagem de correlação fenotípica entre familiares portadores da SMF, GRANGE et al. (2020) encontraram mais evidências para a existência

de fatores poligênicos de susceptibilidade. Em camundongos, a partir da geração de uma linhagem mista do modelo $mg\Delta^{loxPneo}$, FERNANDES e colaboradores (2016) identificaram cinco QTLs (do inglês, *quantitative trait loci*) candidatos a moduladores dos fenótipos cardiovascular e esquelético nestes animais. Entre as regiões identificadas, diversos genes com funções possivelmente relevantes na SMF foram selecionados como candidatos, entre eles o gene *Hspg2*, posteriormente investigado no mesmo modelo também por nosso grupo (GYURICZA, 2019; GYURICZA et al., 2020).

1.1.3.2. O gene *HSPG2* como candidato a gene modificador

O gene *HSPG2* (referência GenBank [NG_016740.1](#)) localiza-se na região p36.12 do cromossomo 1, possui 97 éxons, é altamente conservado e codifica a proteína secretada perlecan (proteoglicano heparan-sulfato – HSPG – tipo 2), um componente multifuncional da MEC. O perlecan é depositado na membrana basal de diferentes tipos celulares e possui papel crucial na formação dos sistemas cardiovascular e nervoso, entre outros, o que justifica o fato de a completa perda de função de *HSPG2* ser letal ainda durante o desenvolvimento embrionário (revisado por MARTINEZ; DHAWAN; FARACH-CARSON, 2018). Ainda assim, variantes patogênicas de caráter recessivo no gene são associadas a duas condições genéticas extremamente raras (incidências < 1/1.000.000), a Síndrome de Schwartz-Jampel (OMIM #255800) e a displasia dissegmentar tipo Silverman-Handmaker (OMIM #224410), ambas caracterizadas por deformações musculoesqueléticas graves (NICOLE et al., 2000; ARIKAWA-HIRASAWA et al., 2002).

Sabe-se que fibrilina-1 possui múltiplos sítios de ligação a heparina/heparan sulfatos (HS) e que, principalmente por meio de epítomos localizados na sua região central, interage com os domínios I e II de perlecan (TIEDEMANN et al., 2001, 2005). Outro proteoglicano, o versican, também se liga à região que compreende os cbEGF #11-21 de fibrilina-1 (ISOGAI et al., 2002). Como mencionado anteriormente, alterações na porção dos domínios cbEGF #11-18 da fibrilina-1 costumam ser responsáveis pela ocorrência de formas mais graves da SMF, o que pode sugerir que a desestabilização das interações fibrilina-1/perlecan ou fibrilina-1/versican sejam responsáveis pela maior gravidade dos fenótipos da síndrome nestes casos (TIEDEMANN et al., 2005), reforçando um possível papel modulador do gene *HSPG2*.

Uma outra informação interessante é que camundongos nocaute para perlecan apresentam quantidades reduzidas de microfibrilas na membrana basal epitelial da derme (TIEDEMANN et al., 2005) e que a adição de HS livres também inibe a formação dessas estruturas *in vitro* (TIEDEMANN et al., 2001). Como consequência, foi hipotetizado que a interação entre fibrilina-1 e HSPGs seria crucial na biogênese das microfibrilas, e evidências posteriores mostraram que o perlecan é, de fato, capaz de imobilizar os multímeros de fibrilina no espaço pericelular, o que permite a correta montagem das microfibrilas e sua posterior inserção nas redes de fibronectina (Figura 3) (SABATIER et al., 2014).

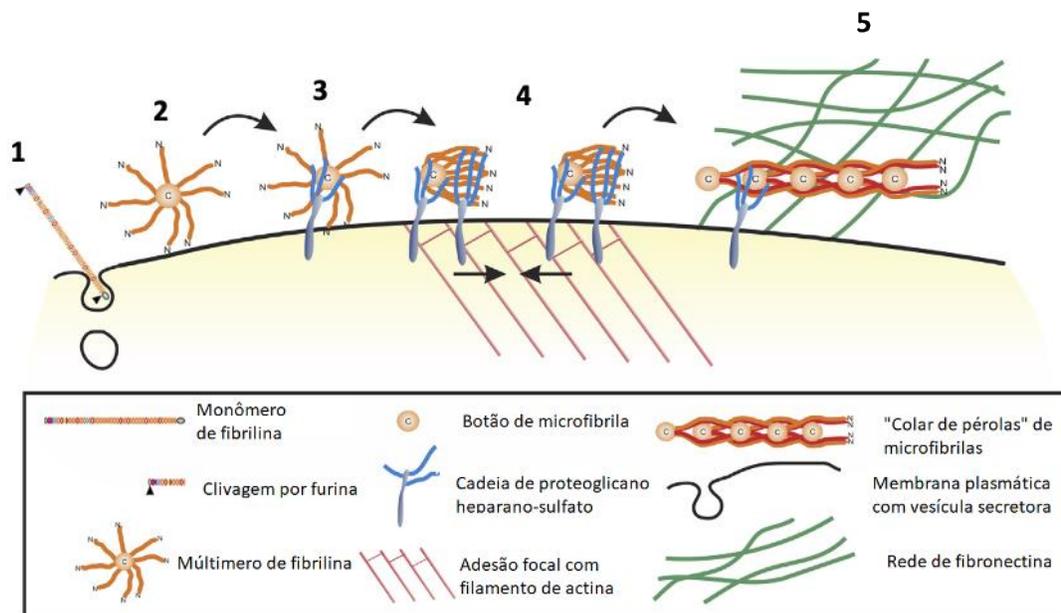


Figura 3. Papel do perlecan na formação das microfibrilas. Após sua secreção pela célula e clivagem pela proteína furina (1), os monômeros de fibrilina-1 associam-se por sua porção C-terminal, formando multímeros (2). Os multímeros interagem com proteoglicanos heparano-sulfato via sítios de ligação C-terminais (3) e são posicionados de forma que as microfibrilas sejam estruturadas (4). As microfibrilas são, então, transferidas para fibras de fibronectina para posterior estabilização e interação com outras proteínas da MEC (5). Adaptado de SABATIER et al., 2014.

Mais recentemente, foi reportado por nosso grupo que na coluna e aorta de animais do modelo murino $mg\Delta^{loxP^{neo}}$ as expressões de *Hspg2* e *Fbn1* são correlacionadas, e que em animais mais severamente afetados a expressão de *Hspg2* é menor (GYURICZA et al., 2020), reforçando a hipótese de que este gene modula os fenótipos cardiovascular e esquelético apresentados pelo modelo. Além disso, é interessante mencionar que um dos *loci* modificadores identificados em pacientes portadores da SMF por AUBART et al. (2018) contém este gene, o que sugere que, também para humanos, este é um forte candidato a modificador de fenótipos da síndrome.

1.1.4. Miocardiopatia dilatada na SMF

As miocardiopatias são doenças do músculo cardíaco causadas por alterações genéticas e/ou fatores ambientais (infecções virais, hipertensão crônica, etc.) que prejudicam a resposta do músculo à sobrecarga hemodinâmica (revisado por HARVEY; LEINWAND, 2011). Na SMF, cerca de 20-25% dos pacientes apresentam disfunções ventriculares (ALPENDURADA et al., 2010; COOK et al., 2014; WINTHER et al., 2019) condizentes com a ocorrência da DCM, que é caracterizada por moderada hipertrofia cardíaca, dilatação ventricular, disfunção sistólica e falha cardíaca progressiva (HARVEY; LEINWAND, 2011).

À exceção dos casos severos neonatais da SMF, causados por variantes patogênicas na região central de *FBN1* que acarretam complicações cardíacas normalmente letais antes do primeiro ano de vida (BARNETT et al., 2010; STHENEUR et al., 2011; FRANKEN et al., 2014), não se sabe ao certo se a miocardiopatia é uma consequência primária da síndrome ou se é resultante de outras manifestações cardiovasculares, como regurgitação das valvas mitral e/ou aórtica, muito comum em pacientes. Visando endereçar esta questão, COOK e colaboradores (2014) avaliaram a ocorrência de disfunções cardíacas no modelo *Fbn1^{mgR/mgR}* (PEREIRA et al., 1999), que produz cerca de 20% da quantidade normal de fibrilina-1 devido à inserção de um cassete de neomicina entre os éxons 18 e 19 do gene e morre devido à ruptura da aorta no primeiro ano de vida. Os autores observaram neste modelo a ocorrência de DCM e, para esclarecer se esta era decorrente da deposição reduzida de fibrilina-1 ou consequência da sobrecarga ventricular causada por regurgitação valvar, produziram uma

linhagem condicional de animais mutantes em que o gene *Fbn1* encontrava-se alterado apenas em cardiomiócitos. Neste novo modelo, a produção de fibrilina-1 ficou restrita a apenas 40% da quantidade normal nas células cardíacas, mas permaneceu normal em outros tipos celulares. Apesar de produzir mais fibrilina-1 que o modelo *mgR*, foi observado que a haploinsuficiência apenas em cardiomiócitos foi suficiente para o desencadeamento da DCM. Além disso, foi visto que a utilização de anticorpos neutralizantes de TGF- β não reverteu os fenótipos cardíacos no modelo *Fbn1^{mgR/mgR}*. Já a administração do Losartan, um antagonista do receptor do tipo I da angiotensina (AT1R), reverteu completamente a DCM nestes animais.

A sinalização por AT1R pode ser ativada por indução do alongamento celular, ou seja, de forma independente de seu ligante (angiotensina II). O aumento da sinalização por esse receptor e a elevação da sinalização por ERK (também observada) oferecem evidências bioquímicas da ocorrência de estresse mecânico persistente induzido pela deficiência estrutural da MEC (Figura 4 – superior). A MEC, no tecido cardíaco, auxilia na transmissão de força mecânica pelos cardiomiócitos por meio da interação indireta de seus componentes com as unidades contráteis (sarcômeros) destas células (Figura 4 – inferior) (KRESH; CHOPRA, 2011; HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014). Essa mecanotransdução é crucial para o funcionamento adequado do coração. Desta forma, o trabalho mostrou que o comprometimento da integridade da MEC devido à deficiência na deposição de fibrilina-1 acarreta alterações na sinalização mecânica entre os cardiomiócitos, o que causa DCM.

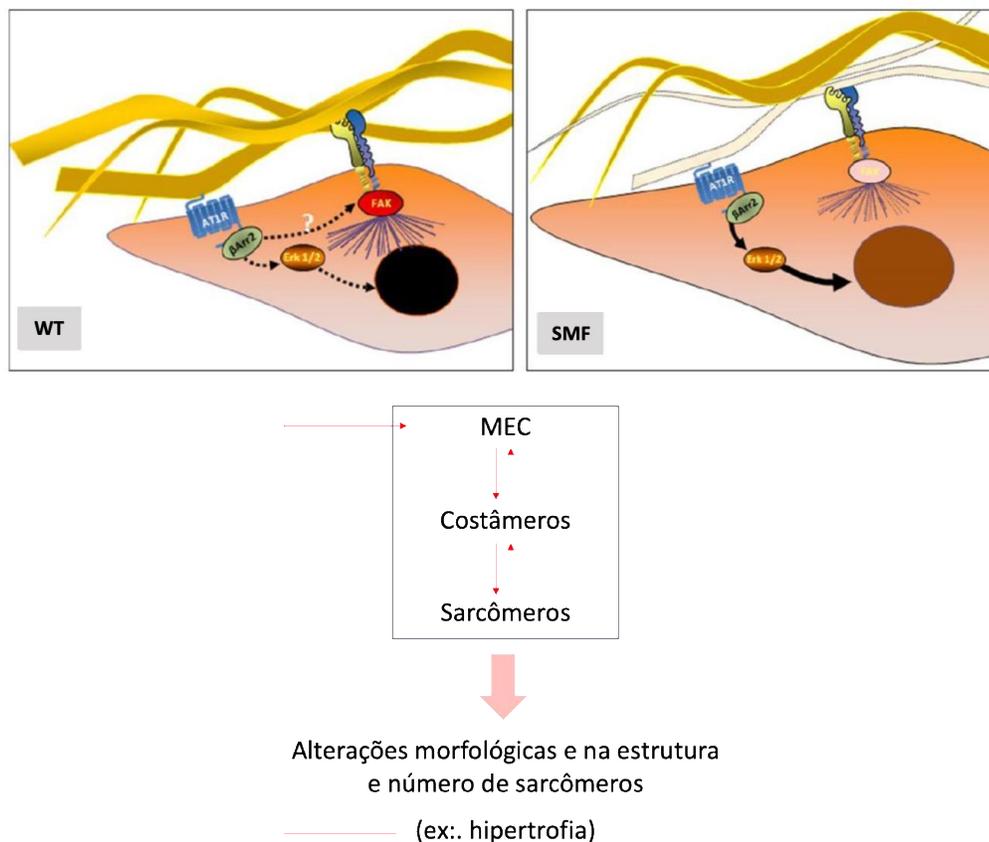


Figura 4. Efeito de alterações na fibrilina-1 no músculo cardíaco de um modelo murino para a SMF e importância da MEC na manutenção das funções dos cardiomiócitos. Superior: em cardiomiócitos selvagens, a ativação do receptor do tipo I da angiotensina (AT1R) pode acontecer mecanicamente, por interações com a MEC (fibras amarelas), independentemente da presença de seu ligante (angiotensina II). A ativação de AT1R promove a sinalização por Erk1/2 ou FAK (quinase de adesão focal), desencadeando processos celulares que mantêm a homeostase cardíaca. Na SMF, alterações na estrutura da MEC superativam AT1R e a via de Erk1/2, o que acarreta prejuízo das funções celulares e fenótipos de DCM. Inferior: Por meio de sua interação com os costâmeros, estruturas que mediam a interação entre os sarcômeros e a membrana celular, a MEC participa da transmissão de sinais de/para os sarcômeros, unidades contráteis dos cardiomiócitos. Alterações nessas interações acarretam falha cardíaca e promovem mecanismos compensatórios, como hipertrofia, por exemplo. Figura superior adaptada de NEILL; ZOELLER, 2014.

Apesar das evidências mencionadas acima, em pacientes SMF, ainda não está claro se a ocorrência de miocardiopatia é, de fato, uma consequência primária de alterações nas microfibrilas depositadas pelos cardiomiócitos.

1.2. Células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs) como modelos *in vitro* para o estudo de doenças genéticas

As células-tronco pluripotentes são células teoricamente capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular especializado, apesar de não poderem gerar um organismo inteiro (SHI et al., 2017). Tanto as células-tronco embrionárias humanas (hESCs) quanto as de pluripotência induzida (hiPSCs) possuem alta capacidade de proliferação *in vitro*, o que possibilitou que fossem muito visadas como modelos para o estudo de diversas patologias. As hESCs são obtidas da massa celular interna do blastocisto (THOMSON et al., 1998) e, por isso, sua utilização traz questões éticas relevantes. As hiPSCs, por outro lado, são células somáticas adultas que, com a introdução de certos fatores (geralmente OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-Myc), adquirem capacidade de pluripotência (TAKAHASHI et al., 2007). Por poderem ser derivadas de células de indivíduos adultos que apresentam manifestações clínicas específicas e por sua versatilidade, as hiPSCs passaram a ser bastante utilizadas para o estudo dos mecanismos de desenvolvimento de diversas doenças genéticas (YAMANAKA, 2009).

1.2.1. hiPSCs no estudo da SMF

No caso da SMF, o primeiro trabalho a utilizar células pluripotentes humanas (hPSCs) para o estudo de fenótipos da síndrome foi o de QUARTO et al. (2012). Os autores derivaram uma linhagem de hESCs a partir de um blastocisto portador de uma alteração de mudança de quadro de leitura no éxon 14 do gene *FBN1*, que cria um códon de parada no éxon 15. Eles também

produziram hiPSCs a partir de fibroblastos de indivíduos portadores de variantes patogênicas no gene. Uma das linhagens proveio de um indivíduo com alteração em um sítio de *splicing* que resulta na eliminação do éxon 32 do mRNA da fibrilina, na região central do gene, produzindo fenótipos severos. Outra foi derivada de indivíduo portador de uma alteração de mudança de quadro de leitura, no éxon 14. Comparando a diferenciação osteogênica das hPSCs SMF com as derivadas de indivíduos saudáveis, os autores observaram diminuição na capacidade de geração de osteoblastos nas células mutantes, havendo redução da expressão de vários marcadores osteogênicos. Este prejuízo foi eliminado após tratamento com um inibidor da sinalização por TGF- β ou com um anticorpo anti-TGF- β . A análise do meio de cultura das células SMF também mostrou a presença de altos níveis de TGF- β ativo. Este excesso de TGF- β nas culturas SMF também foi comprovado durante a diferenciação dessas células para tecido cartilaginoso; enquanto células-tronco controle precisam da adição exógena deste fator para que a diferenciação ocorra, as células SMF conseguiram se diferenciar sem sua adição.

Outro trabalho (GRANATA et al., 2016) avaliou os fenótipos vasculares da SMF utilizando células de musculatura lisa vascular derivadas de hiPSCs (iVSMCs) de dois pacientes portadores de alterações *missense* no gene *FBN1*. Ambos os indivíduos apresentavam doença aórtica severa, o que foi reproduzido *in vitro*, visto que suas iVSMCs demonstraram capacidade reduzida de proliferação e contractilidade, menor deposição de fibrilina-1, maior morte celular e maior número de fibras de estresse e adesões focais (vinculina) quando

comparadas a células controle. A utilização de um anticorpo neutralizante de TGF- β ou do fármaco Losartan aumentou a deposição de fibrilina por reverter processos de degradação da MEC, mas somente o Losartan foi capaz de resgatar parcialmente a capacidade proliferativa, indicando que além do excesso de TGF- β ativo, outros mecanismos são responsáveis pelos fenótipos encontrados. Desta forma, os autores concluíram que os fenótipos na aorta são resultado tanto do aumento da biodisponibilidade de TGF- β quanto de mecanotransdução anormal, adicionando informações ao que já se sabia anteriormente a respeito das alterações vasculares na SMF.

Posteriormente, os fenótipos reportados pelos dois trabalhos acima foram reproduzidos por PARK et al. (2017) em pares isogênicos tanto de uma linhagem de hiPSCs derivada de um paciente portador de uma variante *nonsense* cuja alteração foi corrigida por edição gênica, quanto de uma linhagem originalmente selvagem de hESCs modificada em ambos os alelos de *FBN1*, tornando-se duplo nocaute (KO) para fibrilina-1. A comparação entre linhagens com mesmo *background* genético (também realizada por GRANATA et al., 2016) comprova a importância de *FBN1* no processo de formação de novos osteoblastos e também na proliferação das VSMCs, o que explica parcialmente as manifestações clínicas esqueléticas e cardiovasculares da SMF. Além disso, os trabalhos mencionados também demonstram a utilidade de modelos derivados de hiPSCs para o estudo *in vitro* dos mecanismos da síndrome, no nível molecular.

1.2.2. hiPSCs no estudo da miocardiopatia dilatada

A DCM pode ser causada por alterações em diversos genes e, considerando a dificuldade de obtenção e cultura de cardiomiócitos primários, as hiPSCs derivadas de pacientes com esta condição apresentam-se como uma alternativa promissora. Em 2012, cardiomiócitos diferenciados a partir de hiPSCs (iCMs) de pacientes portadores de uma forma familiar de DCM foram comparadas com iCMs de indivíduos saudáveis da mesma família (SUN et al., 2012). Os iCMs-DCM, portadores de uma variante patogênica para o gene codificador da proteína sarcomérica troponina-T cardíaca (cTNNT2), demonstraram organização sarcomérica anormal e distribuição alterada tanto da proteína alterada quanto da α -actinina sarcomérica após 30 dias de diferenciação cardiomiocítica. Essas alterações foram acentuadas quando as células foram submetidas a estresse induzido pela administração de noradrenalina, visto que a porcentagem de iCMs-DCM que apresentou desorganização sarcomérica aumentou drasticamente, de aproximadamente 20% para valores entre 80 e 90%. O nível de excitação/contração dos cardiomiócitos também foi analisado e indicou redução de força contrátil nestas células. HINSON et al. (2015) também exploraram a utilização de iCMs de pacientes portadores de DCM familiar, porém com alteração em outra proteína sarcomérica, a titina. Os resultados obtidos corroboram as observações de SUN et al. (2012), visto que os fenótipos principais observados também foram diminuição da força contrátil basal e induzida por estresse e desorganização/insuficiência sarcomérica.

Alguns anos depois, foi demonstrado que essa insuficiência observada na DCM é resultante de alterações na formação de novos sarcômeros

(sarcomerogênese) e que as interações com a MEC mediadas por costâmeros imaturos (protocostâmeros) são essenciais para que o processo ocorra corretamente (CHOPRA et al., 2018). Os protocostâmeros/costâmeros apresentam composição similar às adesões focais e constituem-se de integrinas, paxilina, vinculina, FAK, entre outras proteínas (revisado por SAMAREL, 2005). Desta forma, observou-se que a importância da MEC no coração não está relacionada apenas à manutenção, mas também à formação estrutural dos cardiomiócitos.

1.3. O sistema CRISPR/Cas9 e a geração de modelos isogênicos

O sistema CRISPR/Cas (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated*) consiste em um sistema imune adaptativo encontrado em bactérias e arqueas, cujo objetivo é a destruição (clivagem) de material genético exógeno/invasor não benéfico. As enzimas Cas, como a Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*, são nucleases que utilizam uma molécula de RNA para determinação do alvo de DNA a ser clivado (revisado por SANDER; JOUNG, 2014).

A possibilidade de utilização deste sistema para programação *in vitro* da edição gênica direcionada foi reportada inicialmente por JINEK et al. (2012) e, posteriormente, dois trabalhos demonstraram a factibilidade da geração de mutações em células de mamíferos utilizando o sistema (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). Na tecnologia de edição de DNA baseada no sistema CRISPR/Cas9, uma única molécula simples de RNA guia (gRNA) é desenhada de forma a conter uma

sequência complementar à região que se deseja alterar no DNA celular (JINEK et al., 2012; CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). Quando co-expressa com a enzima Cas9, o gRNA direciona a nucleasa a induzir uma quebra de dupla-fita na região-alvo, desde que, no alvo, a sequência preceda um motivo adjacente ao protoespaçador, ou PAM (5'NGG no sistema derivado de *S. pyogenes*) (Figura 5A). A geração de quebras de dupla-fita mobiliza complexos de reparo de DNA que, ao corrigirem o problema, frequentemente deixam “cicatrizes” em forma de pequenas inserções ou deleções (indels) que podem acarretar mudança no quadro de leitura e consequente disfunção gênica, por exemplo (Figura 5B). Quando uma sequência molde é fornecida pelo experimentador, mecanismos de reparo direcionado por homologia (HDR) podem ser mobilizados e alterações específicas como substituições ou inserções podem ser geradas.

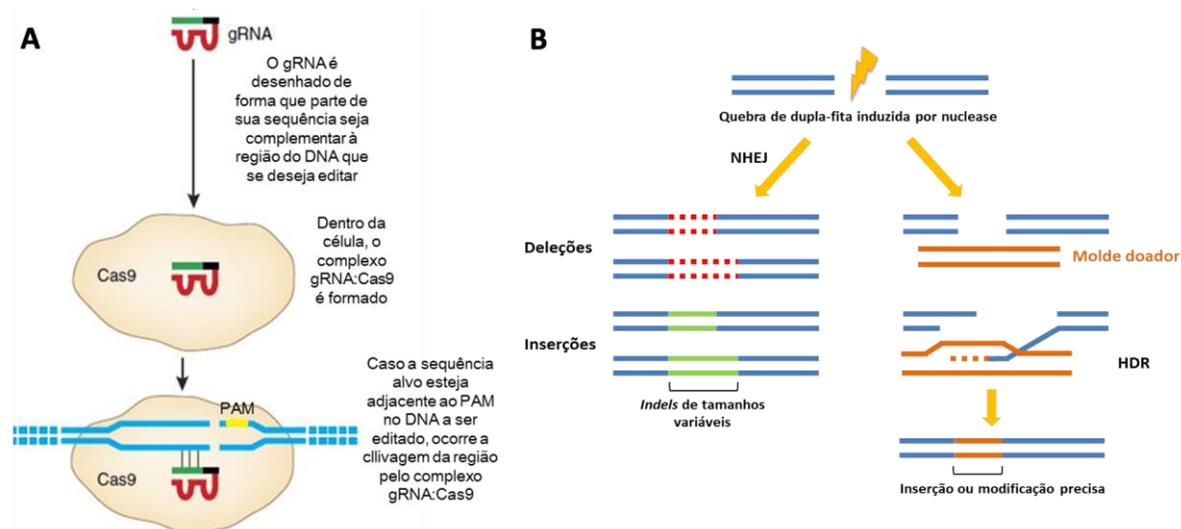


Figura 5. Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9. (A) Um RNA guia (gRNA) contendo uma sequência de interesse complementar à região que se deseja alterar, é sintetizado. Quando esse RNA é expresso dentro da célula em conjunto com a enzima Cas9, forma um complexo capaz de mediar a clivagem de sítios do DNA celular complementares à sequência escolhida, desde que estes precedam

um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM), que é a sequência 5'NGG no sistema adotado neste trabalho. (B) Após a clivagem da dupla-fita, mecanismos de reparo são ativados dentro da célula para reestabelecer a integridade do DNA e muitas vezes geram “cicatrices” na forma de inserções ou deleções (indels) que alteram a sequência gênica e, em alguns casos, sua função. Os mecanismos de reparo possíveis são os de união terminal não-homóloga (NHEJ), aleatório, ou o direcionado por homologia (HDR) que depende de um molde doador. Adaptadas de SANDER; JOUNG, 2014.

O sistema CRISPR/Cas9 é uma ferramenta bastante valiosa na busca por correlações genótipo-fenótipo em doenças genéticas. A possibilidade de indução de diferentes tipos de alterações de forma direcionada abre caminho para uma comparação funcional entre pares isogênicos, ou seja, que diferem geneticamente apenas quanto a uma variante específica. Como já mencionado, este sistema já foi utilizado no estudo da SMF, esclarecendo o papel de *FBN1* nos processos de diferenciação osteogênica e vascular. O sistema poderia também ser utilizado para o estudo, por exemplo, dos diferentes mecanismos (HI e DN) descritos para a SMF, o que ajudaria a explicar, ao menos parcialmente, as origens moleculares da alta variabilidade encontrada entre portadores da síndrome.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer e caracterizar genômica e funcionalmente modelos *in vitro* para o estudo dos diferentes mecanismos moleculares da Síndrome de Marfan (haploinsuficiência e dominância negativa), visando explicar as correlações genótipo-fenótipo existentes entre os grupos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Gerar, utilizando o sistema CRISPR/Cas9, linhagens isogênicas de hiPSCs portando diferentes tipos de mutação (HI ou DN) no gene *FBN1*;

2.2.2. Caracterizar a expressão de fibrilina-1 nas linhagens geradas, validando as consequências previstas para cada mutação;

2.2.3. Diferenciar em cardiomiócitos as linhagens de hiPSCs obtidas por edição gênica e também de pacientes portadores da SMF, caracterizando a eficiência das diferenciações por análise de expressão de proteínas específicas destes tipos celulares;

2.2.4. Caracterizar a expressão gênica de *FBN1* e *FBN2* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs e comparar com dados publicados de transcriptoma de corações humanos em diferentes estágios do desenvolvimento;

2.2.5. Comparar cardiomiócitos dos grupos selvagem e mutante para o gene *FBN1* com relação à taxa de proliferação e expressão de marcadores de hipertrofia;

2.2.6. Gerar, nas linhagens isogênicas de hiPSCs mutantes para *FBN1*, mutação de perda de função do gene *HSPG2* em heterozigose e caracterizar sua expressão gênica, obtendo-se assim modelos para a futura investigação do papel deste gene como modificador dos fenótipos da SMF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e aprovação no comitê de ética

3.1.1. Duas linhagens de hiPSCs derivadas de indivíduos saudáveis, não portadores da Síndrome de Marfan, denominadas hiPSC^{WT7} e hiPSC^{WT16} (iPS7 e iPS16, respectivamente, em TOFOLI et al., 2016);

3.1.2. Duas linhagens de hiPSCs derivadas de diferentes pacientes portadores da Síndrome de Marfan, denominadas hiPSC^{SMF1} e hiPSC^{SMF2} (iPS2 e iPS3 em TOFOLI et al., 2016);

3.1.3. Linhagem primária de fibroblastos dermais adultos humanos (denominada ReBI-PAT) gentilmente cedida pelo laboratório do Professor Chris Denning, da University of Nottingham.

A geração das linhagens de hiPSCs utilizadas foi realizada anteriormente a este projeto com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 34595414.3.0000.5464).

3.2. Cultura celular

3.2.1. hiPSCs

As hiPSCs foram cultivadas em meio *Essential 8*[™] (E8 – Cat. A1517001) (Thermo Fischer Scientific) suplementado com 10-50% mTeSR1[™] (Cat. 85850 – STEMCELL Technologies), na matriz Geltrex[®] (GTX, Cat. A1413302 – Thermo Fischer Scientific) ou Matrigel[™] (MT, Cat. 354234 – BD Biosciences). A troca do meio de cultura aconteceu diariamente e as passagens foram feitas a cada 3-4 dias utilizando-se o reagente *TrypLE*[™] *Express* (Cat. 12604013 – Thermo Fischer Scientific), segundo instruções do fabricante. Em todas as passagens, o meio de

cultura foi suplementado com 10 μ M de inibidor de ROCK Y-27632 (Cat. Y0503 – Sigma Aldrich) para inibição de apoptose e aumento da viabilidade celular. Os cultivos foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera de 5% CO₂ e alta umidade.

3.2.2. Fibroblastos primários

Os fibroblastos dermais foram cultivados em meio DMEM (Cat. 11960044), suplementado com 20% soro fetal bovino *ESC-qualified* (FBS – Cat. 16141079), 1% GlutaMAX™ (Cat. 35050061), 1% MEM-aminoácidos não essenciais (MEM-NEAA – Cat. 11140050), 1% piruvato de sódio (Cat. 11360070) e 0,1 mM β -mercaptoetanol (Cat. 21985023 – todos da Thermo Fisher Scientific). A troca de meio aconteceu a cada 2-3 dias e as passagens foram feitas utilizando-se tripsina-EDTA 0,05% (Cat. 25300054 – Thermo Fischer Scientific). Os cultivos foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera de 5% CO₂ e alta umidade.

3.3. Geração de corpos embrioides (EBs)

3.3.1. Método 1

Culturas de hiPSCs 80-90% confluentes foram inicialmente incubadas em meio E8 suplementado com inibidor de ROCK Y-27632 por 20 minutos a 37°C e manualmente fragmentadas (quadriculadas) com o auxílio de uma ponteira de 20-200 μ l. Após, o meio foi retirado e as células foram incubadas com 2 mg/ml da enzima Dispase II (Cat. 17105 – Thermo Fisher Scientific) por 5-10 minutos a 37°C. Após lavagem com meio DMEM/F-12 (Cat. 11320033 – Thermo Fisher

Scientific), os fragmentos foram coletados em meio E8 e centrifugados a 160 g (860 rpm) durante 2 minutos. Após a centrifugação, foram então ressuspensos em meio E8 e transferidos para placas de cultura previamente tratadas com agarose 1% para o cultivo em suspensão.

3.3.2. Método 2

Culturas 80-90% confluentes de hiPSCs foram dissociadas como descrito no item 3.2.1 e cerca de 10.000 células foram plaqueadas em poços individuais de placas de baixa aderência com fundo “U” (*Costar® Ultra-Low Attachment Microplate*, Cat. 7007 – Corning®) em meio E8. As placas foram então centrifugadas a 100 G por 5 minutos para a formação de agregados celulares tridimensionais.

Em ambos os casos, após cinco dias em meio E8, os EBs já formados foram transferidos para novas placas de cultura revestidas com Gelatina 0,1% (Cat. 7903 – STEMCELL Technologies) para adesão. O cultivo foi mantido por 10 ou 25 dias (total de 15 ou 30 dias após início da formação dos EBs, respectivamente) em meio de diferenciação: DMEM, 20% FBS, 1% GlutaMAX™, 1% MEM-NEAA, 1% piruvato de sódio, 1% penicilina-estreptomicina, (Cat. 15140122), 1% HEPES (Cat. 15630080) e 0,1 mM β -mercaptoetanol (todos da Thermo Fischer Scientific) (TOFOLI et al., 2016). No 15º ou 30º dia, as culturas foram lisadas para extração de RNA ou proteínas ou ainda fixadas para imunofluorescência.

3.4. Edição do gene *FBN1* utilizando-se o sistema CRISPR/Cas9

3.4.1. Escolha dos sítios de mutação e desenho dos RNAs guia (gRNAs)

Escolhemos como alvos uma região próxima ao códon de iniciação (ATG) no éxon 2 de *FBN1* ([NM_000138.5](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000138.5)) para o mutante haploinsuficiente (HI) e a deleção do éxon 31 para o dominante negativo (DN). Para a geração dos mutantes HI, o objetivo foi induzir a formação de pequenas inserções ou deleções (indels) logo após o início da tradução, de forma que o quadro de leitura do gene fosse alterado, acarretando um alelo nulo; a justificativa para a escolha da deleção do éxon 31 (mutantes DN) é a de que este éxon encontra-se dentro da chamada “região neonatal” de *FBN1*, associada a fenótipos mais severos quando alterada (FAIVRE et al., 2007).

Os gRNAs para a geração destas mutações foram escolhidos utilizando-se a plataforma *CRISPRdirect* – <http://crispr.dbcls.jp/>. Após submissão das sequências das duas regiões-alvo na plataforma, o programa determina todas as sequências de 20 pares de base possíveis (gRNAs) considerando a presença do PAM 5'-NGG-3' de *Streptococcus pyogenes* a 3'. O programa também determina a especificidade, ou seja, quantas vezes a sequência é encontrada no genoma, mesmo considerando *mismatches* de 8 e 12 bases a 5'. Foram selecionados dois gRNAs para a geração de uma quebra de dupla-fita no éxon 2 (denominados gRNA E2-1 e gRNA E2-2) e dois para a deleção do éxon 31 (gRNA E31-1 e gRNA E31-2) (Figura 6). As sequências completas (20 bases) de todos os gRNAs escolhidos ocorrem apenas uma vez ao longo de todo genoma humano, diminuindo-se assim a chance de eventos de edição inespecífica (*off-target*).

position		target sequence	sequence information			number of target sites ?		
start	+		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
62 - 84	+	GGGACGGGCGGCGGATAGCGGG [gRNA]	80.00 %	87.52 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	3002 [detail]
86 - 108	-	CCCCGGGCGGCGGTGCGGTTCA [gRNA]	80.00 %	87.15 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	2363 [detail]
131 - 153	+	CGAGCCCGGCGGCAAGAGG [gRNA]	85.00 %	89.53 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	865 [detail]
170 - 192	+	CGGCTCGGCATCATGCGTCGAGG [gRNA]	70.00 %	79.98 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	143 [detail]
171 - 193	+	GGCTCGGCATCATCGTCGAGG [gRNA]	65.00 %	78.80 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	111 [detail]
231 - 253	+	TAGCGTCCACACGAGCCATGGG [gRNA]	55.00 %	76.54 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	473 [detail]
247 - 269	+	CCATGGGGCGGACGCCAATTGG [gRNA]	65.00 %	81.24 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	201 [detail]
250 - 272	+	TGGGGCGGACGCCAATTGGAGG [gRNA]	65.00 %	80.91 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	6241 [detail]
323 - 345	+	GGAGGACACGACGCGTTAAAGG [gRNA]	60.00 %	76.88 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	252 [detail]

position		target sequence	sequence information			number of target sites ?		
start	+		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
1 - 23	+	gaaccaatatcaacaacctgtg [gRNA]	40.00 %	65.55 °C	-	1 [detail]	15 [detail]	4018 [detail]
4 - 26	-	ccaatatcaacaacctgtggtt [gRNA]	40.00 %	67.08 °C	-	1 [detail]	10 [detail]	2511 [detail]
8 - 30	+	tatcaacaacctgtggtt [gRNA]	40.00 %	68.42 °C	-	1 [detail]	61 [detail]	6292 [detail]
17 - 39	-	ccgtggttgttggttttattct [gRNA]	35.00 %	64.54 °C	-	1 [detail]	19 [detail]	3522 [detail]
63 - 85	+	GATAATCCCAATATCTGTGATGG [gRNA]	35.00 %	64.16 °C	-	1 [detail]	27 [detail]	8548 [detail]
66 - 88	+	AATCCCAATATCTGTGATGGTGG [gRNA]	40.00 %	67.16 °C	-	1 [detail]	17 [detail]	9510 [detail]
69 - 91	-	CCCAATATCTGTGATGGTGTCA [gRNA]	40.00 %	68.07 °C	-	1 [detail]	35 [detail]	8113 [detail]
70 - 92	-	CCAATATCTGTGATGGTGTGTCAG [gRNA]	45.00 %	69.43 °C	-	1 [detail]	53 [detail]	5071 [detail]
87 - 109	+	GGTCAGTGCACAAATATCCCTGG [gRNA]	50.00 %	71.86 °C	-	1 [detail]	25 [detail]	5859 [detail]
97 - 119	+	CAAAATATCCCTGGAGAGTACAGG [gRNA]	45.00 %	68.91 °C	-	1 [detail]	19 [detail]	2910 [detail]
104 - 126	-	CCCTGGAGAGTACAGGTGCTTGT [gRNA]	50.00 %	73.93 °C	-	1 [detail]	28 [detail]	5868 [detail]
105 - 127	-	CCTGGAGAGTACAGGTGCTTGTG [gRNA]	55.00 %	73.93 °C	-	1 [detail]	24 [detail]	3125 [detail]
114 - 136	+	TACAGGTGCTTGTGTTATGATGG [gRNA]	40.00 %	68.50 °C	-	1 [detail]	19 [detail]	4257 [detail]
122 - 144	+	CTTGTGTTATGATGGATTATGG [gRNA]	35.00 %	63.36 °C	-	1 [detail]	28 [detail]	6538 [detail]
150 - 172	+	GAGGACATGAAGACTTCTGTAG [gRNA]	40.00 %	65.93 °C	-	1 [detail]	34 [detail]	3610 [detail]

Figura 6. Possíveis gRNAs nas regiões-alvo (éxon 2 e éxon 31) de *FBN1*. As seqüência de 20 pares de bases (20mer) precedidas por uma seqüência PAM (5'NGG) que ocorrem apenas uma vez no genoma foram encontradas para as regiões dos éxons 2 (tabela superior) e 31 (tabela inferior) utilizando-se a plataforma *CRISPRdirect* (<http://crispr.dbcls.jp/>). Os detalhes como posição, conteúdo GC (%GC), temperatura de *melting* (Tm), e número de ocorrências no genoma para a seqüência completa (20mer), ou para os 12 (12mer) ou 8 (8mer) pares de base a 3' também estão demonstrados. As seqüências adotadas estão destacadas em verde e o códon de iniciação de *FBN1* (ATG) está destacado em amarelo.

Para posterior clonagem das seqüências no vetor de expressão da maquinaria CRISPR/Cas9, os oligonucleotídeos de DNA correspondentes a cada gRNA e também suas seqüências complementares foram desenhados contendo também sítios para ligação ao vetor plasmidial digerido com a enzima de restrição BbsI (Figura 7). A síntese de todos os oligonucleotídeos, já fosforilados, foi feita pela Integrated DNA Technologies.

- 1) **E2-1:** 5' **CACCCGGCTCGGCATCATGCGTCG** 3'
 3' GCCGAGCCGTAGTACGCAGCCAAA 5'
- 2) **E2-2:** 5' **CACCCGGCTCGGCATCATGCGTCGA** 3'
 3' CCGAGCCGTAGTACGCAGCTCAAA 5'
- 3) **E31-1:** 5' **CACCGAACCAATATCAACAACCTG** 3'
 3' CTTGTTATAGTTGTTGGACCAAA 5'
- 4) **E31-2:** 5' **CACCGAAGACATGAAGACTTGTGT** 3'
 3' CTTCTGTA CTTCTGAACACAAA 5'

Figura 7. Oligonucleotídeos de DNA com as seqüências de gRNAs para edição dos éxons 2 e 31 do gene *FBN1*. Os quatro oligonucleotídeos escolhidos, denominados E2-1 e E2-2 para edição do éxon 2 e E31-1 e E31-2 para edição do éxon 31, foram sintetizados como oligonucleotídeos de DNA senso e antisenso contendo também sítios para clonagem no vetor digerido com a enzima BbsI (5' CAAC3' e 3' CAAA5', em negrito).

3.4.2. Anelamento e clonagem das seqüências de gRNAs no vetor pX330 mod

Após obtenção dos oligonucleotídeos fosforilados, estes foram diluídos para a concentração de 100 µM e, posteriormente para 10 µM; os anelamentos foram feitos para que concentrações de 100 nM e 1 µM de oligonucleotídeos anelados fossem obtidas. A reação foi feita misturando-se 176 µl de água MilliQ, 20 µl de tampão de PCR (Thermo Fischer Scientific) e 2 µl de cada um dos oligonucleotídeos senso e antisenso a 10 µM (para concentração final de 100 nM na reação) ou a 100 µM (para concentração final de 1 µM), totalizando-se 200 µl de volume final. As amostras foram então incubadas a 95°C por 2 minutos e deixadas esfriando à temperatura ambiente (TA).

Um vetor plasmidial de expressão da enzima Cas9 de aproximadamente 10 kb, denominado pX330 modificado (ETOC et al., 2016) foi gentilmente cedido

pela Profa Dra. Chao Yun Irene Yan, do ICB – USP. Este vetor, que também contém os genes para expressão da proteína verde fluorescente (eGFP) e de resistência à puromicina (mapa no ANEXO A), foi duplamente digerido pelos seguintes pares de enzimas de restrição (todas da New England Biolabs – NEB) para verificação de sua integridade:

- i. Sall (Cat. R0138) e EcoRV (Cat. R0195), gerando fragmentos de 7273 pb e 2752 pb;
- ii. EcoRI (Cat. R0101) e EcoRV, gerando fragmentos de 7722 pb 2302 pb;
- iii. BglII (Cat. R0144) e KpnI (Cat. R0142), gerando fragmentos de 7326 pb e 2698 pb.

As reações de digestão foram feitas conforme descrito na tabela abaixo:

Tabela 1. Reações de dupla digestão para verificação da integridade do vetor pX330 mod.

pX330 mod. (580 ng/μl)	1 μl
Tampão NEBuffer 3.1 (10x)	2 μl
Enzima 1	1 μl
Enzima 2	1 μl
H ₂ O milliQ	15 μl
TOTAL	20 μl

As digestões foram feitas incubando-se as amostras por 18 horas a 16°C. Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8) para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos nas digestões.

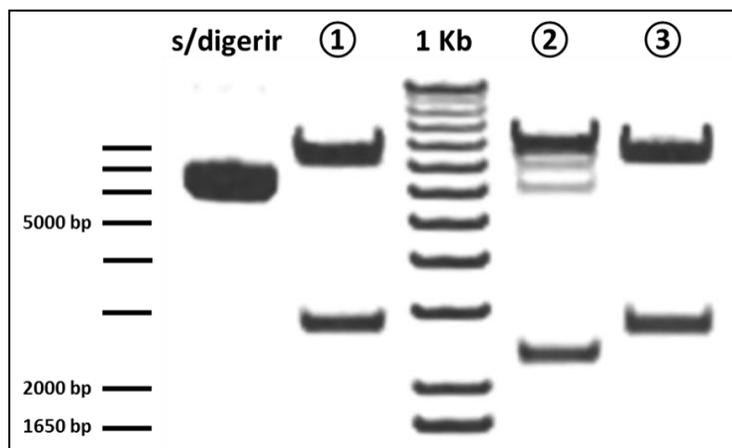


Figura 8. Análise de restrição do plasmídeo pX330 mod. para verificação de sua integridade.

O plasmídeo foi digerido simultaneamente com as enzimas *Sall* e *EcoRV* (①), *EcoRI* e *EcoRV* (②) ou *BglII* e *KpnI* (③). Os fragmentos esperados para cada uma das reações eram: ① → 7274bp + 2750pb; ② → 7722 bp + 2302 bp; ③ → 7326 bp + 2698 bp. A digestão ② apresentou bandas não esperadas devido à atividade inespecífica da enzima utilizada.

Após verificação da integridade, o vetor foi digerido pela enzima *BbsI* (Cat. ER1012 – Thermo Fischer Scientific) para posterior clonagem dos oligonucleotídeos de gRNA anelados. A reação da digestão foi feita segundo a tabela abaixo:

Tabela 2. Reação de digestão do vetor pX330 mod com a enzima *BbsI*. “x” equivale ao volume necessário de água para completar o volume da reação até 40 µl.

pX330 mod.	10 µg
Tampão G (10x)	4 µl
<i>BbsI</i>	1 µl
H ₂ O milliQ	x µl
TOTAL	40 µl

A reação foi feita por incubação a 37°C por 3 horas, seguida de incubação a 65°C por 20 minutos (para inativar a enzima). Após, a amostra foi submetida à

eletroforese em gel de agarose 1% e a banda correspondente ao plasmídeo digerido foi extraída utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Cat. A9281 – Promega).

Para clonagem dos oligonucleotídeos anelados no vetor, a proporção de 4 nM de oligonucleotídeo para cada 50 ng de plasmídeo digerido foi seguida e a reação foi montada conforme abaixo:

Tabela 3. Reação de ligação de cada um dos oligonucleotídeos de gRNA (E2-1, E2-2, E31-1 e E31-2) no vetor pX330 mod. “x” equivale ao volume necessário de água para completar o volume da reação até 20 µl.

Oligonucleotídeo anelado (1 µM)	1,2 µl
pX330 mod. Digerido com BbsI	750 ng
Tampão T4 (10X)	2 µl
T4 ligase (NEB – cat. M0202L)	1,5 µl
H ₂ O milliQ	x µl
TOTAL	20 µl

As amostras foram incubadas a 16°C por 16-18 horas e a enzima ligase foi inativada por posterior incubação a 65°C por 10 minutos. Antes de serem eletroporadas em células competentes de *Escherichia coli*, as amostras foram submetidas a diálise por 30 minutos utilizando-se uma membrana com poros de 0,025 µm (Cat. VSWP02500 – Millipore).

Cerca de metade de cada reação (375 ng) foi eletroporada em bactérias eletrocompetentes e, após crescimento em placas de LB ágar contendo ampicilina (100 µg/ml), 10 colônias de cada placa foram crescidas em meio líquido com

antibiótico e purificadas por Miniprep utilizando-se o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Cat. 27104 – QIAGEN), segundo instruções do fabricante. Para verificação da correta inserção de cada um dos oligonucleotídeos, os vetores purificados foram submetidos a sequenciamento utilizando-se um iniciador complementar a parte da sequência do promotor U6 sob o qual deveriam se encontrar os gRNAs clonados (5' GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC 3'). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Cat. 4337456 – Thermo Fischer Scientific), segundo instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas no serviço oferecido pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP ou no GaTE Lab (Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys) do Departamento de Botânica do IB-USP pela técnica Tatiana Silveira Corrêa. Os vetores corretamente recombinados foram então purificados por Maxiprep (*HiSpeed Plasmid Maxi Kit*, Cat. 12663 – QIAGEN) segundo instruções do fabricante, e armazenados a -20°C para posterior utilização.

3.4.3. Análise *in silico* de possíveis alvos inespecíficos (*off-targets*)

Os possíveis alvos não intencionais de cada gRNA (E2-1, E31-1 e E31-2), foram determinados utilizando-se a plataforma CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) (HAEUSSLER et al., 2016). A plataforma apresenta, para cada gRNA encontrado na região de interesse para edição, o número e a localização dos *mismatches* na região *off-target* e um *Cutting Frequency Determination score* (CFD – DOENCH et al., 2016) que calcula o potencial de interação não intencional da sequência guia com o DNA, e varia de 0 a 1.

Para o gRNA E2-1, a plataforma retornou três possíveis regiões *off-target* em íntrons ou éxons de genes anotados cujo score CFD foi superior a 0,02 (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências com possibilidade de efeito não intencional do gRNA E2-1 obtidas por análise *in silico* utilizando-se a plataforma CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). MMs: mismatches. CFD: Cutting Frequency Determination

Sequência <i>off-target</i>	Posições dos MMs	CFD score	Locus
CGGCTCGGCAGCCTGCGCCGCGG* *	0,036090226	exon:SHROOM1
CGGCTCGGGAACAAGCGTCTGGG* * *	0,201190476	intron:SUMO3
CGGCTTGGGATCCTGCATCGAGG* * * * *	0,112949039	intron:PHLDB1

Para os gRNAs E31-1 e E31-2, a plataforma retornou 70 regiões intrônicas e 12 exônicas em genes anotados e com CFD superior a 0,02. Devido à inviabilidade de se sequenciar todas essas regiões por conta do alto custo, decidimos selecionar apenas as regiões exônicas (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências com possibilidade de efeito não intencional dos gRNAs E31-1 e E31-2 obtidas por análise *in silico* utilizando a plataforma CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>).

MMs: *mismatches*. CFD: *Cutting Frequency Determinatio*.

Sequência <i>off-target</i>	Posições dos MMs	CFD score	Locus
AGACCAAATCATCAACCTGCGG	**.....*.....*	0,1728	exon:TMEM200C
CAAACAATAGCAACAAACTGTGG	*..*.....*.....*	0,140350877	exon:COL1A2
GGGCAAATATCATCAACCTGTGG	..**.....*.....*	0,083809524	exon:FBN2
GAACCAGTAACTACAGCCTGGGG*..**.....*	0,038784745	exon:UQCRC2P1
TGAGAAATGAAGACTAGTGTGG	**...*.....*.....*	0,675324676	exon:WDR16
GAAGACATGAAAACATATTTTGG*..**.....*	0,336218323	exon:SERPINB10
GAAAAAATGAATACTTGTATGGG	...*.....*.....*	0,229591837	exon:CD86
CCAGACATGAGGACATGTGTGG	**.....*.....*	0,211197637	exon:FBN3
GAAGAAATTAAGACATGTATTGG*.....*.....*	0,204797708	exon:KIF13A
GAAGAAATGATGAATTATGTGG*.....*.....*	0,093333333	exon:HMGB4
GAGGAAATGAAGATTTGTGGTGG	..*.....*.....*	0,073436041	exon:UBAP2L
GAAGACAGGAAAACCTGTTTCAGG*.....*.....**	0,041481482	exon:MATN3

Desenhemos iniciadores para a amplificação e posterior sequenciamento de todas as regiões após a edição das hiPSCs (sequências para cada *locus* no APÊNDICE A).

3.4.4. Validação em células da linhagem HEK293T

3.4.4.1. Cultura

Células da linhagem HEK293T, gentilmente cedidas pelo laboratório da Profa. Dra Chao Yun Irene Yan, foram cultivadas em meio DMEM high glucose (Cat. 11965118 – Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de FBS Brazil (Cat. 10270106 – Thermo Fisher Scientific) e 1% penicilina/estreptomicina. As trocas de meio ocorreram a cada dois/três dias e as passagens foram feitas utilizando-se tripsina-EDTA 0,05% quando as culturas se encontravam confluentes. Os cultivos foram mantidos em incubadora a 37°C, atmosfera de 5% CO₂ e alta umidade.

3.4.4.2. Transfecção com *Lipofectamine*® 3000

Para os experimentos de transfecção, 5×10^4 células/cm² foram plaqueadas em poços de placas de 6 poços em meio DMEM high glucose suplementado com 10% FBS (sem antibiótico). Após 24 horas, um total de 2,5 µg de vetor (pX330 sem inserto – SI, E2-1, E2-2 ou E31-1 e E31-2 em conjunto – 1,25 µg de cada) e 2 µl do reagente P3000 (Cat. L3000015 – Thermo Fischer Scientific) foram ressuspendidos em 200 µl de meio Opti-MEM (Cat. 31985088). Em outro tubo, 3,75 µl do reagente *Lipofectamine*® 3000 (Cat. L3000015 – Thermo Fischer Scientific) foram diluídos também em 200 µl de Opti-MEM. Após, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por, no máximo, 5 minutos à TA. Os 400 µl de solução de transfecção de cada uma das condições (pX330 SI, E2-1, E2-2 ou E31-1+2) foram aplicados ao respectivo poço com as células e a placa foi mantida em incubadora a 37°C por 6 horas. Após, o meio foi substituído por meio fresco (DMEM high glucose suplementado com 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina).

