Fanny Wulkan

Análise genética de pacientes portadores de cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD) e caracterização funcional em cardiomiócitos diferenciados (hiPSC-CM)

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wulkan, Fanny
Análise genética de pacientes portadores de cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD) e caracterização funcional em cardiomiócitos diferenciados (hiPSC-CM) / Fanny Wulkan -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Cardiomiopatias 2.Displasia arritmogênica ventricular direita 3.Mutação 4.Genética médica 5.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 6.Células-tronco pluripotentes induzidas 7.Reprogramação celular 8.Miócitos cardíacos

USP/FM/DBD-122/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Dany e Florence, ao meu irmão, Ariel, ao meu noivo, Roberto, e à toda minha família. São vocês que dão sentido a tudo.

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, cientificamente ou não, colaboraram para a minha formação. A todos aqueles que passaram pela minha trajetória dos últimos 7 anos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e deixaram a sua marca ou contribuição.

Ao meu orientador, Alexandre Pereira, Ale, pelo generoso acolhimento e oportunidade. Pela confiança depositada em mim desde o início para conduzir este trabalho com autonomia, sempre disponível para orientar e ajudar. Por sempre trazer questionamento, discussões e ideias tanto relevantes como inspiradoras. Por, através do seu exemplo pessoal, nos ensinar a ser um grande profissional e ser humano.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por me receber no LGCM, pela confiança depositada, pelo apoio e estrutura necessários para a realização deste trabalho.

Ao Dr Michael Laflamme, Mike, por ter aberto as portas de seu laboratório e me acolhido tão generosamente para eu tivesse a enriquecedora experiência no Canadá. Obrigada por todo o suporte na realização deste trabalho, pela orientação, pelos conselhos e ensinamentos. Por inspirar tanta gente, inclusive a mim, com as suas contribuições tão relevantes para a ciência.

Ao Theo, pela amizade, dia-a-dia e grande parceria. Por me puxar para o mundo do NGS, me treinar e me ensinar tanto. Obrigada pela paciência e pela disponibilidade em ajudar sempre. Me inspiro na sua dedicação e comprometimento com a ciência e com os outros. Sem você esse trabalho não teria nem começado!

À Clara, pela grande amizade e tutoria. Pelas conversas e trocas de conhecimento. Por me ensinar a cuidar das células como ninguém. Mas acima de tudo, por ser uma grande e competente profissional. Que me inspira e a todos que tiveram a chance de trabalhar com você. Obrigada por me apresentar um mundo novo, o da cultura de células, e por ter me adotado como sua *mignon*!

À toda equipe do ambulatório de Arritmias do Incor, médicos e colaboradores. Agradeço imensamente à Dra. Natália, pela amizade, parceria, ensinamentos e incansável ajuda. Por sempre se disponibilizar a discutir e agregar. Por ser uma

profissional tão dedicada e comprometida, que contribuiu muito para a realização deste trabalho. É um grande prazer trabalhar com você! À Dra. Luciana por todo o incentivo, ajuda e discussões tão relevantes e interessantes. Ao Dr. Darrieux pelos ensinamentos e acima de tudo, pela oportunidade de trabalhar com nossa casuística de pacientes com CAVD, graças ao seu grandioso empenho em começar a rastrear estes pacientes no Ambulatório de Arritmias. À Gabrielle por sua disponibilidade em ajudar, pelas muitas coletas de sangue realizadas e organização dos pacientes.

A todos os amigos e colegas que já passaram ou ainda são do “grupo das iPSC”, que me ajudaram tanto em diversos momentos. Pelas relevantes discussões, momentos divertidos e trocas de meio. Um agradecimento especial à Thay e ao Thiago pela amizade, almoços, conversas e por fazerem meu dia-a-dia mais feliz. À Graça, Elida, Agatha, Rafa, Juan, Aline, Vini, Santiago por todo o suporte e amizade.

A todos os amigos e colegas do grupo de Genética, os presentes até hoje e os que já saíram. Pela companhia diária, conversas, e apoio científico. À Mariana e Aline por toda a ajuda. Ao Mau, Isa, Marina, Pãmella, Julia Marsiglia, Renatinha, Paulo Roberto, Juliana e Manu por terem feito o meu dia-a-dia no laboratório mais alegre. Ao pessoal do Hipercol e da Fisiologia pelo suporte.

Ao Diogo Biagi pela parceria e colaboração na realização deste trabalho. Pelas discussões, conselhos e suporte.

Aos amigos e colaboradores do Laflamme lab, Rocco, Wahiba, Tamilla, Joe, Beiping, Naaz, Cristoph, Andrew, Juliana, Matt, Winlei, Amine, Shunsuke, por terem me recebido tão bem, pelos ensinamentos, pelo suporte e pela amizade, que levarei sempre comigo. Minha experiência em Toronto não teria sido tão valiosa se não fosse pelo acolhimento de vocês e o dia-a-dia tão agradável. Um agradecimento especial à Wahiba, Tamilla, Rocco e Joe que me ajudaram de diversas formas na realização deste trabalho.

A todos os colegas, PI’s, colaboradores e funcionários do LGCM que de alguma forma também contribuíram para que este trabalho fosse possível. Agradeço especialmemte à Renata Carmona, Maúde, Marcelly, Silvana, Priscila, Ana Maria, Lúcia, Brendo, Sileide, Andrea, Jean, pelos mais diversos apoios e por fazerem com que tudo sempre siga funcionando bem no laboratório.

A todos os colegas do LGCM, lab geral, meninas da Proteômica, Bioinfo, pela amizade e dia-a-dia. Um agradecimento especial a Gabi Venturini e ao Renato Crajoinas pela amizade e disponibilidade em ajudar em todos os meus questionamentos não necessariamente científicos, mas também burocráticos. Ao Thiago Pires pela ajuda com minhas dúvidas estatísticas e à Mariliza pelo suporte técnico.

Aos meus pais, Dany e Florence, por cada gesto de amor. Por terem me dado a chance de realizar esta etapa do meu desenvolvimento com todo o incentivo e suporte. Por sempre me apoiarem em todos os momentos de questionamentos, medos, inseguranças e conquistas ao longo deste trabalho e da vida. Por estarem ao meu lado sempre, de longe ou de perto. Ao meu pai, por ter contribuído de forma tão presente nas correções deste trabalho e pelo constante incentivo. À minha mãe, pela preocupação e torcida para que tudo desse sempre certo nos experimentos. Agradeço também ao meu irmão, Ariel, pelo incentivo, carinho e palavras de apoio quando precisei. Por me alegrar, me divertir tanto e por ser meu grande companheiro para a vida toda.