3.4.4.3. Extração de DNA e detecção de mutações com o kit *Surveyor*®

Decorridas 72 horas da transfecção, a expressão de GFP foi verificada por microscopia de fluorescência e as células foram submetidas à extração de DNA com o *QIAamp DNA Mini Kit* (Cat. 51306 - QIAGEN), segundo instruções do fabricante. As amostras de DNA do *pool* de células transfectadas com cada um dos vetores foram submetidas a PCR para as regiões do éxon 2 e do éxon 31 (pares de iniciadores E2 e E31 Ext., respectivamente; sequências no APÊNDICE B) utilizando-se a enzima *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (Cat. M0491 – NEB), segundo instruções do fabricante (para o PCR E2, foi utilizado o tampão para alto conteúdo GC).

Os fragmentos resultantes da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (PCR E31) ou foram submetidos a desnaturação e renaturação para posterior digestão com a nuclease do kit de detecção de mutações *Surveyor*® (Cat. 706025 – Integrated DNA Technologies), seguindo o protocolo de HENDRIKS et al. (2015). A nuclease *Surveyor*® tem a capacidade de digerir apenas heterodímeros (duplas-fitas formadas por fragmentos **parcialmente** complementares) e espera-se que a digestão aconteça somente se indels tiverem sido gerados. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A Figura 9 esquematiza todos os passos do processo para detecção de mutações utilizando o kit.

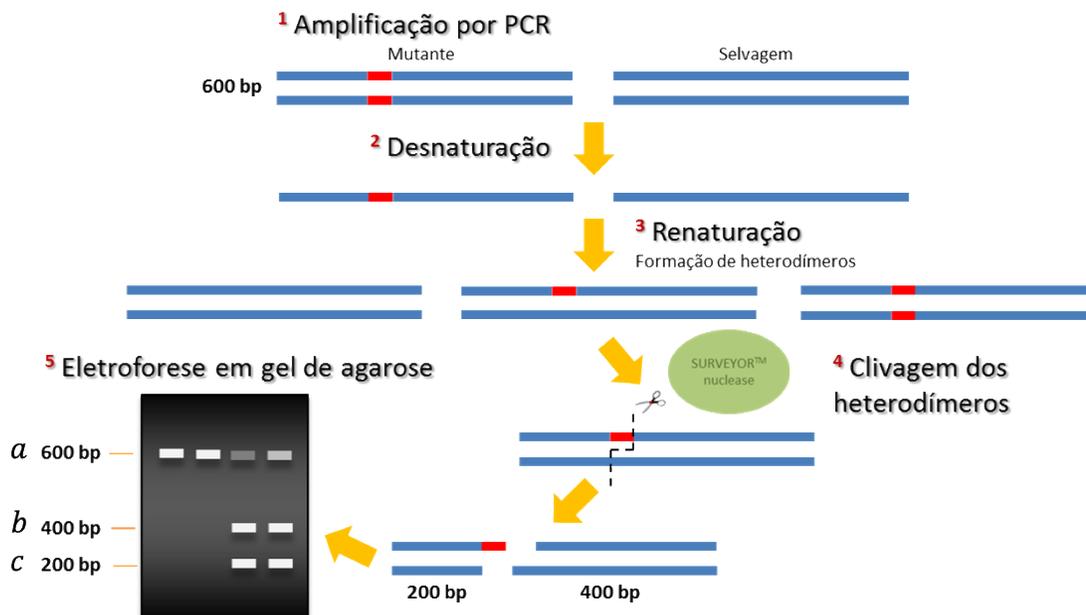


Figura 9. Detecção de mutações utilizando a nucleasa Surveyor®. O esquema evidencia todos passos do processo: (1) inicialmente, partindo-se de uma amostra de DNA genômico (gDNA) extraído do *pool* de células editadas, amplifica-se a região de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Nesta reação, serão obtidas sequências selvagens (não editadas) e mutantes (contendo mutações de ponto ou indels), caso a edição tenha acontecido em algumas células. (2) Após, os fragmentos obtidos por PCR são denaturados e (3) renaturados, de forma que novos fragmentos de duplas-fitas totalmente (homodímeros) ou parcialmente (heterodímeros) complementares sejam formados aleatoriamente. (4) Os fragmentos são então submetidos à digestão com a nucleasa do kit Surveyor®, capaz de digerir apenas heterodímeros. (5) Para análise da ocorrência ou não de digestão, as amostras são submetidas à eletroforese em gel de agarose e os tamanhos dos fragmentos obtidos (*a* – não digeridos e/ou *b* e *c* – resultados da digestão) podem ser observados, indicando a presença ou não de mutação na região.

As intensidades das bandas dos géis (*Surveyor*® e E31) foram estimadas utilizando-se o software *ImageJ (Fiji)* (SCHINDELIN et al., 2012). Para a digestão *Surveyor*®, a intensidade da banda correspondente aos fragmentos não digeridos (*a*) e dos produtos clivados (*b* e *c*) foi utilizada para o cálculo da fração de produto clivado: $f_{cut} = (b + c)/(a + b + c)$. Para a

estimativa da eficiência na geração de *indels*, foi utilizada a fórmula (RAN et al., 2013b):

$$Indel (\%) = 100x(1 - \sqrt{1 - fcut})$$

3.4.5. Edição em hiPSCs

3.4.5.1. Transfecção com *Lipofectamine® 3000* e seleção com puromicina

A linhagem selvagem hiPSC^{WT16}, previamente gerada no âmbito do projeto ELSA-Brasil (TOFOLI et al., 2016), foi escolhida para ser geneticamente editada baseando-se nos protocolos descritos por RAN et al., 2013b e HENDRIKS et al., 2015.

Culturas 80-90% confluentes foram dissociadas com o reagente *Accutase Cell Detachment Solution* (Cat. 561527 – BD Biosciences) segundo instruções do fabricante e $1,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços em meio E8 suplementado com $10 \mu\text{M}$ de inibidor de ROCK Y-27632. Após 24 horas, o meio foi substituído por *mTeSR™1* (Cat. 85850 – STEMCELL Technologies) e os reagentes de transfecção foram preparados para cada um dos poços a serem transfectados: em um tubo, $1,5 \mu\text{l}$ do reagente *Lipofectamine® 3000* foi diluído em $25 \mu\text{l}$ de Opti-MEM; em um segundo tubo, o DNA plasmidial (pDNA) foi diluído em $25 \mu\text{l}$ de Opti-MEM e $1 \mu\text{l}$ do reagente P3000 foi adicionado à mistura. As quantidades de DNA utilizadas para cada edição foram: $1,8 \mu\text{g}$ do vetor pX330 SI; $1,0 \mu\text{g}$ de pX330 E2-1; $0,25 \mu\text{g}$ de cada um dos vetores E31-1 ou E31-2 em conjunto. Após, o

conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por, no máximo, 5 minutos à TA. Os 50 µl de solução de transfecção de cada uma das condições (pX330 SI, E2-1 ou E31-1+2) foram aplicados ao respectivo poço com as células e a placa foi mantida em incubadora a 37°C por 6 horas. Decorrido este tempo, o meio foi substituído por *mTeSR™1* fresco suplementado com o antibiótico puromicina (Cat. A1113803 – Thermo Fisher Scientific) na concentração 0,5 µg/ml. O antibiótico permaneceu por 24 horas para seleção das células efetivamente transfectadas e o meio foi substituído diariamente por *mTeSR™1* até o 4º dia, quando a troca diária passou a ser feita com E8.

3.4.5.2. Subclonagem das colônias transfectadas

Após aproximadamente 10 dias, quando culturas selecionadas atingiram uma confluência aproximada de 70-80%, as células foram dissociadas com *Accutase* ou *TrypLE™* e replaqueadas em baixas concentrações (600 células/cm² ou 1000 células/cm²) para que colônias derivadas de uma única célula fossem obtidas (subclonagem). O meio utilizado foi o E8 suplementado com 10 µM de inibidor de ROCK Y-27632. O restante do *pool* de células selecionadas foi criopreservado em uma mistura de 90% FBS *ESC-qualified* suplementado com 10% *Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™* (Cat. D2650 – Sigma Aldrich) para a realização de subclonagens posteriores, caso necessário.

Após cerca de 15 dias, as colônias individuais (de 6 a 40, dependendo do experimento) foram transferidas para placas-réplica de 24 poços (uma

colônia por poço) e, após expansão, foram criopreservadas ou coletadas para extração de DNA com o *QIAamp DNA Mini Kit* e posterior genotipagem.

3.4.5.3. Triagem das mutações obtidas

As amostras de DNA foram submetidas a PCR para as regiões do éxon 2 e do éxon 31 (pares E2 e E31, respectivamente, no APÊNDICE B), como mencionado anteriormente. Para o éxon 31, as amostras obtidas por amplificação foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5-2% para visualização das diferentes bandas. Para o éxon 2, os produtos de PCR de cada um dos clones obtidos foram purificados com o o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* e, posteriormente, 100-200 ng foram utilizados em uma reação de sequenciamento como mencionado anteriormente. O iniciador utilizado foi o E2 interno (APÊNDICE B).

As amostras que apresentaram possível heterogeneidade alélica no sequenciamento do *pool* de amplicons foram recombinadas com vetores pGEM-T do kit *pGEM®-T Easy Vector System I* (Cat. A1360 – Promega), segundo instruções do fabricante. Os vetores obtidos após a reação de recombinação foram transformados em células competentes de *E. coli* como previamente mencionado e, posteriormente, cinco colônias bacterianas foram isoladas, crescidas e submetidas a extração de pDNA Miniprep. Os vetores purificados foram sequenciados utilizando-se o mesmo iniciador E2 interno para determinação da sequência do inserto.

3.4.5.4. Subclonagem dos clones de interesse, confirmação das mutações em *FBN1* e análise da integridade das regiões *off-target* por sequenciamento

Os clones contendo as mutações de interesse foram novamente subclonados utilizando-se a mesma estratégia mencionada anteriormente (plaqueamento de 600-1.000 células/cm²), visto que foi observado que após algumas passagens houve perda de heterozigosidade provavelmente devido à presença da maquinaria de edição gênica em algumas células.

A presença de mutação em heterozigose foi confirmada por sequenciamento para ambos os éxons. Para o éxon 31, as bandas do gel de agarose 2% foram purificadas utilizando-se o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* antes de serem submetidas a sequenciamento utilizando-se os iniciadores E31 *Forward* e *Reverse* (individualmente) para cobertura completa da sequência.

A integridade dos possíveis alvos não intencionais dos gRNAs foi verificada após amplificação por PCR convencional (iniciadores no APÊNDICE A), purificação com o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* ou com o *ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent* (Cat. 75001 – Thermo Fisher Scientific) e sequenciamento.

3.5. Edição do gene *HSPG2* em hiPSCs utilizando-se o sistema CRISPR/Cas9

3.5.1. Desenho dos gRNAs e clonagem no vetor de expressão

Para a geração de linhagens com perda de função do gene *HSPG2* em heterozigose, uma estratégia utilizando a Cas9 *nickase* (RAN et al., 2013a) e dois gRNAs foi construída, tendo como alvo o éxon 4 do gene. O objetivo foi gerar duas quebras próximas de simples fita (*nicks*) na região-alvo, cada uma determinada por um gRNA. As sequências das moléculas guia foram determinadas utilizando-se a plataforma *CRISPR design tool* (<http://crispr.mit.edu/>), do Zhang Lab. Os dois gRNAs escolhidos foram denominados HSPG2_gRNA1 e HSPG2_gRNA2 e sua síntese (em dupla-fita) foi feita pela Sigma Aldrich UK. Uma sequência “ACCG” foi adicionada à extremidade 5’ de cada oligonucleotídeo senso e um “AAAC” à extremidade 5’ de cada oligonucleotídeo antisense, para que os oligonucleotídeos dupla-fita anelados pudessem ser clonados corretamente no vetor U6-gRNA (Denning Lab – mapa no ANEXO B) previamente digerido com a enzima BsaI (MOSQUEIRA et al., 2018) (Figura 10).

- 1) **HSPG2_gRNA1:** 5' **ACCG**A G A G T T C C G A G A G G T G T C C G 3'
3' T C T C A A G G C T C T C C A C A G G C C A A A 5'
- 2) **HSPG2_gRNA2:** 5' **ACCG**C A G C T G A G G G C T G T A C T C G A 3'
3' G T C G A C T C C C G A C A T G A G C T C A A A 5'

Figura 10. Oligonucleotídeos de DNA sintetizados com as sequências dos gRNAs para edição do éxon 4 do gene *HSPG2*. Os dois gRNAs escolhidos, denominados HSPG2_gRNA1 e HSPG2_gRNA2 foram sintetizados como oligonucleotídeos senso e antisense de DNA contendo também os sítios 5`ACCG3’ e 3’CAAA5’, em negrito, para posterior clonagem no vetor plasmidial.

O anelamento dos oligonucleotídeos foi realizado como previamente mencionado (seção 3.4.2) e a reação para clonagem no vetor U6 foi preparada como na Tabela 3. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *E. coli* quimicamente competentes *One Shot™ TOP10* (Cat. C404003 – Thermo Fischer

Scientific) e a purificação do pDNA foi feita utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Cat. A1460 – Promega). A correta inserção dos oligonucleotídeos foi verificada por sequenciamento utilizando-se um iniciador específico para o promotor SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'), do próprio serviço de sequenciamento da Sigma Aldrich.

3.5.2. Construção do vetor doador (pUC57-HSPG2-Blast)

Para anulação de um dos alelos de *HSPG2*, um cassete de resistência ao antibiótico blasticidina foi inserido na região-alvo. Para que isso acontecesse, foi construído um vetor doador contendo a sequência do cassete flanqueada por braços de 1 kb (denominados LA e RA, respectivamente) homólogos à região do éxon 4 do gene. A síntese do vetor aconteceu em quatro passos:

- i. Amplificação dos braços de homologia: cada uma das sequências de 1 kb (LA e RA) foi amplificada de uma amostra de gDNA da linhagem hiPSC^{WT1} utilizando-se iniciadores contendo, além de uma sequência de 26 pb sobreposta entre eles para futuro anelamento, sítios de restrição para as enzimas *SacI* e *Ascl* (par LA) ou *SmaI* e *HindIII* (par RA). A sequência dos iniciadores pode ser encontrada na Tabela 6. Os fragmentos de PCR foram anelados e amplificados utilizando-se a enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Cat. M0530 – NEB), segundo as instruções do fabricante. Os parâmetros de ciclagem foram: 98°C por 30s; 35 ciclos de 98°C por 30 s, 64°C por 60-90 s e 72°C por 90 s; 72°C por 10 min. Os produtos

de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas com tamanho correto (2 kb) foram purificadas utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (Cat. 28704 – QIAGEN), segundo as instruções do fabricante;

- ii. Clonagem no *backbone* de pUC57 (vetor intermediário): após a purificação, o fragmento final foi digerido com HindIII (Cat. R3104 – NEB) por 3 horas e parcialmente digerido com SacI (Cat. R3156 – NEB) por 1 min, purificado de um gel de agarose 1% e ligado ao *backbone* de pUC57 backbone (Eurofins), como na Tabela 3. Após, o vetor foi transformado em bactérias quimiocompetentes e purificado por Miniprep como previamente descrito;
- iii. Purificação do cassete de resistência a blasticidina: um vetor contendo o cassete foi duplamente digerido com Ascl e SmaI (Cat. FD2164 e FD0663, respectivamente – Thermo Fisher Scientific) e o fragmento com o tamanho correto foi posteriormente purificado de um gel de agarose 1%;
- iv. O vetor doador intermediário pUC57 contendo os braços LA e RA foi duplamente digerido com Ascl e SmaI e o cassete purificado foi clonado como anteriormente detalhado. O vetor final pUC57-HSPG2-Blast (APÊNDICE C) foi então sequenciado pelo serviço de sequenciamento Sigma Aldrich UK utilizando-se os iniciadores M13-*Forward* (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') ou M13-*Reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

Tabela 6. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos braços de homologia esquerdo (LA) e direito (RA) do gene *HSPG2*. Os sítios de restrição das respectivas enzimas estão em negrito.

ID	SEQUÊNCIA (5' → 3')
HSPG2_SacI_FWD	GATGCAG AGCTCT GTTCACACCAGTCTGAGATGAATT
HSPG2_AscI_REV	CCCGGGCTCGGAACTCTC GGCGCGCC CTGCATCCTCCAGCTGAG
HSPG2_SmaI_FWD	GGCGCGCCGAGAGTTCCGAG CCCGGG CCGAGGCTGTGGTAGACA
HSPG2_HindIII_REV	ACCCGG AAGCTT GAAATAAAGGCAGTCAGTGCTCAGT

3.5.3. Nucleoporação, seleção e subclonagem de hiPSCs

As linhagens de hiPSCs a serem editadas foram dissociadas com *TrypLE*[™] e 1x10⁶ células foram ressuspensas em 100 µl do tampão *Amaxa P3 Primary Cell*, do *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit L* (Cat. V4XP-3024 – Lonza). Uma mistura de DNA contendo 0,5 µg de cada pU6-gRNA (1 e 2), 1 µg do vetor de expressão da Cas9 *nickase* hCas9_D10A (Cat. 41816 – Addgene, MALI et al., 2013) e 1 µg do vetor pUC57-HSPG2-Blast foram adicionados ao tubo contendo as células. A mistura de células com pDNA foi transferida para uma cubeta e foram submetidas a nucleoporação utilizando-se o programa CA137 do *4D-Nucleofector™ System* (Lonza). As cubetas foram incubadas a 37°C por 5 minutos e, após, 900 µl de E8 suplementado com 10 µM de inibidor de ROCK foram adicionados. As células foram plaqueadas em poços de placas de 6-poços revestidas com MT em 1,5 ml do mesmo meio de cultura. O meio foi trocado por E8 fresco após 24 horas e 48 horas pós-transfecção as células foram replaqueadas na densidade de 300 células por disco de 35 mm. O tratamento com blastocidina (10 µg/ml, Cat. A1113903 – Thermo Fisher Scientific) foi iniciado 24

horas após o plaqueamento e foi mantido (troca diária de E8 suplementado com o antibiótico) até que as colônias atingissem o tamanho de 0,5-1 mm de diâmetro, quando foram individualmente transferidas, de forma manual, pela técnica Maria Barbadillo-Munoz para poços de placas de 48-poços. Os clones individuais foram expandidos e subclonados para manutenção/estoque ou para extração de DNA. A extração foi feita com o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Cat. 69504 – QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

3.5.4. Triagem dos clones obtidos

Para amplificação da região de interesse e genotipagem dos clones obtidos, quatro reações de PCR convencional foram realizadas. Duas para determinar se o cassete foi inserido na região correta e, para isso pares de iniciadores flanqueando as junções entre cada um dos braços de homologia e o cassete foram desenhados (pares HSPG2 LA e HSPG2 RA); uma para amplificar preferencialmente o alelo selvagem, visto que o mutante seria muito maior (2,8 kb contra 5,1 kb, respectivamente), e para isso um par foi desenhado flanqueando a região-alvo (par HSPG2 WT/MT); e uma reação específica para o cassete, para avaliar sua integridade (par HSPG2 cassete). As sequências dos iniciadores encontram-se no APÊNDICE B. As quatro reações foram realizadas para cinco clones de cada grupo (WT, HI e DN) inicialmente, totalizando um máximo de 15 para grupos em que clones positivos não foram encontrados na análise inicial.

Os clones positivos para a inserção foram sequenciados para confirmação e posteriormente expandidos e criopreservados para utilização em experimentos futuros.

3.6. Genotipagem das linhagens paciente-específicas

Para genotipagem das linhagens SMF paciente-específicas, as regiões do éxon 16 ou do éxon 56 do gene *FBN1* foram amplificadas por PCR convencional, utilizando-se os pares de iniciadores E16 e E56, respectivamente (APÊNDICE B). Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* e sequenciados no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP ou no GaTE Lab. Os iniciadores utilizados no sequenciamento foram os E16 interno ou E56 interno.

3.7. Análise da integridade cromossômica (cariótipo e CGH-array)

A preparação das células para análise de cariótipo foi feita como detalhado por MOSQUEIRA e colaboradores (2018). Brevemente, culturas de hiPSCs confluentes foram dissociadas com TrypLE™ como descrito anteriormente e $7-8 \times 10^4$ células/cm² foram replaqueadas em meio E8 suplementado com inibidor de ROCK. Após 24 horas, o meio foi substituído por E8 fresco suplementado com 100 ng/ml de *KaryoMAX™ Colcemid solution* (Cat. 15210040 – Thermo Fisher Scientific) e as culturas foram incubadas por 1-2 horas a 37°C. As células foram dissociadas, centrifugadas (200 G por 5 min) e delicadamente ressuspendidas em solução 0,6% citrato de sódio diluído em água MilliQ/destilada. As amostras foram incubadas à TA por 20 min, centrifugadas (300 G por 5 min, com freio ~4) e ressuspendidas para

fixação em solução 16,7% ácido acético em metanol. As amostras fixadas foram centrifugadas (350 G por 5 min, freio ~4) e ressuspensas na mesma solução para lavagem. Foram realizadas três lavagens, após as quais a centrifugação aconteceu nas velocidades de 400, 450 e 500 G, respectivamente. Após, as células foram novamente ressuspensas em solução de fixação e armazenadas a -20°C para futura preparação das lâminas e análise pelo *Cytogenetics Department do Nottingham City Hospital* ou pela técnica Mara Pinheiro do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP.

Alternativamente, a integridade cromossômica foi analisada por CGH-array (do inglês *array-based comparative genomic hybridization*) pela técnica Silvia Costa em colaboração com os laboratórios da Profa. Dra. Ana Krepischki e da Profa. Dra. Carla Rosenberg do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP. Foram enviadas para análise amostras de gDNA extraído como previamente mencionado.

3.8. Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos (iCMs)

3.8.1. Protocolo 1

A diferenciação cardiomiocítica de hiPSCs foi feita utilizando uma combinação dos protocolos de LIAN et al. (2013) e BURRIDGE et al. (2014). Brevemente, hiPSCs foram individualizadas com TrypLE™ e plaqueadas na em poços revestidos com GTX a uma densidade aproximada de $1,2 \times 10^5$ células/cm² em meio E8 suplementado com 25% mTeSR1™ e 5 μM do inibidor de ROCK Y-27632. Dois dias após o plaqueamento (Dia 0), caso as células estivessem 100% confluentes e compactas, ocorreu a troca para o primeiro meio de diferenciação

cardiomiocítica (RPMI/B27⁻ suplementado com o inibidor de GSK-3 β CHIR99021 – Cat. 361571 – Merck). O meio RPMI/B27⁻ é constituído de meio RPMI 1640 (Cat. 11875135 – Thermo Fischer Scientific) e B27 sem insulina 1X (Cat. A1895601 – Thermo Fischer Scientific). Nos dias subsequentes até o dia 4, foram utilizados os meios RPMI/B27⁻ suplementado com BMP4 (Cat. 314-BP – R&D Systems) e CHIR99021, RPMI/B27 (RPMI suplementado com B27 1X, Cat. 17504044 – Thermo Fisher Scientific) suplementado com os inibidores da via de Wnt KY02111 (Cat. 14315) e XAV939 (Cat. 13596), ambos da Cayman Chemical. Após, a troca aconteceu com meio CDM3 (BURRIDGE et al., 2014) até o dia 13-15, quando as células foram dissociadas por incubação com tripsina-EDTA 0,25% (Cat. 25200072 – Thermo Fischer Scientific) por 10 minutos à TA e replaqueadas em RPMI/B27 suplementado com 5 μ M do inibidor de ROCK Y-27632 na matriz GTX. As trocas subsequentes foram feitas a cada dois ou três dias com CDM3 até o dia 20, 30, 40, 50, 60, 75 ou 90 pós início da diferenciação, quando as células foram fixadas ou coletadas.

Para o teste de diferentes matrizes comerciais, os iCMs foram novamente dissociados no dia 25 e replaqueados da mesma forma em GTX, L7TM hPSC Matrix (Cat. FP-5020 – Lonza) ou laminina 521 recombinante humana (Cat. LN521 – BioLamina).

3.8.2. Protocolo 2 (Denning Lab)

As hiPSCs foram dissociadas com TrypLETM e plaqueadas a densidades específicas (1,6-4,8x10⁴ células/cm²) em E8 suplementado com inibidor de ROCK

Y-27632. Após 24 horas, o meio foi substituído por E8 fresco e, no dia seguinte, a indução da diferenciação foi iniciada segundo detalhado por MOSQUEIRA et al. (2018) . No dia 12 pós-início da diferenciação, o meio de manutenção RPMI/B27 foi substituído por RPMI sem glicose (Cat. 11879020 – Thermo Fischer Scientific) suplementado com lactato 4 mM (cat. 71718 – Sigma Aldrich) por quatro dias para purificação das culturas por seleção metabólica dos iCMs, com troca de meio acontecendo após 48 horas. A partir do dia 15, o meio de manutenção RPMI/B27 utilizado e as trocas aconteceram a cada dois dias. No dia 18, os iCMs foram dissociados com colagenase-II, como previamente descrito (BRECKWOLDT et al., 2017), e replaqueados em poços revestidas com vitronectina (VN, Cat. A14700 – Thermo Fisher Scientific) ou fibronectina (FN, Cat. 11051407001 – Roche).

3.8.3. Geração das cardioesferas

Para geração das cardioesferas, após a dissociação (dias 13-18) os iCMs foram plaqueados em placas de 96-poços com fundo V na densidade de 10.000 células/poço em 50 μ L de RPMI/B27 suplementado com 5 μ M do inibidor de ROCK. Imediatamente após, as placas foram submetidas a centrifugação a 100 G por 5 minutos. O meio foi substituído por RPMI/B27 ou CDM3 após 48 horas e as trocas subsequentes foram realizadas três vezes por semana.

3.8.4. Tratamentos

Quando requerido, o meio foi substituído por CDM3 ou RPMI/B27 suplementado com 10 ou 100 nM de Endotelina-1 (ET-1, Cat. E7764 – Sigma Aldrich) ou ainda com 100 nM de Bosentan (BOS, Cat. SML1265 – Sigma Aldrich)

e mantido por 18-24 horas até a fixação ou coleta. A Brefeldina A (BFA, Cat. B7651 – Sigma Aldrich) foi utilizada na concentração de 1 µg/ml por 3 horas antes da fixação para os ensaios de BNP. A BFA é um bloqueador de tráfego proteico, que impede a secreção de proteínas pela célula.

3.9. Análise de contaminação por micoplasma

A análise da presença de micoplasma foi feita utilizando-se o *MycoScope PCR Mycoplasma Detection Kit* (Cat. MY01100 – Genlantis), segundo instruções do fabricante. Foram utilizadas amostras de sobrenadante de culturas de hiPSCs confluentes (>80%) após fervura a 95 °C por 5 minutos.

3.10. Citometria de fluxo

Para os experimentos de citometria de fluxo, os iCMs foram individualizados com tripsina-EDTA 0,25%, centrifugados a 300 G por 5 minutos, lavados com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS – Cat. 14190250 – Thermo Fischer Scientific) e fixados com solução de formaldeído 1% por 15 minutos a 4°C (1 ml/10⁶ células). Em seguida, as células foram lavadas novamente com DPBS e armazenadas por até dois dias a 4°C, ou imediatamente permeabilizadas com a solução Perm/Wash™ Buffer 10X (Cat. 554723 – BD Biosciences) (500 µl/10⁶ células) por 30 minutos à TA. Após centrifugação a 500 G por 5 minutos, as amostras foram divididas em tubos de microcentrífuga (pelo menos 500.000 células/tubo), ressuspendidas em 50 µl de Perm/Wash contendo ou não o anticorpo primário *PE Mouse Anti-Cardiac Troponin T* (cTNNT2, 1:100, Cat. 564767 – BD Biosciences). A incubação com o anticorpo foi feita por 1h à TA. Em seguida, as amostras foram

lavadas duas vezes com a solução Perm/Wash e ressuspendidas em *Fetal Bovine Serum Stain Buffer* (Cat. 554656 – BD Biosciences). A análise da expressão do marcador cTNNT2 foi realizada utilizando-se o equipamento *BD Accuri™ C6 Cytometer* (BD Biosciences) ou o *Cytomics FC 500 flow cytometer* (Beckman Coulter). Os dados foram analisados no *BD Accuri™ C6 Software* (BD Biosciences) ou no *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter) após exclusão de *debris* celulares e *doublets/triplets*. A tolerância máxima de falsos positivos foi de 1,5%.

3.11. Imunocitoquímica de fluorescência (IF)

3.11.1. Marcadores de pluripotência e fibrilina-1

Para os experimentos de imunocitoquímica de fluorescência, hiPSCs ou EBs foram plaqueados em lâminas de vidro para cultura celular (Cat. 154534 – Thermo Fisher Scientific) a uma concentração aproximada de $2-3 \times 10^4/\text{cm}^2$ ou 2-3 EBs por poço. Decorrido o tempo de cultivo necessário (48 horas para hiPSCs e 10-25 dias para EBs), após lavagem com DPBS, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% e sacarose 4% por 20 minutos à TA. Para análise da expressão de marcadores de pluripotência nas hiPSCs, foi utilizado o *Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit* (Cat. A24881 – Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante. Para os EBs, a permeabilização foi feita com solução Triton-X 0,1% (Cat. T8787 – Sigma Aldrich) em DPBS por 15 min à TA e o bloqueio com solução BSA 4% em DPBS por 1 hora à TA. A marcação foi feita com incubação das amostras com um dos anticorpos anti-fibrilina-1 (1:100, Cat. MAB2502 – Millipore; 1:500, Cat.

HPA021057 – Sigma Aldrich; 1:100, Cat. ab3090 - Abcam) diluídos em em solução de DPBS-BSA 4% por aproximadamente 18 horas a 4 °C. Também foi testado o anticorpo policlonal anti-fibrilina-1 α -rF6H (1:500-1:1.000) gentilmente doado pelo laboratório do Dr. Reinhardt (McGill University, Canadá). Após três lavagens com solução Tween-20 0,1% em DPBS por 5 min, as células foram incubadas com os anticorpos secundários anti-camundongo AlexaFluor® 647 ou 594 (Cat. A21235 e A11020, respectivamente) e/ou anti-coelho AlexaFluor® 488 (Cat. 11008 – todos 1:500, Thermo Fischer Scientific) diluídos em DPBS-BSA 4%, por 2 horas à TA. As amostras foram novamente lavadas três vezes com solução Tween-20 0,1% em DPBS por 5 min e incubadas com Hoechst (Cat. H3570 – Thermo Fisher Scientific) 0,5 μ g/ml diluído em DPBS por 5 minutos à TA. Uma nova lavagem com DPBS foi realizada e as lâminas foram montadas para posterior visualização e aquisição de imagens no Microscópio de Super-Resolução *LEICA STED 3X* (Leica) pelo técnico Waldir Caldeira, no Centro de Aquisição de Imagens e Microscopia do IB-USP, ou no *Axio Imager.D2* (Zeiss). As montagens com as imagens foram realizadas no *software ImageJ (Fiji)* (SCHINDELIN et al., 2012).

3.11.2. KI67, α -actinina, cTNNT2, BNP e vinculina

As hiPSCs foram dissociadas e replaqueadas (10.000 células/poço) em placas de 96 poços (Cat. 6005550 – Perkin Elmer) e, após 48 horas, foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 15 min à TA. Para os iCMs, foram plaqueadas $5-6 \times 10^4$ células/poço em placas revestidas com VN após dissociação com colagenase no dia 12-18 de diferenciação. As células foram fixadas nos dias

14, 16, 18, 20, 30 ou 35, como mencionado acima. Para análise dos níveis de BNP, os iCMs foram tratados por 24 horas com ET-1 ou BOS e por 3 horas com BFA antes da fixação. Após, o protocolo seguido foi o mesmo mencionado no item anterior, com exceção da solução de bloqueio/diluição dos anticorpos que foi preparada com soro de cabra (Cat. G9023 – Sigma Aldrich). Os anticorpos primários utilizados foram o anti-KI67 (1:200, Cat. ab16667 – Abcam), anti- α -actinina (1:800, Cat. A7811 – Sigma Aldrich), anti-cTNNT2 (1:500, Cat. ab45932 – Abcam), anti-ProBNP4 (1:500, Cat. ab13115 – Abcam), ou anti-vinculina (1:200, Cat. ab73412 – Abcam). O núcleo e citoplasma celulares foram corados com solução de DAPI (Cat. D9542 – Sigma Aldrich) 0,5 μ g/ml e *HCS CellMask™ Orange Stain* (1:10000, Cat. H32713 – Thermo Fisher Scientific), respectivamente, diluídos em DPBS (incubação por 30 min à TA). As amostras foram mantidas em DPBS a 4°C até visualização no *Operetta High-Content Imaging System* (Perkin Elmer). As imagens foram analisadas no *Harmony high-content imaging analysis software* (Perkin Elmer) e a pureza da diferenciação de cardiomiócitos (porcentagem de células positivas para α -actinina ou cTNNT2), multinucleação e níveis (baixo, médio e alto) perinucleares de BNP foram calculados utilizando-se algoritmos previamente desenvolvidos no Denning Lab (MOSQUEIRA et al., 2018). Alternativamente, imagens foram adquiridas no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP) utilizando-se os equipamentos *High Content Imaging InCell Analyzer 2200* (GE) ou o Confocal Zeiss *LSM-780-NLO* (Zeiss) e posteriormente analisada no *software ImageJ (Fiji)* (SCHINDELIN et al., 2012).

3.12. Western Blot (WB)

3.12.1. Extração de proteínas e quantificação

Culturas celulares foram lavadas duas vezes com DPBS e incubadas com tampão de lise para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) suplementado com *Protease Inhibitor Cocktail* (1:100, Cat. P8340 – Sigma Aldrich), *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2* (1:100, Cat. P5726 – Sigma Aldrich) e *Phosphatase Inhibitor Cocktail 3* (1:100, Cat. P0044 – Sigma Aldrich) por 15 minutos no gelo. Após, os lisados celulares foram coletados diretamente das placas de cultura com rodos de raspagem estéreis e as amostras foram sonicadas com 50% de amplitude de pulso por dois ciclos de 30 segundos no *Q700 Sonicator* (QSonica Sonicators). As amostras foram então incubadas por 15 minutos no gelo e centrifugadas a 14.000 G por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo o extrato proteico foram coletados e armazenados a -80°C. A concentração de cada amostra foi determinada por meio de ensaio colorimétrico de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Cat. 500-0006 – Bio-rad) segundo as instruções do fabricante.

3.12.2. SDS-PAGE e transferência gel-membrana

Para cada amostra, 15-50 µg de proteína foram ressuspensos em tampão de amostra 4X e a mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para desnaturação. As amostras foram corridas em geis 3-8% *NuPAGE® Novex® Tris-Acetate* (Cat. EA03755BOX – Thermo Fischer Scientific) por 1 hora a 150 V em *NuPAGE™ Tris-Acetate SDS Running Buffer* (Cat. LA0041 – ThermoFischer Scientific). Foi utilizado o padrão *HiMark™ Pre-stained Protein Standard* (Cat.

LC5699 – ThermoFischer Scientific) para estimativa do peso molecular das proteínas (bandas) de interesse. A transferência para membranas de PVDF (Millipore) foi feita por 1 h 30 a amperagem constante (125 mA) em *NuPAGE™ Transfer Buffer* (Cat. NP0006 – Thermo Fischer Scientific).

3.12.3. *Imunobloting*

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de 5% leite desnatado diluído em *Tris Buffered Saline* 1X Tween-20 0,1% (TBST) por 1 hora à TA. A incubação com os anticorpos primários (diluídos em solução de bloqueio) anti-fibrilina-1 (1:100, Cat. HPA021057 – Sigma Aldrich; 1:100, Cat. PA527358 – Thermo Fischer Scientific; 1:100, Cat. ab3090 – Abcam; ou 1:2.000 do anticorpo do Reinhardt Lab), anti-vinculin (1:10.000, Cat. ab73412 – Abcam) ou anti- β -actin (1:7.000, sc-47778 – Santa Cruz Biotechnology) foi feita por aproximadamente 18 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (3x15 min) e incubadas com o respectivo anticorpo secundário anti-coelho HRP (1:15.000, Cat. G21234 – Thermo Fischer Scientific) ou anti-camundongo (1:13.000, Cat. G21040 – Thermo Fischer Scientific) diluídos em 1% leite desnatado em TBST por 2 horas à TA. Após três lavagens por 15 min com TBST, as membranas foram reveladas utilizando-se o substrato de peroxidase *Luminata™ Forte Western HRP Substrate* (Cat. WBLUF0500 – Millipore).

3.13. PCRs reverso (RT-PCR) e quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

3.13.1. Extração de RNA

Para extração de RNA, as células foram coletadas e lisadas com o reagente *TRIzol*® (Cat. 15596026 – Thermo Fischer Scientific). A extração e o tratamento com DNase dos iCMs foi realizada com o kit *Direct-zol RNA Miniprep Plus* (Cat. R2071 – Zymo Research) segundo as instruções do fabricante.

Para os demais tipos celulares, os lisados em TRIzol® foram incubados por 5 minutos à TA e, após adição de 200 µl de clorofórmio e incubação por 3 minutos, foram centrifugadas a 12.000 G por 15 minutos (4°C). A fase incolor observada após a centrifugação foi transferida para tubos estéreis e, em cada um destes, foi adicionado 1 volume de etanol 70% preparado com água tratada com o inibidor de RNAase dietilpirocarbonato (DEPC, Cat. D5758 – Sigma Aldrich). As etapas seguintes foram realizadas utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Cat. 74106 – QIAGEN) e o *RNase-Free DNase Set* (Cat. 79254 – QIAGEN) segundo as instruções do fabricante.

3.13.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Entre 200 ng e 2 µg de RNA total foram utilizados para a síntese de DNA complementar (cDNA) segundo as instruções do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Cat. 4368814 – Thermo Fischer Scientific) ou do kit *SuperScript™III Reverse Transcriptase* (Cat. 18080093 – Thermo Fisher Scientific).

3.13.3. Avaliação da qualidade da transcrição reversa

Para controle da qualidade do cDNA sintetizado, o gene GAPDH foi amplificado por PCR convencional utilizando-se o mesmo par de iniciadores

posteriormente adotado para o PCR quantitativo (Tabela 7). A reação foi feita com a *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* e seu respectivo tampão para alto conteúdo GC, segundo instruções do fabricante. A ciclagem adotada foi a sugerida no manual da enzima, sendo a temperatura de anelamento 72 °C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% e, em caso de contaminação com DNA genômico, uma banda de tamanho 356 pb foi observada, além da esperada para o cDNA (116 pb).

3.13.4. Sequenciamento do DNA complementar

Quando requerido, as amostras de cDNA foram amplificadas por PCR convencional utilizando-se iniciadores específicos para os éxons 2, 31, 16 ou 56 do gene *FBN1* (APÊNDICE B). Os produtos obtidos foram purificados e submetidos a sequenciamento como previamente detalhado. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento da região dos éxons 16 e 56 foram os E16 cDNA interno e E56 cDNA interno, respectivamente (APÊNDICE B). Para os éxons 2 e 31, foram utilizados os mesmos iniciadores da amplificação.

3.13.5. Padronização de iniciadores específicos (*SYBR™ Green*)

Para análise de expressão gênica, foram desenhados iniciadores específicos para o alelo selvagem de *FBN1* e para o gene de expressão estável *HPRT1*; para o gene de expressão estável *GAPDH*, as sequências foram obtidas de KUZNETSOV; CHERMAN; ROBEY (2011). O reagente utilizado para quantificação da amplificação foi o corante *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Cat.

4309155 – Thermo Fisher Scientific) e as reações foram preparadas como se segue:

cDNA (10 ng/ μ l)	1 μ l
Iniciador <i>Forward</i>	1 μ l
Iniciador <i>Reverse</i>	1 μ l
<i>SYBR</i> [™] <i>Green 2X</i>	5 μ l
H ₂ O milliQ	2 μ l
TOTAL	10 μl

Na primeira etapa de padronização, diferentes concentrações de cada iniciador foram testadas (1, 2, 4 e 8 μ M). O termociclador utilizado foi o *Applied Biosystems StepOnePlus*[™] *RealTime PCR System* (Thermo Fisher Scientific) e a ciclagem utilizada foi a padrão. Ao final do processo, a especificidade das reações foi validada analisando-se a curva de dissociação do produto amplificado (curva de *melting*) no próprio programa e, quando necessário, também por eletroforese em gel de agarose 2%. Também no *software*, um limiar (*threshold*) foi manualmente definido em um ponto da curva de amplificação em que a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva encontra-se na fase logarítima. O ciclo da reação em que a fluorescência da amostra intercepta o limiar é chamado C_T (*cycle threshold*), e a comparação da expressão gênica de diferentes amostras é feita por meio da comparação entre os C_Ts. A concentração de iniciadores adotada para cada par foi a que proporcionou maior eficiência de amplificação (menor valor de C_T) sem prejuízo na especificidade.

A segunda etapa de padronização consistiu na determinação da eficiência de amplificação para cada par de iniciadores. Para isso, foram feitas reações utilizando a concentração determinada anteriormente e cinco quantidades de cDNA resultantes de diluições seriadas (100; 10; 1; 0,1 e 0,01 ng). Foi construída uma curva-padrão da média dos Cts obtidos para cada concentração em função do logaritmo da quantidade de cDNA, e o coeficiente angular da reta resultante (a em $y = ax + b$) foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores por meio da fórmula:

$$\text{Eficiência (Ef)} = 10^{-1/a}$$

A tabela abaixo apresenta as sequências dos iniciadores e suas respectivas concentrações adotadas, além da eficiência calculada após padronização:

Tabela 7. Sequência dos iniciadores utilizados para PCR quantitativo em tempo real (SYBR™ Green), suas respectivas concentrações (CONC.) e valores de eficiência (EF.) obtidos após padronização.

GENE	SEQUÊNCIA (5' -> 3')	CONC.	EF.
<i>FBN1</i> WT	FW: TTTCCAGCCAGCTGTGGACCAAACG RV: ACGAACGGGGTGGGGACTAAACAAC	1 µM	1,76
<i>GAPDH</i>	FW: GCCTCCCGCTTCGCTCTCTG RV: CGTTGACTCCGACCTTCACCTTCC	2 µM	2,09
<i>HPRT1</i>	FW: ATATGCCCTTGACTATAATGA RV: CTTTTCCAGTTTCACTAATGACA	4 µM	1,89

3.13.6. Reações para os genes de interesse e cálculo da expressão gênica diferencial

3.13.6.1. Reações com ensaios *TaqMan*®

Para a detecção da expressão de alguns genes, foram utilizadas sondas (ensaios) comerciais (*TaqMan*® Assays, Cat. 4331182 – Thermo Fisher Scientific), além do reagente *TaqMan*™ *Gene Expression Master Mix* (Cat. 4369016 – Thermo Fisher Scientific). As reações foram preparadas como se segue:

cDNA (10 ng/μl)	1 μl
Sonda	0,5 μl
<i>Taqman</i> ™ <i>Master Mix</i> 2X	5 μl
H ₂ O milliQ	3,5 μl
TOTAL	10 μl

Os seguintes ensaios foram utilizados: *FBN1* (Hs00171191_m1 e Hs00973164_m1), *FBN2* (Hs00266592_m1), *ELN* (Hs00355783_m1), *NPPA* (Hs00383230_g1), *NPPB* (Hs00173590_m1), *ACTA1* (Hs00559403_m1), *HPRT1* (Hs02800695_m1), *GAPDH* (Hs02786624_g1) e *ACTB* (Hs99999903_m1). Os termocicladores utilizados foram o *Applied Biosystems StepOnePlus*™ *RealTime PCR System* ou o *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fischer Scientific).

Os valores de Ct obtidos pelo *software* foram usados para o cálculo da expressão gênica diferencial entre as amostras a serem comparadas. Todas

as reações foram realizadas em duplicata ou triplicata e foram considerados aceitáveis resultados cujas diferenças entre os C_Ts das réplicas foram menores que 0,5. A diferença entre os valores de C_T de amostras diferentes obtidos para o gene de interesse após normalização pelos C_Ts de um gene de expressão estável ou pela média geométrica dos C_Ts de múltiplos genes de expressão estável (no nosso caso, *HPRT1*, *GAPDH* e/ou *ACTB*) é chamada ΔC_T e reflete sua expressão diferencial. O cálculo da expressão diferencial relativa (*fold-change*) foi feito utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, em que o ΔΔC_T foi calculado como: ΔC_T da amostra de interesse - ΔC_T da amostra referência (controle). Foi desenvolvida uma função em linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019) para estes cálculos, e o código completo encontra-se no APÊNDICE D.

3.13.6.2. Reações SYBR™ Green

Para os iniciadores padronizados na seção 3.13.5, após realização das reações como previamente mencionado, o cálculo da expressão relativa foi realizado segundo PFAFFL (2001), utilizando-se a fórmula:

$$expressão\ relativa = \frac{E_{gene\ alvo}^{Ct\ ref - Ct\ amostra}}{\sqrt{E_{HPRT1}^{Ct\ ref - Ct\ amostra} \times E_{GAPDH}^{Ct\ ref - Ct\ amostra}}}, \text{ sendo } ref$$

a amostra referência (controle) e *HPRT1* e *GAPDH* os genes de expressão estável utilizados.

Também foi desenvolvida uma função em linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019) para estes cálculos, e o código completo encontra-se no APÊNDICE E.

3.14. Análise de expressão gênica em embriões humanos utilizando dados de RNA-seq publicados

Os dados de transcriptoma gerados por CUI et al. (2019) foram obtidos por meio de acesso ao website do *National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO)* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) utilizando-se o número de identificação ID GSE106118.

Inicialmente, os dados de expressão dos genes de interesse nos ventrículos esquerdos (LV) de todos os embriões foram manualmente selecionados e salvos em arquivos separados. Após, os dados das células individuais de cada embrião foram filtrados utilizando-se informações de classificação de cada uma das células em um *cluster* (tipo celular) específico. Essas informações estão disponibilizadas em tabelas suplementares do artigo. Desta forma, apenas os dados de expressão gênica das células classificadas como cardiomiócitos ou fibroblastos (*fibroblast-like*) foram utilizados para cada embrião, e o $\log_2 + 1$ da contagem de transcritos por milhão (TPM) para cada célula, assim como a média, mediana e desvio padrão para cada embrião/embriões de mesmo estágio foram calculados e representados graficamente.

A filtragem das células de interesse, assim como os cálculos posteriores e os gráficos foram feitos utilizando-se a linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM,

2019) no software R Studio (RSTUDIO TEAM, 2015). O código desenvolvido e utilizado nestas etapas encontra-se no APÊNDICE F.

3.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas na linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019) no programa RStudio (RSTUDIO TEAM, 2015), e todos gráficos foram gerados com o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009), exceto quando especificado. A escolha entre testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) ou paramétricos (teste-t e ANOVA) foi feita após análise da distribuição dos dados e execução do teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. hiPSCs derivadas de pacientes portadores da SMF como modelo de estudo dos fenótipos cardíacos

4.1.1. Dados clínicos dos pacientes e caracterização de suas variantes em *FBN1*

Previamente em nosso laboratório foram geradas duas linhagens de hiPSCs a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores da SMF, diagnosticados pela Profa. Dra Ana Beatriz Alvarez Perez, pesquisadora da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP e nossa colaboradora. Além disso, para serem utilizados como controles, escolhemos duas linhagens derivadas de indivíduos não portadores da síndrome, também anteriormente geradas e caracterizadas no laboratório (TOFOLI et al., 2016), mas como parte

do projeto Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto (ELSA-Brasil – www.elsa.org.br). Foram escolhidas, para estes indivíduos controle, características como sexo e faixa etária que fossem compatíveis com as dos pacientes SMF. Os dados clínicos de todos os indivíduos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Características clínicas dos pacientes SMF e controle. As idades apresentadas são as do momento da coleta do sangue utilizado para a reprogramação em hiPSCs. F: feminino; M: masculino.

Linagem	Sexo	Idade	Características clínicas
hiPSC ^{SMF1}	F	40	SMF: fenótipo marfanoide, miopia, dilatação da aorta e transplante renal por doença aparentemente não relacionada.
hiPSC ^{SMF2}	M	51	SMF: fenótipo marfanoide, miopia e luxação do cristalino, dissecação da aorta operada.
hiPSC ^{WT7}	F	57	Controle: não hipertenso, não diabético, não obeso.
hiPSC ^{WT16}	M	51	Controle: não hipertenso, não diabético, não obeso.

De forma a se diagnosticar molecularmente a SMF nos indivíduos afetados, também anteriormente a este projeto foi feito um sequenciamento de exoma de amostras dos pacientes. Foram observadas variantes patogênicas no gene *FBN1* em ambos os indivíduos, confirmando-se assim o diagnóstico. Para o paciente 1 (linagem hiPSC^{SMF1}), foi identificada uma alteração de troca de sentido (*missense*) em heterozigose no éxon 56 (da referência [NG_008805.2](#)), como demonstrado na Figura 11A. Para o paciente 2 (linagem hiPSC^{SMF2}), foi

detectada uma deleção de dois pares de bases no éxon 16, também em heterozigose (Figura 11B).

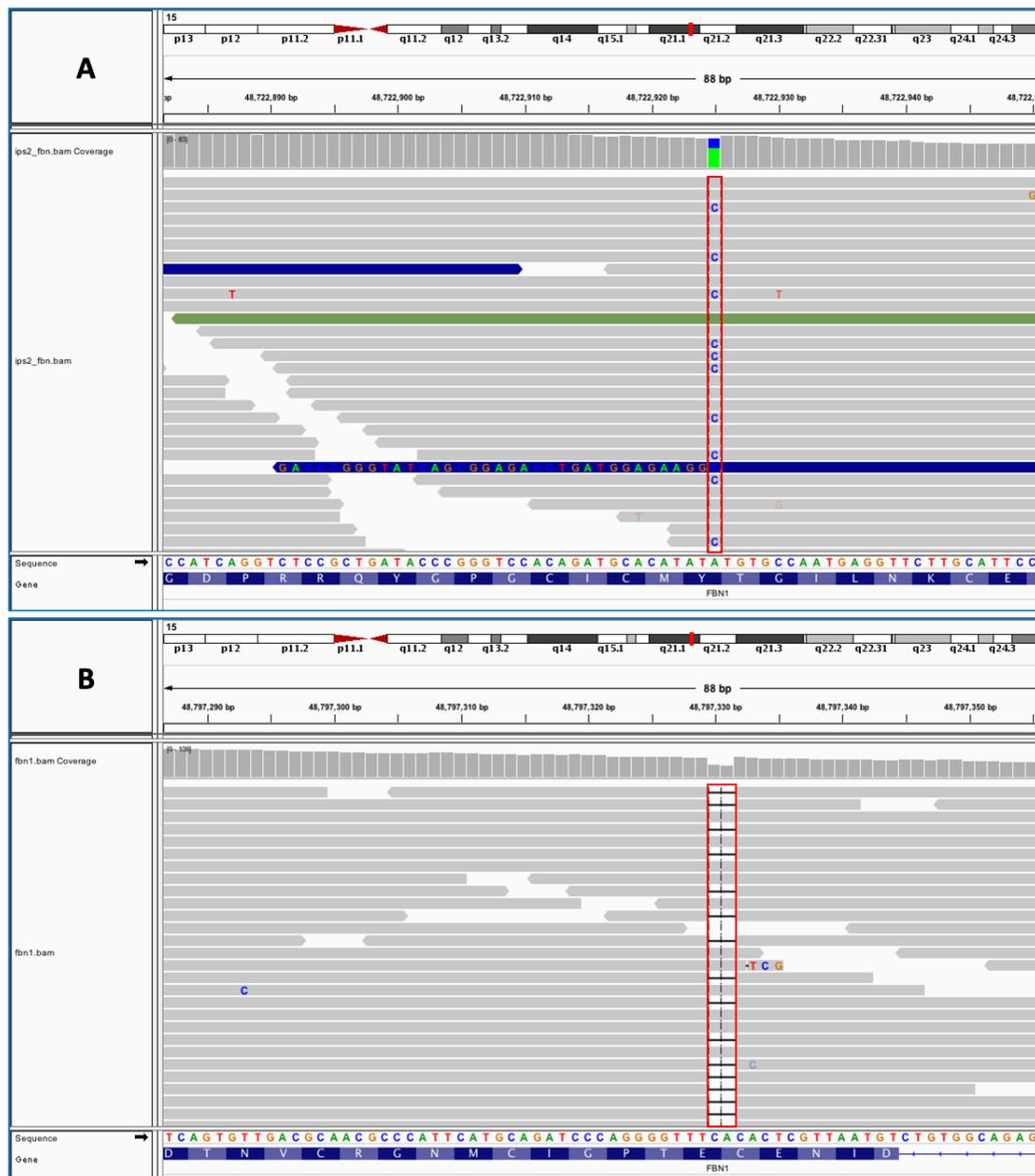


Figura 11. Resultados do sequenciamento de exoma dos pacientes clinicamente diagnosticados com Síndrome de Marfan. (A) Resultados obtidos para amostras do paciente 1. Observa-se, no retângulo vermelho, uma alteração A>C, presente apenas em algumas das leituras (*reads* – linhas horizontais em cinza), o que indica heterozigose. (B) Resultados obtidos para o paciente 2. Pode-se observar a deleção de dois pares de base (indicada por “—” dentro do

retângulo vermelho) também em heterozigose. A posição das alterações no cromossomo 15, região 15q21.1, está indicada no topo de cada painel. A sequência referência (da fita-molde) e sua tradução esperada encontram-se na base dos painéis.

Para se confirmar a presença das variantes encontradas no exoma, desenhamos iniciadores específicos para as respectivas regiões alteradas em cada um(a) dos pacientes/linhagens (APÊNDICE B). Após amplificação por PCR, sequenciamos os fragmentos de gDNA obtidos e confirmamos a presença das alterações, conforme demonstrado na Figura 12. Análises *in silico* indicaram que a variante presente na linhagem hiPSC^{SMF1} acarreta a substituição do aminoácido 2272 (tirosina - Y) por um ácido aspártico (D), no domínio cbEGF #35 na porção mais C-terminal da fibrilina-1, um resíduo-consenso importante na manutenção da estrutura do domínio (RAMIREZ et al., 1993; HANDFORD, 2000). As ligações ao cálcio nos domínios cbEGF são importantes para a manutenção estrutural das microfibrilas, pois, entre outras funções, mediam interações entre os monômeros de fibrilina-1 (RAMIREZ; GAYRAUD; PEREIRA, 1999; HANDFORD, 2000). Além disso, a variante p.Y2272D (c.T6814G) já foi previamente descrita como patogênica na plataforma *UMD-Predictor* (<http://umd-predictor.eu/> - FRÉDÉRIC et al., 2009), e outras trocas do mesmo resíduo (p.Y2272C; p.Y2272N; p.Y2272H) também já foram reportadas em outros pacientes (COLLOD-BÉROUD et al., 2003; FRÉDÉRIC et al., 2009), reforçando assim a importância da manutenção deste aminoácido nesta posição em particular. Para este paciente, devido às características da variante patogênica, o mecanismo molecular causador mais provável parece ser o de dominância negativa (DN) (FRANKEN et al., 2015).

Para a linhagem hiPSC^{SMF2}, análises *in silico* indicam que a deleção de dois pares de base no éxon 16 altera o quadro de leitura e leva ao surgimento de PTC no mesmo éxon, o que pode acarretar a degradação do mRNA pelo mecanismo mediado por mutações sem sentido (NMD) (revisado por POPP; MAQUAT, 2016) ou à produção de uma proteína truncada. Sabe-se que a ocorrência de PTCs como consequência de alterações no gene *FBN1* está comumente relacionada ao mecanismo de haploinsuficiência na SMF (ROBINSON et al., 2006; LOEYS, 2016), visto que na maior parte dos casos leva a uma produção diminuída de proteína, justamente devido à degradação do mRNA alterado (SCHRIJVER et al., 2002). Desta forma, acreditamos que, no caso do paciente 2 (hiPSC^{SMF2}), o mecanismo molecular causador da SMF mais provável seja o de HI (FRANKEN et al., 2015).

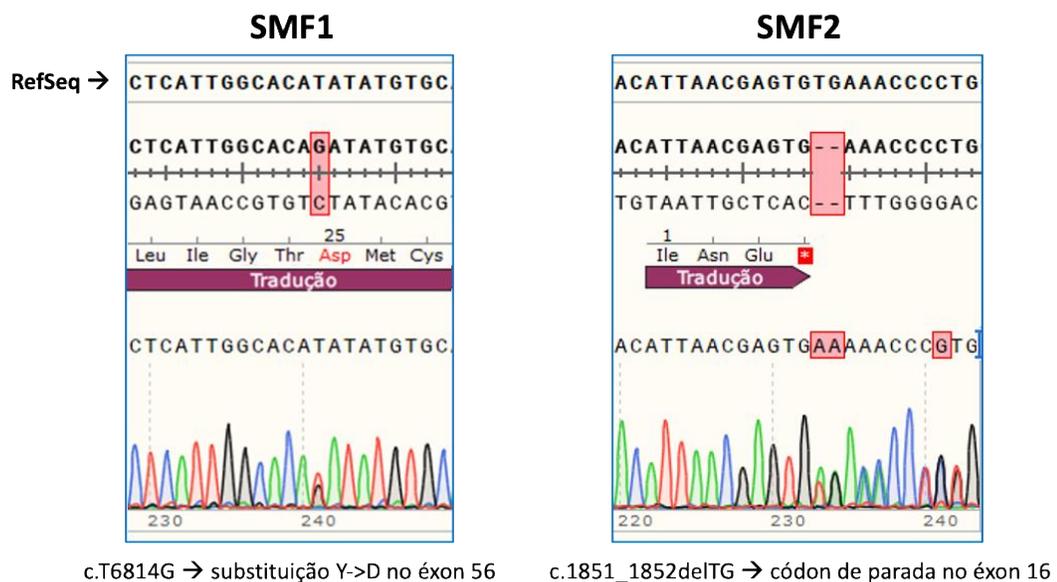


Figura 12. Sequenciamento das regiões de localização das variantes patogênicas do gene *FBN1* nas linhagens de hiPSCs derivadas de pacientes portadores da Síndrome de Marfan. Os cromatogramas foram obtidos após sequenciamento dos fragmentos de gDNA de regiões

específicas (éxon 56, para SMF1 e éxon 16 para SMF2) do gene *FBN1* para confirmação das mutações encontradas no sequenciamento de exoma. A sequência referência (RefSeq) está indicada no topo e as sequências obtidas para cada linhagem encontram-se logo abaixo, com quadros vermelhos indicando *mismatches*, sendo a alteração *missense* T>G demonstrada para SMF1 e (--) indicando a deleção de dois pares de base (TG) em SMF2. As consequências de cada variante na tradução da proteína também estão indicadas. O símbolo (*) no quadro vermelho indica um códon de parada. Y: tirosina; D: ácido aspártico.

É importante ressaltar que o sequenciamento de ambos os éxons (16 e 56) foi realizado também para as linhagens selvagens (WT) hiPSC^{WT7} e hiPSC^{WT16}, além de hiPSC^{SMF1} e hiPSC^{SMF2}. Foi detectada a presença de uma variante sinônima (c.1875T>C; p.N625N) em heterozigose, classificada como não patogênica (segundo o *UMD Predictor* – FRÉDÉRIC et al., 2009), nas linhagens hiPSC^{WT7} e hiPSC^{SMF1} (Figura 13). Este polimorfismo (rs.25458 no dbSNP do NCBI – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) já foi correlacionado à maior estatura em um grupo de indivíduos japoneses saudáveis (MAMADA et al., 2006), mas não foi associada à SMF. A presença dessa variante em uma das linhagens WT, mas não na outra, possibilita que usemos o sequenciamento destas regiões (éxons 16 e 56) não somente para a genotipagem das duas linhagens SMF, mas também para identificar hiPSC^{WT7} e hiPSC^{WT16}. Isso facilita o frequente monitoramento da identidade dessas linhagens, não sendo necessário recorrer à análise de repetições curtas em tandem (STR) normalmente realizada em nosso laboratório para este fim (SARAFIAN et al., 2018).

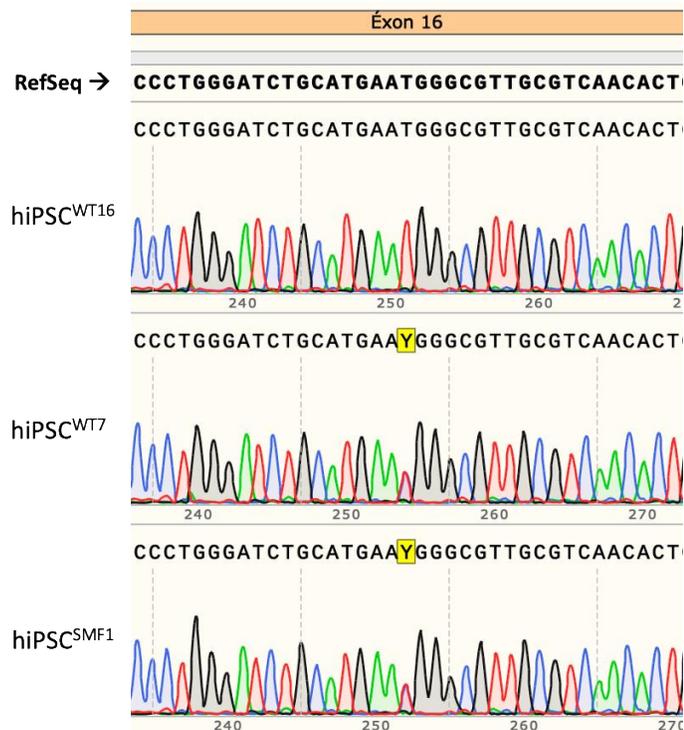


Figura 13. Sequenciamento do éxon 16 do gene *FBN1* nas linhagens de hiPSCs utilizadas.

Os cromatogramas foram obtidos após sequenciamento dos fragmentos de gDNA da região que compreende o éxon 16 do gene *FBN1*. A sequência referência (RefSeq) está indicada no topo e as sequências obtidas para cada linhagem encontram-se logo abaixo. O quadro amarelo (Y) indica a presença de uma pirimidina (T ou C) na posição, indicando heterozigose.

Em resumo, confirmamos a presença de variantes patogênicas no gene *FBN1* das linhagens SMF paciente-específicas e discutimos suas possíveis consequências. Concluímos assim a etapa de diagnóstico molecular nessas linhagens, qualificando-as como modelos para o estudo *in vitro* de fenótipos da síndrome. A Tabela 9 resume as alterações encontradas em cada uma e também seus efeitos hipotéticos no nível proteico, segundo suas características.

Tabela 9. Nomenclatura, variantes patogênicas em *FBN1* e seus efeitos preditos na proteína fibrilina-1 para linhagens de hiPSCs derivadas de indivíduos saudáveis (WT) ou portadores da Síndrome de Marfan (SMF).

Linhagem	IDs	Variante patogênica	Efeito predito na fibrilina-1
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/WT}	WT7, WT16	-	WT
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/E56_T>G}	SMF1	c.6814T>G	DN*
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/KO}	SMF2	c.1851_52delTG	HI*

IDs: identificação adotada; HI: haploinsuficiente; DN: dominante negativo. *Predições baseadas nas características de cada variante.

4.1.2. Diferenciação em cardiomiócitos

Como descrito anteriormente, COOK et al. (2014) relatam que a ocorrência de DCM em um modelo murino para a SMF (mgR/mgR – haploinsuficiente) é uma característica primária da síndrome e não secundária, como se acreditava anteriormente. Diante disso, exploramos a hipótese de que cardiomiócitos derivados das linhagens de hiPSCs descritas acima (iCMs^{SMF}) se comportariam de forma diferente *in vitro* quando comparados a iCMs selvagens. Para tanto, diferenciamos as hiPSCs das linhagens SMF1, SMF2, WT16 e WT7 em cardiomiócitos, seguindo um protocolo previamente estabelecido no laboratório (seção 3.8.1). A Figura 14 exemplifica as alterações morfológicas observadas ao longo do processo de diferenciação.

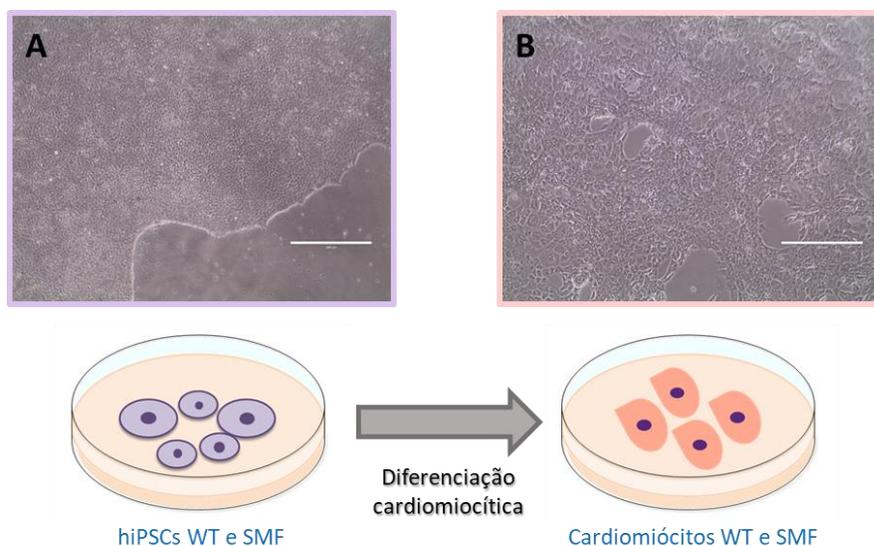


Figura 14. Alterações na morfologia celular após diferenciação cardiomiocítica de hiPSCs.

(A) Uma colônia da linhagem pluripotente hiPSC^{WT16}. Observa-se que as células estão bastante compactadas. (B) Cardiomiócitos imaturos derivados da mesma linhagem após 20 dias de diferenciação. Observa-se uma morfologia mais espreada. Barra de escala: 400 μ m.

Após 10 dias de indução da diferenciação (D10), as células já apresentam movimentos de contração característicos de cardiomiócitos e, após 30 dias, observamos a expressão das proteínas sarcoméricas α -actinina e troponina-T cardíaca (cTNNT2) (Figura 15). Ambas as proteínas são marcadores específicos de cardiomiócitos. Para determinação da eficiência de cada experimento de diferenciação, foi realizado um experimento de citometria de fluxo para cada uma das linhagens em torno do D15, de forma a se quantificar a proporção da população de células diferenciadas positiva para cTNNT2 (Figura 16). Apenas diferenciações com eficiência igual ou superior a 90% foram utilizadas em experimentos subsequentes.

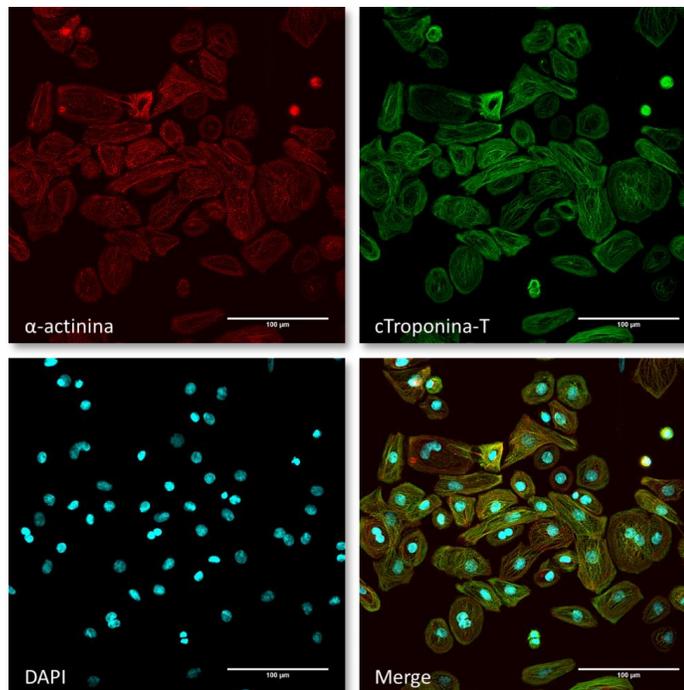


Figura 15. Expressão das proteínas α -actinina e troponina-T cardíaca (cTroponina-T) em cardiomiócitos derivados da linhagem hiPSC^{WT7}. Experimento de imunofluorescência realizado após 30 dias de diferenciação. Barra de escala: 100 μ m.

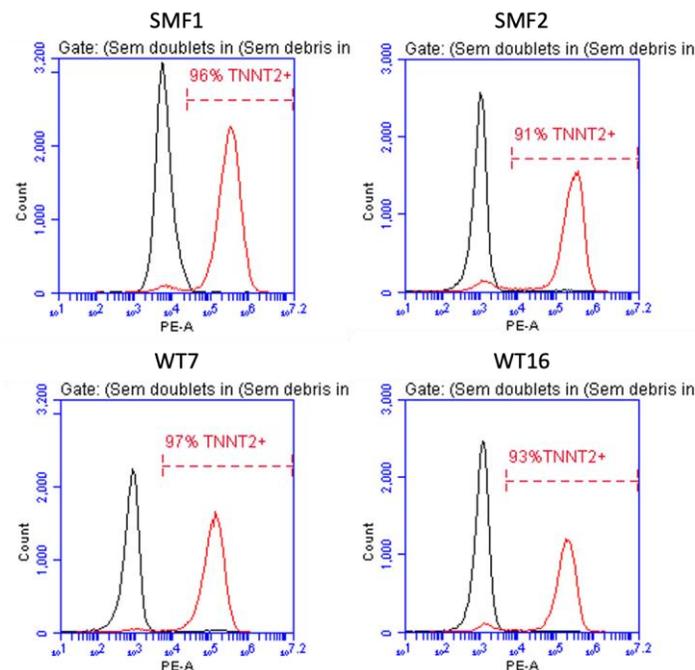


Figura 16. Expressão do marcador troponina-T cardíaca (TNNT2) em cardiomiócitos derivados de hiPSCs após cerca de 15 dias de diferenciação. A porcentagem de células

positivas quanto à expressão das proteínas está indicada no painel. A curva preta indica o controle negativo – células marcadas com o isotipo controle ficoeritrina (PE), e a vermelha indica as células marcadas com o anticorpo específico.

4.1.2.1. Expressão de *FBN1* em iCMs

Devido ao fato de não haver descrição na literatura a respeito da expressão de fibrilina-1 por cardiomiócitos derivados de hiPSCs, antes de procurarmos fenótipos distintos entre células selvagens e SMF, decidimos verificar, por RT-qPCR, se essas células realmente expressam o gene *FBN1* *in vitro*. Para esta análise inicial, as linhagens WT16, SMF1 e SMF2 foram utilizadas. Verificamos, como esperado, que iCMs de todas as linhagens expressam o gene em níveis bastante superiores às células indiferenciadas (dados não mostrados) e que, como previsto por análise *in silico* e demonstrado anteriormente, a linhagem SMF2, portadora de uma variante predita HI em *FBN1*, apresenta cerca da metade da expressão da linhagem selvagem (Figura 17).

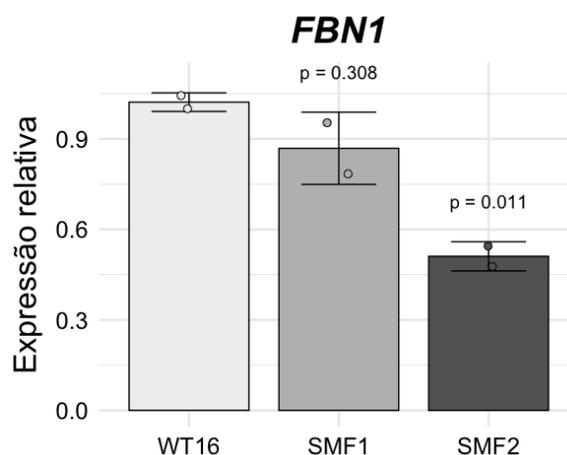


Figura 17. Expressão do gene *FBN1* nas linhagens de cardiomiócitos WT16 (selvagem), SMF1 e SMF2, diferenciadas a partir de hiPSCs por 30 dias. Os valores de expressão

gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo o controle (expressão relativa = 1) uma das réplicas da linhagem WT16. Os valores de p indicados foram obtidos por teste-t não pareado na comparação com a linhagem WT16. N=2.

Para confirmarmos a hipótese de que a linhagem SMF2 é haploinsuficiente para *FBN1* e que, portanto, somente o alelo selvagem é expresso, sequenciamos o DNA complementar (cDNA) utilizado nas análises. Observamos, como esperado, que para a linhagem SMF1, cDNAs provenientes dos dois alelos estavam presentes na amostra (Figura 18A), ao contrário da linhagem SMF2, para a qual foi observada apenas a presença da sequência selvagem (Figura 18B). Desta forma, confirmamos que, ao menos no nível do mRNA, a linhagem SMF2 é realmente haploinsuficiente para *FBN1*.

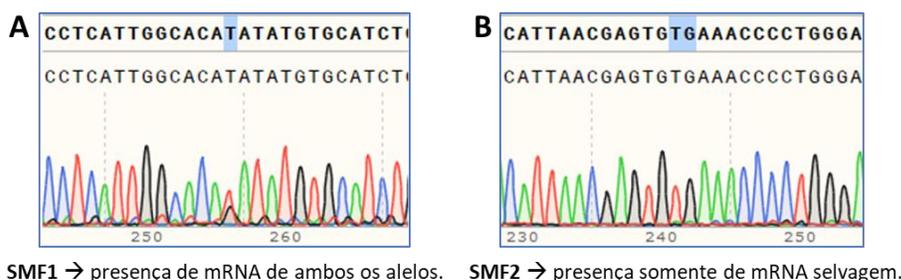


Figura 18. Sequenciamento do cDNA de duas linhagens de cardiomiócitos (SMF1 e SMF2) diferenciadas a partir de hiPSCs. As sequências em negrito (topo) representam a sequência-referência (selvagem) das respectivas regiões alteradas do gene *FBN1* em cada linhagem, enquanto as sequências abaixo representam as leituras dos cromatogramas obtidos. (A) A linhagem SMF1 é heterozigota para uma mutação de troca de sentido (T>G – em azul) no éxon 56 e observa-se dois picos (relativos a T e G nesta posição). (B) A linhagem SMF2 possui uma deleção de dois pares de bases (TG – em azul) no éxon 16, não observada neste sequenciamento devido à presença apenas do fragmento selvagem na amostra.

Com relação à SMF1, ainda não podemos afirmar que se trata de uma linhagem com dominância negativa para a fibrilina-1, pois não sabemos se a proteína produzida é secretada e incorporada à matriz extracelular.

É importante salientar que, apesar de menores do que em hiPSCs, os valores de C_T obtidos com iCMs foram próximos de 30, o que indica que, apesar de ocorrer, a expressão de *FBN1* não é alta nestas células, principalmente se comparada a outros tipos celulares especializados na secreção de componentes da MEC, como fibroblastos, por exemplo (tópico discutido mais adiante).

4.1.2.2. Expressão de *FBN1* e de marcadores de hipertrofia em iCMs selvagens e SMF após tratamento com endotelina-1 (ET-1)

Como primeira análise fenotípica dos iCMs, foi verificada a expressão dos marcadores clássicos de hipertrofia *NPPA*, *NPPB* e *ACTA1*. Estes marcadores são frequentemente analisados no estudo da miocardiopatia hipertrófica (HCM), principalmente após tratamento com ET-1 (HAN et al., 2014; TANAKA et al., 2014), porém, como na DCM também ocorre hipertrofia dos cardiomiócitos (HARVEY; LEINWAND, 2011), decidimos incluir este parâmetro em nosso estudo. Os genes *NPPA*, *NPPB* e *ACTA1* codificam os peptídeos natriuréticos tipo A e B e a α -actina de musculatura esquelética do tipo 1, respectivamente. A expressão de todos esses genes é enriquecida na fase embrionária e aumentada em situações de falha cardíaca progressiva e remodelamento hipertrófico (DIRKX; DA COSTA MARTINS; DE WINDT, 2013; AGGARWAL et al., 2014).

Após contato com a Dra. Cathy Merry, nossa colaboradora e minha coorientadora durante o período de estágio na University of Nottingham,

decidimos testar diferentes matrizes comerciais para o cultivo de cardiomiócitos e posterior análise fenotípica. Imaginamos que a utilização de matrizes exógenas poderia influenciar nas análises dos efeitos de mutações na fibrilina-1 no fenótipo celular, já que a matriz Geltrex®, normalmente utilizada tanto para o cultivo de hiPSCs quanto de iCMs, contém quantidades saturadas de diversas proteínas de membrana basal (mas não fibrilina-1) que poderiam substituir as microfibrilas em algumas funções. Desta forma, poderíamos não encontrar fenótipos simplesmente pelo fato de a fibrilina-1 endógena não ser necessária nessas condições de cultivo.

Testamos as matrizes L7 e laminina 521 (LAM), além do próprio Geltrex® (GTX), de forma a se determinar a mais adequada para experimentos futuros. Também decidimos estimular as células com ET-1 (100 nM) por 24 horas antes da coleta no dia 30 de diferenciação, para análise de expressão dos marcadores de hipertrofia. A endotelina-1 é um hormônio peptídico associado à disfunção cardíaca que promove hipertrofia e aumenta a capacidade de contração dos cardiomiócitos (BUPHA-INTR; HAIZLIP; JANSSEN, 2012) e é frequentemente utilizada no estudo da HCM (AGGARWAL et al., 2014; HAN et al., 2014; TANAKA et al., 2014). A concentração e o tempo de tratamento adotados foram determinados segundo padronização prévia de um outro grupo de pesquisa colaborador do laboratório (Prof. Dra. Rhian Touyz, da University of Glasgow), que estuda hipertensão e utiliza esse mesmo tratamento em células primárias.

As quatro linhagens (WT7, WT16, SMF1 e SMF2) foram diferenciadas em GTX e, após uma segunda dissociação no D25, replaqueadas nas diferentes matrizes (GTX, L7, LAM). O tratamento com ET-1 (100 nM) foi iniciado no D29 e as células foram coletadas no D30 para análise de expressão gênica dos três marcadores de hipertrofia (*NPPA*, *NPPB* e *ACTA1*) e de *FBN1*. Observamos que as linhagens SMF apresentaram níveis similares de expressão de *NPPA* em comparação com o grupo selvagem na ausência de tratamento com ET-1 (p-valor = 0,117, teste de Wilcoxon-Mann-Whitney) (Figura 19A). Para *NPPB* (Figura 19B) e *ACTA1* (Figura 19C), entretanto, o grupo SMF apresentou expressão basal aumentada (p-valores = 0,0016 e $1,7 \times 10^{-5}$, respectivamente).

Após tratamento com ET-1, diferenças entre as linhagens selvagens e SMF também só foram observadas para *NPPB* e *ACTA1* (p-valor = $3,6 \times 10^{-5}$ para ambos os genes). Para *NPPA*, não houve diferenças (p-valor = 0,061) e somente SMF2 demonstrou aumento de expressão substancialmente maior que as linhagens selvagens (p-valor WT7 vs SMF2 = 0,0152; WT16 vs SMF2 = 0,005), visto que o efeito do tratamento na linhagem WT7 foi mais intenso que em SMF1. Comparando as linhagens SMF1 (DN predita) e SMF2 (HI), somente para *ACTA1* SMF2 é substancialmente diferente de SMF1 sem e com tratamento com ET-1 (p = 0,0022 para as duas condições), quando ambas são diferentes do grupo selvagem. Os resultados de todas as comparações estatísticas realizadas podem ser encontrados no APÊNDICE G.

Quanto às diferentes matrizes, no nível basal a expressão de todos os genes foi muito similar e após tratamento com ET-1 a única tendência observada é a de que a matriz L7 parece intensificar o aumento da expressão dos três genes. Em todo caso, as diferenças observadas entre os grupos foram independentes da matriz utilizada e indicam uma possível maior susceptibilidade das linhagens SMF ao estresse hipertrófico, um fenótipo já descrito anteriormente em iCMs modelos de miocardiopatias familiares (revisado por ESCHENHAGEN; CARRIER, 2019), mas não para a SMF.

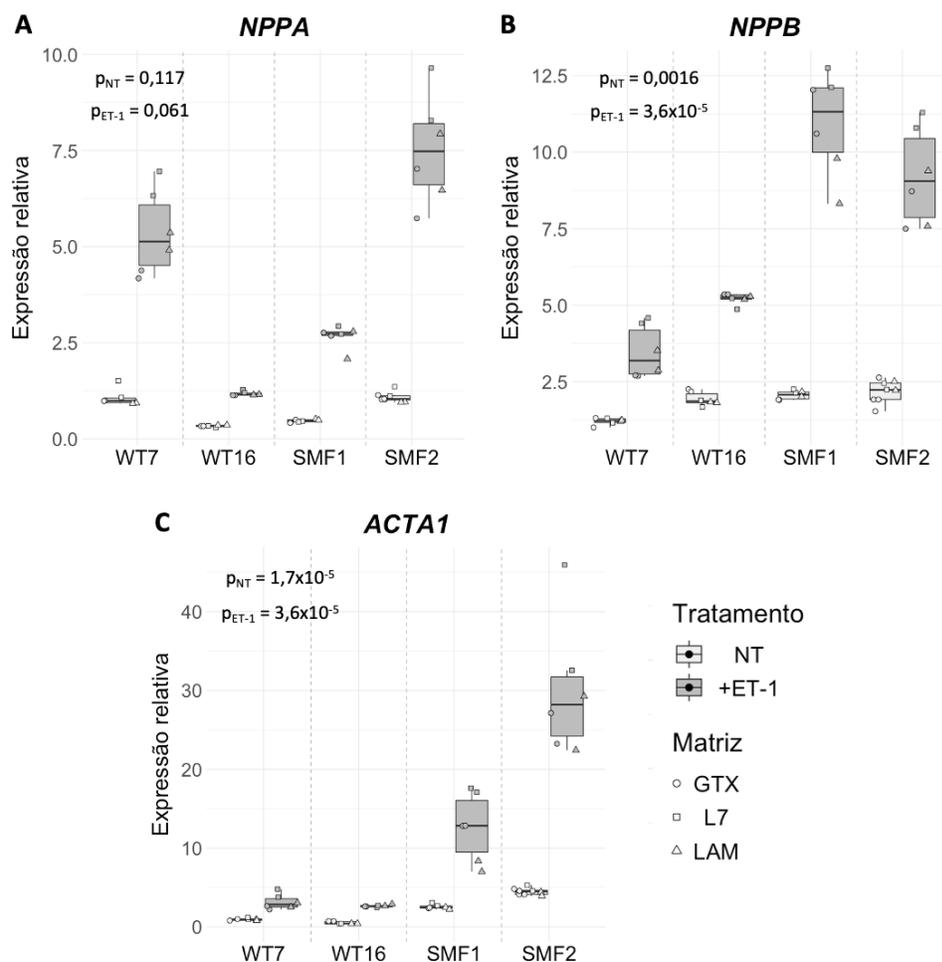


Figura 19. Expressão de marcadores de hipertrofia em iCMs selvagens (WT) e paciente-específicos (SMF) em diferentes matrizes comerciais. Cardiomiócitos derivados de hiPSCs

foram cultivados por 30 dias, sendo nos últimos cinco dias nas matrizes indicadas (GTX, L7 ou LAM). Durante as 24 horas anteriores à coleta, as células foram (+ET-1) ou não (NT) submetidas ao tratamento com endotelina-1 na concentração de 100 nM. A expressão dos genes *NPPA* (A), *NPPB* (B) ou *ACTA1* (C) foi analisada. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo a referência (=1) uma das réplicas NT GTX da linhagem WT7. Os valores de p indicados para cada gene foram obtidos nas comparações entre o grupo selvagem e o SMF (teste de Wilcoxon-Mann-Whitney). Ver APÊNDICE G para demais comparações. N=6 (2/matriz).

Além da expressão dos marcadores de hipertrofia, também analisamos a expressão de *FBN1* nas mesmas condições. Observamos novamente o mesmo padrão de expressão nas linhagens SMF, com SMF2 apresentando redução de aproximadamente 50% dos níveis de expressão na comparação com as demais linhagens, tanto na ausência (p-valor WT7 vs SMF2 = $2,6 \times 10^{-6}$; WT16 vs SMF2 = $3,8 \times 10^{-4}$; SMF1 vs SMF2 = $9,1 \times 10^{-4}$) quanto na presença de ET-1 (p-valor WT7 vs SMF2 = $5,9 \times 10^{-5}$; WT16 vs SMF2 = $2,6 \times 10^{-5}$; SMF1 vs SMF2 = $4,3 \times 10^{-6}$ – Teste-t, ver APÊNDICE G para análises completas) (Figura 20). Uma observação interessante é que a expressão deste gene parece ser negativamente afetada pelo tratamento com ET-1 em todas as linhagens testadas (p-valor = $2,3 \times 10^{-10}$ – teste-t pareado), independentemente do grupo. Sabe-se que a ligação de ET-1 a seus receptores ETA e ETB induz processos fibróticos, como deposição de colágeno do tipo 1, além de diminuir a degradação da MEC em diversos tecidos, incluindo os do sistema cardiovascular (revisado por RODRÍGUEZ-PASCUAL; BUSNADIEGO; GONZÁLEZ-SANTAMARÍA, 2014). Os mecanismos de indução de remodelamento da MEC por ET-1, e mais diretamente o aumento na deposição de colágeno I e fibronectina, foram previamente relacionados à

ativação de sinalização por ERK1/2 e à interação de ET-1 com TGF- β (LAMBERS et al., 2013). A diminuição da expressão de *FBN1* poderia ser um efeito da indução deste remodelamento.

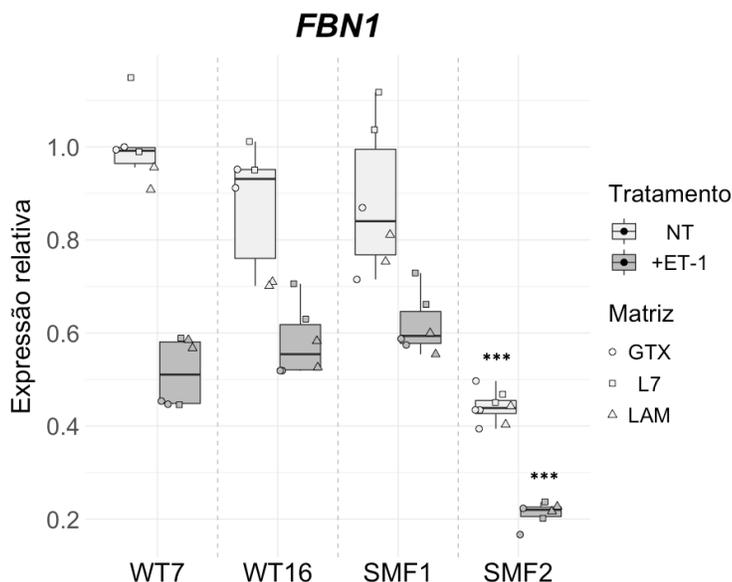


Figura 20. Expressão de *FBN1* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs selvagens e SMF. Os iCMs foram cultivados por 30 dias, sendo nos últimos cinco dias nas matrizes indicadas (GTX, L7 ou LAM). Durante as 24 horas anteriores à coleta, as células foram (+ET-1) ou não (NT) submetidas ao tratamento com endotelina-1 na concentração de 100 nM. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo a referência (=1) uma das réplicas NT GTX da linhagem WT7. *** $p < 0,001$ nas comparações com as demais linhagens individualmente em cada um dos tratamentos. N=6 (2/matriz).

Os resultados descritos acima demonstram que a maior sensibilidade dos cardiomiócitos ao estresse hipertrófico pode ser um fenótipo de mutantes para *FBN1*, apesar da baixa expressão deste gene nesse tipo celular. Entretanto, o baixo número de linhagens selvagens e SMF utilizado (N=2/grupo), todas derivadas de indivíduos distintos e, portanto, com diferentes *backgrounds* genéticos, limita nossas conclusões. Adicionalmente,

os pacientes utilizados em nossas análises não apresentam manifestações cardíacas, o que também limita que uma relação causal entre a presença de alterações no gene *FBN1* e o fenótipo encontrado seja estabelecida e ainda menos que efeitos de classes distintas de mutações (HI e DN) sejam determinados.

É importante mencionar que, dependendo da condição estudada, o baixo número de pacientes ou estas diferenças de *background* não são tão relevantes, como por exemplo no caso das miocardiopatias familiares (SUN et al., 2012; TANAKA et al., 2014; HINSON et al., 2015) e outras doenças, monogênicas ou não (revisado por SHI et al., 2017). Além disso, existem vantagens em se usar linhagens paciente-específicas (CHEN; MATSA; WU, 2016), sendo a mais importante delas o conhecimento prévio do quadro-clínico e, conseqüentemente do efeito deletério de uma variante em uma determinada característica de interesse. No caso da SMF, entretanto, observa-se uma alta variabilidade tanto entre indivíduos com diferentes mutações (inter-familiar) quanto entre indivíduos de uma mesma família que carregam a mesma alteração no gene *FBN1* (intra-familiar) (HUTCHINSON et al., 2003; LANDIS; VELDTMAN; WARE, 2017). Isso demonstra uma alta influência do *background* genético, que foi previamente investigada em camundongos por nosso grupo (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016) e mais recentemente também demonstrada em pacientes (HUTCHINSON et al., 2003; AUBART et al., 2018; GRANGE et al., 2020). Desta forma, acreditamos ser extremamente importante, no caso da SMF, o uso de linhagens isogênicas, que se

diferenciam apenas quanto a uma alteração específica no gene *FBN1*, para o estudo *in vitro* dos mecanismos moleculares da síndrome.

Visando endereçar essas questões, decidimos gerar linhagens de hiPSCs isogênicas portando diferentes mutações, HI ou DN, no gene *FBN1* utilizando a técnica de edição gênica CRISPR/Cas9.

4.2. Geração de hiPSCs mutantes para o gene *FBN1* utilizando o sistema CRISPR/Cas9

4.2.1. Identificação das regiões-alvo para edição, desenho e clonagem dos gRNAs

As regiões do gene *FBN1* a serem editadas foram determinadas segundo dois objetivos principais: o estudo da hipótese de haploinsuficiência na SMF, ainda pouco conhecida em humanos, e a investigação de uma possível correlação genótipo-fenótipo entre mutações HI ou DN e fenótipos cardiovasculares *in vitro*.

Para isso, duas estratégias foram adotadas: a primeira tem como objetivo induzir a formação de inserções ou deleções (indels) no éxon 2 ([NM_000138.5](#)), logo após o primeiro ATG que determina o início da tradução, gerando uma mudança de quadro de leitura e, possivelmente, um alelo nulo; a segunda tem como objetivo a deleção do éxon 31, que se encontra dentro da chamada “região neonatal” do gene *FBN1*, associada a fenótipos severos agudos da SMF (FAIVRE et al., 2007). Para isso, duas quebras no DNA devem ser geradas, flanqueando este éxon. A exclusão do éxon 31 devido a mutações em sítios de *splicing* foi

reportada em quatro pacientes com fenótipos graves da doença, três dos quais faleceram de insuficiência cardíaca/cardiorrespiratória poucos meses após o nascimento (STHENEUR et al., 2009, 2011; BARNETT et al., 2010). É importante mencionar que a numeração dos éxons adotada na literatura é a estabelecida por PEREIRA e colaboradores (1993), que considera somente os éxons codificantes do gene *FBN1* (éxons 2-66 da referência [NG_008805.2](#)); portanto, nos trabalhos mencionados, o éxon 31 ao qual nos referimos é denominado éxon 30.

A linhagem hiPSC^{WT16} (Tabela 8), gerada no âmbito do projeto ELSA Brasil e previamente caracterizada quanto à expressão de marcadores pluripotência, capacidade de diferenciação em tipos celulares dos três folhetos embrionários e integridade cromossômica (denominada iPS16 em TOFOLI et al., 2016), foi escolhida para a edição. Inicialmente, sequenciamos as regiões-alvo de mutações (éxon 2 e éxon 31) para a confirmação da ausência de mutação prévia. O sequenciamento demonstrou que, como esperado, hiPSC^{WT16} não apresenta alterações nessas regiões do gene *FBN1* (Figura 21).

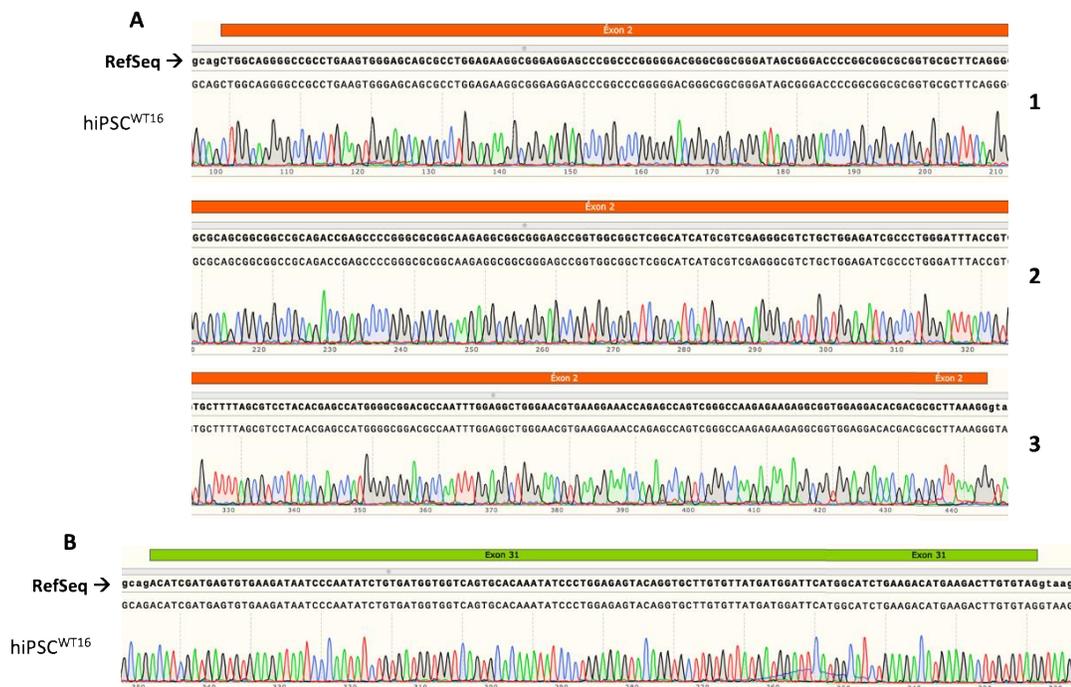


Figura 21. Sequenciamento dos éxons 2 e 31 do gene *FBN1* da linhagem de hiPSCs WT16. Os cromatogramas foram obtidos após sequenciamento dos fragmentos de gDNA das duas regiões-alvo da edição gênica na linhagem selvagem hiPSC^{WT16}. A sequência referência (RefSeq) está indicada no topo e as sequências obtidas para a linhagem encontram-se logo abaixo. (A) Sequenciamento do éxon 2 (dividido em 3 partes – 1 a 3) e (B) do éxon 31.

Os gRNAs para a introdução de mutações no gene *FBN1* foram determinados usando-se a plataforma *CRISPR direct* (<http://crispr.dbcls.jp/>). Dois gRNA foram escolhidos para a geração de uma quebra de dupla-fita no éxon 2 (denominados gRNA E2-1 e gRNA E2-2) e dois para a deleção do éxon 31 (gRNA E31-1 e gRNA E31-2), flanqueando o éxon – detalhes na seção 3.4.1. A Figura 22 ilustra a posição destas sequências nas regiões-alvo do gene. Dois gRNAs para a mesma região do éxon 2 foram desenhados para que primeiramente se pudesse comparar a eficiência de edição de cada um na linhagem HEK293T (ver mais adiante – seção 4.2.2). Para o éxon 31, poucos gRNAs com especificidade

satisfatória foram identificados e, por isso, somente um par (E31-1 e E31-2) foi escolhido.

```

Exon 2 – gRNA E2-1
5' gaccgcgaggcttcagcatcccgatgccctgaaagtctccccgctcggggatttgtc
tctgtgtgcag CTGGCAGGGGCCCTGAAGTGGGAGCAGCGCCTGGAGAAGGCGGGA
GGAGCCCGGCCCGGGGACGGGCGGGGATAGCGGGACCCCGGGCGGCGGTGCGCTTC
AGGGCGCAGCGGCGGCGCAGACCGAGCCCCGGGCGGGCAAGAGGCGGCGGGAGCCGGT
GGCGGCTCGGCATC ATGCGTCCGAGGGCGTCTGCTGGAGATCGCCCTGGGATTACCGTGC
TTTTAGCGTCTACACGAGCCATGGGGCGGACGCCAATTTGGAGGCTGGGAACGTGAAGG
AAACCAGAGCCAGTCGGGCCAAGAGAAGAGGCGGTGGAGGACACGACGCGCTTAAAGG g
taaaggaaccggttccctcctttggtgtgggtctcccaagt ttcaagatccagaacaa3'

Exon 2 – gRNA E2-2
5' gaccgcgaggcttcagcatcccgatgccctgaaagtctccccgctcggggatttgtc
tctgtgtgcag CTGGCAGGGGCCCTGAAGTGGGAGCAGCGCCTGGAGAAGGCGGGA
GGAGCCCGGCCCGGGGACGGGCGGGGATAGCGGGACCCCGGGCGGCGGTGCGCTTC
AGGGCGCAGCGGCGGCGCAGACCGAGCCCCGGGCGGGCAAGAGGCGGCGGGAGCCGGT
GGCGGCTCGGCATC ATGCGTCCGAGGGCGTCTGCTGGAGATCGCCCTGGGATTACCGTGC
TTTTAGCGTCTACACGAGCCATGGGGCGGACGCCAATTTGGAGGCTGGGAACGTGAAGG
AAACCAGAGCCAGTCGGGCCAAGAGAAGAGGCGGTGGAGGACACGACGCGCTTAAAG g
taaaggaaccggttccctcctttggtgtgggtctcccaagt ttcaagatccagaacaa3'

Exon 31 – gRNAs E31-1 e E31-2
5' caagataacccaatgggctagtttatgcaaagcttcatttggatttgagagttaata
gtcttatgctagtaggctaagtttatttgactgcggtcagttaatgttttctcactgaac
agt gaaaccaatatcaacaacctgtggttgtggttttattctttgcag ACATCGATGA
GTGTGAAGATAATCCCAATATCTGTGATGGTGGTCAGTGCACAAATATCCCTGGAGAGTA
CAGGTGCTTGTGTTATGATGGATTATGGCATCTGAAGACATGAAGACTTGTGTA gtaa
gcaaagaagacagaatttttcatct gtgtcttgttagtcataagcactgttaaattacat
aaagttagtttgggtcagtgatagaaagattccataggaaaagtaaggatatttagag3'

```

Figura 22. RNAs guia (gRNAs) desenhados para geração de quebras de dupla-fita nos éxons 2 ou 31 do gene *FBN1*. Éxons são evidenciados em azul (letras maiúsculas) e íntrons, em preto (letras minúsculas). As sequências dos gRNAs escolhidos estão sublinhadas em azul claro com os respectivos PAMs (NGGs) realçados em cinza. O objetivo da geração de uma quebra de dupla-fita no éxon 2, próxima ao primeiro ATG (realçado em amarelo), é a introdução de inserções ou deleções nesta região, o que pode acarretar mudança no quadro de leitura e formação de um alelo nulo. Para o éxon 31, o objetivo é a geração de duas quebras de dupla-fita simultâneas que leve à excisão do éxon sem alteração do quadro de leitura.

Cada uma das sequências de gRNA foi clonada no vetor pX330 modificado (ETOC et al., 2016 - mapa no ANEXO A), gerando quatro vetores recombinantes, denominados pX330 mod. E2-1, E2-2, E31-1 ou E31-2 (detalhes na seção 3.4). Os vetores foram sequenciados para confirmação (APÊNDICE H).

4.2.2. Validação da eficiência do sistema de edição em células HEK293T

Os plasmídeos recombinantes portando as sequências dos gRNAs e um vetor não recombinado (sem inserto – SI) foram transfectados individualmente (ou em conjunto, no caso de E31-1 e E31-2) em células da linhagem HEK293T para validação dos gRNAs escolhidos. A análise da eficiência de transfecção foi feita visualmente por meio da observação da expressão da proteína verde fluorescente (GFP), que indicou alta eficiência em todos os casos (Figura 23). Um controle não transfectado também foi feito (dado não mostrado) e o DNA do *pool* de células de cada condição foi extraído para análise da eficiência das edições.

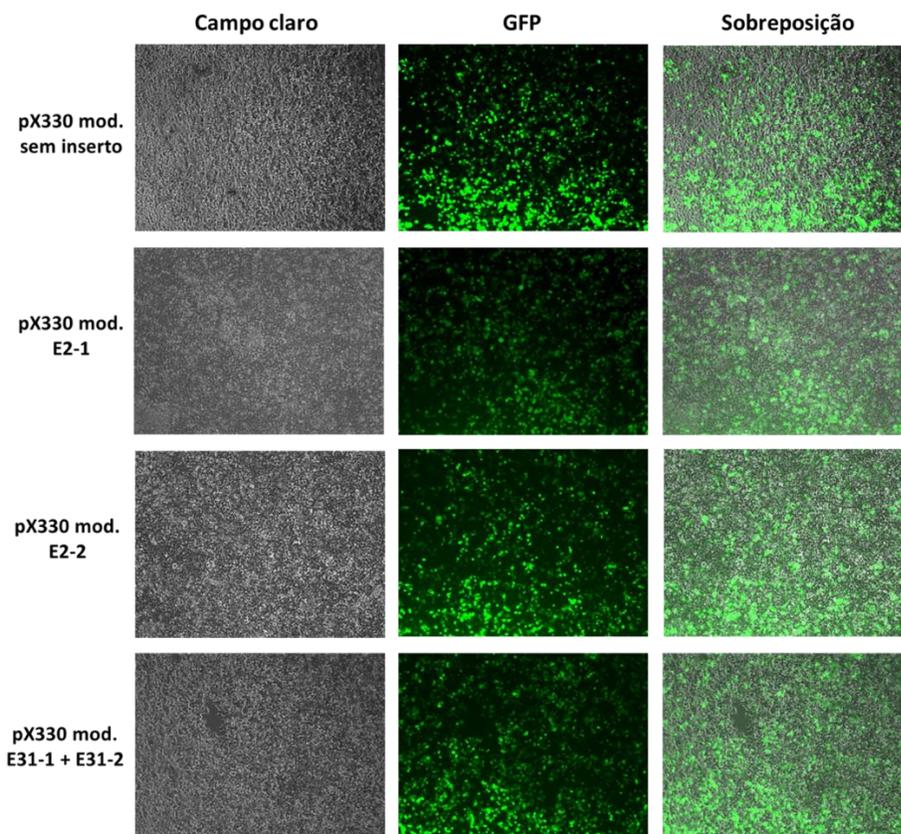


Figura 23. Transfecção de células HEK293T com o plasmídeo pX330 mod. não recombinante ou portando os respectivos gRNAs (E2-1, E2-2, E31-1 ou E31-2). As células foram submetidas

à transfecção e, após 72 horas, a expressão de GFP foi verificada por microscopia de fluorescência. As fotografias foram obtidas no aumento de 10x.