À toda minha família, meus avós, tios, primos e sogros pelo incentivo e torcida. À minha avó Sara, que sempre me pergunta sobre como estão os “bichinhos” (células) e ao meu avô Ignácio. A Mami Helène e Papi Claude, que de longe ou de perto, sempre me perguntam de forma tão interessada sobre o trabalho.

Ao meu grande amor, Roberto, por ser também meu grande incentivador. Pelo apoio diário, por ser meu grande amigo, confidente e parceiro da vida. Por acreditar tanto em mim e no meu desenvolvimento. E por ser meu companheiro tanto nas minhas, como nas nossas escolhas. Agradeço também pela grande contribuição na correção deste trabalho. Não tenho palavras para o que você significa na minha vida.

A todos os meus amigos, pelo apoio e compreensão em momentos de ausência. Tenho muita sorte em ter pessoas tão especiais ao meu redor, que tornam a minha vida muito melhor.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, processo nº 2016/23858-9 (Bolsa de Doutorado Direto) e processo nº 2017/16399-0 (BEPE).

Epígrafe

"O importante é não parar de questionar.

A curiosidade tem sua própria razão de existir."

Albert Einstein

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Sumário

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito CAVD) 2

1.2 Aspectos genéticos 4

1.3 Importância da realização e interpretação do diagnóstico molecular 6

1.4 Testes funcionais para a caracterização genótipo-fenótipo com hiPSCs 9

1.4.1 Células-tronco pluripotentes induzidas 9

1.4.2 Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos 13

1.4.3 Maturação dos hiPSC-CMs 15

1.4.4 Uso dos cardiomiócitos derivados de hiPSCs para modelagem da CAVD 16

2 OBJETIVOS 21

2.1 Objetivo geral 21

2.2 Objetivos específicos 21

3 MÉTODOS 23

3.1 Aspectos éticos 23

3.2 Casuística 23

3.2.1 Probandos 23

3.3 Análise genética de pacientes portadores de Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito (CAVD) 26

3.3.1 Coleta de sangue e extração do DNA e RNA para sequenciamento 26

3.3.2 Desenho do Painel Genético 27

3.3.3 Processo de enriquecimento, construção da biblioteca e sequenciamento de *high-throughput* 28

3.3.4 Preparo de amostras e sequenciamento 29

3.3.5 Análise bioinformática e chamada de variantes 30

3.3.6 Análise de variantes 31

3.3.7 Confirmação pela plataforma *Sanger* de sequenciamento 36

3.3.8 Dados clínicos 36

3.3.9 Análise estatística da relação genótipo x fenótipo 37

3.4 Caracterização funcional em cardiomiócitos diferenciados (hiPSC-CM) 37

3.4.1 Isolamento e cultivo de células progenitoras de urina (*Urine Progenitor Cells*) 37

3.4.2 Biópsia de pele para obtenção e cultivo dos fibroblastos 38

3.4.3 Reprogramação das UPCs e fibroblastos em hiPSCs usando estratégia de reprogramação não integrativa 39

3.4.4 Manutenção e expansão das hiPSCs 40

3.4.5 Caracterização das hiPSCs 41

3.4.6 Diferenciação dos clones de hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs) 42

3.4.7 Citometria de fluxo 43

3.4.8 Imunofluorescência 45

3.4.9 Ensaios funcionais e de caracterização para modelagem da CAVD 46

3.4.10 Análise estatística da caracterização funcional com CM diferenciados 59

4 RESULTADOS 62

4.1 Características clínicas da casuística analisada 62

4.1.1 Cobertura média dos genes relacionados à CAVD 64

4.2 Alterações encontradas 65

4.3 Associação Genótipo- Fenótipo 73

4.4 Isolamento de UPCs 77

4.5 Extração de fibroblastos 78

4.6 Reprogramação das UPCs e fibroblastos em hiPSCs 78

4.7 Caracterização dos clones de hiPSCs 80

4.7.1 Morfologia 80

4.7.2 Marcadores moleculares 81

4.7.3 Marcadores proteicos 81

4.7.4 Integridade cromossômica e presença das alterações genéticas 84

4.8 Diferenciação dos clones de hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs) 85

4.8.1 Padronização do protocolo de diferenciação 85

4.8.2 Caracterização dos cardiomiócitos 87

4.9 Ensaios fenotípicos e funcionais – modelagem celular da CAVD 89

4.9.1 Expressão das proteínas desmossomais 90

4.9.2 Análise ultra-estrutural 91

4.9.3 Expressão do gene marcador pró-adipogênico (*PPAR-γ*) 93

4.9.4 Análise do perfil de gotas lipídicas das células 94

4.9.5 Duração do potencial de campo celular 95

4.9.6 Propagação e velocidade de condução do impulso elétrico nos microtecidos cardíacos (*Heart-on-a-chip*) 97

4.9.7 Força de contração dos microtecidos 99

5 DISCUSSÃO 102

5.1 Análise do perfil genético da casuística CAVD 102

5.2 Geração de hiPSCs e hiPSC-CMs para a o modelo celular da CAVD 107

5.3 Modelagem e estudo funcional da CAVD com hiPSC-CMs 110

5.3.1 Eletrofisiologia do modelo 112

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS 118

7. ANEXOS 122

8. REFERÊNCIAS 147

Listas

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura esquemática desmossomal - As caderinas desmossomais, desmogleína (DSG2) e desmocolina (DSC2) compreendem o componente transmembranar do complexo desmossomal 5

Figura 2: Esquema do processo de geração de células diferenciadas a partir da geração de células-tronco pluripotentes induzidas 10

Figura 3: Eletrocardiogramas de 12 derivações dos dois probandos selecionados para o estudo funcional com cardiomiócitos diferenciados. 25

Figura 4: Algoritmo de filtragem das alterações encontradas nos resultados de sequenciamento que foram posteriormente consideradas para a classificação de acordo com ACMG (NGS) 33

Figura 5: Esquema da cronologia de isolamento das células somáticas (UPCs e fibroblastos) e reprogramação em hiPSC. 40

Figura 6: Chip do sistema MED64, contendo os 64 eletrodos de platina ou nanotubos de carbono (50 μm), isolados de 150μm entre eles com poliamida. 50

Figura 7: Cardiomiócitos em monocamada plaqueados sob os eletrodos do chip de MEA 50

Figura 8: Definição da amplitude mínima (entre os cursores iniciais) e máxima (entre os cursores finais) utilizado para o cálculo da duração do potencial de campo 51

Figura 9 : Dispositivos feitos de poli-metil-metacrilato (PMMA) como base e hastes feitas de polidimetilsiloxano (PDMS) 52

Figura 10: Microtecido do clone controle-CM ligado na parte inferior às hastes de PDMS, após serem deslocados com uma agulha para garantir que estivessem centralizados. 55

Figura 11: Esquema do sistema de de mapeamento ótico 58

Figura 12: Boxplot da distribuição das porcentagens de cobertura média acima de 10x dos genes associados a CAVD. 64

Figura 13: Células presentes em colônia de UPCs do paciente CAVD 5 no dia 6 depois do isolamento 77

Figura 14: Fibroblastos do paciente CAVD 2 no dia 18 depois da extração. 78

Figura 15: Primeiros clusters de potenciais clones de hiPSCs (paciente CAVD 5) aparentes após 21 dias de cultivo. 79
Figura 16: Clones de hiPSCs amplificados apresentando morfologia tipica de hiPSCs 80
Figura 17: Gel de agarose (1%) da RT-PCR realizada a partir do RNA das células para a verificação da presença dos genes marcadores de pluripotência. 81
Figura 18: Colônias de hiPSCs do clone 5.5 com expressão das proteínas relacionadas a pluripotência nucleares (OCT 3/4, NANOG e SOX2) e de membrana (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81). DAPI (em azul) marca os núcleos celulares 82
Figura 19: Análise de citometria de fluxo do clone 5.5 (P30) sobre a porcentagem de células que exprimem os marcadores específicos 83
Figura 20: Cariótipo normal 46,XY do clone de hiPSC 5.5. 84
Figura 21: Esquema da placa de 24 poços com a estratégia de combinações das concentrações de BMP4 e Activina A utilizada para otimização do protocolo para cada clone de nosso estudo. 86
Figura 22: Linha do tempo sobre o processo da diferenciação dos clones até o momento em que as células foram dissociadas (no dia 20) para experimentos posteriores e/ou criopreservação. 87
Figura 23: Corpos embrióides de cardiomiócitos no dia 15 da diferenciação (clone 5.5) 88
Figura 24: Imagem de microscopia confocal do ensaio de imunofluorescência dos cardiomiócitos do clone 2.5 CAVD-CM no dia 30 da diferenciação, com marcação da proteína específica de cardiomiócitos (α-actinina). DAPI (em azul) marca os núcleos celulares 89
Figura 25: Expressão dos genes desmossomais PKP2 e DSC2 90
Figura 26: Caracterização ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão dos cardiomiócitos derivados de hiPSC 92
Figura 27: Avaliação quantitativa morfométrica da largura desmossomal 93
Figura 28: Comparação da expressão do marcador pró adipogênico PPAR-γ 94
Figura 29: Quantificação da expressão média do marcador Nile Red para análise do perfil de gotas lipídicas 95
Figura 30: Análise randomizada da distribuição de FPD dos clones ao longo dos eletrodos do chip do MEA 96

Figura 31: Comparação da duração média de potencial de ação (FPD) entre os clones CAVD e controle...97

Figura 32: Gráficos comparativos da média APD_{90} e velocidade média de condução do impulso elétrico entre os clones CAVD-CM e controle-CM. 98

Figura 33: Potenciais de ação....98

Figura 34: Processamento dos sinais ópticos representados em mapas de propagação do impulso elétrico (a esquerda) e potenciais de ação ópticos (á direita)....99

Figura 35: Gráfico representando a força de contração ativa média para cada clone, nos dias 2, 5 e 10 após o plaqueamento das células no dispositivo....100

Lista de Tabelas

Tabela 1: Genes associados a CAVD (ordem alfabética). Abreviações: Autossômica Dominante (AD), Autossômica Recessiva (AR) 5

Tabela 2: Critérios para classificação de variantes patogênicas, segundo ACMG. 34

Tabela 3: Somatória dos critérios para a classificação de variantes, segundo o ACMG. 35

Tabela 4: Lista de anticorpos utilizados para imunofluorescência. 46

Tabela 5: Primers usados para os experimentos de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). 48

Tabela 6: Características clínicas da população analisada. 63

Tabela 7: Porcentagens médias de cobertura acima de 10x, para os genes de CAVD, para todas as amostras. 64

Tabela 8: Variantes consideradas patogênicas (1) ou provavelmente patogênicas (2) de acordo com a classificação ACMG. 66

Tabela 9: Variantes consideradas Variantes de significado incerto (VSI) para CAVD de acordo com a classificação ACMG. 67

Tabela 10: Variantes consideradas Genes de significado incerto (GSI) para CAVD de acordo com a classificação ACMG. 68

Tabela 11: Variantes encontradas e informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG. 69

Tabela 12: Características clínicas dos casos-índice de CAVD relacionados á presença ou ausência de variantes causais (Patogênicas ou Provavelmente Patogênicas). 75

Tabela 13: Características clínicas dos pacientes dos casos-índice de CAVD relacionadas ao gene desmossomal causal (PKP2 ou outros genes desmossomais) (Patogênicas ou Provavelmente Patogênicas). 72

Lista de Abreviações

ABraOM- *Online Archive of Brazilian Mutations*

ACMG - *American College of Medical Genetics and Genomics*

APD_{90} – do inglês, action potential duration at 90% of repolarization

APDo – do inglês, optical action potential duration

ARVC – do inglês, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy

BAM – do inglês, Binary Alignment Map

BMP4 -gene, do inglês bone morphogenetic protein

BSA - do inglês, bovine serum albumin

CaCl2- Cloreto de Cálcio

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CAVD-Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito

CAVD-CMs – cardiomiócitos diferenciados dos pacientes com cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito

CDI – Cardiodesfibrilador implantável

c-Myc- gene, do inglês c-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CNV - do inglês, copy number variation