4.2.2.1. Detecção de mutações (indels) no éxon 2 do gene *FBN1* utilizando a nucleasse *Surveyor*®

Para a edição do éxon 2, a presença de mutações foi analisada com o kit para detecção de mutações *Surveyor*®, recomendado na literatura para validação da eficiência de gRNAs (JINEK et al., 2013). Caso tenha havido edição (formação de *indels*), espera-se que dois fragmentos com tamanhos aproximados de 310 pb e 350 pb sejam formados após a digestão do fragmento original obtido por amplificação da região (\approx 660 pb).

Foi observada digestão para os dois gRNAs testados (E2-1 e E2-2), mas não para a condição em que o plasmídeo sem inserto foi transfectado, como esperado (Figura 24A). A Figura 24B mostra as estimativas de intensidade das bandas e as eficiências calculadas para cada gRNA (detalhes na seção 3.4.4.3). Observa-se que E2-1 (porcentagem de *indels* \approx 37,2%) foi ligeiramente mais eficiente que E2-2 (*indels* \approx 29,8%) e, por isso, o primeiro foi escolhido para a posterior edição das hiPSCs.

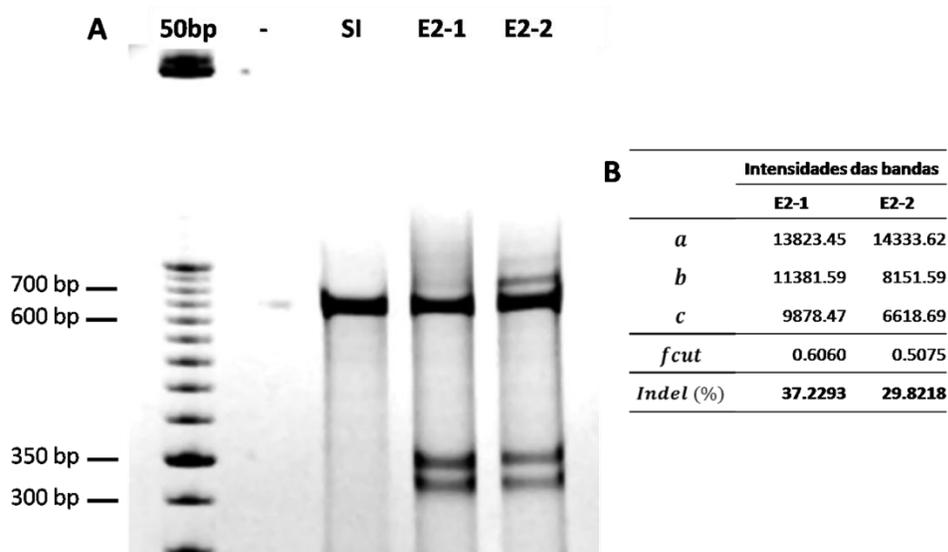


Figura 24. Análise da eficiência de edição do éxon 2 do gene *FBN1* em células HEK293T por meio de digestão com a nuclease Surveyor®. (A) Gel de poliacrilamida 10% com os resultados da digestão (50 bp: peso molecular; (-): controle negativo da reação). O DNA extraído do *pool* de células HEK293T transfectadas com o vetor pX330 mod. não recombinante (sem inserto - SI) ou com o mesmo vetor recombinado com os gRNAs E2-1 ou E2-2 foi submetido a PCR e os fragmentos obtidos foram desnaturados e renaturados de forma que hetero ou homodímeros fossem formados aleatoriamente. Estes foram então submetidos à digestão com a nuclease. Observa-se a banda não digerida (659 pb) nas 3 condições, mas a presença de dois fragmentos menores (produtos da digestão) apenas nas condições E2-1 e E2-2. (B) Cálculo da eficiência da edição do éxon 2 para cada um dos gRNAs (E2-1 e E2-2). Utilizando o software *ImageJ*, as intensidades das três bandas obtidas para as condições E2-1 e E2-2 (*a* – não digerida, *b* e *c* – digeridas) foram estimadas e, utilizando uma fórmula pré-estabelecida (detalhada na seção 3.4.4.3), a eficiência de edição (porcentagem de indels gerados) para cada um dos gRNAs foi calculada.

4.2.2.2. Análise da deleção do éxon 31 do gene *FBN1* por PCR convencional

Para análise da deleção do éxon 31, a eficiência da edição pode ser verificada por PCR convencional, visto que uma diferença de aproximadamente 150 pb pode ser observada entre o fragmento selvagem

(603 pb) e o mutante (450 pb). Observa-se a presença de uma banda com tamanho aproximado de 450 pb somente para a amostra transfectada com os vetores recombinantes (E31), como esperado (Figura 25). Também pode-se notar a presença de bandas deslocadas pouco acima ou abaixo do fragmento selvagem de 603 pb, o que indica a possível geração de indels em algumas células transfectadas. Estas células possivelmente internalizaram apenas um dos plasmídeos (E31-1 ou E31-2), o que acarretou uma única quebra de dupla-fita e não duas, como seria esperado para a eficiente deleção do éxon.

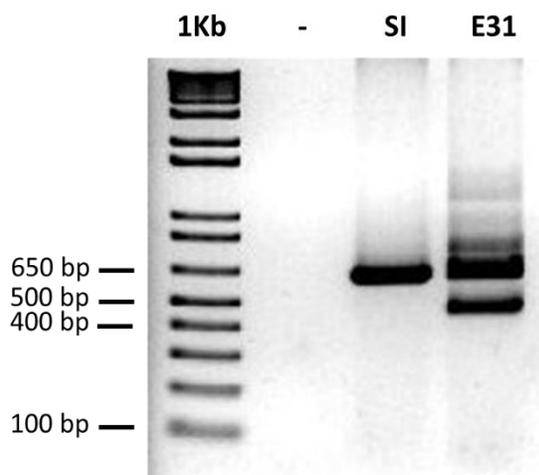


Figura 25. Análise da eficiência da deleção do éxon 31 do gene *FBN1* em células HEK293T. Gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos obtidos após amplificação da região em amostras de DNA extraído do *pool* de células HEK293T transfectadas com o vetor pX330 mod. não recombinante (sem inserto - SI) ou com vetores portando os gRNAs E31-1 ou E31-2 em conjunto (E31). 1 Kb: marcador molecular; (-): controle negativo da reação.

Desta forma, demonstramos com sucesso a eficiência dos gRNAs escolhidos.

4.2.3. Edição das regiões-alvo na linhagem hiPSC^{WT16}

4.2.3.1. Transfecção das hiPSCs e genotipagem dos clones obtidos

As células da linhagem hiPSC^{WT16} foram transfectadas em três condições: 1) com o vetor sem inserto (pX330 SI); 2) com o vetor pX330 E2-1 para a edição do éxon 2 (mutação 1); 3) com os vetores pX330 E31-1 e E31-2 em conjunto (E31), para deleção do éxon 31 (mutação 2). O antibiótico puromicina foi utilizado para seleção das que corretamente internalizaram o(s) plasmídeo(s) e as colônias selecionadas foram subclonadas.

Os clones obtidos para a mutação 1 (éxon 2) foram genotipados por sequenciamento após amplificação da região de interesse por PCR. Entre todos os clones analisados, observou-se ausência de edição em alguns e presença de pequenas deleções ou inserções que preservam ou não o quadro de leitura em outros, tanto em homozigose quanto em heterozigose (dados não mostrados). Para os clones cujos sequenciamentos indicaram a presença de alelos distintos, fizemos a clonagem dos produtos de PCR para sequenciamento. De todas as colônias sequenciadas, selecionamos dois clones com mutações de interesse em heterozigose (denominados HI1 e HI2 – Figura 26). A maioria dos demais clones apresentaram mutações (distintas) nos dois alelos (dados não mostrados).



Figura 26. Sequenciamento da região-alvo (éxon 2) do gene *FBN1* de clones heterozigotos da linhagem hiPSC^{WT16} submetidos à edição gênica. Os cromatogramas foram gerados após sequenciamento de vetores pGEM-T recombinados com produtos de PCR provenientes da amplificação da região do éxon 2. Os quadros vermelhos indicam as posições em que são observados *mismatches* entre o fragmento sequenciado e a sequência referência (RefSeq). O códon de início da tradução do gene (ATG) está destacado em azul. A região-alvo do gRNA E2-1 (próxima ao códon de início da tradução) está indicada, assim como a sequência PAM (motivo adjacente ao protoespaçador); a quebra de dupla fita de DNA normalmente acontece 3 bases a 5' do PAM (JINEK et al., 2012). O símbolo (-) indica uma deleção na posição indicada. Observa-se, para cada um dos clones (HI1 e HI2), a presença de dois cromatogramas indicando uma sequência selvagem (alelo 1) e uma mutada (alelo 2), confirmando a heterozigose.

A mutação de HI1 (c.3delG) consiste na deleção da guanina do códon de início da tradução (ATG); os próximos quatro ATGs que poderiam ser usados como códon de início levam a um PTC, assim como a mutação de HI2 (c.5_6insG), que altera o quadro de leitura do gene (dados não mostrados).

Outro clone (denominado KO), homocigoto para a mesma mutação de HI1, também foi selecionado, sendo potencialmente nocaute para *FBN1*. Infelizmente, não encontramos clones com a mutação de HI2 em homocigose, mas selecionamos outro clone com a mesma mutação (HI3) para também utilizar em experimentos futuros.

Com relação à mutação 2 (deleção do éxon 31), as genotipagens foram feitas por PCR convencional. Após sucessivas subclonagens, obtivemos três clones heterocigotos (denominados DN1, DN2 e DN3), além de um homocigoto (DN/DN) para a deleção esperada (Figura 27).

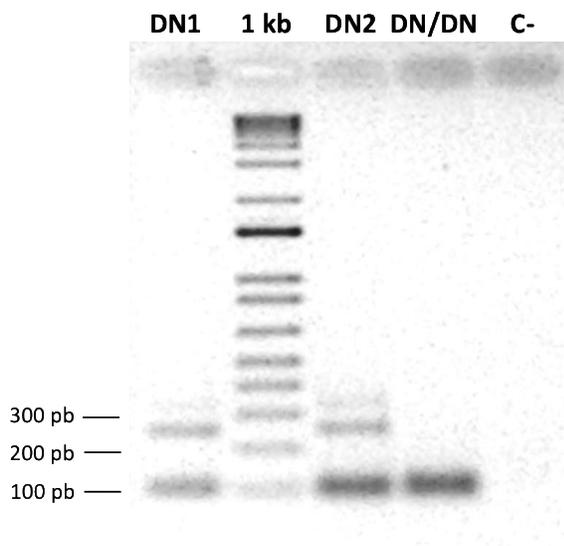


Figura 27. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR da região-alvo para deleção do éxon 31 do gene *FBN1*. A banda correspondente ao alelo selvagem possui 250 pb e a mutante, 101 pb. 1 kb: marcador molecular; C-: controle negativo da reação (sem adição de gDNA).

A presença da deleção em heterocigose e a integridade do alelo selvagem dos clones heterocigotos foram verificadas por sequenciamento (Figura 28). Para DN1, DN2 e DN3, a mutação encontrada, em apenas um dos

alelos, foi a mesma (c.3713-28_3833del). Entretanto, observamos que o clone classificado como homozigoto, na realidade é um heterozigoto composto, visto que foram observados dois picos para uma mesma posição nos cromatogramas obtidos, indicando duas sequências distintas. Utilizamos a estratégia descrita por MA et al. (2015) para decodificar a sequência de cada um dos alelos a partir do sequenciamento de produtos de PCR e constatamos que este clone apresenta duas deleções que diferem em apenas dois pares de base (c.[3713-28_3833del];[3713-30_3833del]). Esperamos, entretanto, que o fato de a junção íntron 30-éxon 31 ter sido deletada seja o suficiente para causar a omissão do éxon 31 com preservação do quadro de leitura no mRNA maduro independentemente do tamanho da deleção genômica.

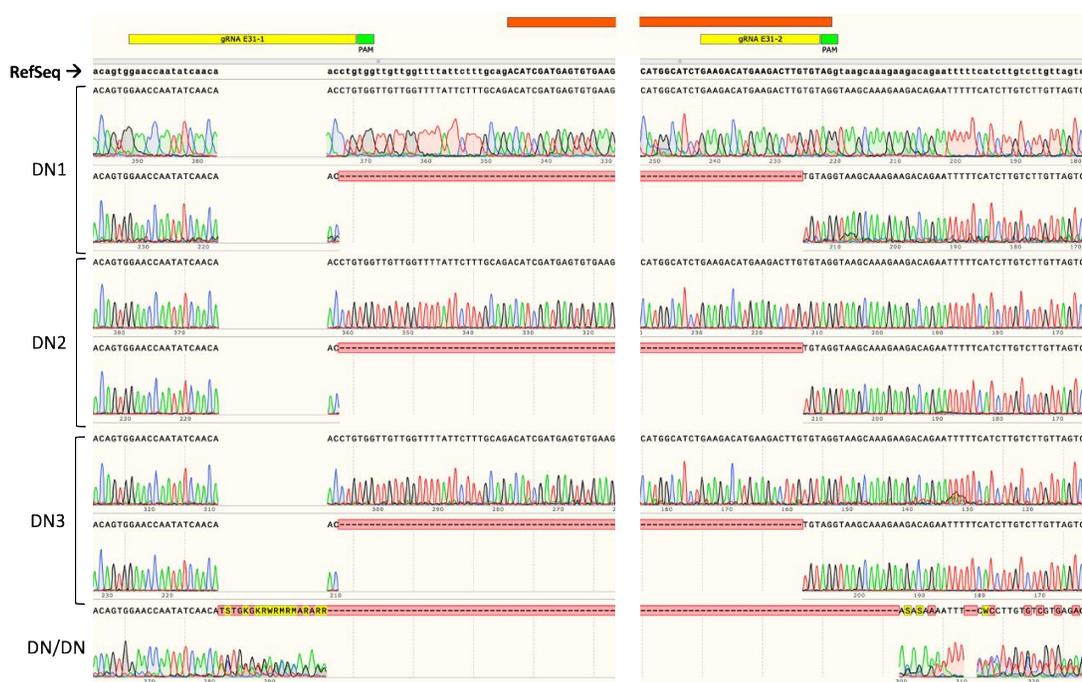


Figura 28. Sequenciamento da região-alvo (éxon 31) do gene *FBN1* de clones heterozigotos da linhagem hiPSC^{WT16} submetidos à edição gênica. Os cromatogramas foram gerados após sequenciamento de vetores pGEM-T recombinados com produtos de

PCR provenientes da amplificação da região do éxon 31 (DN1, 2 e 3) ou dos produtos de PCR diretamente (DN/DN). Os quadros vermelhos (-) indicam as posições em que há deleções em comparação com a sequência referência (RefSeq). As regiões-alvo dos gRNAs E31-1 e E31-2 estão indicadas, assim como as sequências PAM (motivo adjacente ao protoespaçador). Observa-se para os clones DN1, DN2 e DN3 a presença de dois cromatogramas indicando uma sequência selvagem (superior – alelo 1) e uma mutada (inferior – alelo 2). Para DN/DN, observa-se um cromatograma com duas sequências sobrepostas a partir de uma determinada posição. A região central do éxon foi omitida na figura para melhor visualização.

Os clones transfectados com o vetor não recombinante foram sequenciados para as regiões-alvo de edição no éxon 2 e no éxon 31, de forma a se assegurar que o vetor correto tenha sido utilizado e que as linhagens permanecem selvagens (dados não mostrados). Selecionamos três clones (WT1, WT2 e WT3) para serem utilizados em experimentos posteriores. A Tabela 10 resume as características de todos os clones adotados.

Tabela 10. Nomenclatura, mutações em *FBN1* e seus efeitos preditos na proteína fibrilina-1 para os clones de hiPSCs adotados após edição gênica. IDs: identificação adotada; HI: haploinsuficiente; DN: dominante negativo.

Grupo	IDs	Mutação	Efeito predito na fibrilina-1
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/WT}	WT1, WT2, WT3	-	WT
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/KO}	HI1	c.3delG	HI*
	HI2, HI3	c.5_6insG	
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/Δ31}	DN1, DN2, DN3	c.3713-28_3833del	DN*
hiPSC <i>FBN1</i> ^{KO/KO}	KO	c.3delG	KO*
hiPSC <i>FBN1</i> ^{Δ31/Δ31}	DN/DN	c.[3713-28_3833del]; [3713-30_3833del]	DN/DN*

*Predições baseadas nas características de cada mutação.

4.2.3.2. Análise da integridade de possíveis alvos inespecíficos da edição gênica

Como mencionado na seção 3.4.3, desenhamos iniciadores para analisar a integridade dos potenciais alvos não intencionais da edição por sequenciamento. Amplificamos as regiões por PCR convencional e as sequenciamos. Os resultados encontram-se na Figura 29 e na Figura 30. Observa-se que, exceto para o gene *PHLDB1*, em todos os casos as regiões encontram-se preservadas e não houve edição inespecífica. No caso deste gene especificamente, após decodificação como previamente descrito (MA et al., 2015), constatamos que as interferências no sequenciamento são causadas por uma indel (rs5795129/rs869066926) a 3' da sequência obtida, reportada como variante intrônica.

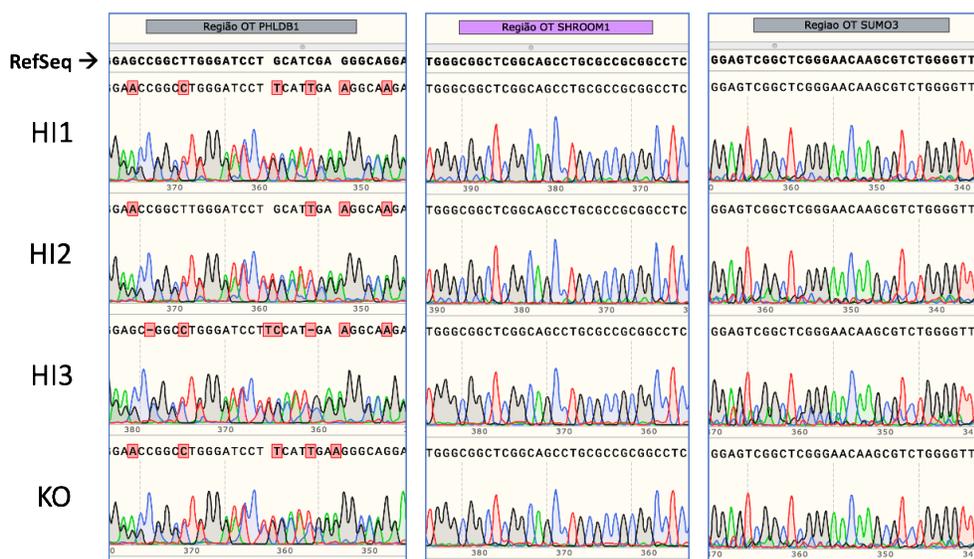


Figura 29. Sequenciamentos das regiões com possível efeito não intencional do gRNA E2-1 em hiPSCs editadas. Os cromatogramas foram gerados após sequenciamento das regiões preditas *in silico* como possíveis alvos inespecíficos do gRNA E2-1 utilizado para

edição do éxon 2 do gene *FBN1*. O nome de cada gene no qual a região está inserida está indicado nos respectivos retângulos coloridos. OT: *off-target*. RefSeq: sequência referência.

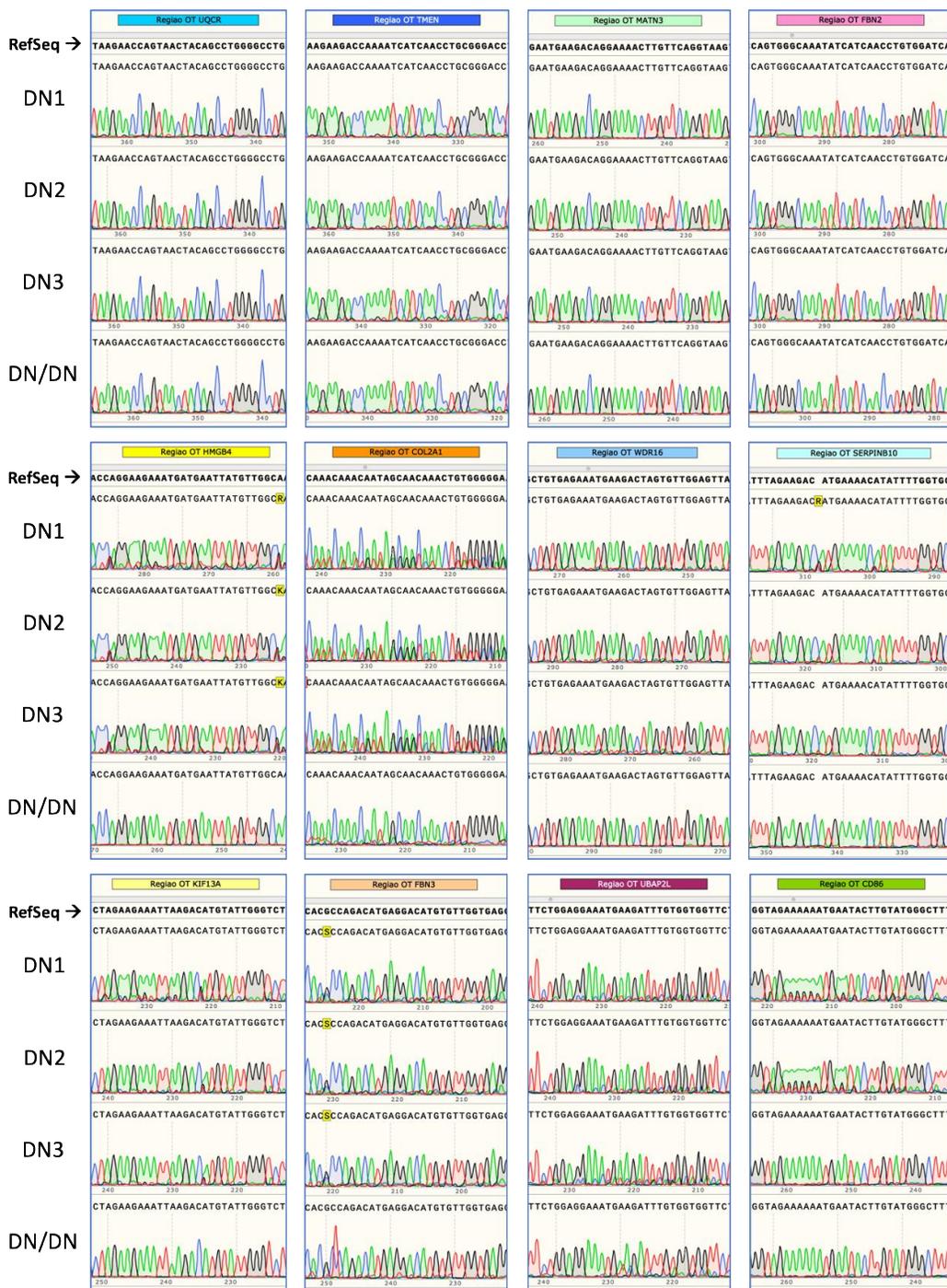


Figura 30. Sequenciamentos das regiões com possível efeito não intencional dos gRNAs E31-1 e E31-2 em hiPSCs editadas. Os cromatogramas foram gerados após sequenciamento das regiões previstas *in silico* como possíveis alvos inespecíficos dos gRNA

E31-1 e E31-2 utilizados para excisão do éxon 31 do gene *FBN1*. O nome de cada gene no qual a região está inserida está indicado nos respectivos retângulos colorido. OT: *off-target*. RefSeq: sequência referência.

4.2.3.3. Análise da pluripotência e da integridade cromossômica dos clones obtidos

A integridade cromossômica das linhagens WT1, WT2, HI1, HI2, DN1 e DN3 foi analisada por CGH array (do inglês *array-based comparative genomic hybridization*). Não foram detectadas alterações em nenhuma das linhagens (dados não mostrados) exceto em DN3, para a qual foram observadas a deleção do braço curto e a duplicação do braço longo do cromossomo 20 (APÊNDICE I). Esta linhagem foi então descartada dos experimentos seguintes.

Posteriormente, durante o período em que parte do projeto foi executado na University of Nottingham foi realizada análise de cariótipo das mesmas linhagens (exceto DN3, já excluída) e todos os resultados foram normais (dados não mostrados). Para os clones WT3, HI3, DN2, KO e DN/DN, os resultados obtidos após análise de cariótipo também foram normais.

Além disso, também não detectamos contaminação por micoplasma em nenhuma das linhagens (dados não mostrados).

Analizamos também se a expressão de marcadores de pluripotência foi mantida nas hiPSCs após a edição de *FBN1* e subclonagem. Por imunofluorescência, observamos em todos os clones a expressão dos fatores

de transcrição OCT4 e SOX2, importantes na manutenção da autorrenovação característica destas células (BOYER et al., 2005), e também de SSEA4 e TRA-1-60, expressos por células indiferenciadas (THOMSON, 1998) (Figura 31).

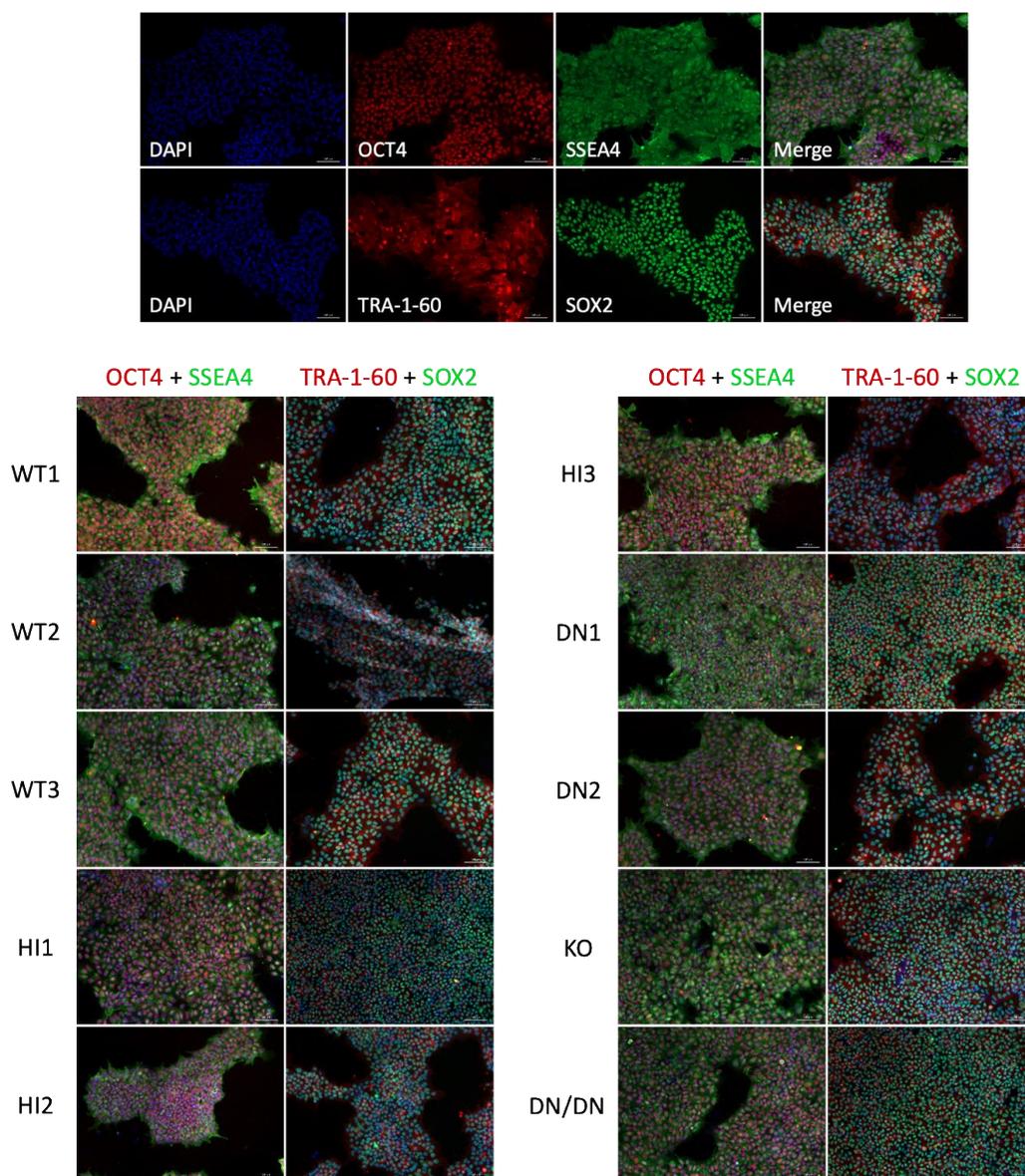


Figura 31. Expressão de marcadores de pluripotência nos clones de hiPSCs obtidos após edição gênica de *FBN1*. A presença dos fatores de transcrição OCT4 e SOX2 e das proteínas de superfície SSEA4 e TRA-1-60 foi analisada em hiPSCs indiferenciadas 48 horas

após a passagem. No painel superior, observa-se a marcação individual de cada proteína, evidenciando a localização nuclear de OCT4 e SOX2 e a citoplasmática/de membrana de SSEA4 e TRA-1-60, além da sobreposição (merge) esperada. No painel inferior, observa-se apenas a sobreposição das marcações DAPI/OCT4/SSEA4 ou DAPI/TRA-1-60/SOX2 para cada um dos clones. Barra de escala: 100 μ m.

4.3. Geração de hiPSCs mutantes para o gene *HSPG2* utilizando o sistema CRISPR/Cas9

Durante o período na University of Nottingham, sob orientação do Professor Chris Denning e da Dra. Cathy Merry, um de nossos objetivos consistiu na geração de hiPSCs duplos mutantes *FBN1/HSPG2* para estudar o possível papel deste último gene como modificador dos fenótipos cardiovasculares da SMF, como previamente sugerido em camundongos (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016; GYURICZA et al., 2020). Para isso, induzimos uma mutação de perda de função em heterozigose no gene *HSPG2* nos mutantes previamente gerados para *FBN1*, de forma a se induzir uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de expressão do gene. A ação de genes modificadores de fenótipo está normalmente associada a diferenças de *background* genético, causadas por polimorfismos existentes na população que, individualmente, não causam efeitos patogênicos (NADEAU, 2001). Sabe-se que o nocaute de ambos os alelos do gene *HSPG2* em humanos está associado à ocorrência da Síndrome de Schwartz-Jampel (OMIM #255800) e da displasia dissegmentar tipo Silverman-Handmaker (OMIM #224410), mas não há patologias associadas à haploinsuficiência deste gene. Desta forma, acreditamos que a redução de expressão a ser induzida em nossas linhagens não causaria, sozinha,

nenhum fenótipo, mas talvez seja o suficiente para entendermos sua influência na SMF quando combinada a mutações no gene *FBN1*.

4.3.1. Identificação da região-alvo para edição, desenho dos gRNAs e construção dos vetores

Uma estratégia de nocaute relativamente simples, já previamente utilizada no laboratório do Professor Chris Denning para outro gene (MOSQUEIRA et al., 2018), é a inserção de um grande cassete de resistência a antibiótico utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Adotamos um sistema ligeiramente diferente do utilizado para a edição de *FBN1* e, ao invés de usarmos a Cas9 selvagem, que induz uma quebra de dupla fita no DNA, utilizamos uma versão modificada da enzima, a Cas9 *nickase* (nCas9), que gera duas quebras simultâneas de fitas simples (ou *nicks*) em uma mesma região do DNA, cada uma determinada por um gRNA diferente. Neste sistema, a ocorrência de edições não intencionais no genoma é significativamente reduzida (RAN et al., 2013a).

Utilizando a ferramenta *Guide Design Resources* (<http://crispr.mit.edu/>), escolhemos dois gRNAs (denominados gRNA1 e gRNA2) altamente específicos para a região-alvo da edição, o éxon 4 do gene *HSPG2*. Escolhemos esta região, pois ainda que este éxon seja omitido durante o processamento do mRNA mutante, o quadro de leitura seria alterado e um PTC seria gerado no éxon 7. Segundo as predições da plataforma *Guide Design Resources* e também da CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), não há potenciais alvos inespecíficos em

comum para a dupla de gRNAs escolhidos (dados não mostrados), ou seja, a chance de efeito não intencional neste caso é próxima de zero.

Para a inserção do cassete no gene, além do vetor de expressão da nCas9 e dos vetores de expressão dos gRNAs, um vetor plasmidial contendo a sequência do cassete, flanqueada por dois braços (5' e 3') de 1 kb homólogos à região éxon 4 (denominados LA e RA) foi também desenhado. A Figura 32 esquematiza a estratégia de edição adotada. Neste caso, como buscamos a inserção de um fragmento específico, o reparo da quebra de dupla fita deverá ser direcionado por homologia (HDR), por isso um vetor doador da sequência do cassete é necessário.

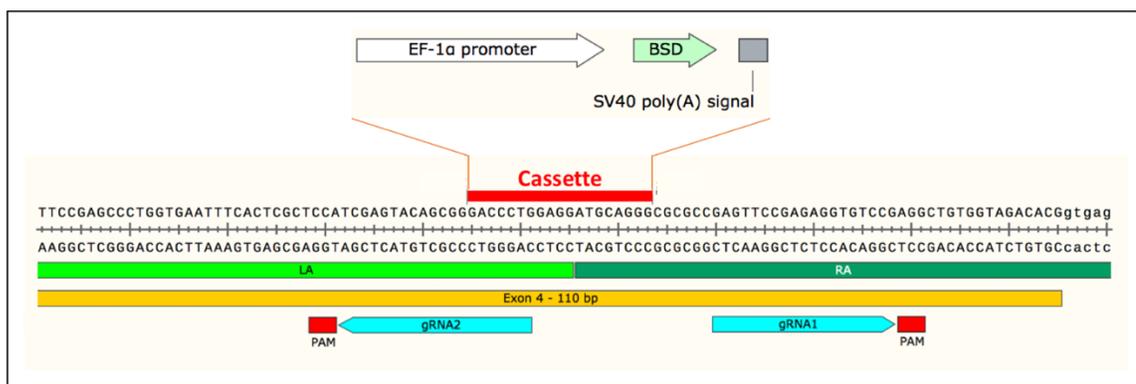


Figura 32. Estratégia para a inserção de um cassete de resistência a blasticidina no éxon 4 do gene *HSPG2* utilizando o sistema CRISPR/nCas9. Dois gRNAs (gRNA1 e gRNA2 em azul) foram desenhados para induzir a geração de *nicks* no éxon 4 do gene *HSPG2*. Um vetor doador da sequência do cassete (indicado em vermelho), contendo dois braços de homologia à região-alvo (LA e RA – de 1 kb cada), foi desenhado para que o gene de resistência ao antibiótico (BSB) seja inserido pelo mecanismo de reparo do DNA mediado por homologia. As sequências PAM (5'NGG de *Streptococcus pyogenes*) de cada gRNA estão indicadas, assim como o promotor (EF-1α) e o sinal poliA contidos no cassete.

Os oligonucleotídeos correspondentes aos gRNAs escolhidos foram clonados em um vetor de expressão de gRNAs (MOSQUEIRA et al., 2018 – mapa no ANEXO B), originando os vetores recombinantes pU6-gRNA1 e pU6-gRNA2, cuja integridade foi conferida por sequenciamento (APÊNDICE H). Para a construção do vetor doador do cassete, as regiões LA e RA do gene *HSPG2* da linhagem WT1 foram amplificadas e inseridas em um outro vetor (pUC57) juntamente com o cassete de expressão da blasticidina, originando o vetor recombinante pUC57-HSPG2-Blast (mapa no APÊNDICE C).

4.3.2. Edição da região-alvo nas linhagens WT1, HI1 e DN1 e genotipagem dos clones obtidos

Para edição, escolhemos um clone de cada grupo de hiPSCs mutantes para *FBN1* (HI1 e DN1) e também um clone selvagem (WT1). O vetor de expressão da nCas9, em conjunto com pU6-gRNA1, pU6-gRNA2 e pUC57-HSPG2-Blast foram transfectados nas células e após seleção com blasticidina, as colônias individuais foram transferidas para placas-réplica para futura criopreservação ou genotipagem, da mesma forma que na edição de *FBN1*.

Quatro diferentes reações de PCR convencional foram utilizadas para genotipagem dos clones (detalhes na seção 3.5.4). A Figura 33 demonstra a estratégia utilizada e também os resultados da genotipagem de um clone positivo de cada grupo.

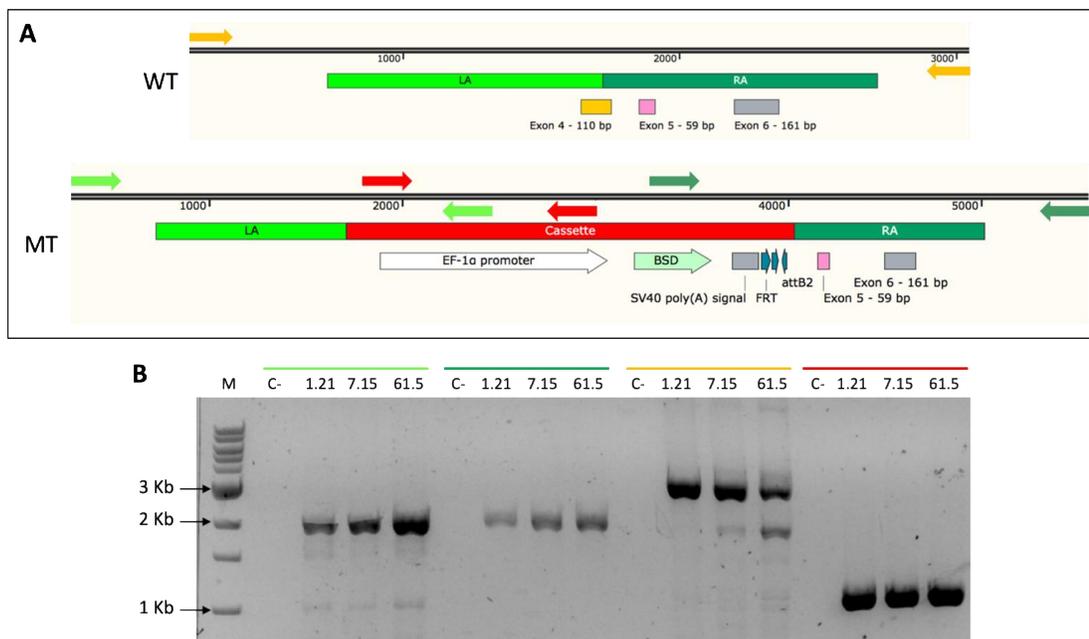


Figura 33. Estratégia e genotipagem de clones isogênicos de hiPSCs WT ou mutantes para o gene *FBN1* após edição do gene *HSPG2*. (A) Estratégia para genotipagem. As linhas pretas horizontais representam os alelos selvagem (WT) e mutante (MT) da região-alvo do gene *HSPG2*. Quatro pares de iniciadores (indicados por setas opostas coloridas) foram desenhados para: 1. amplificar o alelo selvagem (setas amarelas no alelo WT); 2. amplificar a junção LA-cassete (setas em verde claro no alelo MT); 3. amplificar o cassete (setas vermelhas em MT); 4. amplificar a junção RA-cassete (setas verdes escuras em MT). O tamanho dos produtos de PCR esperados são: 1 = 2.8 Kb (WT) e 5.1 Kb (MT – raramente amplificado); 2 = 1.8 Kb; 3 = 1 Kb e 4 = 1.9 Kb. (B) Gel de agarose 1% dos produtos gerados para um clone de cada grupo de *FBN1* (WT1: 1.21, HI1: 7.15 e DN1: 61.5) corretamente editado. As barras acima do gel indicam a cor dos pares de iniciadores utilizados, como estabelecido em (A). M: 1 Kb DNA ladder; C-: controle negativo das reações (sem gDNA adicionado).

Após sequenciamento da região-alvo dos clones que apresentaram resultados esperados nas reações de genotipagem, dois clones positivos para os grupos WT e DN foram encontrados e apenas um para o grupo HI. A Tabela 11 resume as identificações adotadas para os clones obtidos após edição.

Tabela 11. Nomenclatura para os clones de hiPSCs adotados após edição gênica do gene *HSPG2*. IDs: identificação.

Grupo	IDs
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/WT} / <i>HSPG2</i> ^{WT/KO}	1.9 e 1.21
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/KO} / <i>HSPG2</i> ^{WT/KO}	7.15
hiPSC <i>FBN1</i> ^{WT/Δ31} / <i>HSPG2</i> ^{WT/KO}	61.5 e 61.12

Após sequenciamento, notamos que a linhagem hiPSC^{WT16}, utilizada na edição, apresenta três variantes (rs2254357, rs2254358, rs3767141 – dbSNP) em heterozigose na região próxima à editada do gene *HSPG2*, duas delas no éxon 6, classificadas como sinônimos e benignas no ClinVar. Também notamos que a inserção do cassete aconteceu em diferentes cromossomos em alguns clones. Escolhemos então, para experimentos futuros, os clones 1.21, 7.15 e 61.5, que apresentaram a inserção no mesmo cromossomo (APÊNDICE J).

4.3.2.1. Análise da pluripotência e da integridade cromossômica dos clones obtidos

Para confirmação da manutenção da integridade cromossômica dos clones gerados, foi realizada análise de cariótipo dos cinco clones e os resultados foram normais em todos os casos (dados não mostrados). Também não foi detectada contaminação por micoplasma (dados não mostrados).

A análise da expressão dos marcadores de pluripotência já descritos anteriormente também demonstrou resultados esperados (Figura 34).

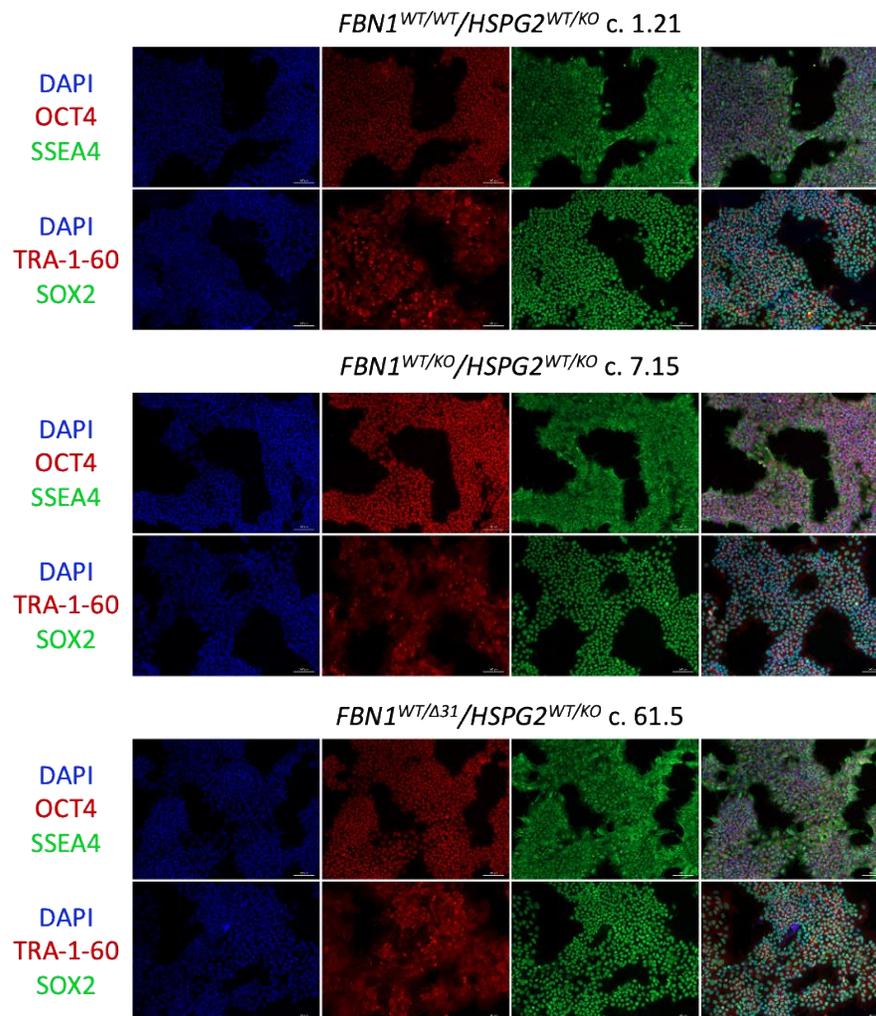


Figura 34. Expressão de marcadores de pluripotência nos clones de hiPSCs obtidos após edição gênica de *HSPG2*. A presença dos fatores de transcrição OCT4 e SOX2 e das proteínas de superfície SSEA4 e TRA-1-60 foi analisada em hiPSCs indiferenciadas 48 horas após a passagem. Observa-se a a localização nuclear de OCT4 e SOX2 e a citoplasmática/de membrana de SSEA4 e TRA-1-60, além da sobreposição (coluna de imagens mais à direita). Barra de escala: 100 μ m.

4.4. Confirmação do caráter haploinsuficiente e dominante negativo das mutações geradas em *FBN1* por edição gênica e nas linhagens paciente-específicas

4.4.1. Geração de corpos embrioides (EBs) e diferenciação espontânea

Para verificarmos se os efeitos das mutações em *FBN1* nas linhagens isogênicas e paciente-específicas correspondem ao previsto por análises *in silico*, decidimos gerar corpos embrioides (EBs) para posterior indução da diferenciação espontânea das hiPSCs. Os EBs consistem em agregados tridimensionais de hPSCs e são comumente utilizados no processo de caracterização da pluripotência dessas células demonstrando sua capacidade de se diferenciar em tipos celulares dos três folhetos embrionários. Em nosso laboratório, desenvolvemos um protocolo de geração de EBs por meio da fragmentação manual das colônias de hiPSCs, que utilizamos rotineiramente nas etapas de caracterização das novas linhagens geradas, e observamos que a diferenciação espontânea gera células com alta expressão de *FBN1* em comparação com cardiomiócitos derivados das células pluripotentes (dados não mostrados).

Para a caracterização da expressão gênica e proteica de *FBN1* nos mutantes e sua comparação com linhagens selvagens, estabelecemos uma estratégia que consiste na formação dos EBs por cinco dias, e sua posterior diferenciação espontânea por 10 ou 25 dias. Após este período, realizamos as análises (Figura 35).

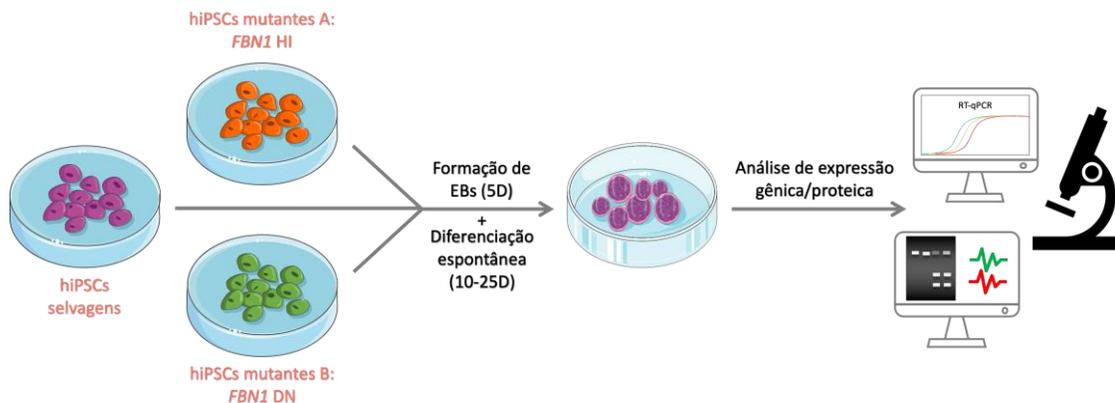


Figura 35. Estratégia utilizada para caracterização de mutantes HI e DN para o gene *FBN1*.

Os fragmentos de colônias de hiPSCs selvagens ou mutantes foram mantidos em suspensão por cinco dias (5D) para formação dos corpos embrioides (EBs) que foram posteriormente cultivados em um meio genérico, que permite a diferenciação celular espontânea, por 10 ou 25 dias (10-25D). Decorrido este tempo, as estruturas foram coletadas ou fixadas para análise da expressão gênica e proteica de *FBN1*. HI: haploinsuficiente; DN: dominante negativo.

Em estágios distintos do projeto, utilizamos dois diferentes métodos para a formação dos EBs: o primeiro (método 1) consiste na fragmentação manual das colônias de hiPSCs e acarreta a formação estruturas de tamanhos diversos após cinco dias; o segundo (método 2), mais consistente entre experimentos independentes, consiste na dissociação das colônias em células individuais e replaqueamento em placas de 96-poços de baixa aderência com fundo U.

4.4.2. Expressão gênica e proteica de *FBN1* em EBs no D15

Em um primeiro experimento (método 1), coletamos as células diferenciadas no dia 15 e analisamos a expressão total do gene *FBN1* nas linhagens WT1, WT2, HI1, HI2, DN1, DN2, KO, DN/DN e também nas paciente-específicas SMF1 e SMF2 (N=1/linhagem). Em comparação com as respectivas células indiferenciadas, observamos um aumento de mais de 50 vezes na

expressão desse gene após diferenciação espontânea e, para algumas linhagens, este aumento levou a uma expressão comparável até mesmo à observada em fibroblastos adultos primários (Figura 36). Observamos um padrão de expressão condizente com o esperado para o clone KO, que apresentou uma redução de cerca de 10x em comparação com os clones WT, e HI, para os quais observamos redução significativa de aproximadamente 50% (p-valor para comparação WT vs HI = 0.027, teste-t não pareado). Isso fortalece a hipótese de que o mRNA mutante seja degradado por NMD, como previsto inicialmente.

Para os clones DN, não observamos redução significativa na expressão de *FBN1* (p-valor WT vs DN=0.063). Também observamos consistência entre os clones CRISPR de mesmo grupo (WT, HI e DN). As linhagens DN/DN e SMF1 apresentaram uma expressão bastante aumentada em comparação com os clones selvagens WT1 e WT2. Porém, como um único experimento foi realizado para cada linhagem, não se pode correlacionar este fato com as mutações, principalmente se considerarmos a provável heterogeneidade de tipos celulares em EBs de linhagens/clones diferentes, visto que a diferenciação é espontânea. A linhagem paciente-específica SMF2 novamente apresentou expressão reduzida de *FBN1*, também corroborando a hipótese de degradação do mRNA mutante devido à sua mutação.