CO2 - dióxido de carbono

CRISPR- do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

cTnT- do inglês, cardiac troponin T

D20F2A - Meio DMEM suplementado com 20% de SFB e 2% de antibióticos

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

dbSNP – *Single Nucleotide Polymorphisms database*

DEPC - dietil pirocarbonato

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMSO

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNase - desoxirribonuclease

E6 - Meio de cultura *Essencial 6*

E8 - Meio de cultura *Essencial 8*

EBs- do inglês, embryoid bodies

EDTA - do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ESCs - do inglês, embryonic stem cells

EVS – *Exome Variant Server*

FAV - Frequência do alelo variante

FBS - do inglês, fetal bovine serum

FGF2 - gene, do inglês *Fibroblast growth factor 2*

FM-USP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FPD - do inglês, field potential duration

GAPDH - gene, do inglês, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

gnomAD-Genome Aggregation Database

GSI - gene de significado incerto

GSK3 - do inglês, Glycogen Synthase Kinase 3

HCFMUSP - Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HCl -ácido clorídrico

hiPSCs- do inglês, human induced pluripotent stem-cells

ICC-insuficiência cardíaca

InDels - inserções e deleções

hiPSC-CMs- do inglês, cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem-cells

KCl - cloreto de potássio

KH2PO4 -dihidrogenofosfato de potássio

KY - Composto químico KY21111

LGCM - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

MAF – *Minor Allele Frequency*

MEA - do inglês, multi electrode array

MEF2C - gene, do inglês, myocyte Enhancer Factor 2C

MgSO4 -sulfato de magnésio

MLC2V - gene, do inglês Myosin light chain 2v

MSC - morte súbita cardíaca

MTG - monotioglicerol

NaHCO3 -hidrogenocarbonato de sódio

NANOG- fator de transcrição presente em células tronco pluriotentes

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NGS – *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de nova geração)

NKX2.5 - gene, do inglês *NK2 homeobox 5*

NTC-do inglês, No Template Control

OCT4 - gene, do inglês *Octamer-binding transcription factor 4*

OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - do inglês, *polymerase chain reaction*

PdgfR-a - do inglês, platelet-derived growth factor receptor α

PDMS -Polidimetilsiloxano

PEI - Polietilenoimina

PFA - paraformaldeído

PMMA - poli-metil-metacrilato

PPAR-γ-do inglês, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PROVEAN -Protein variation effect analyzer

qRT-PCR - reação da cadeia de polymerase em tempo real

qRT-PCR-do inglês, quantitative real-time polymerase chain reaction

RB- - Meio RPMI suplementado com B27 sem insulina

RB+ - Meio RPMI suplementado com B27

RecPC – recuperação de parada cardíaca

RecPC-parada cardíaca recuperada

REGM -meio de cultura, Renal Epithelial Growth

RI - molécula, do inglês, Rock Inhibitor

RNM-ressonância magnética

ROI - do inglês, Region of Interest

RPM - rotações por minuto

RPMI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SOX2 - gene, do inglês *Sex determining region Y- box 2*

SSEA4 - gene, do inglês *Stage-specific embryonic antigen-4*

TNNi3 -gene, do inglês Troponin I type 3

TNNT2 -gene, do inglês cardiac troponin T2

TRA-1-60 - epítopo presente em células-tronco pluripotentes

TRA-1-81 - epítopo presente em células-tronco pluripotentes

TV – Taquicardia Ventricular

TVS - taquicardia ventricular sustentada

UPC -do inglês, urine progenitor cell

VD – Ventrículo direito

VE- Ventrículo esquerdo

VSI - Variante de significado incerto

WNT - do inglês, *wingless-type MMTV integration site*

Resumo

Wulkan F. *Análise genética de pacientes portadores de Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito (CAVD) e caracterização funcional em cardiomiócitos diferenciados (iPSC-CMs)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD) tem origem genética e é caracterizada pela substituição de células miocárdicas por tecido fibroadiposo. A doença tem uma prevalência aproximada de 1:3500, sendo mais frequentemente diagnosticada em indivíduos jovens, atletas e do sexo masculino. Atualmente, várias alterações genéticas associadas a CAVD foram descritas em 12 genes diferentes. No entanto, existem poucos estudos na literatura que descrevem o espectro mutacional da doença usando um painel abrangente de genes potencialmente causais, em populações diferentes das coortes descendentes de europeus. O sequenciamento de nova geração (*NGS*) como ferramenta para o diagnóstico molecular da doença, permite um avanço na correlação entre alterações genotípicas e fenotípicas e tem aportado potenciais benefícios que crescem juntamente com os desafios na sua interpretação. Além disso, o uso de hiPSCs como modelo *in vitro* de determinadas doenças cardíacas, permite avaliar especificamente a relação do genótipo com as diferentes consequências fenotípicas celulares da CAVD. Entretanto, os mecanismos moleculares da doença ainda são pouco esclarecidos e não há na literatura estudos que englobem ao mesmo tempo o perfil mutacional (com um painel extenso de genes) e estudo funcional das alterações encontradas com o uso de hiPSC-CMs. Esta tese teve como objetivo descrever a prevalência de variantes causais em genes associados à CAVD na população brasileira, e caracterizar, do ponto de vista funcional, os cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CMs) de pacientes com mutações identificadas, a fim de associar o perfil mutacional e a expressão fenotípica celular. Quarenta e sete indivíduos, não aparentados, sendo 38 (80,85%) pacientes do sexo masculino, idade média 40,2 ± 15,56 anos, com diagnóstico clínico de CAVD, foram submetidos ao sequenciamento de um painel genético relacionado à cardiomiopatias hereditárias, compreendendo os 12 genes previamente descritos como causadores de CAVD, utilizando sequenciamento de nova geração (NGS). As variantes foram interpretadas e classificadas de acordo com os critérios da ACMG. Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas foram encontradas em dezoito probandos (38,3%), com maior número de ocorrências no gene *PKP2* (38,8%). Entre os 18 casos positivos, treze variantes diferentes foram encontradas, quatro delas novas variantes em genes desmossomais, sem descrição prévia na literatura. Variantes de significado incerto (VSI) foram encontradas em 16 pacientes. A presença de uma variante causal ocorreu em todos os probandos assintomáticos e foi significativamente associada a probandos com histórico familiar de morte súbita cardíaca abaixo de 35 anos. Para a modelagem celular da CAVD, foram geradas hiPSCs de dois pacientes a partir de células