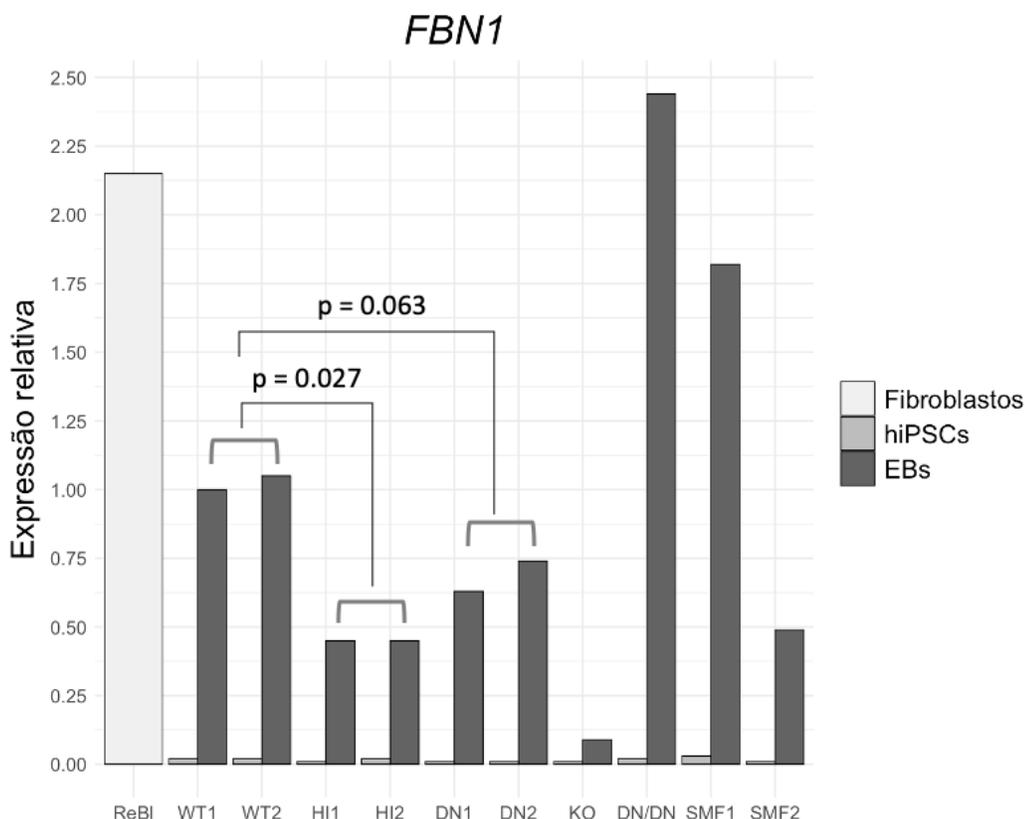


Figura 36. Expressão de *FBN1* em uma linhagem de fibroblastos adultos (ReBI), em hiPSCs e corpos embrioides (EBs) após 10 dias de diferenciação espontânea. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo o controle (=1) a linhagem EB-WT1. WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); HI: clones (da mesma linhagem) haploinsuficientes preditos; DN: clones (da mesma linhagem) dominantes negativos preditos; KO: clone (da mesma linhagem) duplo nocaute predito; DN/DN: clone (da mesma linhagem) homocigoto (no nível do mRNA) predito para a mutação DN ($\Delta 31$); SMF1: linhagem derivada de paciente portador da SMF (predito DN); SMF2: linhagem derivada de paciente portador da SMF (HI predita). Os valores de p referem-se à comparação entre grupos WT e HI ou WT e DN (somente EBs). N=1/clone.

Para verificar se nos clones HI isogênicos a expressão de *FBN1* observada provém de fato apenas do alelo selvagem, desenhamos iniciadores específicos para o produto deste alelo e comparamos com a expressão gênica total. Observamos que, tanto para a linhagem HI1 quanto para HI2, a expressão de *FBN1* selvagem é bastante próxima da expressão total do gene (razão WT/total

para HI1 = 0,95; HI2 = 0,75). Para a linhagem KO, os níveis de expressão do alelo selvagem foram indetectáveis, como esperado, o que confirma a especificidade dos iniciadores alelo-específicos utilizados (Figura 37).

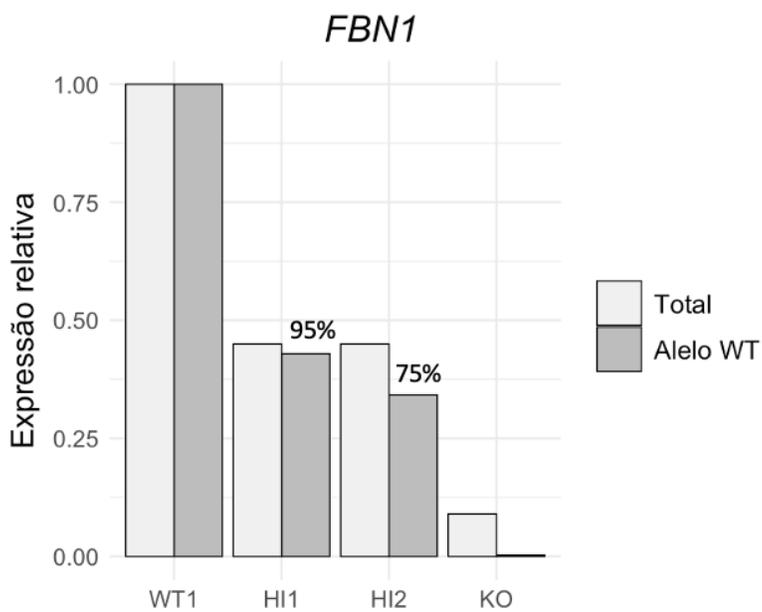


Figura 37. Expressão de *FBN1* total e alelo-específica em EBs selvagens e mutantes após 10 dias de diferenciação espontânea. Os valores de expressão gênica relativa de *FBN1* total foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo o controle (=1) a linhagem WT1. Para a expressão alelo específica, a expressão relativa foi calculada utilizando-se uma fórmula que considera a eficiência de amplificação dos iniciadores (PFAFFL, 2001). Também neste caso, o controle (expressão relativa = 1) foi a linhagem WT1. WT1: clone da linhagem hiPSC^{WT16} não editado (selvagem); HI: clones haploinsuficientes preditos; KO: clone duplo nocaute predito. A porcentagem estimada de produto selvagem com relação ao total está indicada para cada linhagem HI. N=1/clone.

Para as linhagens DN1, DN2 e DN/DN, verificamos a presença do mRNA mutante (com a deleção do éxon 31) por RT-PCR, visto que a diferença entre os produtos dos diferentes alelos é de mais de 100 pb. Confirmamos a presença de uma banda com tamanho esperado para o alelo selvagem e outra correspondente ao alelo mutante para as linhagens heterozigotas e somente do produto mutante

para a linhagem DN/DN, como esperado (Figura 38A). As demais linhagens (WT1-2, HI1-2 e KO) apresentaram apenas a banda correspondente ao alelo selvagem, também como esperado. Confirmamos assim que o mRNA proveniente do alelo mutante é transcrito e não sofre degradação devido à mutação. Desenhamos iniciadores alelo-específicos para a região, de forma a quantificar a expressão dos alelos selvagem e mutante por RT-qPCR, porém, devido à baixa especificidade desta região do gene, a padronização não foi possível (dados não mostrados). Esta baixa especificidade também justifica a ocorrência de vários alvos não intencionais possíveis para os gRNAs usados (seção 3.4.3) e a presença de bandas inespecíficas na amplificação (Figura 38A). Por análise de densitometria do gel, estimamos então a proporção entre as intensidades das bandas selvagem e mutante com relação ao total e observamos intensidades um pouco maiores para os produtos mutantes das duas linhagens DN (Figura 38B), provavelmente apenas por ser um fragmento menor, preferencialmente amplificado, como já visto na amplificação do gDNA na Figura 27.

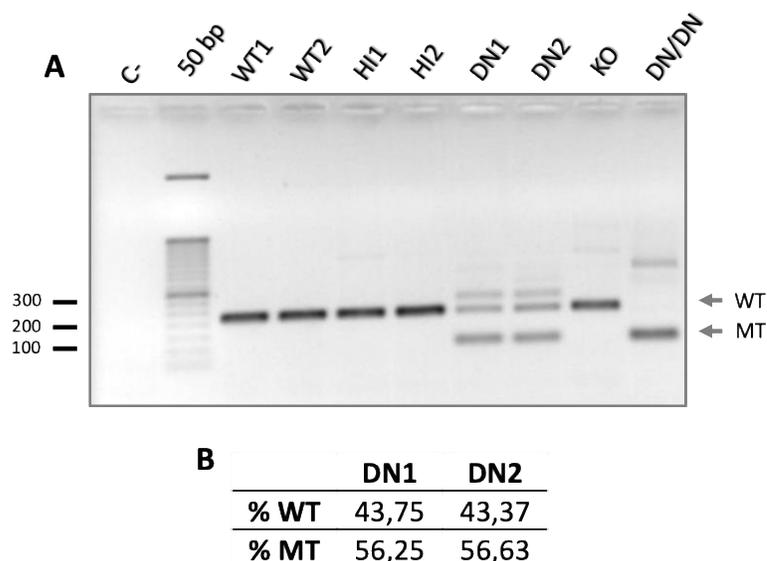


Figura 38. Análise da expressão alelo-específica dos mutantes com deleção do éxon 31 do gene *FBN1* por RT-PCR. (A) Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da amplificação do cDNA do gene *FBN1* na região com a deleção. À direita estão indicados as alturas esperadas para a banda selvagem (WT – 226 pb) ou mutante (MT – 100 pb). C-: controle negativo da reação. (B) Tabela com os resultados da densitometria demonstrando as porcentagens de intensidade relativa de cada uma das bandas (WT e MT) para as linhagens DN1 e DN2.

Para verificar se a exclusão do éxon 31 no processo de *splicing* do mRNA mutante de fato ocorreu sem alteração do quadro de leitura do gene, sequenciamos os produtos do RT-PCR das linhagens DN1, DN2 e DN/DN. Verificamos que, como previsto, a deleção do éxon aconteceu sem alteração da sequência subsequente, como previsto *in silico* (Figura 39). Também observamos que, novamente como previsto, apesar de apresentar heterogeneidade alélica, a linhagem DN/DN possui apenas um tipo de transcrito para *FBN1*, indicando que o resultado de ambas as mutações foi o mesmo, sendo esta, portanto uma linhagem homocigota para a deleção do éxon 31.



Figura 39. Sequenciamento dos cDNAs obtidos por amplificação da região do éxon 31 de *FBN1* das linhagens DN1, DN2 e DN/DN. A sequência referência (RefSeq) está indicada pela

seta. Os éxons estão indicados por retângulos coloridos no topo da figura. Uma parte do éxon 31 foi omitida para mais completa visualização da região. Os símbolos (-) nos cromatogramas das linhagens indicam deleções das bases nas respectivas posições. Observa-se que houve omissão do éxon 31 sem alteração do quadro de leitura do gene em apenas um dos alelos de DN1 e DN2 e nos dois de DN/DN.

Testamos diferentes anticorpos comerciais para fibrilina-1, tanto por WB (Sigma Aldrich, Cat. HPA021057; ThermoFisher Scientific, Cat. PA527358) quanto por IF (Millipore, Cat. MAB2502; Sigma Aldrich, Cat. HPA021057; Abcam, Cat. ab3090), além do anticorpo α -rF6H (TIEDEMANN et al., 2001). No WB, após padronização, apenas o anticorpo da Sigma Aldrich previamente utilizado por BALDWIN et al. (2014) e CAIN et al. (2016) apresentou marcação específica (Figura 40) e, na IF, somente o MAB2502, caracterizado por KIELTY e colaboradores (2005) e utilizado por GRANATA et al. (2016) demonstrou-se eficiente (dados não mostrados). Em ambos os experimentos, não foi detectada expressão de proteína na linhagem KO. Porém, como para ambos os anticorpos, a detecção de fibrilina-1 requereu altas exposições (15 minutos para o WB e cerca de 3 segundos para a IF), mesmo para amostras de fibroblastos adultos primários cultivamos pelo mesmo período (dados não mostrados), repetimos esta análise após cultivarmos os EBs por mais tempo (ver adiante).

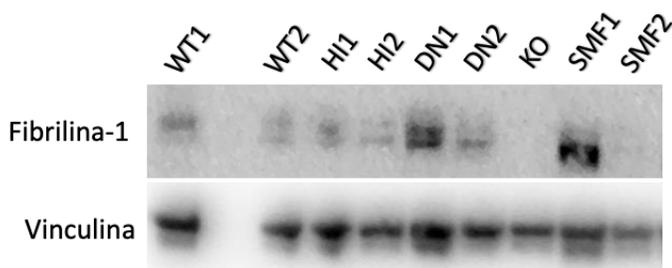


Figura 40. Análise da expressão de fibrilina-1 em corpos embrioides após 10 dias de diferenciação espontânea por Western Blot. Os EBs foram gerados pelo método de

fragmentação manual (método 1) das colônias de hiPSCs e a vinculina (130 kDa) foi utilizada como controle de carregamento de proteínas de cada amostra. A banda da fibrilina-1 apresentou tamanho aproximado de 300 kDa. WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); HI: clones haploinsuficientes preditos; DN: clones dominantes negativos preditos; KO: clone duplo nocaute predito; SMF1: linhagem derivada de paciente portador da SMF (predito DN); SMF2: linhagem derivada de paciente portador da SMF (HI predita).

É interessante observarmos que, para a linhagem SMF2, apesar de os níveis de expressão de mRNA se mostrarem reduzidos apenas em cerca de 50% (Figura 17 e Figura 36), praticamente não foi detectada proteína por WB (Figura 40). SCHRIJVER e colaboradores (2002) reportaram casos semelhantes, em que variantes que levam ao surgimento de PTCs apresentaram redução de deposição de fibrilina-1 desproporcionalmente menor que a redução observada no nível transcricional. O mesmo estudo reporta, porém, que células de um paciente cuja alteração em *FBN1* leva a um PTC no mesmo éxon que SMF2 (éxon 16, ou éxon codificante 15 no trabalho citado) não faz parte deste grupo e apresenta redução semelhante nos níveis transcricional e proteico.

4.4.3. Expressão gênica e proteica de *FBN1* em EBs no D30

Para confirmarmos os resultados acima, geramos novos EBs utilizando o método 1 e os cultivamos por mais tempo (até o dia 30). Nossa hipótese era de que o cultivo por um período mais longo poderia aumentar significativamente a formação de microfibrilas, sendo possível detectarmos a presença de a fibrilina-1 com mais certeza de especificidade, tendo em vista a baixa eficiência dos anticorpos para esta proteína. Incluímos, além de WT1 e WT2, um terceiro clone WT (WT3).

Na análise de expressão gênica, observa-se uma alta variação entre os clones WT, apesar de todos apresentarem maior expressão que a linhagem KO, que teve níveis próximos de zero (Figura 41).

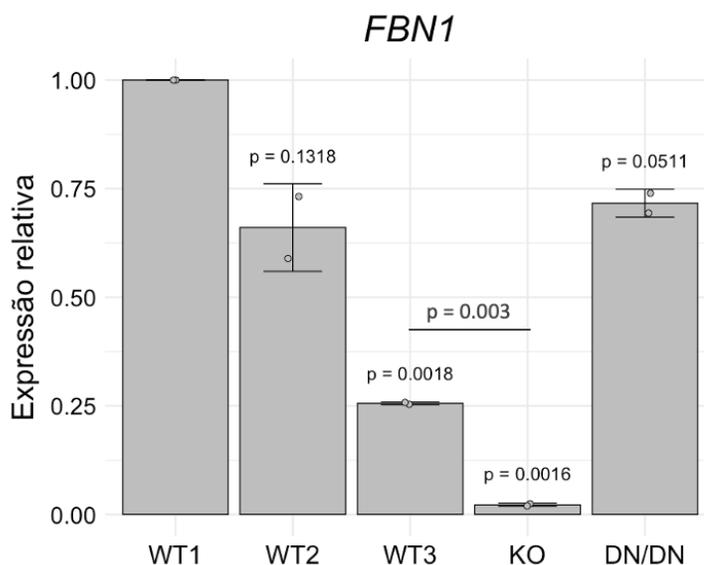


Figura 41. Expressão de *FBN1* em corpos embrioides (EBs) diferenciados espontaneamente por 25 dias. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo o controle (=1) a linhagem WT1. WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); KO: clone duplo nocaute predito; DN/DN: clone homozigoto (no nível do mRNA) predito para a mutação DN ($\Delta 31$). Os valores de p indicados acima de cada barra referem-se à comparação com WT1 (teste-t não pareado). N=2/clone.

A análise de expressão proteica dos mesmos EBs demonstrou resultados consistentes com os níveis de mRNA e, novamente, observamos ausência de marcação para fibrilina-1 na linhagem KO, tanto por WB (Figura 42A) quanto por IF (Figura 42B). Como esperado, a exposição necessária para visualização de marcação foi muito menor que em EBs no D15 (2 min para WB e 500 ms para IF).

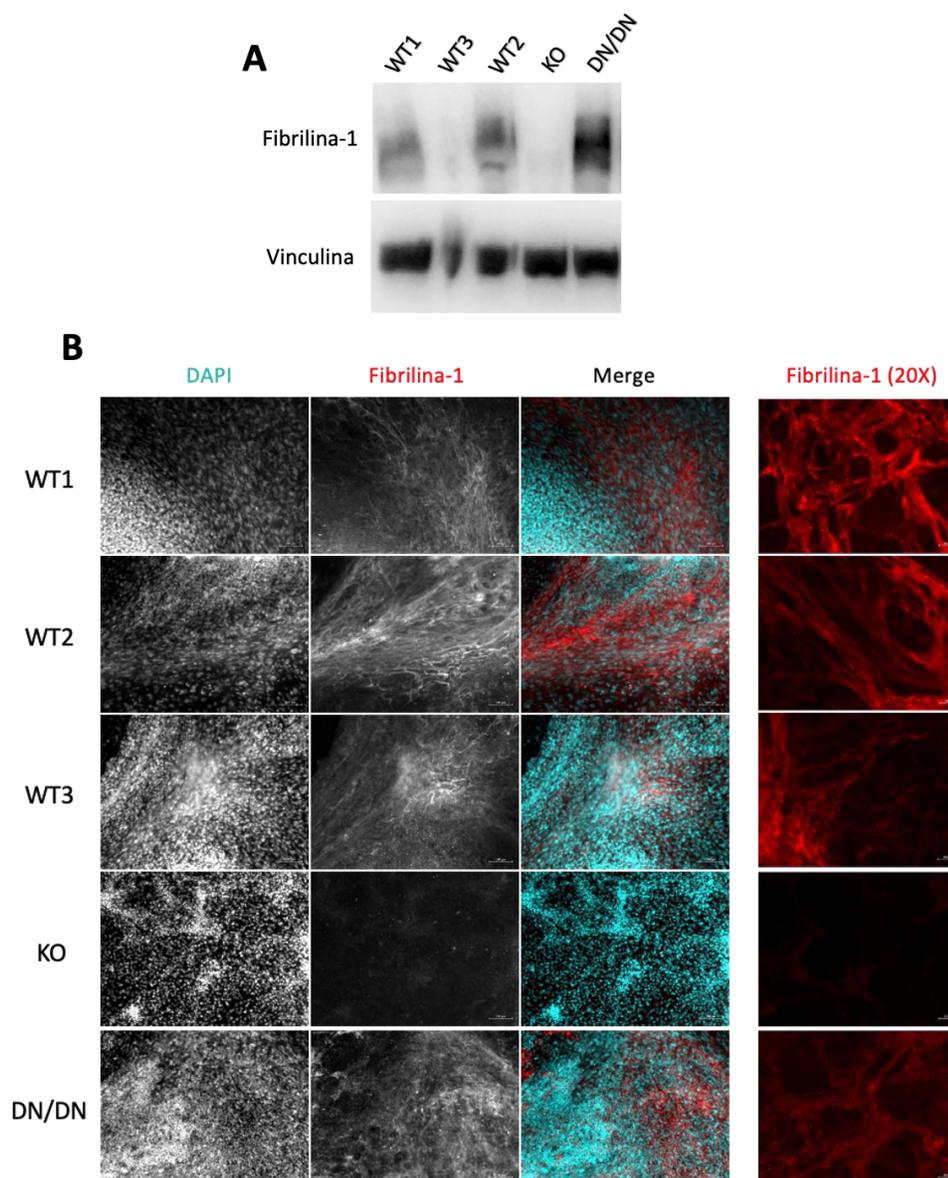


Figura 42. Análise da expressão de fibrilina-1 em corpos embrioides após 25 dias de diferenciação espontânea por Western Blot (A) ou imunofluorescência (B). Em (A), a vinculina (130 kDa) foi utilizada como controle de carregamento de proteínas de cada amostra. Para a linhagem WT3, a amostra não migrou corretamente durante a eletroforese possivelmente por estar muito concentrada e com alta viscosidade, o que resultou em uma banda estreita. A banda da fibrilina-1 apresentou tamanho aproximado de 300 kDa. Em (B), observa-se marcação específica, de estruturas fibrilares, apenas para as linhagens WT e DN/DN. Barra de escala: 100 μm ou 20 μm (20x). WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); KO: clone duplo nocaute predito; DN/DN: clone homocigoto (no nível do mRNA) predito para a mutação DN ($\Delta 31$).

Com estes experimentos, demonstramos que a alteração c.3delG de HI1 e KO de fato leva à anulação do alelo, como esperado. A variante c.5_6insG, de HI2 e HI3, também parece levar ao decaimento do transcrito, como demonstrado pelos resultados da análise de expressão alelo-específica do gene *FBN1* (Figura 37). Devido à falta de um mutante homocigoto para esta alteração, não conseguimos fazer esta comprovação no nível proteico, já que a heterogeneidade dos EBs torna imprecisas comparações quantitativas entre diferentes clones, como visto mesmo entre clones WT. Também demonstramos que a deleção do éxon 31 com preservação do quadro de leitura (mutação de DN1, DN2 e DN/DN) acarreta a produção e, pelo menos em DN/DN, a secreção de uma forma mutada da fibrilina-1, o que confirma seu caráter dominante negativo. Entretanto, para os clones heterocigotos, não está descartada a possibilidade de compensação dos efeitos das mutações pelo alelo selvagem.

4.5. Expressão de *HSPG2* em EBs

Utilizando a mesma estratégia, em um experimento-piloto (N=1/clone), analisamos a expressão de *HSPG2* nos duplo-mutantes obtidos por edição gênica. Os EBs foram gerados pelo método 2 e somente o clone WT1 entre os clones selvagens para o gene foi utilizado, visto que os EBs obtidos para HI1 e DN1 foram gerados por outro método. Observa-se que, como esperado, houve redução expressiva da expressão de *HSPG2* nos clones com alteração (Figura 43). Desenhamos iniciadores específicos para o alelo selvagem, mas não conseguimos garantir sua especificidade e a padronização não foi possível (dados não mostrados).

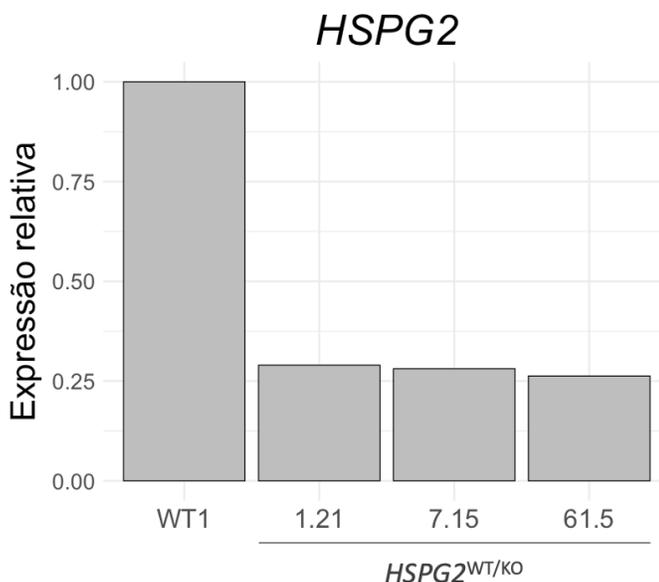


Figura 43. Expressão de *HSPG2* em corpos embrioides (EBs) de clones selvagens e editados após 10 dias de diferenciação espontânea. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo o controle (=1) a linhagem WT1. WT1: clone da linhagem hiPSC^{WT16} não editado (selvagem); 1.21: clone derivado de WT1, editado apenas para o gene *HSPG2*; 7.15: clone derivado de HI1, com mutação em heterozigose em *FBN1* e *HSPG2*; 61.5: clone derivado de DN1, com mutação em heterozigose em *FBN1* e *HSPG2*. N=1/clone.

4.6. Análise do padrão proliferativo dos clones editados para *FBN1* e *HSPG2*

De forma a analisamos se a taxa de proliferação se alterou significativamente após as edições gênicas, quantificamos as duplicações populacionais durante três passagens dos clones isogênicos WT1, WT2, HI1, HI2, DN1 e dos três clones *HSPG2*^{WT/KO}. Não observamos diferenças entre mutantes e selvagens, nem quanto ao total de duplicações (Figura 44A – N=1/passagem) e nem quanto ao tempo para duplicação (Figura 44B).

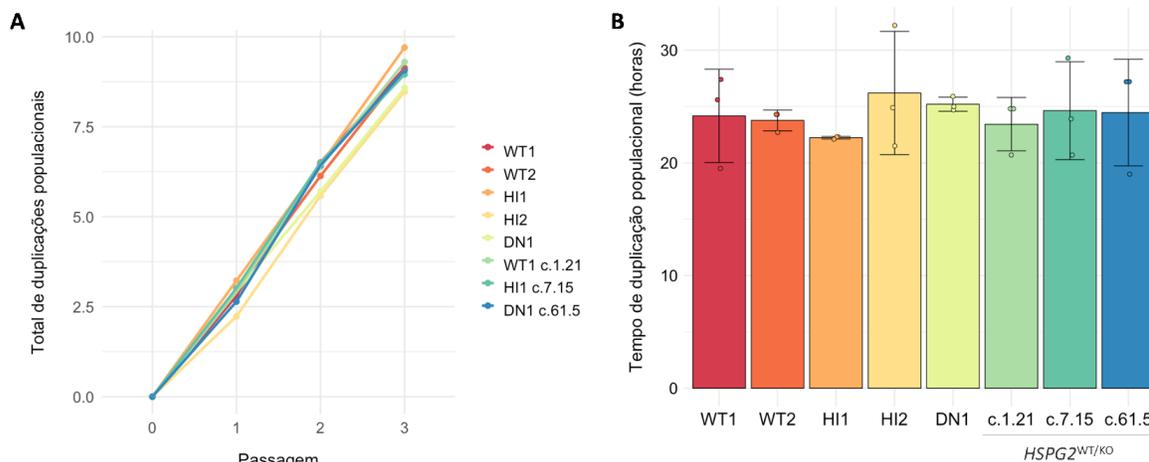


Figura 44. Quantificação do número total e do tempo de duplicações populacionais de hiPSCs selvagens e editados. (A) Total de duplicações populacionais após três passagens em cultura. O número total de vezes que a população de hiPSCs de cada clone duplicou foi calculado segundo a fórmula: $cPD = \sum \frac{\log_{10} \frac{N}{N_0}}{\log_{10} 2}$, sendo N o número de células coletadas após 72 horas e N_0 o número inicialmente plaqueado. (B) Tempo de duplicação populacional. O tempo de duplicação médio para cada uma das passagens foi calculado dividindo-se 72 (horas) pelo número de duplicações populacionais ($\frac{\log_{10} \frac{N}{N_0}}{\log_{10} 2}$). WT: clones selvagens; HI: clones haploinsuficientes; DN: clones dominantes negativos; 1.21: clone derivado de WT1, editado apenas para o gene *HSPG2*; 7.15: clone derivado de HI1, com mutação em heterozigose em *FBN1* e *HSPG2*; 61.5: clone derivado de DN1, com mutação em heterozigose em *FBN1* e *HSPG2*.

Também analisamos a expressão do marcador de proliferação KI67 por imunofluorescência (exemplo na Figura 45). Não observamos diferenças na porcentagem de células positivas para o marcador entre os clones e, como esperado para células com alto potencial de autorrenovação como as iPSCs, praticamente 100% das células apresentaram-se KI67-positivas (média $99.49\% \pm 1.18$).

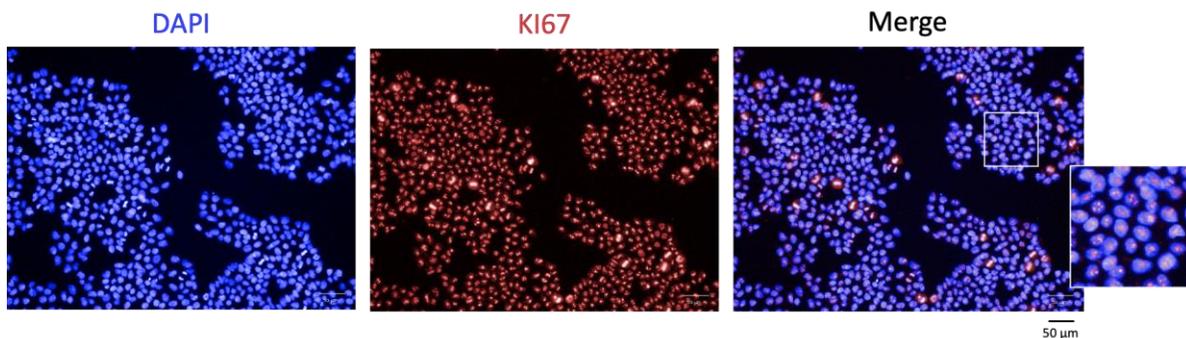


Figura 45. Expressão de KI67 em hiPSCs. As células foram cultivadas por 48 horas antes da fixação. No detalhe, à direita, é possível observar a marcação nuclear do KI67. O KI67 associa-se à periferia dos cromossomos mitóticos (CUYLEN et al., 2016) e, por isso, apresenta marcações pontuais no núcleo. A quantificação foi feita por meio da contagem automatizada de núcleos KI67-positivos e do número total de células. Barra de escala: 50 μ m.

Desta forma, concluímos que as mutações em *FBN1* e *HSPG2* não alteram a taxa proliferativa das hiPSCs.

4.7. Análise fenotípica de iCMs selvagens e mutantes para o gene *FBN1*

4.7.1. Diferenciação em cardiomiócitos

Para investigarmos a ocorrência de fenótipos da DCM em cardiomiócitos selvagens e mutantes para o gene *FBN1*, diferenciamos as linhagens/clones de hiPSCs cardiomiócitos e comparamos os grupos segundo diversos parâmetros. A maior parte dos experimentos foi realizada no laboratório do Prof. Chris Denning, na University of Nottingham. Este laboratório foi escolhido justamente por sua experiência no uso de cardiomiócitos derivados de hiPSCs (iCMs) para o modelamento *in vitro* de diferentes doenças hereditárias, como a HCM, e por ter desenvolvido diversas técnicas para análise fenotípica de iCMs (MOSQUEIRA et al., 2018). O protocolo de diferenciação utilizado durante este período foi diferente

do previamente descrito, assim como a quantificação da eficiência da diferenciação, que foi realizada, na maioria das vezes, por imunofluorescência utilizando-se o sistema de aquisição e análise automatizada de imagens. A proporção de cardiomiócitos foi calculada de por meio da contagem de células positivas para o marcador α -actinina (ou troponina-T cardíaca) no dia 30 de diferenciação (exemplo na Figura 46A). Em outros casos, assim como descrito anteriormente, foi realizado um experimento de citometria de fluxo com o mesmo objetivo, também no dia 30 (exemplos na Figura 46B). Utilizamos nos experimentos apenas diferenciações com eficiência superior a 90%. Os clones utilizados foram o WT1, WT2, HI1, HI2 e DN1.

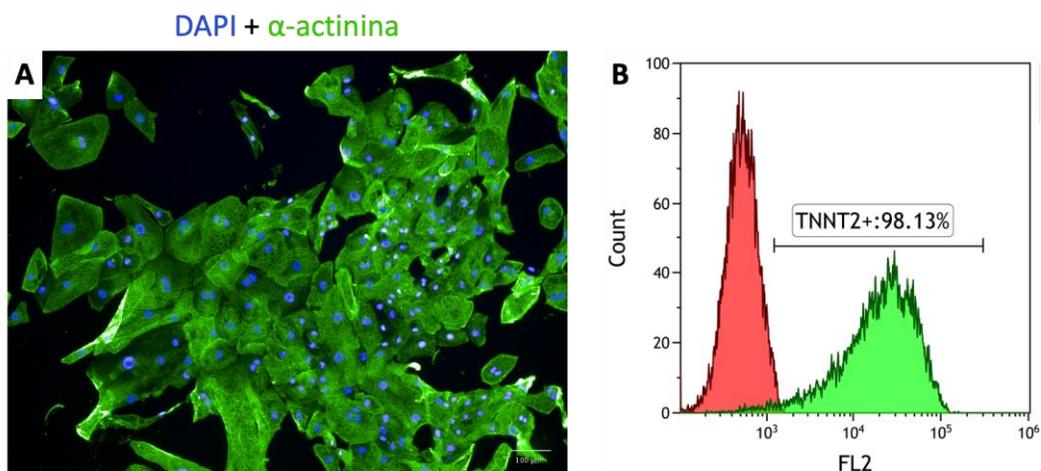


Figura 46. Análise da eficiência das diferenciações de hiPSCs em cardiomiócitos por imunofluorescência (IF) ou citometria de fluxo (CF). As diferenciações feitas na University of Nottingham foram quantificadas pela análise da expressão de marcadores específicos de cardiomiócitos, α -actinina ou troponina-T cardíaca. (A) Exemplo de um experimento de IF no dia 30 de diferenciação. Observa-se que todas as células apresentaram marcação para α -actinina. Barra de escala: 100 μ m. (B) Exemplo de um experimento de CF com 98,13% da população positiva para troponina-T cardíaca (TNNT2).

4.7.2. Análise fenotípica de iCMs selvagens e mutantes

4.7.2.1. Proliferação

Por terem sido observadas alterações contráteis e proliferativas de células musculares em modelos murinos para a SMF (BUNTON et al., 2001; GYURICZA, 2019) e em células diferenciadas a partir de hiPSCs paciente-específicas (GRANATA et al., 2016), e também devido ao papel de TGF- β na proliferação celular no contexto da SMF (CROSAS-MOLIST et al., 2015) e possivelmente de cardiomiócitos (SORENSEN; VAN BERLO, 2020), decidimos quantificar a expressão do marcador KI67 em diferentes dias pós início da diferenciação de hiPSCs em iCMs (dias 14, 16, 18, 20 e 35). Observamos, para todas as linhagens, uma baixa porcentagem de células KI67-positivas no dia 14 (<35% - Figura 47A), se comparado ao previamente observado para hiPSCs. Essa porcentagem é condizente com o previamente reportado na literatura para este estágio de diferenciação, assim como a queda na proporção de células proliferativas ao longo do tempo (Figura 47B) (FUNAKOSHI et al., 2016; TITMARSH et al., 2016), visto que o aumento mais significativo no número de células acontece durante as fases iniciais da diferenciação, em que as células progenitoras cardíacas (CPCs) se proliferam ativamente (CAO et al., 2012). Com relação à comparação entre as diferentes linhagens, não observamos diferenças significativas em nenhum dos dias analisados.

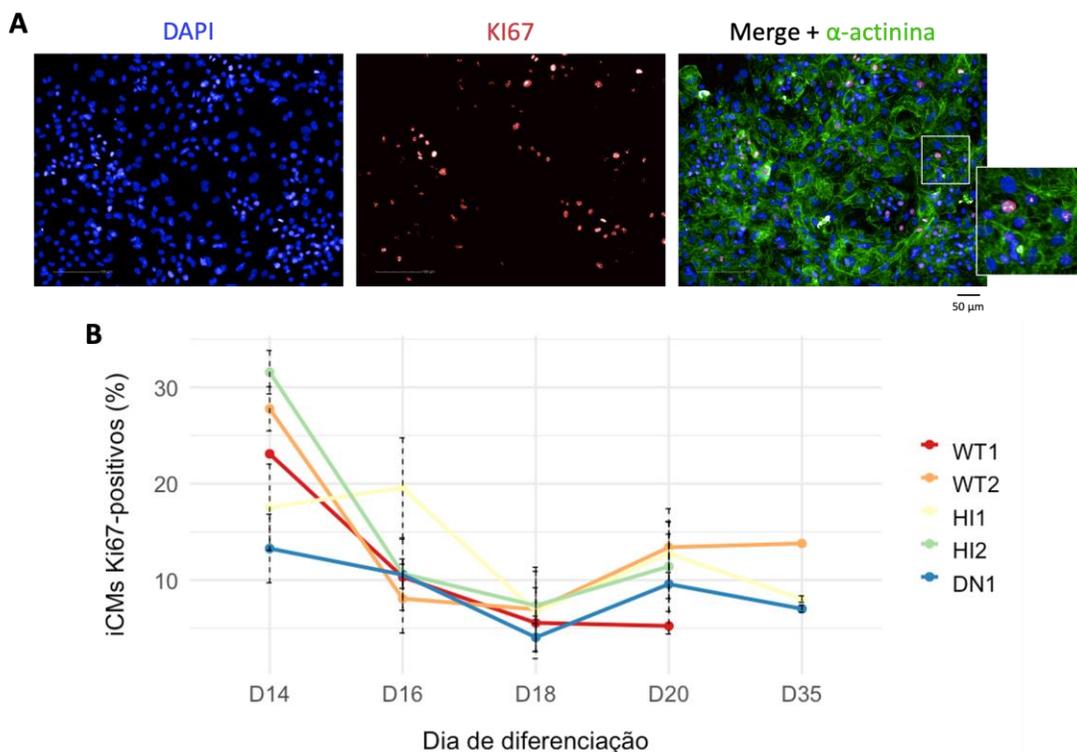


Figura 47. Expressão de KI67 em diferentes estágios da diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos. Cardiomiócitos derivados de hiPSCs (iCMs) com alterações no gene *FBN1* geradas por edição gênica foram dissociados no dia 12 pós início da diferenciação e replaqueados para análise da expressão do marcador KI67 por imunofluorescência. As análises foram feitas nos dias 14, 16, 18 e 20 (N=2 para WT1; N=3 para demais linhagens) ou dia 35 (N=1 para WT2; N=2 para HI1 e DN1) pós início da diferenciação. (A) Imagens representativas da expressão de KI67 no dia 14. (B) Percentual médio de iCMs (células α -actinina-positivas) proliferativos para cada linhagem nos diferentes dias. Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Willcoxon-Mann Whitney para análise dos dados e os valores de p obtidos foram maiores que 0,05 em todos os casos, exceto na comparação entre os dias de diferenciação ($p = 7,5 \times 10^{-6}$; Teste de Kruskal-Wallis). WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); HI: clones haploinsuficientes preditos; DN: clones dominantes negativos preditos.

Nossa hipótese era de que iCMs mutantes para *FBN1* apresentariam menor capacidade proliferativa, como observado para iVSMCs (GRANATA et al., 2016), e que, portanto, apresentariam menor número de células KI67-positivas, o que não foi observado. A alta variação entre os diferentes

experimentos de diferenciação e também uma possível baixa expressão de *FBN1* por estas células, discutida na seção 4.1.2.1, podem explicar nossos resultados. Outra explicação seria o diferente papel exercido pela fibrilina-1 em CMs e VSMCs.

4.7.2.2. Multinucleação e padrão de expressão de α -actinina e vinculina

Outros fenótipos, como a porcentagem de iCMs multinucleados e o padrão de expressão de α -actinina e também de vinculina (componente de um dos complexos dos costâmeros e de adesões focais) também foram analisados por IF. No primeiro caso, não observamos diferenças entre nenhum dos grupos (dados não mostrados), o que se justifica não somente pelo fato de o aumento na multinucleação de cardiomiócitos ser um fenótipo reportado para a HCM e não DCM, mas também por este ser considerado controverso e bastante sujeito a condições ambientais e a vieses experimentais (PASUMARTHI; FIELD, 2002; ESCHENHAGEN; CARRIER, 2019).

No segundo caso, a análise foi feita após a observação de uma aparente dificuldade dos iCMs mutantes para *FBN1* em se manterem completamente aderidos à placa, como exemplificado pela maior intensidade de α -actinina nas extremidades celulares e pelo maior número de adesões focais, evidenciado pela marcação da vinculina (Figura 48 – painel superior). Nossa hipótese era de que alterações na fibrilina-1 perturbariam as interações entre a MEC e os costâmeros, comprometendo a adesão celular e, possivelmente, também o alinhamento dos sarcômeros. Após desenvolvermos

um algoritmo para a quantificação destes parâmetros, porém, diferenças significativas não foram observadas entre as linhagens (Figura 48 – gráfico).

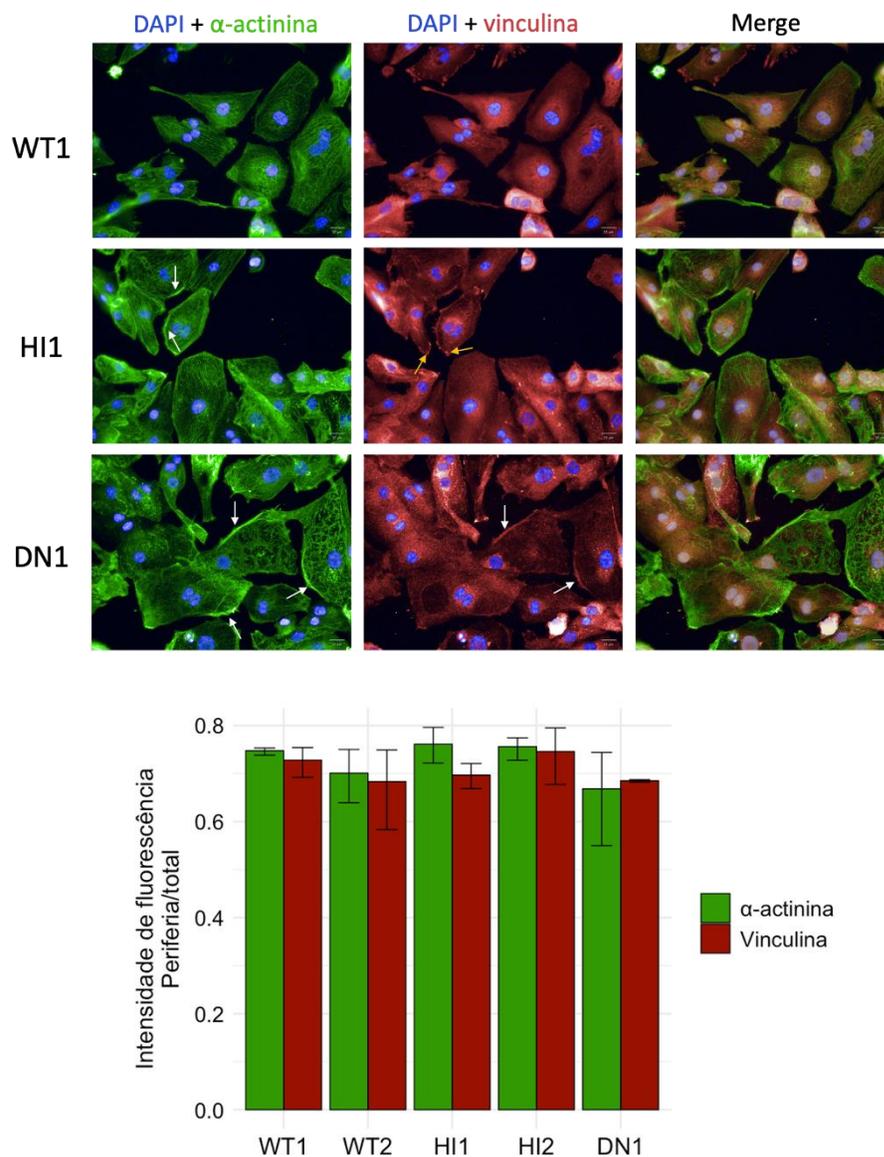


Figura 48. Padrão de expressão de α -actinina e vinculina em iCMs isogênicos com e sem mutação no gene *FBN1*. Cardiomiócitos foram dissociados no dia 15 pós início da diferenciação e analisados por imunofluorescência no dia 30. O painel superior exemplifica o padrão de marcação obtido para as proteínas α -actinina, um componente do complexo sarcomérico específico de cardiomiócitos, e vinculina, um componente dos costâmeros e das adesões focais (indicadas pelas setas amarelas), que participa da comunicação entre

componentes da matriz extracelular e os sarcômeros. As setas brancas indicam a aparente maior intensidade (ou concentração) dessas proteínas em regiões mais periféricas de alguns cardiomiócitos. O gráfico na parte inferior expõe os resultados da quantificação dessa intensidade periférica e da razão entre ela e a intensidade total da célula. A delimitação da periferia celular foi feita de forma automatizada. WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); HI: clones (da mesma linhagem) haploinsuficientes preditos; DN: clones (da mesma linhagem) dominantes negativos preditos.

4.7.2.3. Ensaio de BNP e expressão de *NPPA*, *NPPB* e *ACTA1*

Analisamos também a expressão de um marcador de hipertrofia, o peptídeo natriurético tipo B (BNP), codificado pelo gene *NPPB*, já mencionado. Sabe-se que o aumento da expressão deste peptídeo por cardiomiócitos está associado ao remodelamento hipertrófico causado por falha cardíaca, o que justifica seu uso clínico como biomarcador para o diagnóstico de doenças cardiovasculares (revisado por MAALOUF; BAILEY, 2016). Mais especificamente, os níveis de BNP no soro sanguíneo de pacientes portadores de HCM e DCM também estão aumentados, fenótipo este que já foi previamente reproduzido *in vitro* em iCMs paciente-específicos (revisado por ESCHENHAGEN; CARRIER, 2019). Em pacientes portadores da SMF, também foi reportado aumento dos níveis de NT-proBNP (fragmento N-terminal de BNP) no sangue, principalmente nos casos em que alguma disfunção diastólica estava presente (GEHLE et al., 2016).

Sendo assim, utilizamos um protocolo desenvolvido no Denning Lab (MOSQUEIRA et al., 2018) e quantificamos os níveis intracelulares de proBNP por IF nas linhagens selvagens ou mutantes para *FBN1* após tratamento com ET-1, um promotor de hipertrofia, e bosentan (BOS), um antagonista dos

receptores de ET-1 (ROUX; RUBIN, 2002). Exemplos de imagens geradas no ensaio podem ser vistos na Figura 49.

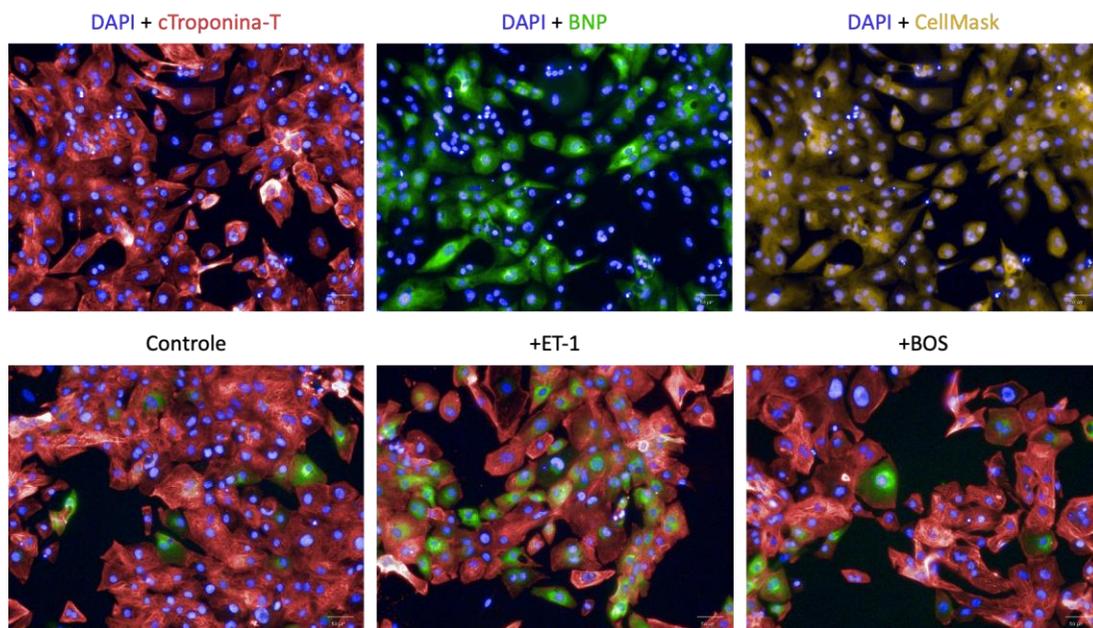


Figura 49. Expressão do peptídeo natriurético tipo B (BNP) em cardiomiócitos derivados de hiPSCs no dia 30 de diferenciação. As células foram (ou não) tratadas por 24 horas com endotelina-1 (ET-1 – 10 nM) ou bosentan (BOS – 100 nM) para estimular ou bloquear a expressão de BNP. A brefeldina-A, um inibidor do tráfego proteico, foi utilizada três horas antes da fixação para que a secreção proteica fosse inibida. O painel superior evidencia, individualmente, a expressão do marcador de cardiomiócitos troponina-T cardíaca (cTroponina-T), de BNP, cuja marcação é predominantemente perinuclear, e do corante de citoplasma CellMask, também utilizado na análise da expressão cardiomiócitos-específica do peptídeo. O painel inferior mostra os efeitos de cada um dos tratamentos na expressão de BNP pelos cardiomiócitos. Barras de escala: 50 µm.

Quantificamos a porcentagem de iCMs BNP-positivos, assim como a intensidade do sinal perinuclear nessas células, classificando-o como alto, médio ou baixo, como descrito por MOSQUEIRA et al. (2018). Observamos que, como esperado, o tratamento com ET-1 aumentou o percentual de iCMs BNP-positivos (Figura 50) e também a intensidade média de sinal nessas

células (dados não mostrados). Entretanto, não encontramos diferenças significativas entre as linhagens em nenhum dos casos, e observamos que a variação entre diferentes experimentos de diferenciação foi bastante acentuada para ambos os parâmetros, ainda que a pureza (porcentagem de cardiomiócitos produzidos) não tenha variado significativamente (dados não mostrados).

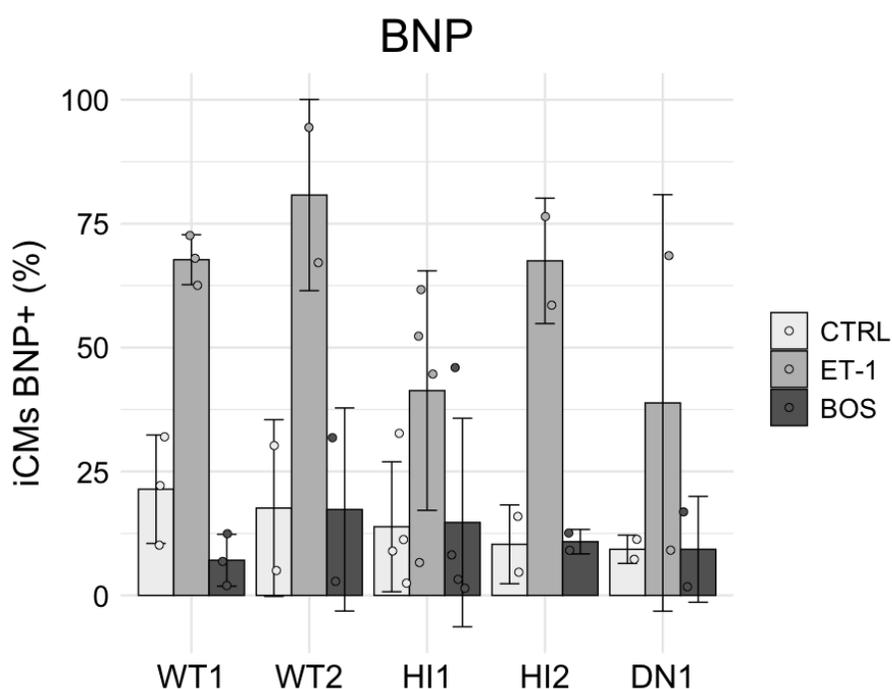


Figura 50. Expressão do peptídeo natriurético tipo B (BNP) em cardiomiócitos derivados de linhagens de hiPSCs (iCMs) selvagens e mutantes para o gene *FBN1*. As células foram dissociadas no dia 15 pós início da diferenciação e replaqueadas para análise da expressão de BNP por imunofluorescência no dia 30. Vinte e quatro horas antes da fixação, as células foram (ou não – CTRL) tratadas com endotelina-1 (ET-1 – 10 nM) ou bosentan (BOS – 100 nM) para estimular ou bloquear a expressão do peptídeo. iCMs BNP+: células duplamente marcadas para troponina-T cardíaca e BNP. WT: clones da linhagem hiPSC^{WT16} não editados (selvagens); HI: clones haploinsuficientes; DN1: clone dominante negativos. Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Willcoxon-Mann Whitney para análise dos dados e os valores de p

obtidos foram maiores que 0,05 em todos os casos, exceto na comparação entre os tratamentos ($p = 0,00017$; Teste de Kruskal-Wallis).

Verificamos então a expressão gênica de *NPPB* e dos demais marcadores de hipertrofia após tratamento com 100 nM de ET-1 por 24 horas, como feito para as linhagens paciente-específicas (seção 4.1.2.2). Utilizamos neste ensaio todos os clones isogênicos (WT1-3, HI1-3, DN1-2, KO e DN/DN), que foram agrupados em WT, HI, DN, KO ou DN/DN. Para *NPPA* (Figura 51A), observamos que, na ausência de tratamento, apenas o grupo DN apresentou expressão aumentada em comparação ao grupo WT (p -valor = 0,0051; Teste t não pareado), apesar de a mesma tendência ter sido observada para o clone KO ($p = 0,3016$). Após o tratamento com ET-1 foram observadas diferenças entre o grupo WT e os grupos DN ($p = 0,018$), KO ($p = 3,5 \times 10^{-5}$) e DN/DN ($p = 0,0022$), mas não HI ($p = 0,1773$), para o qual a variação entre os diferentes clones foi bem alta.

Para *NPPB* (Figura 51B) e *ACTA1* (Figura 51C), não foram observadas diferenças entre nenhum dos grupos mutantes e o grupo WT, nem na ausência de tratamento (*NPPB*: $0,413 < p < 0,8$; *ACTA1*: $0,063 < p < 0,533$; Teste de Wilcoxon-Mann Whitney) e nem após estímulo por ET-1 (*NPPB*: $0,063 < p < 1$; *ACTA1*: $0,133 < p < 1$). As análises estatísticas completas estão no APÊNDICE G.

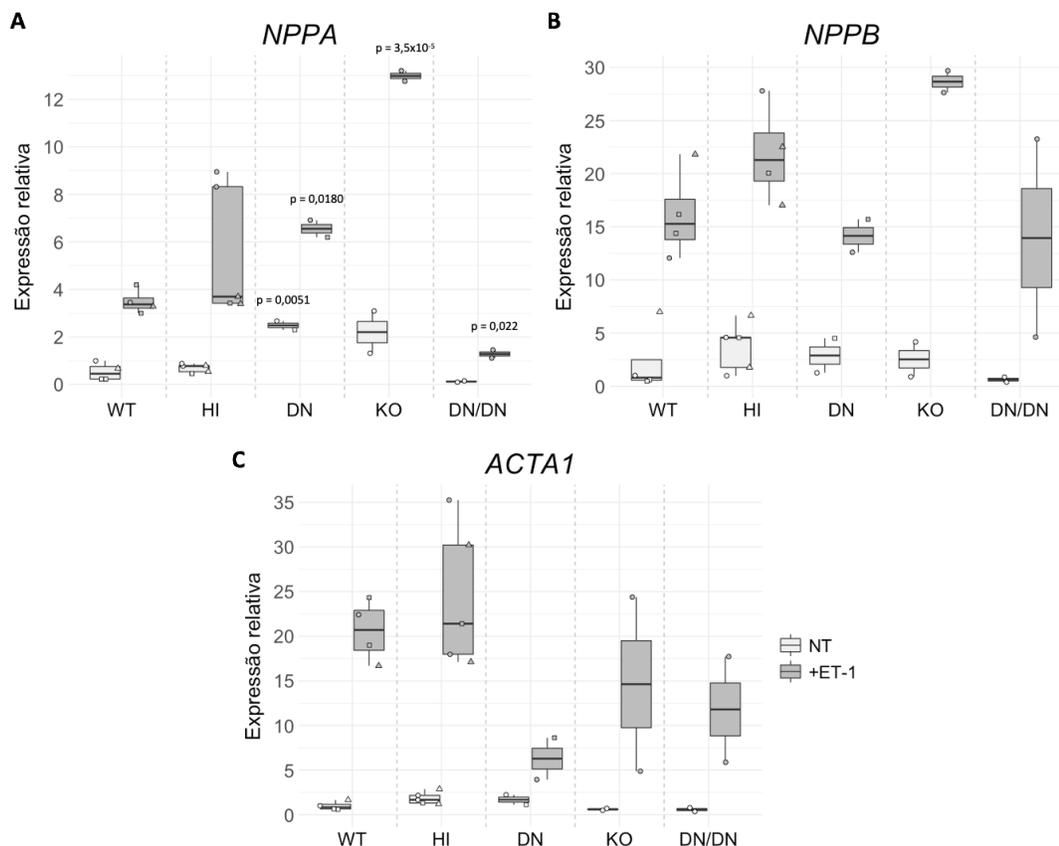


Figura 51. Expressão de marcadores de hipertrofia em iCMs isogênicos selvagens e mutantes para o gene *FBN1* no dia 30 de diferenciação. Cardiomiócitos derivados de hiPSCs foram dissociados no dia 15 de diferenciação e coletados no dia 30. Durante as 24 horas anteriores à coleta, as células foram (+ET-1) ou não (NT) submetidas ao tratamento com endotelina-1 na concentração de 100 nM. (A) Expressão de *NPPA*. Os valores de p indicados referem-se à comparação com o grupo selvagem de mesmo tratamento (Teste-t não pareado) e somente os valores menores que 0,05 foram indicados. (B) Expressão de *NPPB*. (C) Expressão de *ACTA1*. Os diferentes símbolos (\circ , \square e \triangle) indicam clones específicos de cada grupo (1, 2 ou 3), e cada ponto indica uma réplica de uma diferenciação independente. WT: grupo selvagem; HI: grupo haploinsuficiente; DN: grupo dominante negativo; KO: clone duplo nocaute; DN/DN: clone homozigoto para a mutação DN. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo a referência (=1) uma das réplicas NT da linhagem WT1 (\circ) do grupo WT. Para análises estatísticas completas, ver APÊNDICE G. $N \geq 2/\text{grupo}$.

Os resultados descritos acima não corroboram o observado para as linhagens paciente-específicas (Figura 19). Para estas, não houve diferenças

entre os grupos WT e SMF para *NPPA*, ao contrário do observado para os clones isogênicos. Para os outros genes, observamos novamente o oposto: houve diferenças para *NPPB* e *ACTA1* entre as linhagens controle e paciente-específicas, mas não entre os grupos isogênicos. O ensaio de BNP também não mostrou diferenças entre os grupos. Desta forma, acreditamos que as diferenças observadas provavelmente não têm relevância biológica, e decidimos investigar se a expressão de *FBN1* por estas células é, de fato, relevante.

4.7.3. Expressão de *FBN1* e *FBN2* em iCMs e amostras de coração humano adulto

Verificamos a expressão de *FBN1* nos iCMs isogênicos e comparamos com a amostra de fibroblastos dermais adultos previamente utilizada (Figura 36). Observamos que os fibroblastos apresentam expressão de *FBN1* mais de 20 superior à dos iCMs (Figura 52). Também observamos uma alta variação entre os diferentes clones isogênicos de cada grupo, apesar de a tendência observada (mediana) corresponder ao esperado para WT, HI e KO. Os clones DN e DN/DN, entretanto, demonstraram baixíssima expressão, ao contrário do previamente observado para os EBs (Figura 36 e Figura 41). As diferenças entre o grupo WT e os demais não foram significativas ($0,063 < p < 1$; Teste de Wilcoxon-Mann Whitney). As análises estatísticas completas estão no APÊNDICE G.

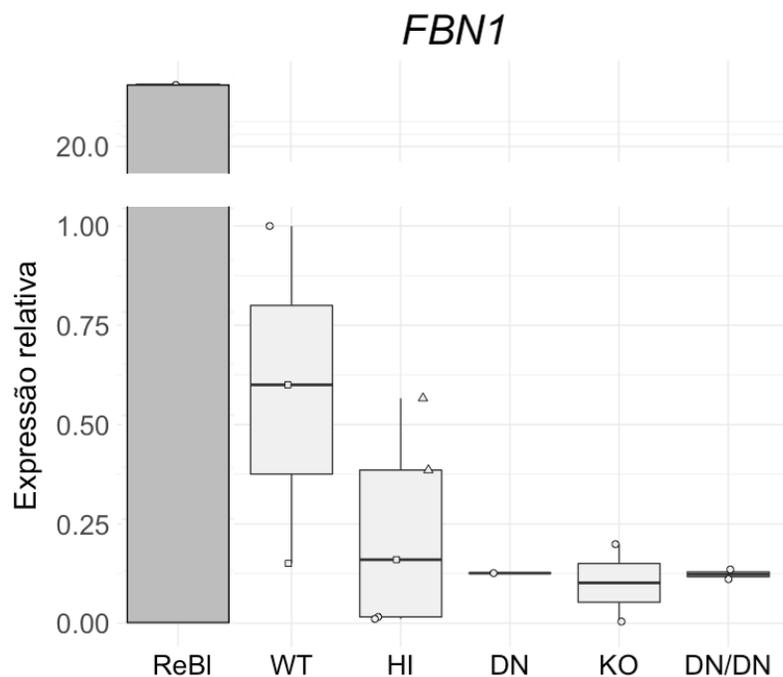


Figura 52. Expressão de *FBN1* em iCMs isogênicos selvagens e mutantes no dia 30 de diferenciação e em uma linhagem de fibroblastos adultos (ReBI). Cardiomiócitos derivados de hiPSCs foram dissociados no dia 15 de diferenciação e coletados no dia 30 para análise da expressão de *FBN1*. Os diferentes símbolos (\circ , \square e \triangle) indicam clones específicos de cada grupo (1, 2 ou 3), e cada ponto indica uma réplica de uma diferenciação independente. ReBI: fibroblastos primários dermais adultos (Denning Lab); WT: grupo selvagem; HI: grupo haploinsuficiente; DN: grupo dominante negativo; KO: clone duplo nocaute; DN/DN: clone homozigoto (no nível do mRNA) para a mutação DN ($\Delta 31$). Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo a referência (=1) uma das réplicas da linhagem WT1 (\circ) do grupo WT. N=1 para ReBI; Para CMs, N \geq 2/grupo.

Esta falta de concordância entre diferentes clones de um mesmo grupo, assim como os altos valores de C_T s obtidos em diferenciações com alta pureza de cardiomiócitos (já mencionados para as linhagens paciente-específicas) em comparação aos valores obtidos para os fibroblastos dermais adultos e para EBs nos levaram à hipótese de que este gene não possui expressão relevante em cardiomiócitos.

Dados de expressão gênica do NCBI (BARRETT et al., 2012) e UCSC (CASPER et al., 2018) consultados antes do início deste projeto, entretanto, demonstraram que *FBN1* é, de fato, o principal gene da família das fibrilinas expresso no coração. Em relação à expressão por cardiomiócitos especificamente, um dos estudos que fundamentaram o projeto demonstrou que, em camundongos, a diminuição da expressão de *Fbn1* apenas neste tipo celular foi suficiente para desencadear DCM nos animais, independentemente dos níveis de expressão em outros tipos celulares (COOK et al., 2014). Esses dados sugerem então que a fibrilina-1 associada à membrana basal dos cardiomiócitos deve exercer função crucial na manutenção da homeostase cardíaca.

Buscamos então dados de expressão de fibrilina-1 em cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes. Em um estudo recente, FRIEDMAN e colaboradores (2018) analisaram o transcriptoma de células únicas (scRNA-seq) durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos. Os dados gerados pelos pesquisadores foram disponibilizados em uma plataforma interativa de fácil utilização (<http://computationalgenomics.com.au/shiny/hipsc2cm/>). Verificamos a expressão de *FBN1* nas células classificadas como cardiomiócitos no dia 30 pós-início da diferenciação e constatamos que menos de 1% destas células expressam o gene, contra ≈20% das células não contráteis (Figura 53). O gene *FBN2*, entretanto, apareceu como expresso em cerca de 50% das células das duas populações. Este gene não é significativamente expresso em corações humanos adultos, porém, é expresso em certos órgãos fetais, incluindo o coração (QUONDAMATTEO et al., 2002; PETRYSZAK et al., 2016). Diversos estudos têm

demonstrado que células derivadas de hPSCs frequentemente apresentam características fetais e, quanto a isso, os cardiomiócitos não são uma exceção (MUMMERY et al., 2012; VAN DEN BERG et al., 2015), o que explicaria os resultados de FRIEDMAN et al. (2018).

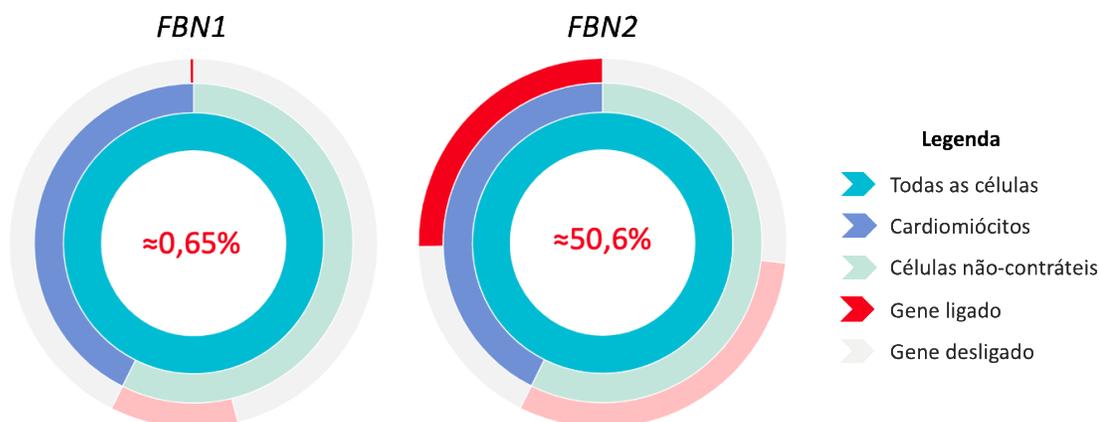


Figura 53. Percentual de cardiomiócitos derivados de hiPSCs positivos quanto à expressão de *FBN1* ou *FBN2* no dia 30 de diferenciação (FRIEDMAN et al., 2018). Cada círculo central indica o total de células analisadas, enquanto os intermediários são subdivididos entre os dois grupos celulares (cardiomiócitos e células não-contráteis) e os mais externos quanto à expressão gênica (gene ligado ou gene desligado) de cada grupo. À esquerda, está indicada a proporção de cardiomiócitos positivos para *FBN1* e, à direita, para *FBN2*. Retirada e modificada de: <http://computationalgenomics.com.au/shiny/hipsc2cm/>.

Para testar a hipótese de que *FBN2* é mais expresso que *FBN1* também nas células geradas pelo protocolo de diferenciação utilizado em nosso laboratório, analisamos a expressão de ambos os genes, e também de *ELN*, nos nossos iCMs no dia 30. O gene *ELN* codifica a proteína elastina que, junto com a fibrilina-1 ou 2, formam as fibras elásticas em diferentes tecidos (BALDWIN et al., 2013). No coração, a expressão de *ELN* e também a deposição de fibras elásticas

parecem correlacionar com a expressão de *FBN1*, aumentando após o nascimento (YU et al., 2017; BILDYUG, 2019).

Testamos diferentes matrizes comerciais: o Matrigel™ (MT), que tem composição semelhante ao Geltrex® (previamente mencionado), a vitronectina e a fibronectina. Além disso, testamos também uma cultura tridimensional (3D), compactando os iCMs em estruturas denominadas “cardioesferas”. Coletamos as células (cultivadas em monocamada nas diferentes matrizes ou tridimensionalmente) para a análise da expressão de *FBN1* e *FBN2* no dia 30 pós início da diferenciação, assim como anteriormente. Observamos que, de fato os iCMs expressam *FBN2* em níveis muito mais elevados que *FBN1*, independentemente da matriz utilizada na cultura em monocamada, padrão oposto ao observado para fibroblastos adultos (Figura 54). Na cultura em 3D, observamos uma tendência de aumento (não significativo) da expressão dos dois genes, mais pronunciada para *FBN2*. A expressão de *ELN*, entretanto, não foi detectada em nenhuma das amostras (dados não mostrados).

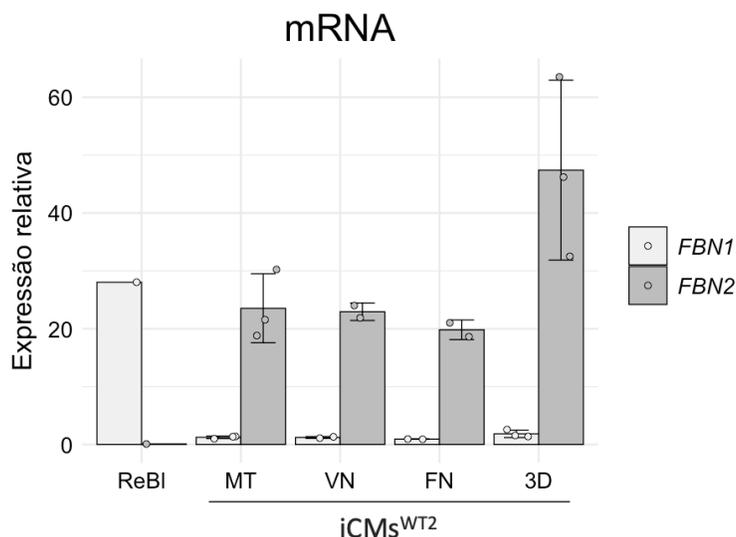


Figura 54. Expressão de *FBN1* e *FBN2* em fibroblastos dermais adultos (ReBI) e iCMs cultivados em diferentes matrizes e como cardioesferas. Os cardiomiócitos derivados de hiPSCs do clone selvagem WT2 (iCMs^{WT2}) foram dissociados no dia 15 pós início da diferenciação e replaqueados em diferentes matrizes comerciais (MT: Matrigel; VN: vitronectina; FN: fibronectina) ou em placas de fundo “V” para a formação de estruturas tridimensionais (3D) denominadas cardioesferas. No dia 30, as amostras foram coletadas para análise da expressão de *FBN1*. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo a referência (=1) uma das réplicas de *FBN1* da linhagem WT2 cultivada em MT. Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Willcoxon-Mann Whitney para análise dos dados e os valores de p obtidos foram maiores que 0,05 em todos os casos, exceto na comparação entre *FBN1* e *FBN2* em iCMs ($p = 1,1 \times 10^{-5}$). N=1 para ReBI; Para CMs, N≥2.

É interessante mencionar que essa tendência de aumento na expressão de *FBN2* em culturas tridimensionais também foi observada nos dados de transcriptoma de GIACOMELLI et al. (2020) em que iCMs foram cultivados com outros tipos celulares (Figura 55). Dados de proteoma (ULMER et al., 2018) também sugerem aumento significativo da expressão de fibrilina-2 após cultura em 3D, o que não foi descrito para fibrilina-1. Também é importante ressaltar que, em ambos os trabalhos, os autores reportam maior maturação dos iCMs com relação a diversas características. MILLS e colaboradores (2017) também descrevem um aumento na maturação dessas células quando cultivadas como organoides cardíacos em comparação com sua cultura em 2D, que se torna ainda mais proeminente na cultura dos organoides em um meio específico (denominado meio de maturação). Os dados de proteoma e RNA-seq deste trabalho, porém, indicam uma diminuição da razão *FBN1*/*FBN2* e fibrilina-1/fibrilina-2 após cultivo neste meio (dados não mostrados). Esse conjunto de observações sugere que, talvez, a expressão de *FBN1* não seja, de fato, maior que a de *FBN2* em cardiomiócitos maduros, como pensávamos.

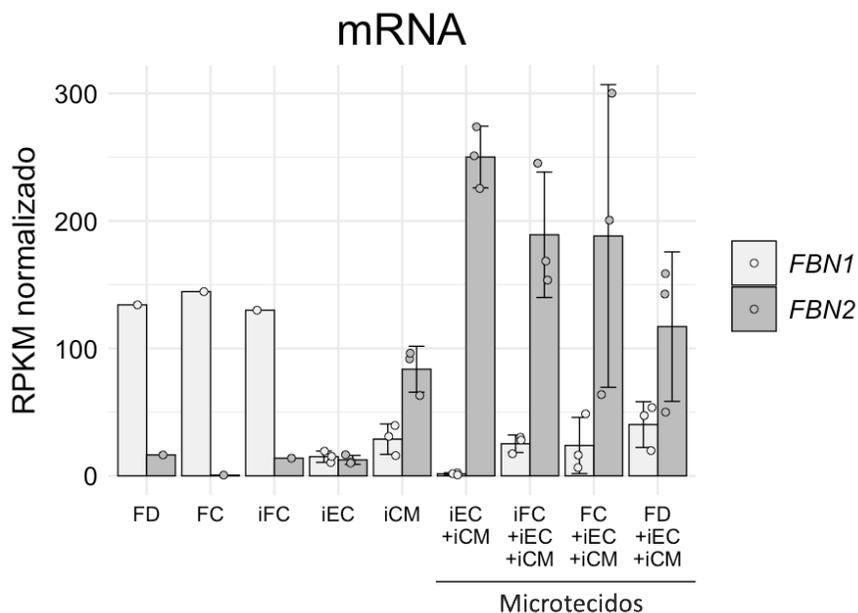


Figura 55. Expressão de *FBN1* e *FBN2* em fibroblastos primários e em diferentes tipos celulares derivados de hiPSCs cultivados em monocamada ou como microtecidios (GIACOMELLI et al., 2020). Culturas em monocamada de fibroblastos dermais (FD) e cardíacos (FC) adultos foram comparadas com a de fibroblastos cardíacos (iFC), células endoteliais (iEC) ou cardiomiócitos (iCM) derivados de hiPSCs quanto à expressão de *FBN1* e *FBN2*. Os diferentes tipos celulares foram também cultivados por 21 dias em diferentes combinações como agregados tridimensionais denominados microtecidios, sendo as proporções utilizadas: iEC+iCM = 15% iECs com 85% iCMs; iFC+iEC+iCM = 15% iFCs, 15% iECs e 70% iCMs; FC+iEC+iCM = 15% FCs, 15% iECs e 70% iCMs; FD+iEC+iCM = 15% FDs com 15% iECs e 70% iCMs.

Para confirmarmos o padrão de expressão de *FBN1* e *FBN2* reportado nos bancos de dados do NCBI e da UCSC para corações adultos, analisamos a expressão de ambos os genes (e também de *ELN*) em amostras comerciais obtidas de fibroblastos cardíacos adultos e fetais, de coração humano adulto (total) e de valvas e câmaras cardíacas individualmente. Infelizmente, não conseguimos amostras puras de cardiomiócitos adultos. Notamos que, confirmando o reportado na literatura, *FBN1* é predominantemente expresso em amostras adultas quando comparado a *FBN2* (Figura 56). O padrão oposto,

porém, não foi observado na amostra de fibroblastos fetais, como hipotetizado para células imaturas.

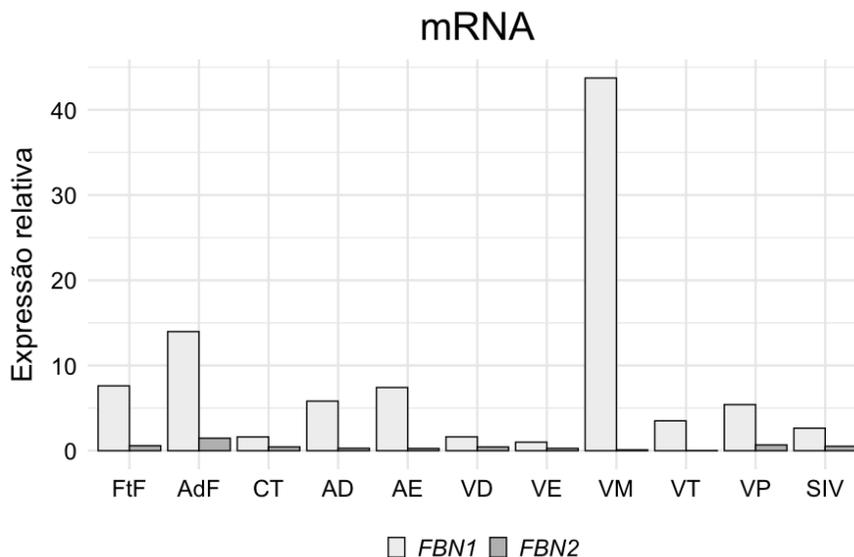


Figura 56. Expressão de *FBN1* e *FBN2* em diferentes estruturas do coração humano adulto e em amostras de fibroblastos cardíacos fetais e adultos. Amostras comerciais de fibroblastos cardíacos fetais (FtF) e adultos (AdF), coração total (CT), câmaras (AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo) e valvas (VM: valva mitral; VT: valva tricúspide; VP: valva pulmonar) cardíacas e septo interventricular (SIV) foram analisadas quanto à expressão de ambos os genes. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo a referência (=1) a expressão de *FBN1* pela amostra VE. N=1.

Também observamos uma correlação significativa entre a expressão de *FBN1* e *ELN* nas câmaras cardíacas e valvas, e que ambos os genes são altamente expressos na valva mitral (Figura 57). Esses resultados não são surpreendentes, visto que mais de 80% dos pacientes portadores da SMF apresentam alterações nesta valva (prolapso e/ou regurgitação) (VAN KARNEBEEK et al., 2001), o que sugere um papel importante das fibras elásticas nessa estrutura cardíaca.

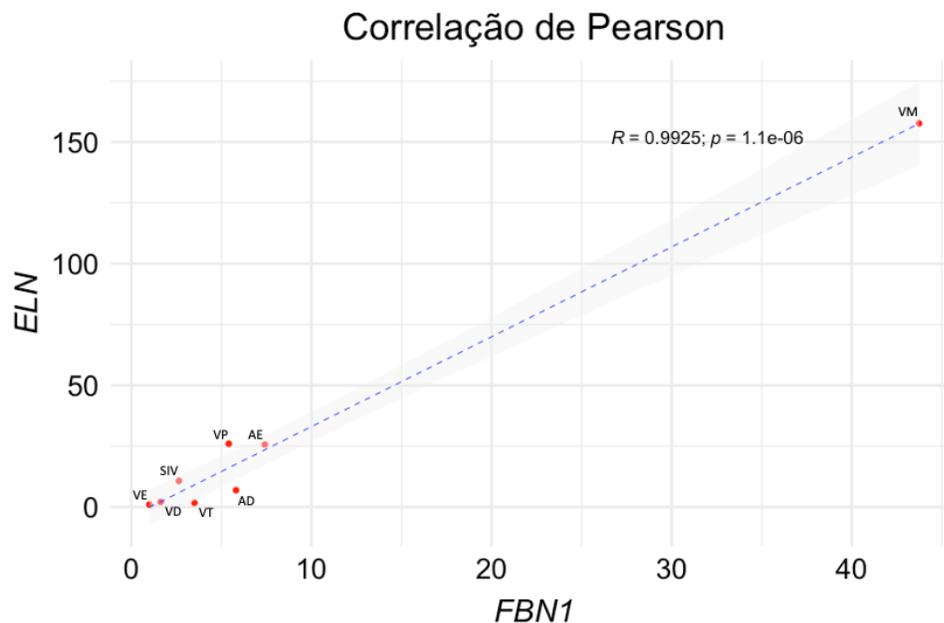


Figura 57. Correlação entre a expressão de *FBN1* e *ELN* em câmaras e valvas cardíacas. A expressão de ambos os genes foi analisada por RT-qPCR em amostras comerciais de câmaras (AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo) e valvas (VM: mitral; VT: tricúspide; VP: pulmonar) cardíacas e septo interventricular (SIV). Os valores de expressão relativa para cada gene foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ e plotados um contra o outro. A referência (=1) foi a amostra VE. A linha azul evidencia a tendência linear na co-variação da expressão dos genes. O coeficiente de correlação de Pearson (R) está evidenciado, assim como o p-valor encontrado.

A seguir, nos questionamos se observaríamos a transição de um padrão fetal para o adulto na expressão dos genes de fibrilina, caso mantivéssemos os iCMs por ainda mais tempo (90 dias) em cultura, visto que esta é uma estratégia de maturação descrita previamente (revisado por VEERMAN et al., 2015) e de simples execução. Diferenciamos os clones WT2, KO e do DN/DN e coletamos as células para extração de RNA após 20, 30, 40, 50, 60, 75 e 90 dias. A escolha de incluir dois clones mutantes neste experimento foi feita pois o objetivo deste projeto sempre foi avaliar se iCMs seriam capazes de recapitular os fenótipos cardíacos da SMF e acreditamos que os mutantes homocigotos (teoricamente

mais graves) seriam os mais adequados na busca inicial por possíveis fenótipos. Desta forma, caso conseguíssemos detectar o aumento na expressão de *FBN1* utilizando esta estratégia de maturação, a expressão de marcadores de hipertrofia, por exemplo, poderia ser analisada nessas mesmas amostras.

Ao longo do tempo (D20 ao dia 90), percebemos que a proporção de células contaminantes (semelhantes a fibroblastos) aumentou, principalmente para as diferenciações menos puras (<95%). Isso se justifica pelo fato de os cardiomiócitos se proliferarem ativamente apenas até cerca do dia 20 de diferenciação (como demonstrado na seção 4.7.2.1), enquanto as células contaminantes continuam a se proliferar. Para diferenciações muito eficientes (>95%), entretanto, a presença dessas células não foi observada mesmo após 90 dias (dados não mostrados). Para comparação da influência das células contaminantes nos níveis de expressão de *FBN1* e *FBN2*, coletamos (no dia 15) uma amostra destas células de uma das diferenciações de WT2 e comparamos com as diferenciações com alta pureza de iCMs.

Observa-se que, mesmo após 90 dias, a expressão de *FBN1* tende a permanecer constante (D20-D90) e que há uma alta variação entre as réplicas mesmo após exclusão das amostras com baixa pureza visível no dia da coleta (Figura 58). Para KO, como esperado, a expressão e os desvios permanecem próximos de zero, tendo em vista a presença quase nula do mRNA mutante de *FBN1*. A expressão de *FBN2*, entretanto, tende a cair ao longo do tempo em todas as amostras, apesar de, em média, ter aumentado para DN/DN no dia 90. É importante ressaltar que em todos os casos a expressão de *FBN2* permanece

superior à de *FBN1* ao longo do tempo, exceto para a amostra do D15 de WT2, que representa as “impurezas” de uma de suas diferenciações. Isso fortalece a hipótese de que essas células contaminantes influenciam nos níveis de expressão de *FBN1* observados, visto que, como mencionado anteriormente, os fibroblastos são o principal tipo celular secretor de MEC (e conseqüentemente de fibrilina-1) no coração. Dados de RNA-seq de fibroblastos cardíacos derivados de hiPSCs corroboram esta hipótese, visto que observamos neste tipo celular uma expressão muito maior de *FBN1* em comparação com *FBN2* (Figura 55) (GIACOMELLI et al., 2020).

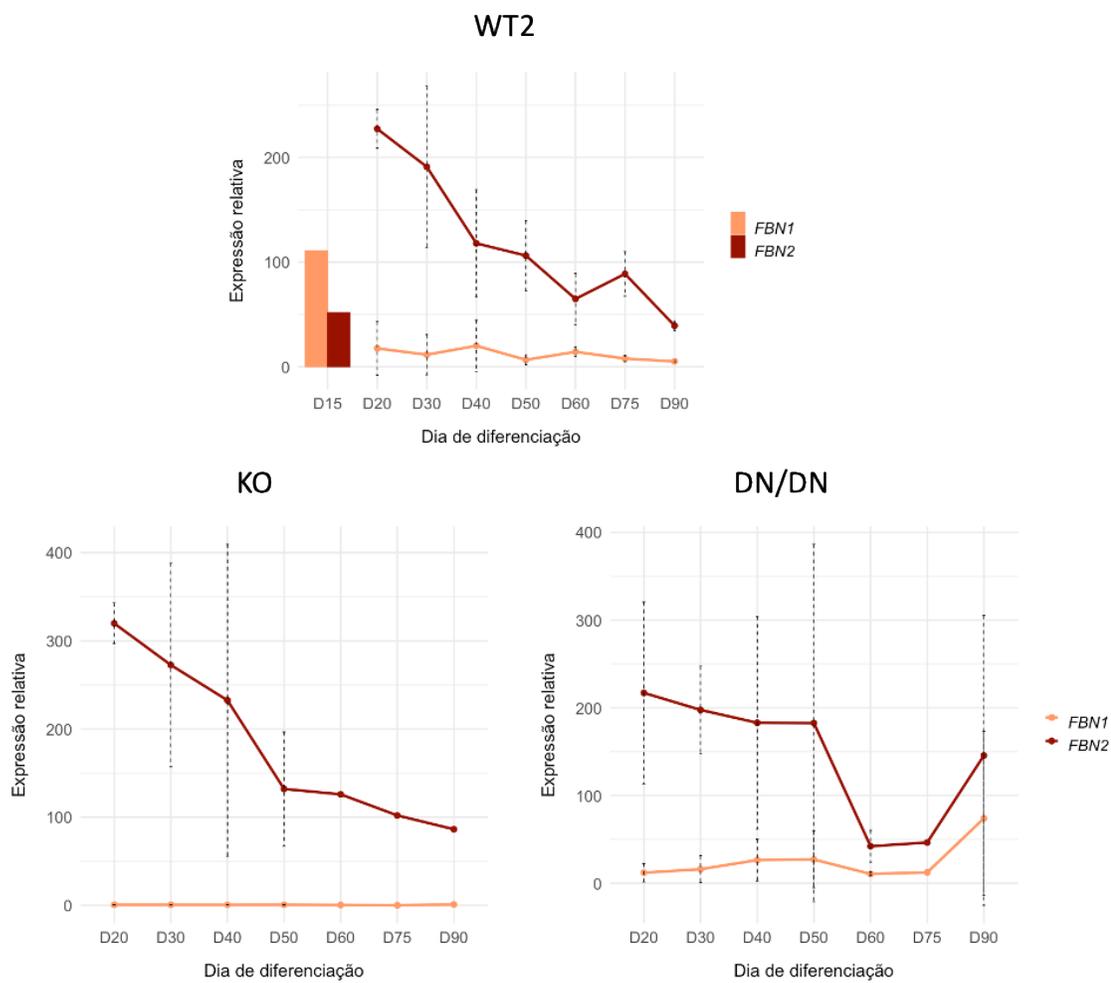


Figura 58. Expressão de *FBN1* e *FBN2* durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos. As amostras foram coletadas nos dias 20, 30, 40, 50, 60, 75 e 90 pós início da indução cardíaca. WT2: clone da linhagem hiPSC^{WT16} não editado (selvagem); KO: clone duplo nocaute; DN/DN: clone homozigoto (no nível do mRNA) para a mutação DN ($\Delta 31$). A amostra do dia 15 (D15) de WT2 (barras) foi obtida separando-se as impurezas (células semelhantes a fibroblastos) de uma das diferenciações, que foi descartada por apresentar porcentagem de cardiomiócitos (células positivas para troponina-T cardíaca) inferior a 90% no controle de qualidade. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo o controle (= 1) uma amostra de *FBN1* da linhagem WT2. $N \geq 2$ para todas as amostras exceto: WT2 D15; KO D60, 75 e 90; DN/DN D75 (N=1).

É importante ressaltar que tanto as estratégias de maturação de iCMs mencionadas, quanto outras há muito tempo discutidas (revisado por VEERMAN et al., 2015), não são consenso entre os grupos que trabalham com essas células. As formas de quantificação da maturação também são discutíveis e, por isso, KANNAN e colaboradores (BioRxiv, 2020) desenvolveram recentemente um método baseado na medida da entropia transcriptômica para unificar a avaliação da maturação de cardiomiócitos derivados de hPSCs. A entropia, neste caso, pode ser definida como a variação no padrão de expressão de um determinado gene em relação aos outros genes de uma amostra. Ou seja, quanto maior a variação, maior a entropia. Os autores observaram que em dados de scRNA-seq de corações fetais a entropia diminui à medida que os cardiomiócitos maturam. Isso se justifica, pois células mais indiferenciadas expressam vias de sinalização mais diversas. À medida que se diferenciam, entretanto, o número de vias ativas torna-se menor, já que vias desnecessárias são desligadas, e o padrão de expressão gênica torna-se mais estreito. Utilizando essa métrica, os autores conseguiram criar um *score* e comparar trabalhos que utilizaram diferentes métodos de maturação de iCMs e viram que a entropia permanece inalterada e

não diminui como observado *in vivo* para células maduras, o que contraria as conclusões de que os iCMs atingiram estágios mais maduros após os tratamentos. O mesmo foi visto para iCMs cultivados por até 100 dias.

Os resultados acima descritos corroboram a hipótese de que cardiomiócitos derivados de hiPSCs não são, ainda, um bom modelo para o estudo da miocardiopatia relacionada à SMF. Acreditamos que, caso *FBN1* seja relevante em cardiomiócitos adultos, um método eficiente de maturação dos iCMs é necessário para que seu fenótipo fetal seja revertido.

4.8. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* em conjuntos de dados de trabalhos publicados

4.8.1. Desenvolvimento cardíaco – dados de transcriptoma de células únicas

Os resultados da expressão de *FBN1* e *FBN2* em iCMs e em amostras de coração adulto nos levaram a questionar a dinâmica de expressão dos genes da família das fibrilinas e sua importância durante o desenvolvimento cardíaco humano, algo ainda pouco conhecido. Recentemente, muitos trabalhos de análise de transcriptoma têm surgido e, inclusive, foi um deles (FRIEDMAN et al., 2018) que nos fez observar o protagonismo de *FBN2* em cardiomiócitos derivados de hiPSCs. A partir desta primeira observação, buscamos na literatura trabalhos de análise de expressão gênica global em células cardíacas durante o desenvolvimento embrionário que pudessem nos ajudar a entender o papel das fibrilinas no desenvolvimento do coração.

Dentre os trabalhos lidos, o que mais nos interessou foi o de CUI e colaboradores (2019) por apresentar dados de células únicas de câmaras de corações humanos obtidos de embriões de cinco a 25 semanas de desenvolvimento. Decidimos então investigar nesses dados a expressão dos genes *FBN1*, *FBN2*, *FBN3* e também *ELN*, visto que uma alta correlação entre a expressão deste gene e de *FBN1* foi anteriormente observada. Devido ao fato de a população de cardiomiócitos obtida com o nosso protocolo de diferenciação ser predominantemente formada pelo subtipo ventricular, analisamos os dados obtidos para o ventrículo esquerdo (LV) dos corações embrionários. Filtramos então os dados normalizados em transcritos por milhão (TPM) de todos os tipos celulares identificados pelos autores e obtivemos resultados separados para os subtipos de interesse que seriam cardiomiócitos e também células depositoras de matriz extracelular (MEC), denominadas “semelhantes a fibroblastos” (ou *fibroblast-like*). Foi então calculado o $\log_2(\text{TPM} + 1)$ para cada gene, para melhor visualização dos dados. A estratégia utilizada está graficamente representada na Figura 59.

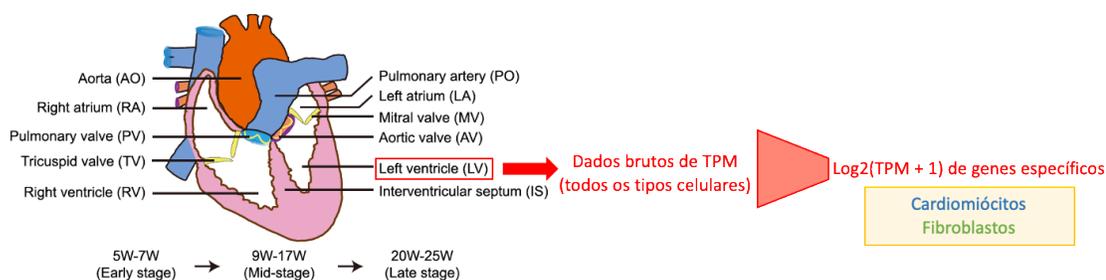


Figura 59. Estratégia utilizada para a análise da expressão de genes específicos em cardiomiócitos e células semelhantes a fibroblastos de ventrículos esquerdos (*Left ventricle* – LV) de corações humanos em desenvolvimento (5 a 25 semanas). Dados de sequenciamento de mRNA (RNA-seq) de células únicas gerados por CUI e colaboradores (2019)

foram inicialmente filtrados para que apenas células do LV fossem utilizadas. Após, foi feita uma nova filtragem para que, de todos os subtipos celulares identificados no LV, somente os de interesse fossem analisados. Figura modificada de CUI et al. (2019).

Devido ao alto número de células negativas para os genes de interesse, excluímos as que apresentaram valores de TPM iguais a zero, para melhor visualização das tendências de expressão ao longo dos estágios embrionários. Para o gene *FBN3*, devido ao altíssimo número de células excluídas (90-97%), não foi possível obter dados para todos ou para a maioria dos estágios e poucas células foram analisadas. A única tendência observada foi sua maior expressão entre a 6^a e 9^a semanas do desenvolvimento, para ambos os tipos celulares considerados (dados não mostrados).

4.8.1.1. Cardiomiócitos

Analisando apenas os cardiomiócitos, observamos que há, como esperado, uma tendência de aumento na expressão de *FBN1* ao longo do tempo, principalmente a partir da 15^a semana (Figura 60A). Para *FBN2*, a média de expressão permanece relativamente estável entre todos os estágios (Figura 60B), enquanto para *ELN*, também parece aumentar a partir da 15^a semana (Figura 60C), mas de forma menos notável em comparação com *FBN1*. Essa observação também não surpreende, visto que já mencionamos uma correlação entre a expressão de *FBN1* e a de *ELN* em câmaras e valvas de coração humano adulto. Para este conjunto de dados, entretanto, a correlação entre as médias de expressão dos dois genes não foi significativa (coeficiente de correlação de Spearman $r = 0,51$; $p = 0,088$). É importante

ressaltar, entretanto, que a variação entre os valores de TPM (log₂ transformados e, portanto, exponencialmente relacionados) de diferentes células de um mesmo estágio/embrião é bastante alta, sendo muitas vezes mais alta que a observada na comparação entre as médias de expressão para os três genes simultaneamente (Figura 60D).

Também é importante notar na Figura 60D que apenas na 24^a semana as expressões de *FBN1* e *FBN2* parecem se igualar, sendo anteriormente o gene *FBN2* muito mais expresso. Esses dados corroboram as observações já relatadas para cardiomiócitos derivados de hiPSCs, visto já foi descrito que essas células apresentam perfil de expressão gênica global similar ao de corações fetais de primeiro trimestre do desenvolvimento (VAN DEN BERG et al., 2015).

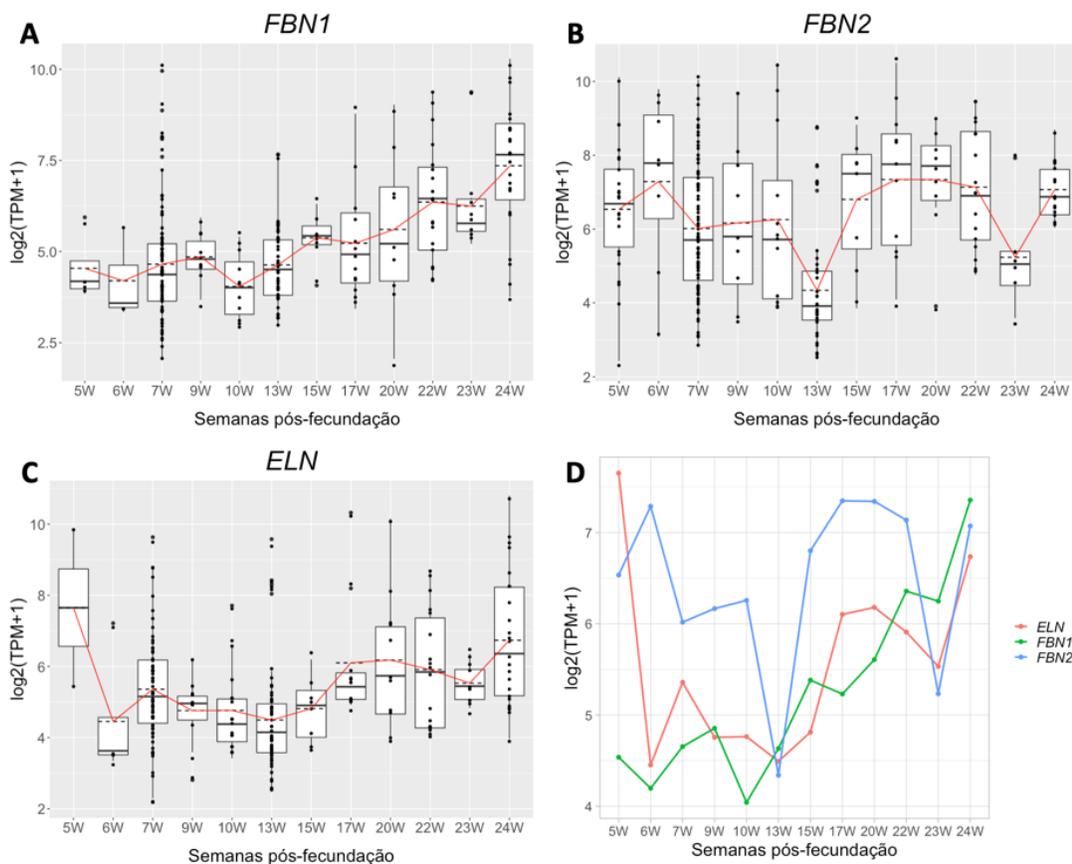


Figura 60. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* em cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de embriões em diferentes estágios, de cinco a 24 semanas (*weeks – W*). Em (A-C), cada ponto representa uma célula e a linha preta pontilhada dentro de cada caixa (boxplot) representa a média dos valores de $\log_2(\text{TPM} + 1)$ entre todas as células de todos os embriões do respectivo estágio. A mediana é representada pela linha preta contínua. A linha vermelha liga as médias de todos os estágios, demonstrando a tendência de expressão observada. A. Expressão de *FBN1*. B. Expressão de *FBN2*. C. Expressão de *ELN*. D. Comparação entre as médias de expressão dos três genes ao longo do desenvolvimento. Em (D), as barras de erro foram omitidas para melhor visualização, já que as altas variações podem ser observadas nos gráficos individuais de cada gene.

Também verificamos a expressão dos mesmos genes nos dados de expressão gênica global de células únicas gerados por ASP e colaboradores (2019) depositadas na plataforma *Human Cell Atlas Development* (disponível em: <https://hdca-sweden.scilifelab.se/a-study-on-human-heart-development/>).

Observamos que as células identificadas como cardiomiócitos e espacialmente atribuídas ao miocárdio ventricular expressam, de fato, mais *FBN2* do que *FBN1* e *ELN* nos três estágios analisados (4,5-5; 6,5 e 9 semanas pós-concepção), corroborando os resultados descritos acima (dados não mostrados).

4.8.1.2. Células semelhantes a fibroblastos

Achamos importante também analisar a expressão destes genes em células consideradas secretoras de MEC que, por não terem um perfil de expressão gênica muito específico durante as primeiras semanas de desenvolvimento embrionário, são chamadas de “semelhantes a fibroblastos” ou, *fibroblast-like*. Sabe-se que até mesmo fibroblastos derivados de hiPSCs apresentam fenótipos imaturos em comparação com células adultas (MILLER et al., 2013) e, por isso, seria interessante verificar se, com relação à expressão de *FBNs*, essa imaturidade também significa maior expressão de *FBN2* em estágios precoces do desenvolvimento, como é o caso de cardiomiócitos.

Observa-se que a média de expressão de *FBN1* parece aumentar já nas primeiras semanas (5^a a 9^a), assim como a de *ELN* (Figura 61A e C, respectivamente). O coeficiente de correlação de Spearman entre as médias de expressão dos dois genes foi de 0,6 ($p = 0,056$). A expressão de *FBN2*, da mesma forma que para cardiomiócitos, não parece variar de forma definida (Figura 61B) e a variação observada também foi alta entre células de um

mesmo estágio, principalmente para *FBN2* e *ELN*. Na comparação entre os genes, entretanto, observa-se que, para este tipo celular a fibrilina-1 parece ser a principal fibrilina expressa mesmo nos estágios mais precoces de desenvolvimento (Figura 61D). Esses resultados também corroboram o padrão visto para amostras fetais e adultas de fibroblastos cardíacos (Figura 56).

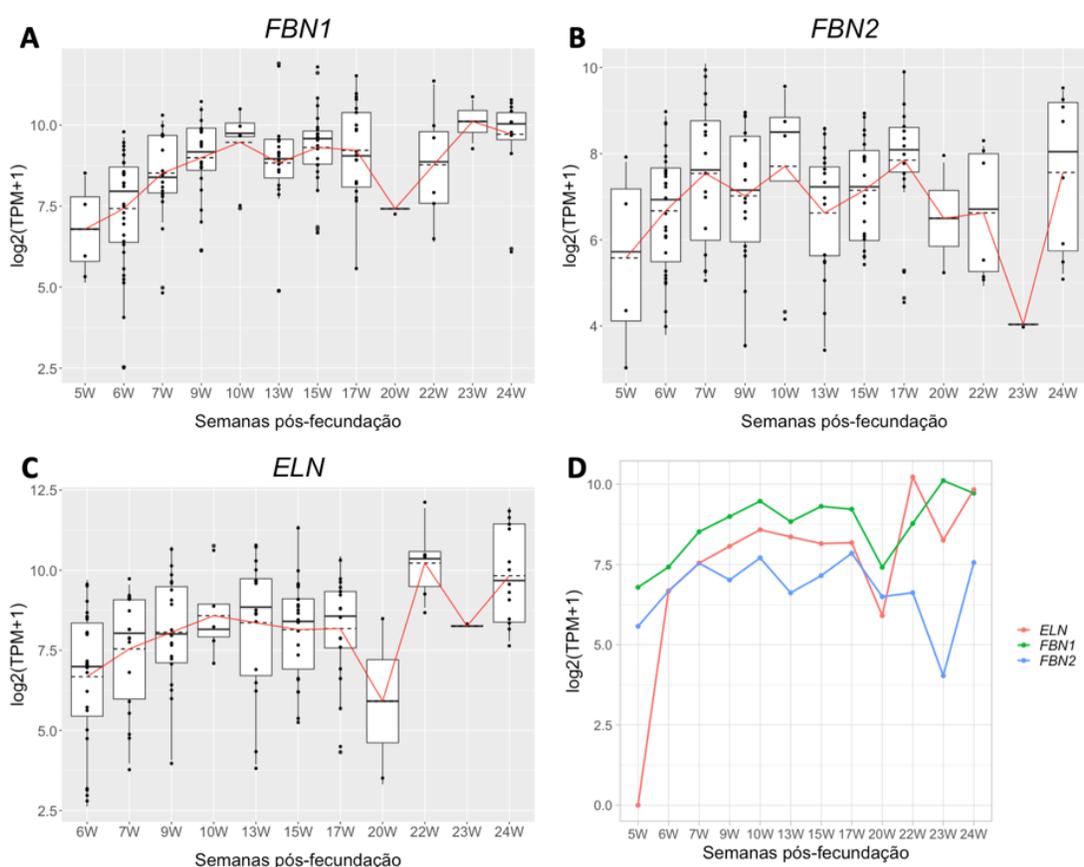


Figura 61. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* em células semelhantes a fibroblastos de ventrículo esquerdo de embriões em diferentes estágios, de cinco a 24 semanas (weeks - W). Em (A-C), cada ponto representa uma célula e a linha preta pontilhada dentro de cada caixa representa a média dos valores de $\log_2(\text{TPM} + 1)$ entre todas as células do respectivo estágio. A mediana é representada pela linha preta contínua. A linha vermelha liga as médias de todos os estágios, demonstrando a tendência de expressão observada. A. Expressão de *FBN1*. B. Expressão de *FBN2*. C. Expressão de *ELN*. D. Comparação entre as médias de

expressão dos três genes ao longo do desenvolvimento. Em (D), as barras de erro foram omitidas para melhor visualização, já que as variações podem ser observadas nos gráficos individuais de cada gene.