progenitoras de urina (UPCs) e fibroblastos, por transfecção episomal. O primeiro paciente possuía alteração missense no gene *PKP2* e o segundo, uma inserção no gene *DSC2*. As hiPSCs foram caracterizadas quanto ao seu potencial de pluripotência e posteriormente diferenciadas em cardiomiócitos (hiPSC-CMs). Nossos resultados demonstraram diferenças fenotípicas significativas entre os CAVD-CMs comparados com os controle-CMs, como: reduções significativas de expressão das proteínas desmossomais e desmossomos estruturalmente alterados; presença de marcadores do acúmulo de gotículas lipídicas e regulação aumentada do fator de transcrição proadipogênico PPAR-γ; aumento de duração do potencial de campo (FPD) e do potencial de ação em 90% de repolarização (APD_{90}); velocidade de condução mais lenta e uma força de contração menor. Em conclusão, este é o primeiro trabalho a caracterizar o perfil genético da CAVD, abrangendo todos os genes descritos até o momento relacionados à doença, na população brasileira. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que, pacientes com história familiar de MSC (<35 anos) têm maior probabilidade de portar uma variante causal. Além disso, nossos achados sugerem que pacientes com alteração causal no gene *PKP2* têm uma maior gravidade da apresentação fenotípica de arritmia. Nosso modelo celular, que contemplou células paciente-específicas com diferentes alterações das estudadas até o presente momento,sugere ser possível o estudo do efeito das alterações genéticas na CAVD e pode ser um acréscimo às ferramentas disponíveis para estudar o mecanismo desta doença complexa.

Descritores: Cardiomiopatias; Displasia arritmogênica ventricular direita; Mutação; Genética médica; Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; Células-tronco pluripotentes induzidas; Reprogramação celular; Miócitos cardíacos.

Abstract

Wulkan F. *Genetic analysis of patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and functional characterization of patient-specific cardiomyocytes derived from hiPSCs (hiPSC-CM* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) has a genetic origin and is mainly characterized by the replacement of myocardial cells with fibroadipose tissue. The disease has a prevalence of approximately 1: 3.500, being more frequently diagnosed in young individuals, athletes and males. Currently, several mutations associated with ARVC have been described in 12 different genes. However, there are few studies in the literature that describe the mutational spectrum of the disease using a comprehensive panel of potentially causal genes in populations other than European-descent cohorts. Next Generation Sequencing (NGS) as a tool for molecular diagnosis of the disease allows an advance in the correlation between genotypic and clinical phenotypic aspects and has potential benefits that grow along with the challenges in its interpretation. In addition, the use of hiPSCs as an in vitro model of certain heart diseases, allows to specifically evaluate the relationship of the genotype with the different cellular phenotypic consequences of ARVC. However, the molecular mechanisms of the disease are still poorly understood and there are no studies in the literature that include both the mutational profile (with an extensive panel of genes) and functional study of different causal variants, with the use of hiPSC-CMs. The aim of this thesis was to describe the prevalence of causal variants in ARVC-associated genes in the Brazilian population, and to characterize, from a functional point of view, cardiomyocytes derived from hiPSC (hiPSC-CMs) from patients with identified mutations, in order to associate the mutational profile and cellular phenotypic expression. Forty-seven unrelated probands, 38 (80.85%) male, mean age 40.2 ± 15.56 years, with clinical diagnosis of ARVC, were submitted to a cardiomyopathy-related gene panel sequencing, comprising 12 genes, using next-generation sequencing (NGS). Variants were interpreted and classified according to the ACMG criteria. Pathogenic or Likely Pathogenic variants were found in eighteen probands (38.3%), with the largest number of occurrences in the *PKP2* gene (38.8%). Among the 18 positive cases, thirteen different variants were found, four of them novel mutations in desmosomal genes, without previous description in the literature. Variants of uncertain significance (VUS) were found in 16 patients. The presence of a causal variant was present in all asymptomatic probands and was significantly associated with probands who have a family history of sudden cardiac death under 35 years. For the cellular modeling, from urinary progenitor cells (UPCs) and fibroblasts, hiPSCs from two patients were generated by episomal transfection. The first patient had a missense variant in the *PKP2* gene, while the second had an insertion in the *DSC2* gene. The hiPSCs were characterized for its pluripotency potential and

subsequently differentiated into cardiomyocytes (hiPSC-CMs). Our results demonstrated significant phenotypic differences between the ARVC-CMs compared to the control-CMs, such as: significant reductions in the expression of desmosomal proteins and structurally altered desmosomes; presence of lipid droplet accumulation markers and increased regulation of the proadipogenic transcription factor PPAR-γ; prolonged field potential duration (FPD) and action potential in 90% repolarization (APD90); slower conduction velocity and a lower active contraction force. In conclusion, this is the first work to characterize the genetic profile of ARVC, covering all genes described to date related to the disease, in the Brazilian population. The data obtained in this study suggests that patients with a family history of sudden cardiac death (<35 years) are more likely to carry a causal variant. In addition, our findings suggest that patients with causal variant in the *PKP2* gene have a greater severity of the phenotypic presentation of arrhythmia. Our cellular model, which contemplated patient-specific cells with different causal variants of the previous studies, suggests that it is possible to study the effect of the genetic changes in ARVC, and may be an addition to the tools available to study the mechanism of this complex disease.

Descriptors: Cardiomyopathies, Arrhythmogenic right ventricular dysplasia; Mutation; Genetics, medical; High-throughput nucleotide sequencing; Induced pluripotent stem cells; Cellular reprogramming; Myocytes, cardiac.

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito CAVD)

A cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD), antigamente chamada também de displasia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD), foi inicialmente descrita em 1977 por Fontaine G et al. Em seguida, em 1982, Marcus F. I. et al complementaram a prévia descrição com as características clínicas da CAVD [1, 2].

Sabe-se atualmente que a CAVD tem origem genética e é caracterizada por alterações no músculo ventricular cardíaco, mais especificamente pela substituição das células miocárdicas por tecido fibroadiposo, tipicamente em uma região que compreende o trato de entrada, a região média e a via de saída do VD. A marca histopatológica clássica é a deposição fibrogordurosa inicial no epimiocárdio ou intramiocárdio, podendo evoluir com extensão transmural, afilamento e até dilatação da parede com formação de aneurismas [2].