Também é interessante notar que a expressão de *FBN1* e *ELN* é maior nestas células que em cardiomiócitos. Isso sugere um papel de maior importância deste grupo de células na formação de fibras elásticas maduras no coração, que seriam mais resilientes e adaptáveis às perturbações mecânicas crescentes ao longo do desenvolvimento (CARTA et al., 2006). Esses dados também corroboram o fato de GRANATA e colaboradores (2016) terem conseguido demonstrar alta deposição de fibrilina-1 e alterações fenotípicas em iVSMCs de pacientes portadores da SMF, já que este tipo celular também está dentro do grupo *fibroblast-like* e, portanto, têm a fibrilina-1 como principal, mesmo apresentando perfil fetal. Esses achados, porém, não descartam a importância da fibrilina-1 depositada na membrana basal pelos cardiomiócitos em estágios mais tardios.

Os resultados acima discutidos reforçam nossa hipótese sobre o padrão invertido de expressão de *FBN1* e *FBN2* nos iCMs estar relacionado à sua imaturidade. Além disso, também encontramos uma explicação para o grande viés na expressão de *FBN1* causado por fibroblastos contaminantes das diferenciações em cardiomiócitos, ainda que também sejam imaturos.

4.8.2. Desenvolvimento cardíaco – dados de transcriptoma de órgãos inteiros

Outro conjunto de dados bastante completo foi o gerado por CARDOSO-MOREIRA et al. (2019). Neste caso, porém, não foi realizado o transcriptoma de células únicas, mas do coração inteiro. Os estágios de desenvolvimento intrauterino analisados foram de 4-19 semanas pós-fecundação, mas também foram analisadas diferentes fases pós-nascimento, de indivíduos recém-nascidos, crianças (6-9 meses e 2-4 anos), adolescentes (13-19 anos), jovens (25-31 anos) e adultos (46-54 anos). Observamos que, neste conjunto de dados, a inversão esperada entre *FBN1* e *FBN2* acontece em algum momento entre a 19ª semana de gestação e o nascimento (Figura 62), o que corrobora os dados de CUI et al. (2019), apesar de os dados terem sido obtidos de diferentes tipos de amostras.

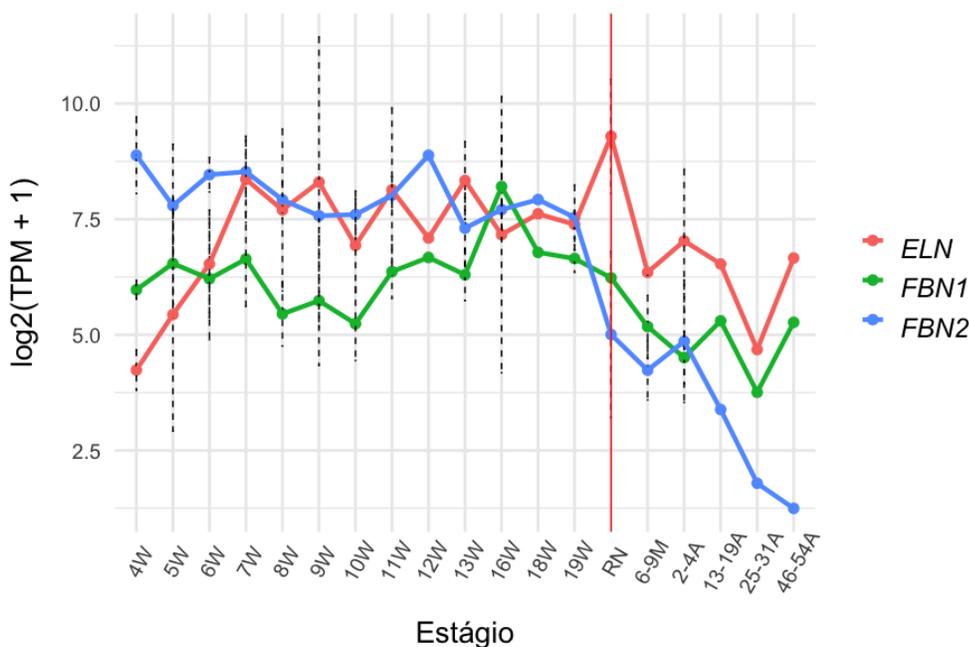


Figura 62. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* em corações humanos em diferentes estágios do desenvolvimento (CARDOSO-MOREIRA et al., 2019). Corações de embriões de 4 a 19 semanas (W), de recém-nascidos (RN) e de indivíduos de diferentes idades (M: meses; A: anos) agrupados por fases do desenvolvimento foram analisados. A linha vermelha divide os períodos

de desenvolvimento pré e pós-nascimento. $N \geq 2$ exceto para 12W, 18W, RN, 13-19A, 25-31A e 46-54A ($N=1$).

O último conjunto de dados analisado foi o do *Projeto ENCODE* (*Encyclopedia of DNA elements* - <https://www.encodeproject.org/>). Pudemos comparar, neste caso, os dados obtidos para corações humanos com os obtidos para cardiomiócitos derivados da linhagem de hESCs RUES2. As amostras de corações humanos analisadas correspondem aos estágios de 12-28 semanas pós-fecundação e também à idade adulta de 30-35 anos. Observamos, novamente que a inversão do padrão entre *FBN1* e *FBN2* acontece após a 19ª semana, visto que os valores de TPM obtidos para a 28ª semana foram equivalentes para os dois genes (Figura 63). Na amostra de coração adulto, como esperado, a expressão de *ELN* e *FBN1* é maior que a de *FBN2*. É interessante notar que na amostra RUES2-CMs a expressão de *FBN2* é cerca de 200 vezes maior que a de *FBN1*, corroborando o encontrado para nossos iCMs (Figura 58).

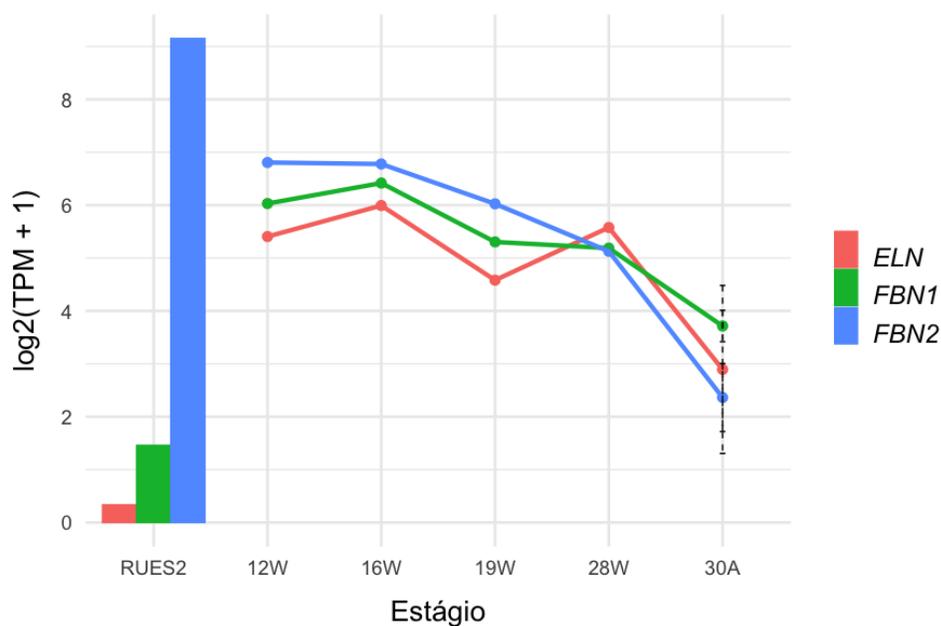


Figura 63. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* em cardiomiócitos derivados de uma linhagem de hESCs (RUES2) e em corações humanos em diferentes fases do desenvolvimento (ENCODE). Corações de embriões de 12 a 28 semanas (W – N=1/estágio), e de indivíduos adultos (com idade em torno de 30 anos – 30A, N=3) foram analisados.

4.8.3. Transcriptoma de núcleos únicos (snRNA-seq) de corações adultos

Durante a elaboração desta tese, TUCKER et al. (2020) publicaram um trabalho em que analisam a diversidade de tipos celulares e de padrões de expressão gênica de corações humanos de doadores adultos por meio da análise do transcriptoma de núcleos únicos. Os dados foram depositados no *Broad Institute's Single Cell Portal* (https://portals.broadinstitute.org/single_cell) e podem ser explorados na própria plataforma. Buscamos os genes *FBN1*, *FBN2* e *ELN* para comparar seus níveis de expressão nos diferentes tipos celulares encontrados. Observamos, surpreendentemente, que em cardiomiócitos ventriculares a expressão de *FBN1* e *ELN* é praticamente nula, enquanto *FBN2* é expresso por um pequeno grupo de uma das populações deste tipo celular (Figura 64). Os fibroblastos, porém, expressam *FBN1* e *ELN*, mas não *FBN2*.

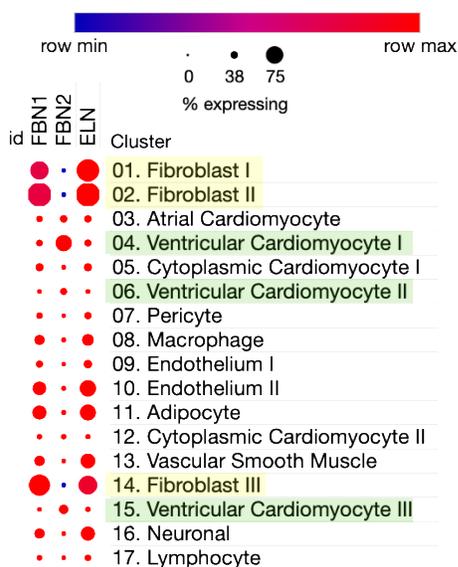


Figura 64. Expressão de *FBN1*, *FBN2* e *ELN* nos diferentes grupos celulares de corações humanos adultos (TUCKER et al., 2020). Os grupos (*Clusters*) de fibroblastos estão destacados em amarelo e os de cardiomiócitos ventriculares estão em verde. Os genes estão indicados no topo de cada coluna e o tamanho dos círculos indicam as porcentagens aproximadas (indicadas) da população de cada tipo celular que positivas para o respectivo gene. As cores indicam a intensidade de expressão, como indicado no topo. Retirada e modificada de: https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP498/transcriptional-and-cellular-diversity-of-the-human-heart#study-visualize.

Mais recentemente, LITVIŇUKOVÁ e colaboradores (2020) também publicaram dados de scRNAseq e snRNAseq de corações humanos adultos. Ao explorar os dados na plataforma *CellxGene Heart Global* (www.heartcellatlas.org) observamos, corroborando os achados de TUCKER et al. (2020), que as células classificadas como cardiomiócitos ventriculares (vCMs) não parecem expressar *FBN1* em quantidades significativas, e tendem a expressar *FBN2* em maiores níveis, ao contrário das classificadas como fibroblastos ventriculares (vFBs) (Figura 65). É importante ressaltar, entretanto, que a maioria das células não parece expressar nenhum dos dois genes (dados não mostrados).

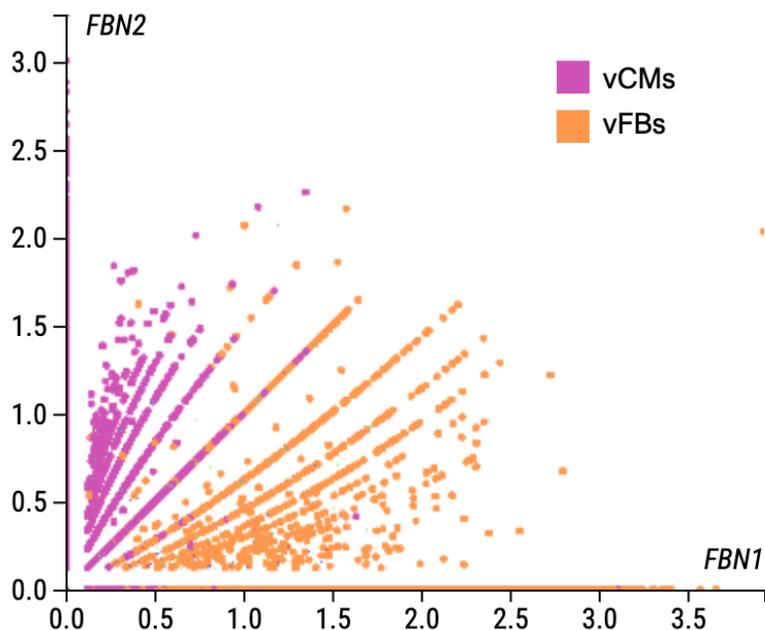


Figura 65. Expressão de *FBN1* e *FBN2* em cardiomiócitos (vCMs) e fibroblastos (vFBs) ventriculares de corações humanos adultos (LITVIŇUKOVÁ et al., 2020). Dados de transcriptoma de células únicas (scRNA-seq) ou de núcleos únicos (snRNA-seq) foram obtidos de 14 corações humanos adultos de indivíduos com idades de 40 a 75 anos. Cada ponto individual representa um único núcleo ou uma única célula. Os respectivos eixos indicam a intensidade de expressão ($x = FBN1$ e $y = FBN2$). Retirada e modificada de: <https://www.heartcellatlas.org/global>.

Esses dados rejeitam a hipótese de que a baixa expressão de *FBN1* em iCMs é, necessariamente, consequência de sua imaturidade, visto que mesmo CMs adultos dessas amostras parecem não expressar o gene. Esta conclusão é surpreendente e vai totalmente de encontro aos achados de COOK e colaboradores (2014) sobre a importância de *Fbn1* em cardiomiócitos de um modelo murino para a SMF. Procuramos então dados de scRNA-seq ou snRNA-seq de camundongos adultos e encontramos o trabalho de HU et al. (2018), que analisou a expressão gênica em corações no estágio perinatal (6 e 10 dias após o nascimento) e a plataforma Tabula Muris (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/>

- SCHAUM et al., 2018). Os dados de HU e colaboradores (2018) também foram depositados no portal *Broad Institute's Single Cell Portal* (https://portals.broadinstitute.org/single_cell) e, ao analisá-los, observamos que *Fbn1* é muito mais expresso por fibroblastos em ambos os estágios, mas que também é expresso por uma pequena parcela de cardiomiócitos maduros (mCMs) no estágio de seis dias pós-nascimento (P6). A expressão não aparece aumentada no estágio de 10 dias (P10). *Fbn2* é expresso principalmente por cardiomiócitos proliferativos (pCMs) e em desenvolvimento (dCMs), principalmente em P6, mas também em P10. Com relação à *Eln*, a expressão é maior em mCMs e não em fibroblastos, como seria esperado (Figura 66). Hipotetizamos que, talvez, em estágios posteriores a expressão de *Fbn1* acompanhe a de *Eln*, o que explicaria os resultados de COOK e colaboradores (2014), já que os fenótipos de DCM observados no modelo SMF apareceram apenas após três meses e não logo ao nascimento.

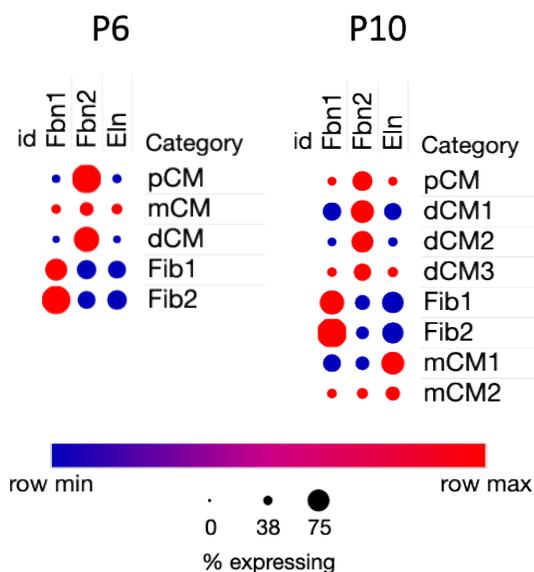


Figura 66. Expressão de *Fbn1*, *Fbn2* e *Eln* em cardiomiócitos e fibroblastos de corações murinos perinatais (HU et al., 2018). Os genes estão indicados no topo de cada coluna e o tamanho dos círculos indicam as porcentagens aproximadas (indicadas) da população de cada tipo celular que positivas para o respectivo gene. As cores indicam a intensidade de expressão, como indicado no topo. Os estágios de seis (P6) e 10 (P10) dias pós-nascimento foram analisados. Fib1 e Fib2: células identificadas como fibroblastos; pCMs: cardiomiócitos proliferativos; dCMs: cardiomiócitos em desenvolvimento; mCMs: cardiomiócitos maduros. Retirada e modificada de: https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP283/single-nucleus-transcriptomic-survey-of-cell-diversity-and-functional-maturation-in-postnatal-mammalian-hearts#study-visualize.

Entretanto, nos dados de Tabula Muris, que são de camundongos de três meses, não observamos expressão de *Fbn1* ou *Eln* em cardiomiócitos, sendo o principal tipo celular responsável pela expressão de ambos os genes os fibroblastos (Figura 67). *Fbn2*, como esperado, já não é significativamente expresso por nenhum tipo celular em corações adultos. Não conseguimos, portanto, explicar por que alterações em *Fbn1* apenas em cardiomiócitos acarretam a DCM no modelo utilizado por COOK e colaboradores (2014), visto que outro trabalho também demonstra que este gene não é expresso por progenitoras cardíacas durante o desenvolvimento embrionário de camundongos (LESCROART et al., 2018). É importante ressaltar, entretanto, que não analisamos os dados de HU et al. (2018) e SCHAUM et al. (2018) diretamente, o que limita nossas conclusões a respeito das comparações entre a expressão de *Fbn1* e *Fbn2* em diferentes tipos celulares.

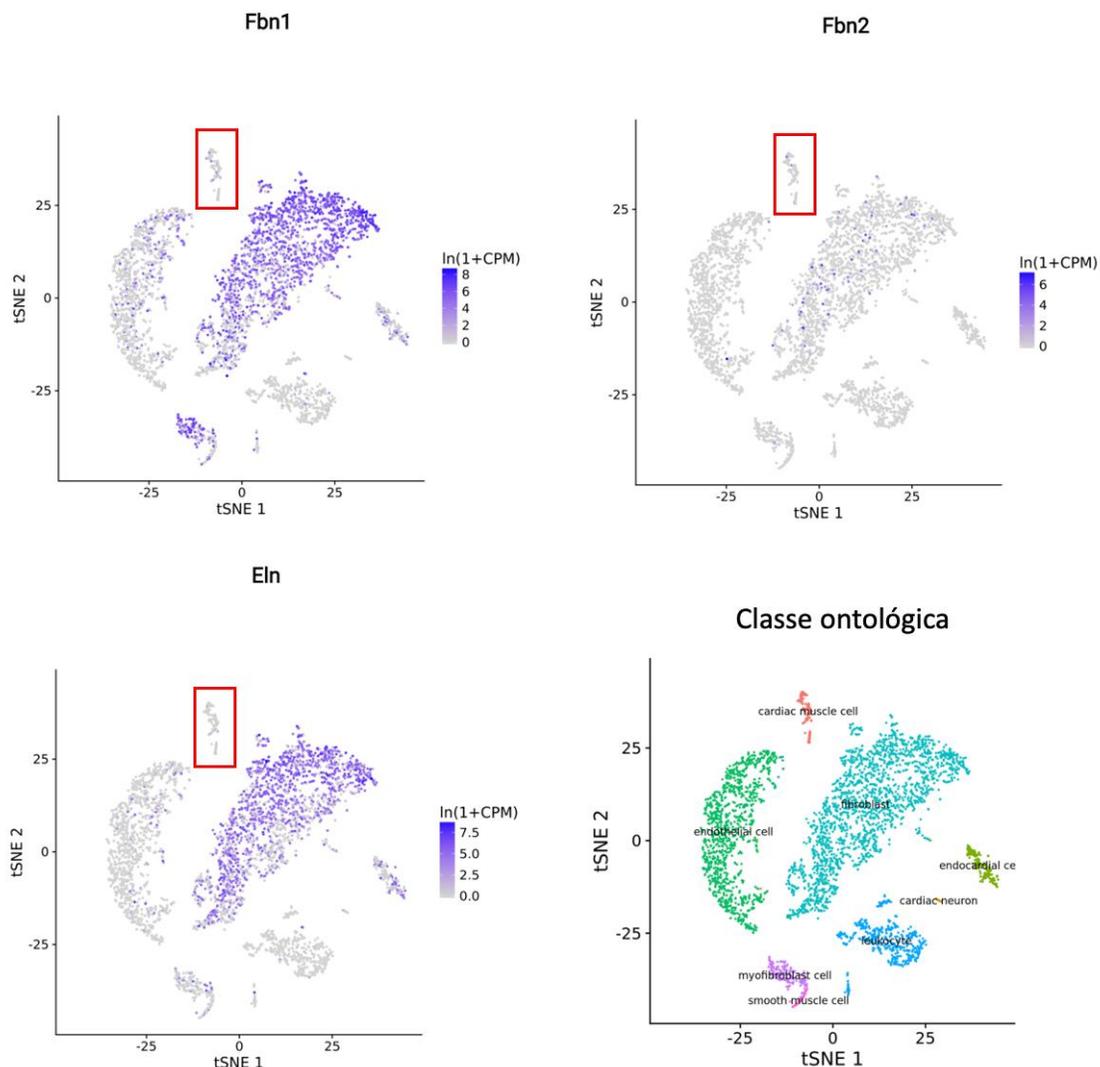


Figura 67. Expressão de *Fbn1*, *Fbn2* e *Eln* em células de corações murinos de três meses de idade (Tabula Muris – SCHAUM et al., 2018). Os gráficos exibidos são resultado da aplicação da técnica de redução de dimensionalidade t-SNE (do inglês, *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) e os eixos são arbitrários. Os pontos indicam células individuais e as distâncias relativas entre eles são inversamente proporcionais à sua similaridade, o que possibilita a identificação de populações celulares de um mesmo tipo, como indicado no painel inferior direito (Classe ontológica). A população de cardiomiócitos (*cardiac muscle cell*) está destacada pelos retângulos vermelhos nos painéis correspondentes a cada gene e as cores dos pontos nestes painéis representam o nível de expressão de cada um, como indicado. A população de fibroblastos (*fibroblast*) é representada pela cor verde-água no painel de classe ontológica. Retirada e modificada de: <https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/>.

Esses dados sugerem que, talvez, o modelo murino não seja o melhor para se elucidar os mecanismos da miocardiopatia observada na SMF, mas não descartam que ela seja uma consequência primária da síndrome, como sugerido. A alta expressão de *FBN1* por fibroblastos cardíacos pode, justamente, acarretar alterações fenotípicas em caso de alterações estruturais das microfibrilas. Em um outro modelo para a síndrome foi ressaltada a contribuição de células não musculares na patofisiologia de fenótipos cardíacos (ROUF et al., 2017). Acreditamos que, para que os mecanismos da DCM relacionada à SMF sejam corretamente investigados, um modelo *in vitro* humano mais complexo, como o de GIACOMELLI et al. (2020) que também incorpora células endoteliais e fibroblastos cardíacos (além dos cardiomiócitos), seja necessário.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, identificamos as variantes patogênicas em *FBN1* de duas linhagens de hiPSCs derivadas de pacientes portadores da SMF e caracterizamos suas consequências moleculares. Também comparamos fenotipicamente os iCMs derivados dessas linhagens com células derivadas de indivíduos saudáveis e observamos uma possível maior sensibilidade ao estresse hipertrófico no grupo SMF.

Geramos linhagens de hiPSCs isogênicas portando mutações de haploinsuficiência ou dominância negativa no gene *FBN1*, cujas consequências foram validadas experimentalmente. A comparação entre iCMs selvagens, HI ou DN para *FBN1*, entretanto, não resultou a observação de diferenças fenotípicas entre os grupos. Também caracterizamos nestas células a expressão dos genes *FBN1* e *FBN2* e

observamos que a fibrilina-2 parece ser a principal fibrilina produzida por cardiomiócitos derivados de hiPSCs, ao contrário do observado para amostras de fibroblastos e de corações adultos.

Outra contribuição deste trabalho foi o estabelecimento de modelos de hiPSCs adicionais portando, além das alterações em *FBN1*, mutações de perda de função em heterozigose no gene *HSPG2*, candidato a modificador dos fenótipos cardiovasculares e esqueléticos da SMF.

Em resumo, no presente trabalho estabelecemos diferentes modelos isogênicos de hiPSCs que, devido à sua plasticidade, podem ser utilizados no estudo do papel da fibrilina-1 em diferentes tipos celulares, algo extremamente valioso no contexto de uma condição pleiotrópica como a SMF. Além disso, caracterizamos duas linhagens paciente-específicas previamente geradas. Esses modelos poderão ser utilizados para o aumento da compreensão da fisiopatologia da síndrome e para o estabelecimento de novas correlações genótipo-fenótipo e de possíveis estratégias terapêuticas.

6. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, P. et al. RNA expression profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes in a cardiac hypertrophy model. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.

ALPENDURADA, F. et al. Evidence for Marfan cardiomyopathy. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 10, p. 1085–1091, out. 2010.

ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 2, p. 217–24, 2003.

ARIKAWA-HIRASAWA, E. et al. Structural and Functional Mutations of the Perlecan Gene Cause Schwartz-Jampel Syndrome, with Myotonic Myopathy and Chondrodysplasia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 5, p. 1368–1375, 1 maio 2002.

ASP, M. et al. A Spatiotemporal Organ-Wide Gene Expression and Cell Atlas of the Developing Human Heart. **Cell**, v. 179, n. 7, p. 1647- 1660.e19, 2019.

AUBART, M. et al. The clinical presentation of marfan syndrome is modulated by expression of wild-type FBN1 allele. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 10, p. 2764–2770, 2015.

AUBART, M. et al. Association of modifiers and other genetic factors explain Marfan syndrome clinical variability. **European Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 12, p. 1759–1772, 7 dez. 2018.

BALDWIN, A. K. et al. Elastic fibres in health and disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, p. e8, 20 ago. 2013.

BALDWIN, A. K. et al. Epithelial-mesenchymal status influences how cells deposit fibrillin microfibrils. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 1, p. 158–171, 2014.

BARNETT, C. P. et al. Central nervous system abnormalities in two cases with neonatal Marfan syndrome with novel mutations in the fibrillin-1 gene. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152A, n. 9, p. 2409–2412, 1 set. 2010.

BARRETT, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D991–D995, 26 nov. 2012.

BIERY, N. J. et al. Revised Genomic Organization of FBN1 and Significance for Regulated Gene Expression. **Genomics**, v. 56, n. 1, p. 70–77, 1999.

BILDYUG, N. Extracellular Matrix in Regulation of Contractile System in Cardiomyocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5054, 11 out. 2019.

BOILEAU, C. et al. Molecular genetics of Marfan syndrome. **Current opinion in cardiology**, v. 20, n. 3, p. 194–200, 2005.

BOOMS, P. et al. Novel exon skipping mutation in the fibrillin-1 gene: Two “hot spots” for the neonatal Marfan syndrome. **Clinical Genetics**, v. 55, n. 2, p. 110–117, fev. 1999.

BOYER, L. A. et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–956, 23 set. 2005.

BRECKWOLDT, K. et al. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. **Nature Protocols**, v. 12, n. 6, p. 1177–1197, 11 jun. 2017.

BUNTON, T. E. et al. Phenotypic Alteration of Vascular Smooth Muscle Cells Precedes Elastolysis in a Mouse Model of Marfan Syndrome. **Circulation Research**, v. 88, n. 1, p. 37–43, 19 jan. 2001.

BUPHA-INTR, T.; HAZLIP, K. M.; JANSSEN, P. M. L. Role of endothelin in the induction of cardiac hypertrophy in vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

BURRIDGE, P. W. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. **Nature methods**, v. 11, n. 8, p. 855–60, 2014.

BYERS, P. H. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: a growth industry. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 161–163, 15 jul. 2004.

CAIN, S. A. et al. ADAMTS-10 and -6 differentially regulate cell-cell junctions and focal adhesions. **Scientific Reports**, v. 6, 25 out. 2016.

CAO, N. et al. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. **Cell Research**, v. 22, n. 1, p. 219–236, 6 jan. 2012.

CARDOSO-MOREIRA, M. et al. Gene expression across mammalian organ development. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 505–509, 26 jul. 2019.

CARTA, L. et al. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 12, p. 8016–8023, 24 mar. 2006.

CASPER, J. et al. The UCSC Genome Browser database: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D762–D769, 4 jan. 2018.

CHEN, I. Y.; MATSA, E.; WU, J. C. Induced pluripotent stem cells: at the heart of cardiovascular precision medicine. **Nature Reviews Cardiology**, v. 13, n. 6, p. 333–349, 24 jun. 2016.

CHOPRA, A. et al. Force Generation via β -Cardiac Myosin, Titin, and α -Actinin Drives Cardiac Sarcomere Assembly from Cell-Matrix Adhesions. **Developmental Cell**, v. 44, n. 1, p. 87- 96.e5, 2018.

COLLOD-BÉROUD, G. et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. **Human Mutation**, v. 22, n. 3, p. 199–208, 2003.

CONG, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.

COOK, J. R. et al. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1329–1339, 2014.

CORSON, G. M. et al. Fibrillin Binds Calcium and Is Coded by cDNAs That Reveal a Multidomain Structure and Alternatively Spliced Exons at the 5' End. **Genomics**, v. 17, n. 2, p. 476–484, ago. 1993.

CROSAS-MOLIST, E. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Changes in Patients With Marfan Syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 4, p. 960–972, abr. 2015.

CUI, Y. et al. Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart. **Cell Reports**, v. 26, n. 7, p. 1934- 1950.e5, 2019.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308–312, 29 jun. 2016.

DEAN, J. C. S. Marfan syndrome: clinical diagnosis and management. **European Journal of Human Genetics**, v. 15, n. 7, p. 724–733, 9 jul. 2007.

DEN HARTOG, A. W. et al. The effect of losartan therapy on ventricular function in Marfan patients with haploinsufficient or dominant negative FBN1 mutations. **Netherlands Heart Journal**, v. 24, n. 11, p. 675–681, 4 nov. 2016.

DIETZ, H. C. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 337–339, jul. 1991.

DIRKX, E.; DA COSTA MARTINS, P. A.; DE WINDT, L. J. Regulation of fetal gene expression in heart failure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2414–2424, dez. 2013.

DOENCH, J. G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 184–191, 18 fev. 2016.

ESCHENHAGEN, T.; CARRIER, L. Cardiomyopathy phenotypes in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes—a systematic review. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 471, n. 5, p. 755–768, 15 maio 2019.

ETOC, F. et al. A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. **Developmental Cell**, v. 39, n. 3, p. 302–315, 2016.

FAIVRE, L. et al. Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Proband with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and FBN1 Mutations: An

International Study. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 454–466, set. 2007.

FERNANDES, G. R.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V. Identification of Loci Modulating the Cardiovascular and Skeletal Phenotypes of Marfan Syndrome in Mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–8, 2016.

FRANKEN, R. et al. Diagnosis and genetics of Marfan syndrome. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 2, n. 10, p. 1049–1062, 18 out. 2014.

FRANKEN, R. et al. Beneficial Outcome of Losartan Therapy Depends on Type of FBN1 Mutation in Marfan Syndrome. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, n. 2, p. 383–388, abr. 2015.

FRANKEN, R. et al. Genotype impacts survival in Marfan syndrome. **European Heart Journal**, v. 37, n. 43, p. 3285–3290, 14 nov. 2016.

FRANKEN, R. et al. Relationship between fibrillin-1 genotype and severity of cardiovascular involvement in Marfan syndrome. **Heart**, v. 103, n. 22, p. 1795–1799, 1 nov. 2017.

FRÉDÉRIC, M. Y. et al. UMD-predictor, a new prediction tool for nucleotide substitution pathogenicity-application to four genes: FBN1 , FBN2 , TGFBR1 , and TGFBR2. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 952–959, jun. 2009.

FRIEDMAN, C. E. et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Cardiac Differentiation from Human PSCs Reveals HOPX-Dependent Cardiomyocyte Maturation. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 4, p. 586- 598.e8, out. 2018.

FUNAKOSHI, S. et al. Enhanced engraftment, proliferation and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19111, 8 maio 2016.

GEHLE, P. et al. NT-proBNP and diastolic left ventricular function in patients with Marfan syndrome. **IJC Heart & Vasculature**, v. 12, p. 15–20, 1 set. 2016.

GIACOMELLI, E. et al. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 6, p. 862- 879.e11, jun. 2020.

GRANATA, A. et al. An iPSC-derived vascular model of Marfan syndrome identifies key mediators of smooth muscle cell death. **Nature Genetics**, v. 49, n. 1, p. 97–109, 2016.

GRANGE, T. et al. Quantifying the genetic basis of marfan syndrome clinical variability. **Genes**, v. 11, n. 5, p. 574, 20 maio 2020.

GUO, G. et al. A short ultraconserved sequence drives transcription from an alternate FBN1 promoter. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 4, p. 638–650, 2008.

GYURICZA, I. G. **Análise do efeito do gene Hspg2 na variabilidade dos fenótipos esquelético e vascular da Síndrome de Marfan**. 2019. Dissertação (Mestrado em

Biologia (Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GYURICZA, I. G. et al. Is HSPG2 a modifier gene for Marfan syndrome? **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 9, p. 1292–1296, 8 set. 2020.

HABASHI, J. P. et al. Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 117–121, 7 abr. 2006.

HAEUSSLER, M. et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2016.

HAN, L. et al. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. **Cardiovascular Research**, v. 104, n. 2, p. 258–269, 1 nov. 2014.

HANDFORD, P. . Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1498, n. 2–3, p. 84–90, 20 dez. 2000.

HARVEY, P. A.; LEINWAND, L. A. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 3, p. 355–365, 2011.

HENDRIKS, W. T. et al. TALEN- and CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Human Pluripotent Stem Cells Using Lipid-Based Transfection. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, v. 34, n. 1, p. 1–25, 3 ago. 2015.

HINSON, J. T. et al. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. **Science**, v. 349, n. 6251, p. 982–986, 28 ago. 2015.

HORIGUCHI, M.; OTA, M.; RIFKIN, D. B. Matrix control of transforming growth factor- β function. **Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 4, p. 321–329, 2012.

HU, P. et al. Single-nucleus transcriptomic survey of cell diversity and functional maturation in postnatal mammalian hearts. **Genes & Development**, v. 32, n. 19–20, p. 1344–1357, 1 out. 2018.

HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 22 dez. 2014.

HUTCHINSON, S. et al. Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: A potential modifier of phenotype? **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2269–2276, 2003.

ISOgai, Z. et al. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 6, p. 4565–4572, 2002.

ISOgai, Z. et al. Latent Transforming Growth Factor β -binding Protein 1 Interacts with Fibrillin and Is a Microfibril-associated Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2750–2757, 24 jan. 2003.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

JINEK, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–9, 2013.

JUDGE, D. P. et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 172–181, 2004.

JUDGE, D. P.; DIETZ, H. C. Marfan's syndrome. **The Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1965–1976, dez. 2005.

KANNAN, S. et al. Transcriptomic entropy quantifies cardiomyocyte maturation at single cell level. **bioRxiv**, p. 2020.04.02.022632, 2020.

KEANE, M. G.; PYERITZ, R. E. Medical Management of Marfan Syndrome. **Circulation**, v. 117, n. 21, p. 2802–2813, 27 maio 2008.

KIELTY, C. M. et al. Fibrillin Microfibrils. In: **Advances in Protein Chemistry**. [s.l.] Academic Press Inc., 2005. 70p. 405–436.

KRESH, J. Y.; CHOPRA, A. Intercellular and extracellular mechanotransduction in cardiac myocytes. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 462, n. 1, p. 75–87, 25 jul. 2011.

KUZNETSOV, S. A.; CHERMAN, N.; ROBEY, P. G. In Vivo Bone Formation by Progeny of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 2, p. 269–287, fev. 2011.

LAMBERS, C. et al. The Interaction of Endothelin-1 and TGF- β 1 Mediates Vascular Cell Remodeling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e73399, 28 ago. 2013.

LANDIS, B. J.; VELDTMAN, G. R.; WARE, S. M. Genotype–phenotype correlations in Marfan syndrome. **Heart**, v. 103, n. 22, p. 1750–1752, nov. 2017.

LESCROART, F. et al. Defining the earliest step of cardiovascular lineage segregation by single-cell RNA-seq. **Science**, v. 359, n. 6380, p. 1177–1181, 9 mar. 2018.

LIAN, X. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. **Nature protocols**, v. 8, p. 162–75, 2013.

LIMA, B. L. et al. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

LITVIŇUKOVÁ, M. et al. Cells of the adult human heart. **Nature**, v. 588, n. 7838, p. 466–472, 17 dez. 2020.

LIU, W. et al. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe marfan syndrome. **Human molecular genetics**, v. 5, n. 10, p. 1581–7, 1996.

LOEYS, B. L. et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 7, p. 476–485, 1 jul. 2010.

LOEYS, B. L. The search for genotype/phenotype correlation in Marfan syndrome: to be or not to be? **European Heart Journal**, v. 37, n. 43, p. 3291–3293, 14 nov. 2016.

MA, X. et al. Rapid Decoding of Sequence-Specific Nuclease-Induced Heterozygous and Biallelic Mutations by Direct Sequencing of PCR Products. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1285–1287, ago. 2015.

MAALOUF, R.; BAILEY, S. A review on B-type natriuretic peptide monitoring: assays and biosensors. **Heart Failure Reviews**, v. 21, n. 5, p. 567–578, 2016.

MALI, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 15 fev. 2013.

MAMADA, M. et al. Fibrillin I gene polymorphism is associated with tall stature of normal individuals. **Human Genetics**, v. 120, n. 5, p. 733–735, 19 dez. 2006.

MARTINEZ, J.; DHAWAN, A.; FARACH-CARSON, M. Modular Proteoglycan Perlecan/HSPG2: Mutations, Phenotypes, and Functions. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 556, 16 nov. 2018.

MILLER, J. D. et al. Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 691–705, dez. 2013.

MILLS, R. J. et al. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 40, p. E8372–E8381, 3 out. 2017.

MOSQUEIRA, D. et al. CRISPR/Cas9 editing in human pluripotent stem cell-cardiomyocytes highlights arrhythmias, hypocontractility, and energy depletion as potential therapeutic targets for hypertrophic cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 39, n. 43, p. 3879–3892, 14 nov. 2018.

MUMMERY, C. L. et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 111, n. 3, p. 344–358, 20 jul. 2012.

NADEAU, J. H. Modifier genes in mice and humans. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 3, p. 165–174, mar. 2001.

NEILL, T.; ZOELLER, J. Matrix Biology Highlights. **Matrix Biology**, v. 36, p. 1–2, 1 jun. 2014.

NEPTUNE, E. R. et al. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 407–411, 24 mar. 2003.

NICOLE, S. et al. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). **Nature Genetics**, v. 26, n. 4, p. 480–483, dez. 2000.

PARK, J. W. et al. Recapitulating and correcting marfan syndrome in a cellular model. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 5, p. 588–603, 2017.

PASUMARTHI, K. B. S.; FIELD, L. J. Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation. **Circulation Research**, v. 90, n. 10, p. 1044–1054, 31 maio 2002.

PEREIRA, L. et al. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 2, n. 10, p. 1762–1762, 1993.

PEREIRA, L. et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3819–3823, 30 mar. 1999.

PETRYSZAK, R. et al. Expression Atlas update—an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D746–D752, 4 jan. 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e – 45, 1 maio 2001.

POPP, M. W.; MAQUAT, L. E. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1319–1322, jun. 2016.

QUARTO, N. et al. Skeletogenic phenotype of human Marfan embryonic stem cells faithfully phenocopied by patient-specific induced-pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. 215–220, 3 jan. 2012.

QUONDAMATTEO, F. et al. Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. **Matrix Biology**, v. 21, n. 8, p. 637–646, dez. 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019.

RAMACHANDRA, C. J. A. et al. Molecular pathogenesis of Marfan syndrome. **International Journal of Cardiology**, v. 187, n. 1, p. 585–591, maio 2015.

RAMIREZ, F. et al. The fibrillin-marfan syndrome connection. **BioEssays**, v. 15, n. 9, p. 589–594, set. 1993.

RAMIREZ, F.; DIETZ, H. C. Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 326–330, nov. 2007.

RAMIREZ, F.; GAYRAUD, B.; PEREIRA, L. Marfan syndrome : new clues to genotype-phenotype correlations. p. 202–207, 1999.

RAN, F. A. et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, set. 2013a.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 24 nov. 2013b.

RIORDAN, J. D.; NADEAU, J. H. From Peas to Disease: Modifier Genes, Network Resilience, and the Genetics of Health. **The American Journal of Human Genetics**, v. 101, n. 2, p. 177–191, 3 ago. 2017.

ROBINSON, P. N. et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. **J Med Genet**, v. 43, p. 769–787, 2006.

RODRÍGUEZ-PASCUAL, F.; BUSNADIEGO, O.; GONZÁLEZ-SANTAMARÍA, J. The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? **Life Sciences**, v. 118, n. 2, p. 156–164, 1 nov. 2014.

ROUF, R. et al. Nonmyocyte ERK1/2 signaling contributes to load-induced cardiomyopathy in Marfan mice. **JCI insight**, v. 2, n. 15, 3 ago. 2017.

ROUX, S.; RUBIN, L. J. Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 11, n. 7, p. 991–1002, 24 jul. 2002.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. Boston: RStudio, 2015.

SABATIER, L. et al. Heparin/heparan sulfate controls fibrillin-1, -2 and -3 self-interactions in microfibril assembly. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 2890–2897, 25 ago. 2014.

SAMAREL, A. M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. H2291–H2301, dez. 2005.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–55, 2014.

SARAFIAN, R. et al. Monitoring cell line identity in collections of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v. 28, p. 66–70, 1 abr. 2018.

SCHAUM, N. et al. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. **Nature**, v. 562, n. 7727, p. 367–372, 3 out. 2018.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 1 jul. 2012.

SCHRIJVER, I. et al. Premature Termination Mutations in FBN1: Distinct Effects on Differential Allelic Expression and on Protein and Clinical Phenotypes. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 2, p. 223–237, 1 ago. 2002.

SHI, Y. et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 2, p. 115–130, 16 fev. 2017.

SORENSEN, D. W.; VAN BERLO, J. H. The Role of TGF— β Signaling in Cardiomyocyte Proliferation. **Current Heart Failure Reports**, p. 1–9, 20 jul. 2020.

STHENEUR, C. et al. Identification of the minimal combination of clinical features in probands for efficient mutation detection in the FBN1 gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 9, p. 1121–1128, 18 mar. 2009.

STHENEUR, C. et al. Prognosis factors in probands with an FBN1 mutation diagnosed before the age of 1 year. **Pediatric Research**, v. 69, n. 3, p. 265–270, mar. 2011.

SUN, N. et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 130, p. 130ra47-130ra47, 2012.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, nov. 2007.

TANAKA, A. et al. Endothelin-1 Induces Myofibrillar Disarray and Contractile Vector Variability in Hypertrophic Cardiomyopathy–Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 6, 17 dez. 2014.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.

TIECKE, F. et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype–phenotype correlations in FBN1 exons 24–40. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 13–21, 12 jan. 2001.

TIEDEMANN, K. et al. Interactions of Fibrillin-1 with Heparin/Heparan Sulfate, Implications for Microfibrillar Assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 36035–36042, 21 set. 2001.

TIEDEMANN, K. et al. Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11404–11412, 2005.

TITMARSH, D. M. et al. Induction of Human iPSC-Derived Cardiomyocyte Proliferation Revealed by Combinatorial Screening in High Density Microbioreactor Arrays. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24637, 21 jul. 2016.

TOFOLI, F. A. et al. Increasing The Genetic Admixture of Available Lines of Human Pluripotent Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34699, 6 dez. 2016.

TUCKER, N. R. et al. Transcriptional and Cellular Diversity of the Human Heart. **Circulation**, v. 142, n. 5, p. 466–482, 4 ago. 2020.

ULMER, B. M. et al. Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 834–847, mar. 2018.

VAN DEN BERG, C. W. et al. Transcriptome of human foetal heart compared with cardiomyocytes from pluripotent stem cells. **Development**, v. 142, n. 18, p. 3231–3238, 15 set. 2015.

VAN KARNEBEEK, C. D. M. et al. Natural history of cardiovascular manifestations in Marfan syndrome. **Archives of Disease in Childhood**, v. 84, n. 2, p. 129–137, 1 fev. 2001.

VEERMAN, C. C. et al. Immaturity of Human Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes in Culture: Fatal Flaw or Soluble Problem? **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 9, p. 1035–1052, maio 2015.

WICKHAM, H. **Ggplot2**. New York: Springer New York, 2009.

WINTHER, S. et al. Cardiovascular Magnetic Resonance Provides Evidence of Abnormal Myocardial Strain and Primary Cardiomyopathy in Marfan syndrome. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 43, n. 3, p. 410–415, 2019.

YAMANAKA, S. A Fresh Look at iPS Cells. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 13–17, abr. 2009.