É uma doença progressiva, que pode também afetar o septo e o ventrículo esquerdo em estágios mais avançados ou, em casos mais raros, pode ocorrer como forma de acometimento inicial ou isolado do VE. Esta nova visão do conhecimento sobre a doença tem levado alguns especialistas a utilizarem o termo mais amplo de “cardiomiopatias arritmogênicas”, com predomínio do VD ou do VE [3,4].

A apresentação clínica inicial ocorre geralmente entre as idades de 20 a 40 anos, sendo mais frequente e severa em homens do que em mulheres, com maior prevalência em atletas e é uma das principais causas de morte súbita. A atividade física intensa aumenta o risco de morte súbita cardíaca em portadores da CAVD, uma vez que o exercício pode desencadear arritmias ventriculares ou acelerar o desenvolvimento das anormalidades estruturais [5,6].

A prevalência média desta doença é estimada entre 0,1 e 0,02% (1:1000 - 1:5000), segundo raça e região mundial, com maior número de casos em descendentes europeus [1,7,8]. Todavia, essa estimativa de prevalência pode apresentar baixa acurácia por algumas razões: primeiro, porque a CAVD pode ser assintomática em uma parcela considerável de indivíduos portadores; segundo, porque a expressão fenotípica da doença é idade-dependente; e terceiro, porque a penetrância de alterações genéticas em algumas famílias é muito baixa [9].

Os principais sintomas da doença são palpitações, síncope, taquicardia ventricular, parada cardiorespiratóiria, ou até como manifestação primária e única, a morte súbita. Em fases mais avançadas da doença, pode ocorrer insuficiência cardíaca direita e/ou esquerda e até a indicação de transplante cardíaco. Atualmente, o diagnóstico clínico da doença é baseado na análise de alterações estruturais, morfológicas, arritmias ventriculares, histórico familiar para CAVD e morte súbita em indivíduos com idade inferior a 35 anos [10,11].

Devido às dificuldades de definição diagnóstica, foram propostos critérios diagnósticos em 1994, o *International Task Force Criteria,* que foram atualizados em 2010 [12,13]. Estes critérios para diagnóstico para a CAVD são baseados em um escore de seis categorias diferentes, que contemplam critérios maiores e menores, usando uma combinação de consequências da disfunção de VD. As categorias incluem: disfunção global e regional e alterações estruturais; caracterização tecidual da parede; alterações de repolarização ventricular; alterações da despolarização; arritmias e história familiar.

1.2 Aspectos genéticos

A CAVD é herdada de forma mendeliana, na maioria dos casos, por um mecanismo autossômico dominante, embora já tenham sido descritos alguns casos de herança recessiva, como a Doença de Naxos e a Síndrome de Carvajal [14,15].

Até o presente momento, variantes causais em mais de 15 genes diferentes foram relacionadas à CAVD, entretanto 12 deles são mais frequentemente descritos na literatura [16] (**Tabela 1**). As variantes mais comumente relacionadas à CAVD estão em genes relacionados ao complexo desmossomal (**Figura 1**). Tal complexo se localiza nos discos intercalados e é relacionado às estruturas de adesão celular, formadas por diversas proteínas. Os desmossomos, além de serem estruturas especializadas em conexão celular, são importantes mediadores que atuam na transdução dos sinais intracelulares e intercelulares. Estes são principalmente encontrados em células epiteliais e cadíacas, tecidos que se encontram frequentemente sob *stress* mecânico, e são formados por três classes de proteínas: a família das caderinas, armadillo e plakinas. A família das caderinas incluem desmocolinas e desmogleínas. Dentre estas, a DSC2 e DSG2, respectivamente, são predominantemente expressas no coração. A família das plakinas incluem as desmoplakinas como DSP e a família armadillo inclui as plakofilinas, como PKP2 [17,18].

Alterações em genes desmossomais são encontradas em aproximadamente 30-60% dos indivíduos afetados em diferentes coortes, sendo *PKP2* o principal gene causador da CAVD [19,20]. Menos frequentemente, a CAVD também pode ser causada por alterações em genes não-desmossomais [21,22,23].

No entanto, a ausência de critérios diagnósticos específicos, a penetrância incompleta dos alelos causais e a expressão clínica heterogênea da doença dificultam o estabelecimento de robustas

associações genótipo-fenótipo e torna a CAVD uma das cardiomiopatias hereditárias mais desafiadoras para o diagnóstico [16,19].

Tabela 1: Genes associados a CAVD (ordem alfabética).

Gene	Locus	MIM	Proteina	Herança
CTNNA3	10q21.3	607667	αT-catenina	AD
DES	2q35	125660	Desmina	AD
DSC2	18q21	125645	Desmocolina-2	AD
DSG2	18q12.1	125671	Desmogleina-2	AD/AR
DSP	6p24	125647	Desmoplaquina	AD/AR
JUP	17q21	173325	Placoglobina Juncional	AD/AR
LMNA	1q22	150330	Lamina A/C	AD
PKP2	12p11	609040	Placofilina-2	AD/AR
TGFB3	14q24.3	190230	Fator de crescimento β 3	AD
TMEM43	3p25.1	612048	Proteína de transmembrana43	AD
TTN	2q31.2	188840	Titina	AD
RYR2	1q43	180902	Recepetor de Rianodina	AD

Abreviações: Autossômica Dominante (AD), Autossômica Recessiva (AR).