YU, Y. et al. Kinetic alterations of collagen and elastic fibres and their association with cardiac function in acute myocardial infarction. **Molecular Medicine Reports**, 27 dez. 2017.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequência dos iniciadores para amplificação dos possíveis alvos não intencionais dos gRNAs utilizados para edição do gene *FBN1*

<i>Locus</i>	TAMANHO (pb)	SEQUÊNCIA (5' -> 3')
<i>SHROOM1</i>	25	<i>Forward:</i> CAGCTTTCCTGGCTCTGAGAAGCAC
	24	<i>Reverse:</i> TCAGCACTCATCTGCGCAGCCATG
<i>SUMO3</i>	17	<i>Forward:</i> TCCACGCCCGTCTCCTC
	19	<i>Reverse:</i> CACCAGGGACGCGATGATG
<i>PHLDB1</i>	19	<i>Forward:</i> TGAGGACTCACCGCCGAAA
	20	<i>Reverse:</i> AGCCCAGGGTGACCTTGTTA
<i>TMEM200C</i>	20	<i>Forward:</i> GGGGTGTCAACTCCAGTTCC
	18	<i>Reverse:</i> CTCGCGGTAGACGCTGTA
<i>COL2A1</i>	20	<i>Forward:</i> AGGGCTCGGAAGCTACACAA
	22	<i>Reverse:</i> TTTTGGGGGTGAATGTATTGCC
<i>FBN2</i>	23	<i>Forward:</i> ACAGCTTCATTTGTTTACACGTT
	22	<i>Reverse:</i> ACCCACAAAACACATGTTAAGC
<i>UQCRC2P1</i>	20	<i>Forward:</i> ATGTGTTTGAGGCTCTGGGC
	20	<i>Reverse:</i> TAGCAGAAAGTGCTGCCACA
<i>WDR16</i>	24	<i>Forward:</i> AGTCCCATATAGCTTGACCAATGA
	23	<i>Reverse:</i> AGGGCTGTTTCTCTCTCTCTAT
<i>SERPINB10</i>	20	<i>Forward:</i> ATGTGGGCATCCGTACTTCC
	21	<i>Reverse:</i> CCTTGGGCTCTTCTTTGGAAT
<i>CD86</i>	25	<i>Forward:</i> AGTTTTCCAGAAATTGAGAGGTCTA
	21	<i>Reverse:</i> ACCGTGGTTCTTTTCTCTTGC
<i>FBN3</i>	18	<i>Forward:</i> CAGGCTGCTCACCTGTG
	20	<i>Reverse:</i> AAAAGAGCAAGGTTTGGGA
<i>KIF13A</i>	20	<i>Forward:</i> ACTCTGGCCTGCAGAATTGG
	23	<i>Reverse:</i> AGTGCACTTCCTCTAGGTAGATT
<i>HMGB4</i>	23	<i>Forward:</i> AGCACTTTCTAGATTGCTCCTGG
	22	<i>Reverse:</i> TTCGGTACTTCTTCTGCGCATT
<i>UBAP2L</i>	19	<i>Forward:</i> CGACTTTAGCGCACCCATC
	18	<i>Reverse:</i> CTACCTTCAGCCTCTGCC

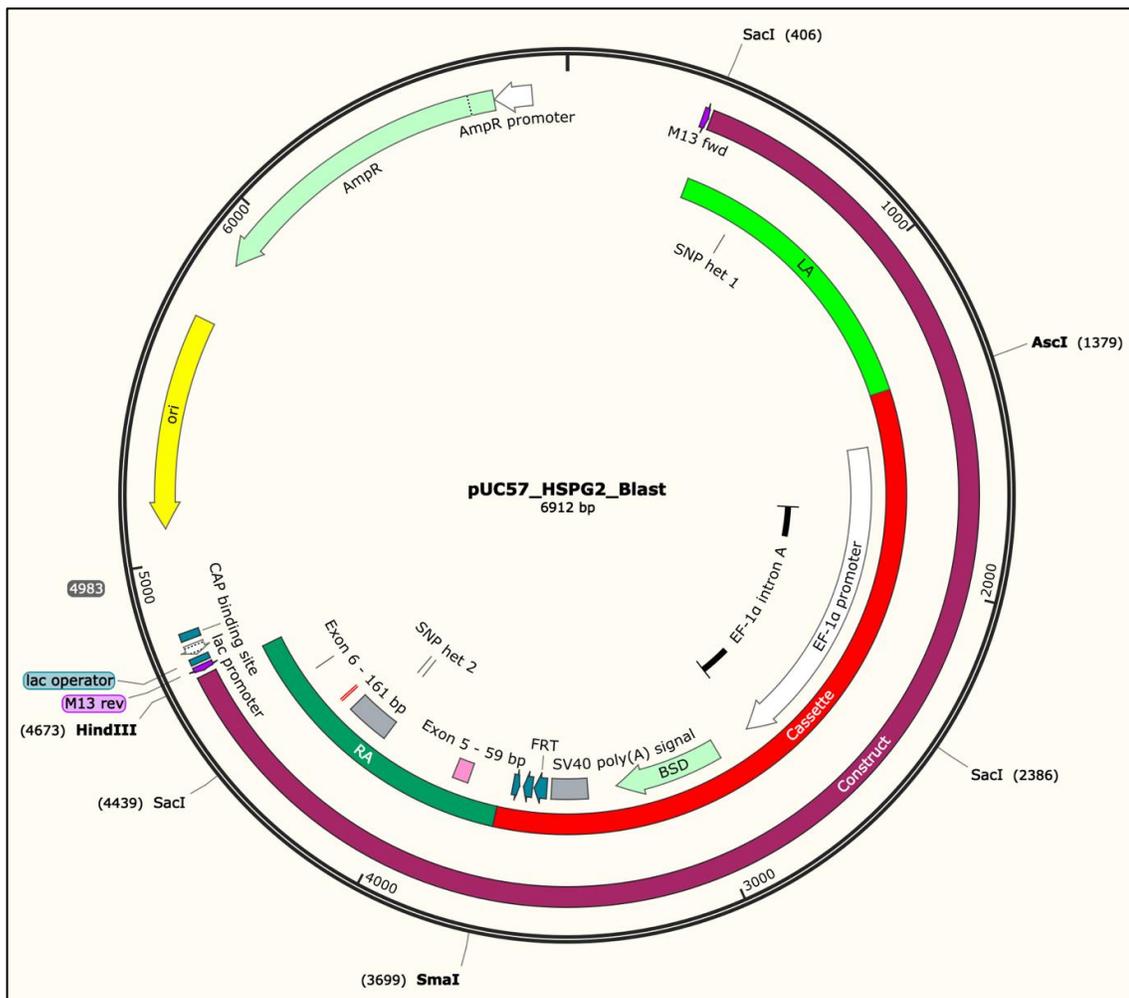
MATN3	23	Forward: AACTTACCTATGTACAGGGTCT
	25	Reverse: TCAACCTACTGAATTGTCTGTAGCA

APÊNDICE B – Sequência dos iniciadores utilizados para genotipagem

ID	TAMANHO (pb)	SEQUÊNCIA (5' → 3')
E2	25	Forward: TTTCCAGCCAGCTGTGGACCAAACG
	25	Reverse: ACGAACGGGGTGGGGACTAAACAAC
E2 interno	21	Forward: ACCCAAATTAAGTGCGCCACG
E31 Ext.	22	Forward: GACTTTTAAGCAGGTGTGGACG
	20	Reverse: CATCTGGAGCTGACGAATGG
E31	21	Forward: GCGGTCAGTTAATGTTTTCTC
	23	Reverse: CTTATGACTAACAAGACAAGATG
E2 cDNA	18	Forward: TGCCACAAGCGGACAGGA
	21	Reverse: TCCATCCAGGGCAACAGTAAG
E31 cDNA	20	Forward: GCTATGAATGTAGCTGTCAG
	21	Reverse: CTTAGGCAGATATTTGGATTC
E16	22	Forward: CTTTTAGCAGCCATTGTTCTCC
	22	Reverse: GGATAGGTGGGGATTCCCTTGC
E16 interno	22	Forward: GGATACAAAATCTCTTGGGAG
E56	22	Forward: AAGAGGTCATCAGTTGATTAGG
	21	Reverse: AAAGGCATGCTGTTCAAATCC
E56 interno	22	Forward: CAAGTTCAAAGGTGGTTAGAAG
E16 cDNA	19	Forward: TACACCTGTCAGTGCCGAG
	21	Reverse: AGAGTGCCTGATATTCCGCTG
E16 cDNA interno	21	Forward: GAATGCCGAGACATTGATGAG
E56 cDNA	24	Forward: GATACTGATGAATGTTCTGTTGGC
	21	Reverse: CACAGCAGCATTCCGATTTGG
E56 cDNA interno	21	Forward: GAAATGGAACCTGCAAGAATG
HSPG2 WT/MT	21	Forward: GGACAGAGTAAAGCGGGAGGA
	20	Reverse: GCTCAGGGGTCAATGCCAAG

HSPG2 LA	19	<i>Forward:</i> GATGGGCCTGGCAGTAGCA
	20	<i>Reverse:</i> CCACACACGGCACTTACCTG
HSPG2 RA	20	<i>Forward:</i> CGGTGCCGACAGGTTCTTCT
	20	<i>Reverse:</i> GACAGGGCCGAGAACCACAC
HSPG2 cassette	21	<i>Forward:</i> GGGACCGTCGTAAACTCCCA
	20	<i>Reverse:</i> GAGTCACATGAAGCGACGGC

APÊNDICE C – Mapa do vetor pUC57-HSPG2-Blast



APÊNDICE D – Código da função *qpcr.R* desenvolvida para cálculo de expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

```
#!/usr/bin/env Rscript

#qpcr.R
# Analise de dados de qPCR para calculo da expressão genica diferencial (fold-change) - metodo deltadeltaCt
# 2019-10-29 - Juliana Borsoi e Isabela Gyuricza
# Contato: juliana-borsoi@outlook.com / isabelagerdes@gmail.com

### ARGUMENTOS:
# file = arquivo de saida do qPCR (Applied Biosystems) salvo em .txt ou .csv SEM os dados de cabeçalho, NTCs e linhas nao totalmente preenchidas, contendo os nomes originais das colunas, exceto o "Ct", que deve ser substituído por "Ct"

# genes = vetor de caracteres contendo os nomes dos genes para os quais o fold-change deve ser calculado, sempre entre ""
# hk = vetor de caracteres contendo os nomes dos genes controle (housekeepers)
# ref = nome da amostra a ser usada como referencia (fold-change = 1)
# separ = tipo de separador do arquivo file (default = "\t"): "\t", se for .txt, e ",", " ou ";", se for .csv.
# geomeaN=argumento logico que determina se o usuario quer que o fold-change tamb em seja calculado para a media geometrica de hk (default = FALSE)
# name.file = nome do arquivo de saida contendo os valores de fold-change (default = "Results.csv")

qpcr <- function(file, genes, hk, ref, separ = "\t", geomeaN=FALSE, name.file = "Results.csv")
{
  if (!require(tidyverse))
  {
    install.packages("tidyverse") # instala o pacote tidyverse
  }

  if (!require(EnvStats))
  {
    install.packages("EnvStats") # instala o pacote envstats
  }

  data = read.table(file, header = TRUE, sep = separ) # abre o arquivo do arguent o file

  data = data.frame(data$Sample.Name, data$Target.Name, data$Ct.Mean) # extrai as colunas a serem usadas

  colnames(data) <- c("Sample", "Target", "CT_mean") # renomeia as colunas

  if (separ == ";" | separ == "\t")
  {
    comma_dot <- function(x)
    {
```

```

    gsub(",", ".", x) # converte as “,” como separação decimal para “.”
  }
  data <- apply(data, 2, comma_dot)
  data <- as.data.frame(data)
}

data$Sample = as.character(data$Sample) # converte a coluna para caracter
data$CT_mean=as.numeric(as.character(data$CT_mean)) # converte para numerico

##### CÁLCULO DA EXPRESSÃO RELATIVA

data <- unique(data) # Para deletar as Linhas idênticas (deleta replicas, ja que
e tem mesma media)
data <- spread(data, key = Target, value = CT_mean) # Cria colunas para cada gene
alvo com seus respectivos valores de Ct

if (geomean == TRUE)
{
  data_hk = matrix(NA, nrow(data), length(hk), dimnames = list(data$Sample, hk)
)
  for (i in 1:length(hk))
  {
    data_hk[,i] = data[,hk[i]]
  }
  data$geomean=apply(data_hk, 1, geoMean) # calcula a media geometrica de hk
}

genes_rep = rep(genes, length(hk))
hk_rep = rep(hk, each = length(genes))
length_tot = length(genes)*length(hk)

names_dct = rep(NA, length_tot)
names_ddct = rep(NA, length_tot)
names_fc = rep(NA, length_tot)

for (a in 1:length_tot)
{
  names_dct[a] = paste0("delta_ct_", genes_rep[a], "_", hk_rep[a])
  names_ddct[a] = paste0("deltadelta_ct_", genes_rep[a], "_", hk_rep[a])
  names_fc[a] = paste0("fc_", genes_rep[a], "_", hk_rep[a])
}

if (geomean == TRUE)
{
  for (b in 1:length(genes))
  {
    names_dct = c(names_dct, paste0("delta_ct_", genes[b], "_geomean"))
    names_ddct = c(names_ddct, paste0("deltadelta_ct_", genes[b], "_geomean"))
    names_fc = c(names_fc, paste0("fc_", genes[b], "_geomean"))
  }
}

delta_ct = matrix(NA, nrow(data), length(names_dct), dimnames = list(data$Sample,
names_dct))

```

```

for (j in 1:length_tot)
{
  delta_ct[,j] = data[,genes_rep[j]] - data[,hk_rep[j]]
}

if (geomean == TRUE)
{
  min=length_tot + 1
  max = ncol(delta_ct)
  for (k in min:max)
  {
    delta_ct[,k] = data[,genes[k-length_tot]] - data$geomean
  }
}

deltadelta_ct = matrix(NA, nrow(data), length(names_ddct), dimnames = list(data
$Sample, names_ddct))

for (l in 1:nrow(data))
{
  deltdelta_ct[l,] = delta_ct[l,] - delta_ct[data$Sample == ref,]
}

fold_change = matrix(2^(-deltadelta_ct), nrow(data), length(names_fc), dimnames
= list(data$Sample, names_fc))

write.csv(fold_change, file = name.file)
}

#quit

```

APÊNDICE E – Código da função *qpcr_sybr.R* desenvolvida para cálculo de expressão gênica relativa considerando-se a eficiência dos iniciadores (PFAFFL, 2001)

```
#!/usr/bin/envRscript

#qpcr_sybr.R
# Analise de dados de qPCR para calculo da expressão genica diferencial (fold-change) - metodo Pfaffl, considerando as eficiencias dos iniciadores
# 2020-05-14 - Juliana Borsoi
# Contato: juliana-borsoi@outlook.com

### ARGUMENTOS:
# file = arquivo de saida do qPCR (Applied Biosystems) salvo em .txt ou .csv SEM os dados de cabecalho, NTCs e linhas nao totalmente preenchidas, contendo os nomes originais das colunas, exceto o "Ct", que deve ser substituído por "Ct"

# genes = vetor de caracteres contendo os nomes dos genes para os quais o fold-change deve ser calculado, sempre entre ""
# eff_genes = vetor de caracteres contendo as respectivas eficiencias dos genes para os quais o fold-change deve ser calculado, na mesma ordem do argumento genes
# hk = vetor de caracteres contendo os nomes dos genes controle (housekeepers)
# eff_hk = vetor de caracteres contendo as respectivas eficiencias dos genes controle, na mesma ordem do argumento hk
# ref = nome da amostra a ser usada como referencia (fold-change = 1)
# geomeaN=argumento logico que determina se o usuario quer que o fold-change tambem seja calculado para a media geometrica de hk (default = FALSE)
# separ = tipo de separador do arquivo file (default = "\t"): "\t", se for .txt, e ",", ou ";", se for .csv.
# name.file = nome do arquivo de output contendo os valores de fold-change (default = "Results.csv")

#### OBS: Eficiência = 10(-1/slope)

qpcr_sybr <- function(file, genes, eff_genes, hk, eff_hk, ref, geomeaN=FALSE, separ = "\t", name.file = "Results.csv")
{
  if (!require(tidyverse))
  {
    install.packages("tidyverse")
  }

  if (!require(EnvStats))
  {
    install.packages("EnvStats")
  }

  data = read.table(file, header = TRUE, sep = separ)

  data = data.frame(data$Sample.Name, data$Target.Name, data$Ct.Mean)
```

```

colnames(data) <- c("Sample", "Target", "CT_mean")

if (separ == ";" | separ == "\t")
{
  comma_dot <- function(x)
  {
    gsub(",", ".", x)
  }
  data <- apply(data, 2, comma_dot)
  data <- as.data.frame(data)
}

data$Sample = as.character(data$Sample)
data$CT_mean = as.numeric(as.character(data$CT_mean))

##### CALCULO DA EXPRESSAO RELATIVA

data <- unique(data)
data <- spread(data, key = Target, value = CT_mean)

genes_rep = rep(genes, length(hk))
hk_rep = rep(hk, each = length(genes))
length_tot = length(genes)*length(hk)

names_fc = rep(NA, length_tot)

for (a in 1:length_tot)
{
  names_fc[a] = paste0("fc_", genes_rep[a], "_", hk_rep[a])
}

if (geomean == TRUE)
{
  for (b in 1:length(genes))
  {
    names_fc = c(names_fc, paste0("fc_", genes[b], "_geomean"))
  }
}

calculo_genes = matrix(NA, nrow(data), length(genes), dimnames = list(data$Sample, genes))
calculo_hk = matrix(NA, nrow(data), length(hk), dimnames = list(data$Sample, hk))

for (j in 1:length(genes))
{
  calculo_genes[,j] = eff_genes[j]^(data[data$Sample == ref, genes[j]] - data[, genes[j]])
}

for (k in 1:length(hk))
{
  calculo_hk[,k] = eff_hk[k]^(data[data$Sample == ref, hk[k]] - data[,hk[k]])
}

```

```

}

if (geomean == TRUE)
{
  calculo_hk = as.data.frame(calculo_hk)
  calculo_hk$geomean=apply(calculo_hk, 1, geoMean)
}

razao = matrix(NA, nrow(data), length(names_fc), dimnames = list(data$Sample, names_fc))

for (l in 1:length_tot)
{
  razao[,l] = calculo_genes[, genes_rep[l]]/calculo_hk[, hk_rep[l]]
}

ncol(calculo_hk)

if (geomean == TRUE)
{
  miN=length_tot + 1
  max = ncol(razao)
  for (m in min:max)
  {
    razao[,m] = calculo_genes[, genes_rep[m - length_tot]]/calculo_hk[, ncol(calculo_hk)]
  }
}

write.csv(razao, file = name.file)
}

#quit()

```

APÊNDICE F – Código desenvolvido para análise de expressão gênica em cardiomiócitos ou fibroblastos de embriões humanos (dados de CUI et al., 2019)

```
#!/usr/bin/envRscript

# Análise de expressão de FBN1, FBN2, FBN3 e ELN em embriões de 5 a 24 semanas
# Dados de RNAseq de células únicas gerados por Cui et al. 2019
# 2019-10-29 - Juliana Borsoi
# Contato: juliana-borsoi@outlook.com

# Instalando e carregando os pacotes necessários
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")

BiocManager::install("DESeq2")

library(dplyr)
library(plyr)
library(DESeq2)
library(ggplot2)
library("tidyverse")

# Estabelecendo o diretorio de trabalho
setwd("~/OneDrive/Bioinfo/BIOINFO_PROJECT/2019 Cui et al/LV_data/")

# Estabelecendo o caminho para o diretorio contendo os arquivos .csv para cada em
# briaio (gerados manualmente)
folder = "~/OneDrive/Bioinfo/BIOINFO_PROJECT/2019 Cui et al/LV_data/Embryos/"

# Criando uma lista com os dados de todos os embrioes
file_list = list.files(path=folder, pattern="*.csv")
file_names = file_list
file_names = sub(pattern="*.csv", "\\2", file_names) # Encontra um padrao e selecio
na como nomes apenas o que esta antes do padrao

# Lendo os arquivos .csv em file_list e criando data frames com o mesmo nome do a
rquivo
for (i in 1:length(file_list)){
  assign(file_names[i], read.csv(paste(folder, file_list[i], sep='')))
}

dflist <- Filter(is.data.frame, as.list(.GlobalEnv)) # Agrupa todos os data.frame
s (dfs) em uma lista
Cluster_CM = read.csv("~/OneDrive/Bioinfo/BIOINFO_PROJECT/2019 Cui et al/LV_data/
Cluster_CM.csv") # Outros arquivos para fibroblastos
Cluster_CM # Data frame com as identificações das células classificadas como card
iomiócitos (CMs) - Fibroblastos = Cluster_fibs
dflist_filtered = as.list(rep(NA, length(names(dflist)))) # Criação de uma lista
vazia com o número de data frames de dflist

for (j in 1:length(names(dflist))){
```

```

dflist_filtered[[j]] = dflist[[j]] %>% filter(X %in% Cluster_CM$Cell.Name) # Filtra os dados de dflist mantendo apenas os CMs (ou fibroblastos) e salva na lista dflist_filtered
}
names(dflist_filtered) = names(dflist)

# Estabelecendo o caminho para o diretorio que conterá os arquivos .csv com os dados filtrados (de CMs ou fibroblastos apenas)
folder2 = "~/OneDrive/Bioinfo/BIOINFO_PROJECT/2019 Cui et al/LV_data/2_Embryos_filtered/"

# Modificando os data frames de dflist_filtered e salvando como arquivos .csv
for (k in 1:length(names(dflist_filtered))){
  row.names(dflist_filtered[[k]]) = dflist_filtered[[k]]$X # Nomeia as linhas de acordo com os dados da coluna X, pois na hora de transformar o .csv em df, os nomes das linhas viraram uma coluna!
  dflist_filtered[[k]] = dflist_filtered[[k]] %>% select(-matches("X")) # Deleta a coluna X, ja que as linhas ja tem os nomes corretos
  write.csv(dflist_filtered[[k]], file = paste(folder2, paste(names(dflist_filtered[[k]]), "_filtered.csv", sep = ''), sep = '')) # Salva os dfs filtrados em arquivos csv
}
length(dflist_filtered)

# Estabelecendo o caminho para o diretorio que conterá os arquivos .csv com os dados de Log2 TPM
folder3 = "~/OneDrive/Bioinfo/BIOINFO_PROJECT/2019 Cui et al/LV_data/2_Embryos_filtered_log2/"

file_list_filtered = list.files(path=folder2, pattern="*.csv") # Cria uma lista com os nomes de todos os arquivos .csv de folder2
file_names_filtered = sub(pattern="*.csv", "\\2", file_list_filtered) # Encontra um padrao e seleciona como nomes apenas o que esta antes do padrao
dflist_filtered = as.list(rep(NA, length(file_names_filtered))) # Cria uma lista vazia
dflist_filtered_log2 = as.list(rep(NA, length(file_names_filtered))) # Cria uma lista vazia

for (l in 1:length(file_list_filtered)){
  dflist_filtered[[l]] = assign(file_names_filtered[l], read.csv(paste(folder2, file_list_filtered[l], sep=''), row.names = 1)) # Atribui ao primeiro objeto da lista um df lido com read.csv, que tem como nome file_names_filtered[l]. Row.names = 1 indica que coluna do df contem os nomes das linhas
  dflist_filtered_log2[[l]] = log2(dflist_filtered[[l]] + 1) # Atribui ao objeto do df dos logs o valor de log2 do df[l] +1 da linha acima
  write.csv(dflist_filtered_log2[[l]], file = paste(folder3, paste(file_names_filtered[l], "_log2.csv", sep = ''), sep = '')) # Cria um arquivo .csv com o df dos log2 +1
}
names(dflist_filtered) = file_names_filtered # Atribui novos nomes a dflist_filtered
names(dflist_filtered_log2) = file_names_filtered # Atribui novos nomes a dflist_filtered_log2
FBN1 = data.frame(Embryo = character(), Cell = character(), FBN1 = numeric()) # Cria um df vazio para os dados de FBN1

```

```

FBN2 = data.frame(Embryo = character(), Cell = character(), FBN2 = numeric()) # C
ria um df vazio para os dados de FBN2
FBN3 = data.frame(Embryo = character(), Cell = character(), FBN3 = numeric()) # C
ria um df vazio para os dados de FBN3
ELN=data.frame(Embryo = character(), Cell = character(), ELN=numeric()) # Cria um
df vazio para os dados de ELN

# Atribuindo a cada um dos dfs os dados de expressao (Log2 TPM)
for (m in 1:length(dflist_filtered_log2)){
  data = tibble::rownames_to_column(dflist_filtered_log2[[m]] %>% select(matches
("FBN1")), var = "Cell")
  Embryo = rep(sub(pattern="*_filtered","\2", names(dflist_filtered_log2[m])), n
row(data))
  temp = cbind(Embryo,data)
  FBN1 = rbind(FBN1, temp)
}

for (m in 1:length(dflist_filtered_log2)){
  data = tibble::rownames_to_column(dflist_filtered_log2[[m]] %>% select(matches
("FBN2")), var = "Cell")
  Embryo = rep(sub(pattern="*_filtered","\2", names(dflist_filtered_log2[m])), n
row(data))
  temp = cbind(Embryo,data)
  FBN2 = rbind(FBN2, temp)
}

for (m in 1:length(dflist_filtered_log2)){
  data = tibble::rownames_to_column(dflist_filtered_log2[[m]] %>% select(matches
("FBN3")), var = "Cell")
  Embryo = rep(sub(pattern="*_filtered","\2", names(dflist_filtered_log2[m])), n
row(data))
  temp = cbind(Embryo,data)
  FBN3 = rbind(FBN3, temp)
}

for (m in 1:length(dflist_filtered_log2)){
  data = tibble::rownames_to_column(dflist_filtered_log2[[m]] %>% select(matches
("ELN")), var = "Cell")
  Embryo = rep(sub(pattern="*_filtered","\2", names(dflist_filtered_log2[m])), n
row(data))
  temp = cbind(Embryo,data)
  ELN=rbind(ELN, temp)
}

# Estabelecendo a ordem de desenvolvimento dos embriões (crescente)
order_names = c("5W_1", "6W_1", "6W_2", "7W_1", "7W_2", "7W_3", "9W_1", "10W_1",
"13W_1", "13W_2", "15W_1",
"17W_1", "17W_2", "20W_1", "22W_1", "23W_1", "24W_1")

# Estabelecendo a ordem de nomenclatura por estágio
order_stages = c("5W", "6W", "7W", "9W", "10W", "13W", "15W", "17W", "20W", "22W",
"23W", "24W")

### Ordenando os dados de cada df, convertendo valores = 0 em NA e eliminando NAs
# Obs:. Para análise com todos os dados, incluindo zeros, a conversão em e elimin

```

ação de NAs não é feita

```

# FBN1
FBN1 = FBN1[order(factor(FBN1$Embryo, levels=unique(order_names))),]
row.names(FBN1) = 1:nrow(FBN1)
FBN1[FBN1 == 0] = NA # Converte 0 em NA
NA_FBN1 = sum(is.na(FBN1))/nrow(FBN1) # Calcula a proporção de NAs
NA_FBN1
FBN1 = na.omit(FBN1) # Exclui NAs
FBN1$Embryo = rep(sub(pattern="_.","\2", FBN1$Embryo, nrow(FBN1))) # Uniformiza
a nomenclatura dos estágios
FBN1$Embryo = as.factor(FBN1$Embryo) # Transforma os estágios em fatores
FBN1$Embryo = factor(FBN1$Embryo, levels=unique(order_stages)) # Ordena os estági
os

# FBN2
FBN2 = FBN2[order(factor(FBN2$Embryo, levels=unique(order_names))),]
row.names(FBN2) = 1:nrow(FBN2)
FBN2[FBN2 == 0] = NA
NA_FBN2 = sum(is.na(FBN2))/nrow(FBN2)
NA_FBN2
FBN2 = na.omit(FBN2)
FBN2$Embryo = rep(sub(pattern="_.","\2", FBN2$Embryo, nrow(FBN2)))
FBN2$Embryo = as.factor(FBN2$Embryo)
FBN2$Embryo = factor(FBN2$Embryo, levels=unique(order_stages))

# FBN3
FBN3 = FBN3[order(factor(FBN3$Embryo, levels=unique(order_names))),]
row.names(FBN3) = 1:nrow(FBN3)
FBN3[FBN3 == 0] = NA
NA_FBN3 = sum(is.na(FBN3))/nrow(FBN3)
NA_FBN3
FBN3 = na.omit(FBN3)
FBN3$Embryo = rep(sub(pattern="_.","\2", FBN3$Embryo, nrow(FBN3)))
FBN3$Embryo = as.factor(FBN3$Embryo)
FBN3$Embryo = factor(FBN3$Embryo, levels=unique(order_stages))

# ELN
ELN=ELN[order(factor(ELN$Embryo, levels=unique(order_names))),]
row.names(ELN) = 1:nrow(ELN)
ELN[ELN == 0] = NA
NA_ELN=sum(is.na(ELN))/nrow(ELN)
NA_ELN
ELN=na.omit(ELN)
ELN$Embryo = rep(sub(pattern="_.","\2", ELN$Embryo, nrow(ELN)))
ELN$Embryo = as.factor(ELN$Embryo)
ELN$Embryo = factor(ELN$Embryo, levels=unique(order_stages))

# Calculando a média de Log2 TPM de cada gene
mean_FBN1 = tapply(FBN1$FBN1, FBN1$Embryo, mean)
mean_FBN1 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(mean_FBN1), var = "Embryo_St
age")
mean_FBN2 = tapply(FBN2$FBN2, FBN2$Embryo, mean)
mean_FBN2 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(mean_FBN2), var = "Embryo_St
age")

```

```

mean_FBN3 = tapply(FBN3$FBN3, FBN3$Embryo, mean)
mean_FBN3 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(mean_FBN3), var = "Embryo_Stage")
mean_ELN=tapply(ELN$ELN, ELN$Embryo, mean)
mean_ELN=tibble::rownames_to_column(as.data.frame(mean_ELN), var = "Embryo_Stage")
)

# Criando um df com as médias
mean_genes = merge(mean_FBN1, mean_FBN2, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
mean_genes = merge(mean_genes, mean_FBN3, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
mean_genes = merge(mean_genes, mean_ELN, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
colnames(mean_genes) = c("Embryo_Stage", "FBN1", "FBN2", "FBN3", "ELN")
mean_genes = mean_genes[order(factor(mean_genes$Embryo, levels=unique(order_stages))),]
mean_genes

# Calculando o desvio padrão de log2 TPM de cada gene
sd_FBN1 = tapply(FBN1$FBN1, FBN1$Embryo, sd)
sd_FBN1 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(sd_FBN1), var = "Embryo_Stage")
)
sd_FBN2 = tapply(FBN2$FBN2, FBN2$Embryo, sd)
sd_FBN2 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(sd_FBN2), var = "Embryo_Stage")
)
sd_FBN3 = tapply(FBN3$FBN3, FBN3$Embryo, sd)
sd_FBN3 = tibble::rownames_to_column(as.data.frame(sd_FBN3), var = "Embryo_Stage")
)
sd_ELN=tapply(ELN$ELN, ELN$Embryo, sd)
sd_ELN=tibble::rownames_to_column(as.data.frame(sd_ELN), var = "Embryo_Stage")

# Criando um df com os desvios
sd_genes = merge(sd_FBN1, sd_FBN2, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
sd_genes = merge(sd_genes, sd_FBN3, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
sd_genes = merge(sd_genes, sd_ELN, by = "Embryo_Stage", all = TRUE)
colnames(sd_genes) = c("Embryo_Stage", "FBN1", "FBN2", "FBN3", "ELN")
sd_genes = sd_genes[order(factor(sd_genes$Embryo, levels=unique(order_stages))),]
sd_genes

# Criando dfs com os mesmos dados (melhor para graficos)
mean_genes2 <- mean_genes %>%
  select(Embryo_Stage, FBN1, FBN2, FBN3, ELN) %>%
  gather(key = "gene", value = "mean_log2_TPM", -Embryo_Stage)

sd_genes2 <- sd_genes %>%
  select(Embryo_Stage, FBN1, FBN2, FBN3, ELN) %>%
  gather(key = "gene", value = "sd_log2_TPM", -Embryo_Stage)

# Criando um novo data.frame com todos os dados de média e df
genes_data = cbind(mean_genes2, sd_genes2$sd_log2_TPM)
names(genes_data)[names(genes_data) == "sd_genes2$sd_log2_TPM"] = "sd_log2_TPM" #
Renomeia as colunas
genes_data$Embryo_Stage = factor(genes_data$Embryo_Stage, levels=unique(order_stages)) # Ordena os estagios
genes_data[is.na(genes_data)] = 0 # Substitui todos os NA por 0

genes_data2 = genes_data[genes_data$gene != "FBN3",] # Cria um novo df sem FBN3

```

```
##### GRAFICOS #####

# TODOS OS GENES (só medias)
All_lines = ggplot(genes_data, aes(x = Embryo_Stage, y = mean_log2_TPM, color=gen
e, group=gene)) +
  geom_point(size = 2) + geom_line(size = 1) + labs(x = "Semanas pós-fecundaçã
o",
y = "log2(TPM+1)") + theme_light(base_size = 18) + theme(axis.title.x = element_t
ext(margin=margin(t = 5, r = 20, b = 0, l = 0), size = 18),

axis.title.y = element_text(size = 18), axis.text = element_text(size = 16)) + th
eme(legend.title = element_blank(), legend.text = element_text(size = 16, face =
"italic"))
All_lines

# TODOS OS GENES (só medias, sem FBN3)
All_lines2 = ggplot(genes_data2, aes(x = Embryo_Stage, y = mean_log2_TPM, color=g
ene, group=gene)) +
  geom_point(size = 2) + geom_line(size = 1) + labs(x = "Semanas pós-fecundaçã
o",
y = "log2(TPM+1)") + theme_light(base_size = 18) + theme(axis.title.x = element_t
ext(margin=margin(t = 5, r = 20, b = 0, l = 0), size = 18),

axis.title.y = element_text(size = 18),

axis.text = element_text(size = 16)) + theme(legend.title = element_blank(),

legend.text = element_text(size = 16, face = "italic"))
All_lines2

# Razao FBN1/FBN2
Ratio = data.frame(mean_genes$Embryo_Stage, mean_genes$FBN1/mean_genes$FBN2)
colnames(Ratio) = c("Embryo_Stage", "FBN1_FBN2_log2_TPM")
Ratio$Embryo_Stage = factor(Ratio$Embryo_Stage, levels=unique(order_stages))
Ratio

Ratio_line = ggplot(Ratio, aes(x = Embryo_Stage, y = FBN1_FBN2_log2_TPM, group=1)
) +
  geom_point(size = 2) +
  geom_line(size = 1) + labs(x = "Semanas pós-fecundaçã
o", y = "log2(TPM+1) FBN1/
log2(TPM+1) FBN2 ") + theme_light(base_size = 18) + theme(axis.title.x = element_
text(margin=margin(t = 5, r = 20, b = 0, l = 0), size = 18),

axis.title.y = element_text(size = 18), axis.text = element_text(size = 16), lege
nd.position="none")
Ratio_line

# SÓ FBN1
FBN1_boxplot = ggplot(FBN1, aes(y = FBN1, x = Embryo)) + geom_boxplot() + geom_ji
tter(width = 0, height = 0.2, shape=16)
FBN1_boxplot = FBN1_boxplot + stat_summary(fun.y = mean, geom = "errorbar",
aes(ymin = ..y.., ymax = ..y.., group =
factor(Embryo)),
width = 0.75, linetype = "dashed", col
or = "black",position=position_dodge())
FBN1_boxplot = FBN1_boxplot + labs(x = "Semanas pós-fecundaçã
o", y = "log2(TPM+1)
```

```

") + theme(axis.title.x = element_text(margin=margin(t = 15, r = 20, b = 0, l = 0
), size = 20),

axis.title.y = element_text(size = 20), axis.text = element_text(size = 16))
FBN1_boxplot = FBN1_boxplot + stat_summary(fun.y=mean, geom="line", aes(group=1),
color="red")
FBN1_boxplot + ggtitle("FBN1") + theme(plot.title = element_text(face = "italic",
size = 30, hjust = 0.5))

# SÓ FBN2
FBN2_boxplot = ggplot(FBN2, aes(y = FBN2, x = Embryo)) + geom_boxplot() + geom_ji
tter(width = 0, height = 0.2, shape=16)
FBN2_boxplot = FBN2_boxplot + stat_summary(fun.y = mean, geom = "errorbar",
aes(ymax = ..y.., ymiN=..y.., group =
factor(Embryo)),
width = 0.75, linetype = "dashed", col
or = "black", position=position_dodge())
FBN2_boxplot = FBN2_boxplot + labs(x = "Semanas pós-fecundação", y = "log2(TPM+1)
") + theme(axis.title.x = element_text(margin=margin(t = 15, r = 20, b = 0, l = 0
), size = 20),

axis.title.y = element_text(size = 20), axis.text = element_text(size = 16))
FBN2_boxplot = FBN2_boxplot + stat_summary(fun.y=mean, geom="line", aes(group=1),
color="red")
FBN2_boxplot + ggtitle("FBN2") + theme(plot.title = element_text(face = "italic",
size = 30, hjust = 0.5))

# SÓ ELN
ELN_boxplot = ggplot(ELN, aes(y = ELN, x = Embryo)) + geom_boxplot() + geom_jitte
r(width = 0, height = 0.2, shape=16)
ELN_boxplot = ELN_boxplot + stat_summary(fun.y = mean, geom = "errorbar",
aes(ymax = ..y.., ymiN=..y.., group = fa
ctor(Embryo)),
width = 0.75, linetype = "dashed", color
= "black", position=position_dodge())
ELN_boxplot = ELN_boxplot + labs(x = "Semanas pós-fecundação", y = "log2(TPM+1)")
+ theme(axis.title.x = element_text(margin=margin(t = 15, r = 20, b = 0, l = 0),
size = 20),

axis.title.y = element_text(size = 20), axis.text = element_text(size = 16))
ELN_boxplot = ELN_boxplot + stat_summary(fun.y=mean, geom="line", aes(group=1), c
olor="red")
ELN_boxplot + ggtitle("ELN") + theme(plot.title = element_text(face = "italic", s
ize = 30, hjust = 0.5))

```

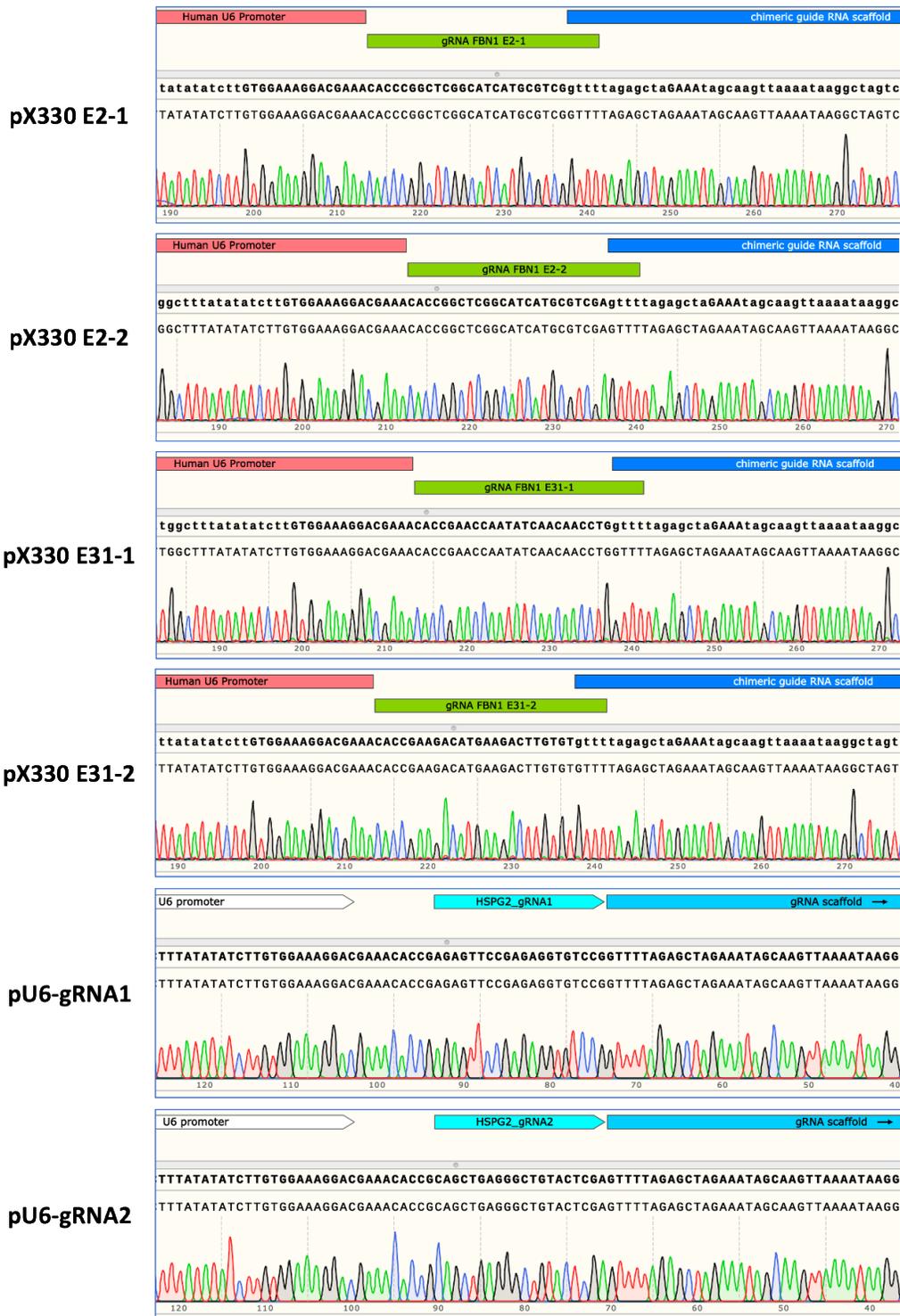
APÊNDICE G – Resultados das comparações estatísticas entre iCMs selvagens e portadores de alterações em *FBN1*

#	Tratamento	Gene	Grupo 1	Grupo 2	p-valor	Signif	Método
1	-	NPPA	NT	+ET-1	1.20E-07	****	Wilcoxon-pareado
2	NT	NPPA	WT	SMF	0.117	ns	Wilcoxon
3	+ET-1	NPPA	WT	SMF	0.061	ns	Wilcoxon
4	NT	NPPA	WT7	WT16	0.0022	**	Wilcoxon
5	NT	NPPA	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
6	NT	NPPA	WT7	SMF2	0.4009	ns	Wilcoxon
7	NT	NPPA	WT16	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
8	NT	NPPA	WT16	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
9	NT	NPPA	SMF1	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
10	+ET-1	NPPA	WT7	WT16	0.005	**	Wilcoxon
11	+ET-1	NPPA	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
12	+ET-1	NPPA	WT7	SMF2	0.0152	*	Wilcoxon
13	+ET-1	NPPA	WT16	SMF1	0.005	**	Wilcoxon
14	+ET-1	NPPA	WT16	SMF2	0.005	**	Wilcoxon
15	+ET-1	NPPA	SMF1	SMF2	0.0022	**	Wilcoxon
16	-	NPPB	NT	+ET-1	1.20E-07	****	Wilcoxon-pareado
17	NT	NPPB	WT	SMF	0.0016	**	Wilcoxon
18	+ET-1	NPPB	WT	SMF	3.60E-05	****	Wilcoxon
19	NT	NPPB	WT7	WT16	0.0022	**	Wilcoxon
20	NT	NPPB	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
21	NT	NPPB	WT7	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
22	NT	NPPB	WT16	SMF1	0.2403	ns	Wilcoxon
23	NT	NPPB	WT16	SMF2	0.1372	ns	Wilcoxon
24	NT	NPPB	SMF1	SMF2	0.3324	ns	Wilcoxon
25	+ET-1	NPPB	WT7	WT16	0.005	**	Wilcoxon
26	+ET-1	NPPB	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
27	+ET-1	NPPB	WT7	SMF2	0.0022	**	Wilcoxon
28	+ET-1	NPPB	WT16	SMF1	0.005	**	Wilcoxon
29	+ET-1	NPPB	WT16	SMF2	0.005	**	Wilcoxon
30	+ET-1	NPPB	SMF1	SMF2	0.132	ns	Wilcoxon
31	-	ACTA1	NT	+ET-1	1.20E-07	****	Wilcoxon-pareado
32	NT	ACTA1	WT	SMF	1.70E-05	****	Wilcoxon
33	+ET-1	ACTA1	WT	SMF	3.60E-05	****	Wilcoxon
34	NT	ACTA1	WT7	WT16	0.0022	**	Wilcoxon
35	NT	ACTA1	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
36	NT	ACTA1	WT7	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
37	NT	ACTA1	WT16	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon

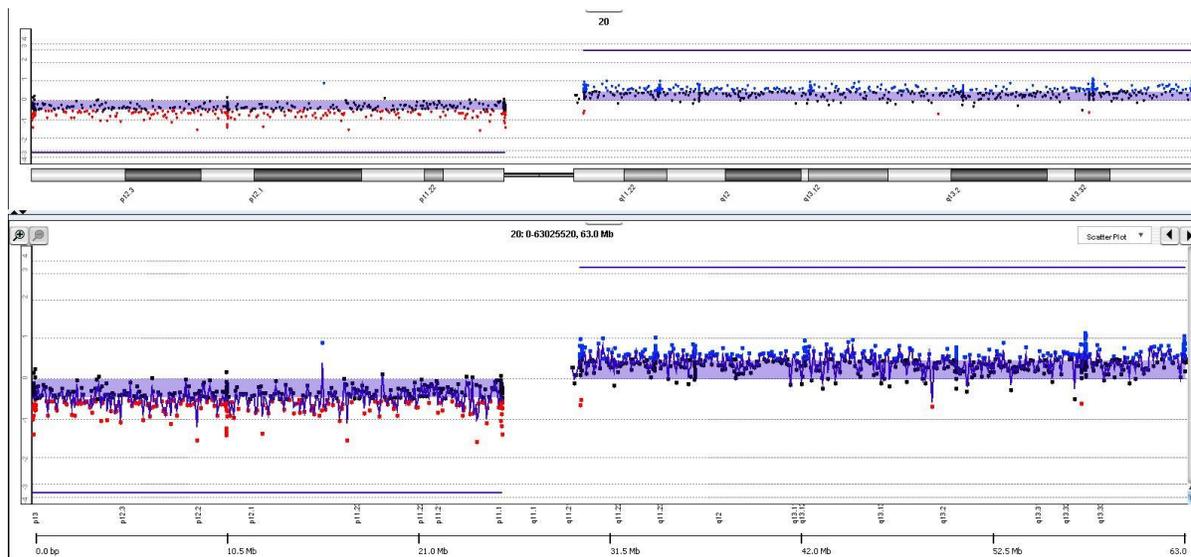
38	NT	ACTA1	WT16	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
39	NT	ACTA1	SMF1	SMF2	0.0024	**	Wilcoxon
40	+ET-1	ACTA1	WT7	WT16	0.5745	ns	Wilcoxon
41	+ET-1	ACTA1	WT7	SMF1	0.0022	**	Wilcoxon
42	+ET-1	ACTA1	WT7	SMF2	0.0022	**	Wilcoxon
43	+ET-1	ACTA1	WT16	SMF1	0.005	**	Wilcoxon
44	+ET-1	ACTA1	WT16	SMF2	0.005	**	Wilcoxon
45	+ET-1	ACTA1	SMF1	SMF2	0.0022	**	Wilcoxon
46	-	FBN1	NT	+ET-1	2.3E-10	****	Teste-t pareado
47	NT	FBN1	WT7	WT16	0.08081	ns	Teste-t
48	NT	FBN1	WT7	SMF1	0.15735	ns	Teste-t
49	NT	FBN1	WT7	SMF2	0.0000026	****	Teste-t
50	NT	FBN1	WT16	SMF1	0.89843	ns	Teste-t
51	NT	FBN1	WT16	SMF2	0.00038	***	Teste-t
52	NT	FBN1	SMF1	SMF2	0.00091	***	Teste-t
53	+ET-1	FBN1	WT7	WT16	0.15564	ns	Teste-t
54	+ET-1	FBN1	WT7	SMF1	0.02754	*	Teste-t
55	+ET-1	FBN1	WT7	SMF2	0.000059	****	Teste-t
56	+ET-1	FBN1	WT16	SMF1	0.38322	ns	Teste-t
57	+ET-1	FBN1	WT16	SMF2	0.000026	****	Teste-t
58	+ET-1	FBN1	SMF1	SMF2	0.0000043	****	Teste-t
59	-	NPPA	NT	+ET-1	0.00036	***	Teste-t
60	NT	NPPA	WT	HI	0.48687	ns	Teste-t
61	NT	NPPA	WT	DN	0.00513	**	Teste-t
62	NT	NPPA	WT	KO	0.30164	ns	Teste-t
63	NT	NPPA	WT	DN/DN	0.11614	ns	Teste-t
64	+ET-1	NPPA	WT	HI	0.17729	ns	Teste-t
65	+ET-1	NPPA	WT	DN	0.01798	*	Teste-t
66	+ET-1	NPPA	WT	KO	3.50E-05	****	Teste-t
67	+ET-1	NPPA	WT	DN/DN	0.00218	**	Teste-t
68	-	NPPB	NT	+ET-1	5.20E-08	****	Wilcoxon
69	NT	NPPB	WT	HI	0.413	ns	Wilcoxon
70	NT	NPPB	WT	DN	0.533	ns	Wilcoxon
71	NT	NPPB	WT	KO	0.8	ns	Wilcoxon
72	NT	NPPB	WT	DN/DN	0.533	ns	Wilcoxon
73	+ET-1	NPPB	WT	HI	0.063	ns	Wilcoxon
74	+ET-1	NPPB	WT	DN	0.8	ns	Wilcoxon
75	+ET-1	NPPB	WT	KO	0.133	ns	Wilcoxon
76	+ET-1	NPPB	WT	DN/DN	1	ns	Wilcoxon
77	-	ACTA1	NT	+ET-1	1.30E-08	ns	Wilcoxon
78	NT	ACTA1	WT	HI	0.063	ns	Wilcoxon
79	NT	ACTA1	WT	DN	0.267	ns	Wilcoxon
80	NT	ACTA1	WT	KO	0.533	ns	Wilcoxon

81	NT	ACTA1	WT	DN/DN	0.533	ns	Wilcoxon
82	+ET-1	ACTA1	WT	HI	0.73	ns	Wilcoxon
83	+ET-1	ACTA1	WT	DN	0.133	ns	Wilcoxon
84	+ET-1	ACTA1	WT	KO	1	ns	Wilcoxon
85	+ET-1	ACTA1	WT	DN/DN	0.267	ns	Wilcoxon
86	-	FBN1	NT	+ET-1	0.59	ns	Wilcoxon
87	NT	FBN1	WT	HI	0.111	ns	Wilcoxon
88	NT	FBN1	WT	DN	1	ns	Wilcoxon
89	NT	FBN1	WT	KO	0.267	ns	Wilcoxon
90	NT	FBN1	WT	DN/DN	0.133	ns	Wilcoxon
91	+ET-1	FBN1	WT	HI	0.063	ns	Wilcoxon
92	+ET-1	FBN1	WT	DN	0.8	ns	Wilcoxon
93	+ET-1	FBN1	WT	KO	0.267	ns	Wilcoxon
94	+ET-1	FBN1	WT	DN/DN	0.133	ns	Wilcoxon

APÊNDICE H – Sequenciamento dos vetores pX330 mod. e pU6-gRNA recombinaados com os respectivos gRNAs para edição de *FBN1* ou *HSPG2*

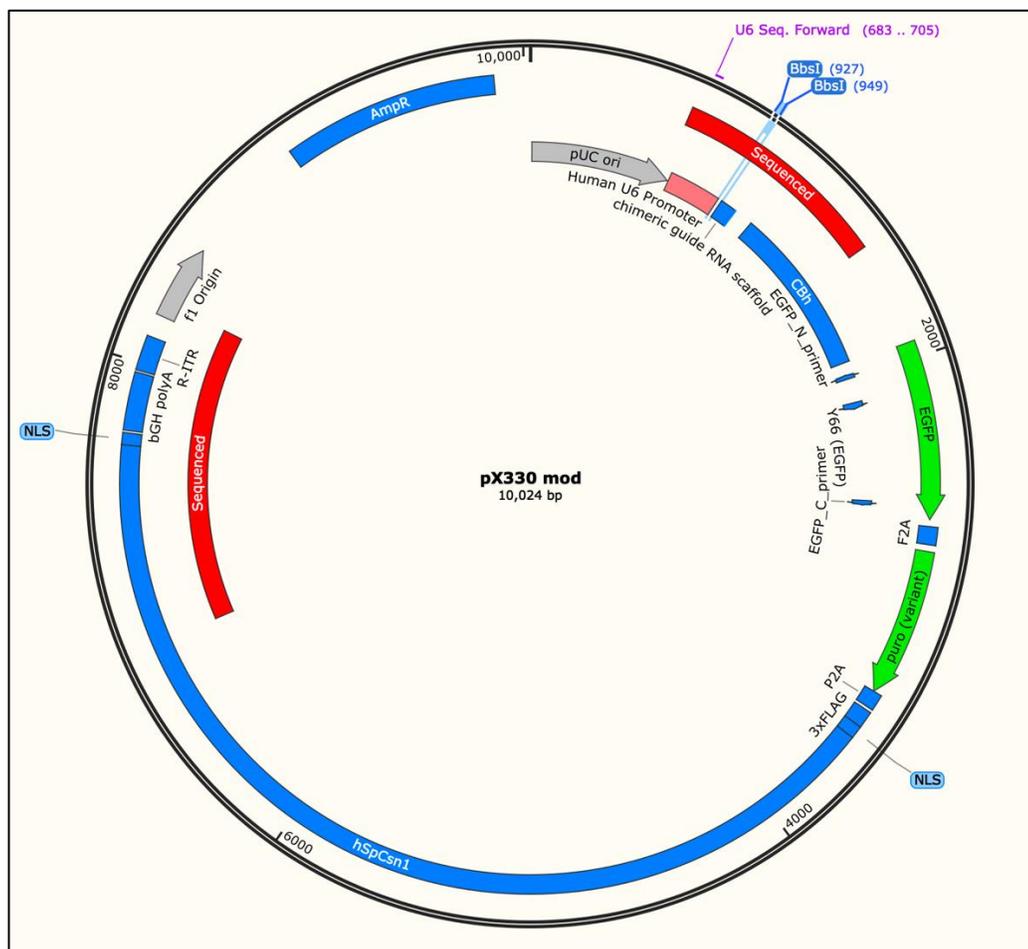


APÊNDICE I – Resultado da análise de CHG-array do clone DN3

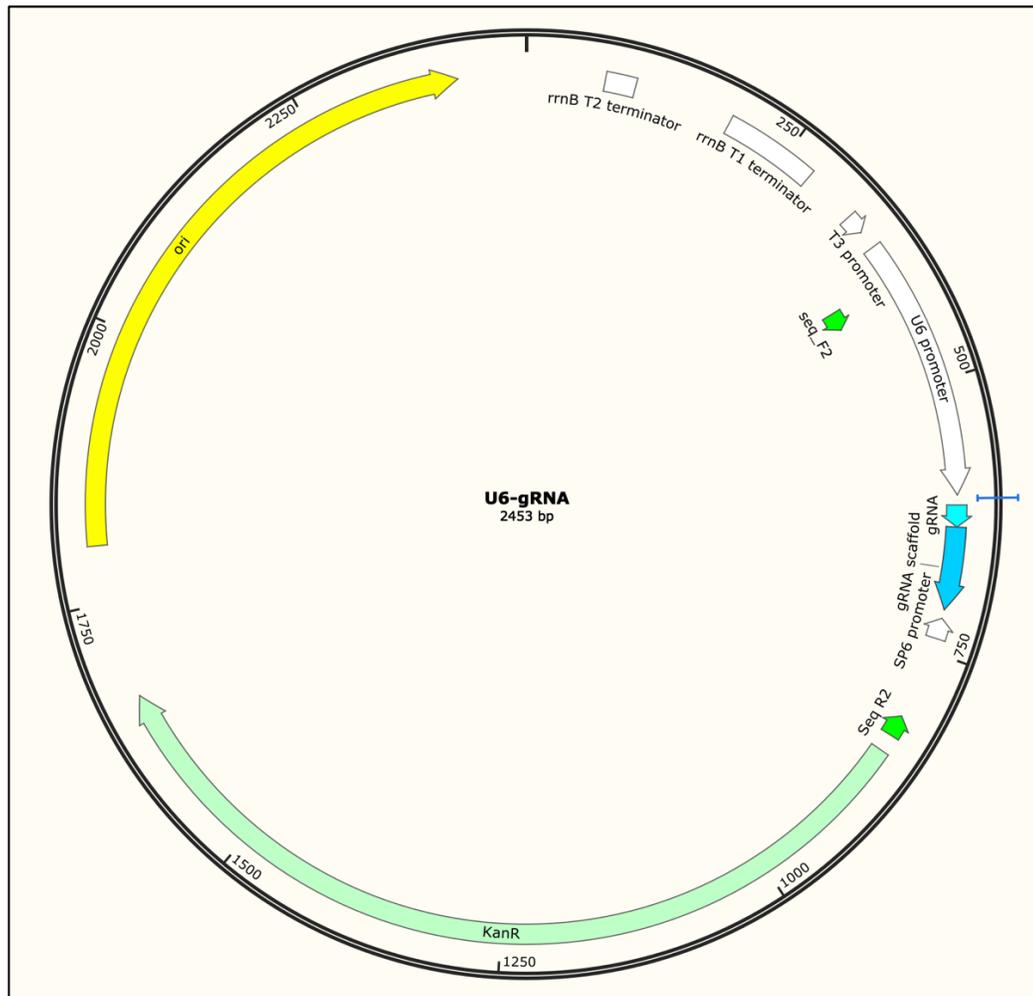


8. ANEXOS

ANEXO A – Mapa do plasmídeo pX330 mod (ETOC et al., 2016)



ANEXO B – Mapa do vetor pU6 (MOSQUEIRA et al., 2018)



ANEXO C – Mapa do vetor Cas9_D10 (#41816 – Addgene)