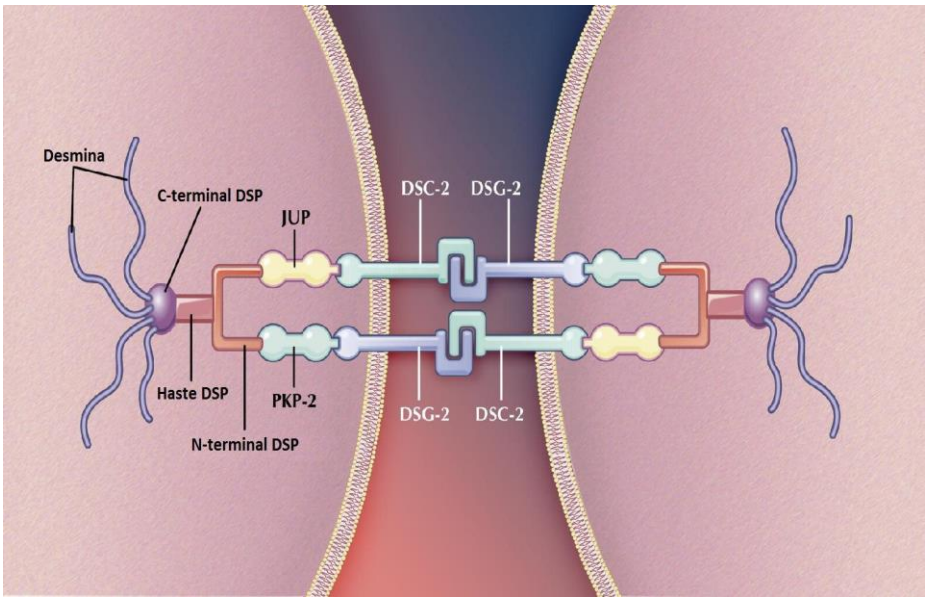

Figura 1: Estrutura esquemática desmossomal - As caderinas desmossomais, desmogleína (DSG2) e desmocolina (DSC2) compreendem o componente transmembranar do complexo desmossomal. A sua interface de domínios extracelular interage diretamente com os seus homólogos em células vizinhas. As porções intracelulares das caderinas desmossomais interagem com proteínas da família armadillo: placoglobinajuncional (JUP) e placofilina (PKP2), que por sua vez se ligam ao domínio N-terminal de desmoplaquina (DSP). Modificado de Sen-Chowdhry *et al*. [24]

Os mecanismos moleculares que tentam explicar a relação entre alterações nas propriedades biomecânicas do miocárdio e anormalidades do ritmo cardíaco na CAVD em decorrência de alterações genéticas que afetam proteínas desmossomais e não-desmossomais, ainda não estão bem caracterizados.

Dentre as diversas hipóteses propostas em recentes estudos, a mais aceita se concentra na irregularidade e ruptura da adesão intracelular (célula-célula) que, por sua vez, promove a morte e desprendimento do cardiomiócito e a subsequente reposição deste por tecido fibroadiposo. A substituição do cardiomiócito por fibrose e gordura contribui para o desenvolvimento de área de condução lenta, que gera substrato anatômico cicatricial para macro reentrada e arritmias ventriculares. Agentes inflamatórios (principalmente linfócitos T) são freqüentemente observados em miócitos em apoptose, sugestivo de que o processo patológico pode ser mediado imunologicamente. Deste modo, a patogênese da doença envolve a fibroadipogênese, o comportamento biomecânico das células e a alteração da sinalização das mesmas [25,26,27].

1.3 Importância da realização e interpretação do diagnóstico molecular

A realização de testes genéticos em portadores da CAVD aporta potenciais benefícios de reforço diagnóstico e em alguns casos específicos, informações prognósticas. Nas situações em que o diagnóstico clínico é confirmado, o estabelecimento do diagnóstico molecular reforça a base fisiopatológica da doença. Já, em casos para os quais há incerteza clínica, este permite um diagnóstico mais assertivo. A ausência de um achado genético relevante não significa ausência da doença, já que cerca de 50% dos pacientes tem diagnóstico molecular confirmado [28].

Outro benefício da análise genética e de maior impacto clínico, é a possibilidade de um rastreamento para diagnóstico pré-clínico em indivíduos

com histórico familiar de CAVD e alterações identificadas em algum caso-índice na família.

O diagnóstico precoce pode levar a mudanças no estilo de vida que previnam a progressão da doença, ao reconhecimento de sintomas de alarme e a implantação de um cardiodesfibrilador implantável (CDI), quando indicado, evitando morte súbita cardíaca. Por outro lado, a ausência de alteração genética em familiares de doentes com variante considerada causal ou patogênica, pode evitar avaliações e exames repetitivos, além de permitir a liberação para atividade física com maior segurança [29]. Um diagnóstico molecular positivo dos familiares, especialmente em indivíduos assintomáticos, não significa doença e sim um risco aumentado ao desenvolvimento da mesma [30,31].

É reconhecido que o perfil genético é dependente da interação dos genes que podem caracterizar o fenótipo, juntamente com os fatores ambientais. As informações disponíveis na literatura sobre o perfil genético de pacientes com CAVD carecem de descrições em populações diferentes das de descendência europeia. Desta forma, há uma carência de contribuição nacional, especialmente proveniente de nosso país, que possui alto grau de miscigenação. Assim, a população brasileira e seu perfil genético heterogêneo não tem sido contemplados em estudos clínicos.

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* ou NGS), se apresentou no mercado a partir de 2005 [32]. Esta possibilita uma investigação mais abrangente, que permite analisar diversas variações genéticas simultaneamente, com abordagens como o sequenciamento de um painel de genes, exoma ou genoma, em um curto período de tempo e com custo relativamente baixo. Esta tecnologia tem permitido encontrar uma presença considerável de alterações genéticas com efeito em proteínas associadas a fenótipos monogênicos, o que justifica o seu uso na prática clínica [33,34,35].

Diversas ferramentas computacionais de análise foram desenvolvidas com intenção de acelerar a capacidade de análise de dados,

aproximando os campos da biologia molecular e informática, consolidando o campo conhecido como bioinformática. A crescente descoberta de novas alterações genéticas resultou em novos desafios quanto à interpretação do impacto das mesmas na funcionalidade dos genes e, consequentemente, a atribuição de causalidade da uma alteração ao fenótipo.

Atualmente, existem algumas estratégias que auxiliam o processo de interpretação das variantes. Dentre elas, as mais utilizadas são: o uso de algoritmos computacionais de predição de impacto funcional (conhecida como abordagem de análise *in silico*) e uso de bancos de dados populacionais para a análise de frequência populacional de uma alteração.

Apesar do fato destas ferramentas já serem de uso frequente por diversos laboratórios, um grande desafio e necessidade para os profissionais envolvidos na realização de testes genéticos é a análise cuidadosa dos achados. A falta de sistematização na interpretação dos resultados e a falta de uma equipe multidisciplinar podem acarretar em problemas de classificação de variantes e impactar negativamente a conduta clínica destes pacientes.

Algumas instituições publicam de forma contínua, diretrizes de interpretação, como é o caso do Colégio Americano de Genética Médica (*American College of Medical Genetics* ou ACMG) [36], nas quais são definidos critérios para coleta de evidências e determinação da patogenicidade de uma alteração. As recomendações da diretriz aplicam-se principalmente à amplitude dos testes genéticos utilizados em laboratórios clínicos e visam servir como um recurso para geneticistas. A diretriz recomenda o uso de terminologia padrão específica (como “patogênica”, “provavelmente patogênica”, “significância incerta”) para descrever variantes identificadas em genes que causam doenças mendelianas. Além disso, a diretriz descreve um processo para classificar variantes nessas cinco categorias, com base em critérios, usando fatores de evidência de variantes (por exemplo, dados populacionais, computacionais, funcionais e de segregação).

1.4 Testes funcionais para a caracterização genótipo-fenótipo com hiPSCs

1.4.1 Células-tronco pluripotentes induzidas

Embora já tenham sido descritas diversas alterações genéticas que causam a CAVD, estudos relativos às consequências funcionais e estruturais de tais alterações são raros, devido às limitações existentes dos modelos atuais de estudo da doença [37].

As células tronco embrionárias (do inglês, *embryonic stem cells ou* ESCs) seriam um excelente modelo *in vitro* para recapitular o desenvolvimento de um fenótipo normal, uma vez que possuem a capacidade de se diferenciarem em todos os tecidos de um organismo. Entretanto, hoje em dia, estas são menos utilizadas para a modelagem de doenças de origem genéticas, uma vez que são, em sua maioria, originárias de embriões que não possuem o *background* genético específico para a doença em questão ou a alteração a ser estudada [38].

A partir do crescente uso de linhagens de células-tronco humanas, uma segunda fonte de células-tronco pluripotentes surgiu em 2006, quando Takahashi e Yamanaka demonstraram que os fibroblastos da pele de camundongos podiam ser reprogramados em células ESCs usando um vetor retroviral para forçar a expressão de 4 fatores de transcrição: Oct3 / 4, Sox2, Klf-4 e c-Myc, que ficaram conhecidos como os "´fatores de Yamanaka" [39]. Estes quatro fatores estão presentes em todas as células do corpo humano, entretanto estão "silenciados" em células já diferenciadas.

Estudos subsequentes reproduziram estes achados usando a mesma combinação dos 4 fatores de transcrição em fibroblastos humanos e mostraram que estas células, as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas humanas (do inglês*, human induced pluripotent stem cells* ou hiPSCs), tinham a capacidade de auto-renovação e poderiam dar origem a

todos os tipos de células somáticas (**Figura 2**). A descoberta determinou a possibilidade de gerar um número ilimitado de células, e consequentemente, possibilitou inúmeras aplicações nos campos da pesquisa biomédica e medicina regenerativa [40].

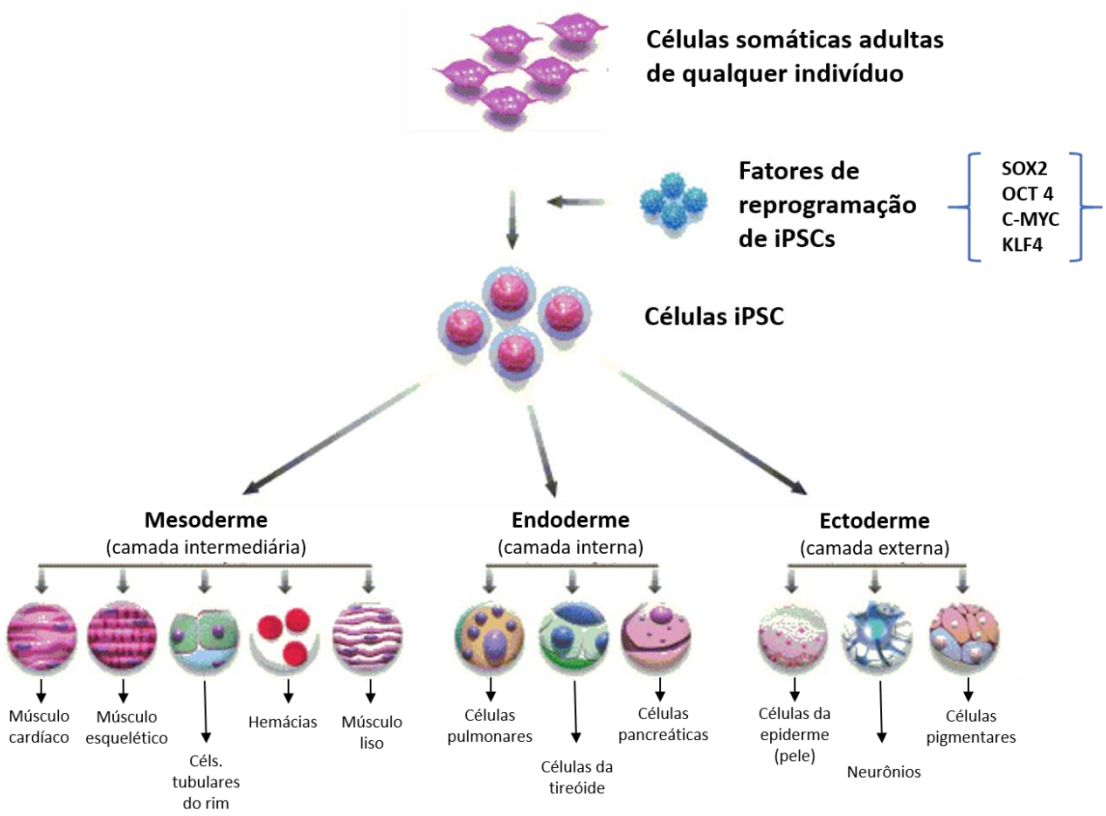

Figura 2: Esquema do processo de geração de células diferenciadas a partir da geração de células-tronco pluripotentes induzidas (método de reprogramação com os "fatores de Yamanaka"). Adaptado de Mark J, Scientific Y; 2014. [144]

Alguns tipos celulares são mais frequentemente utilizados como precursores das iPSCs. Os fibroblastos são o tipo celular mais utilizado ainda hoje, devido principalmente, á sua ampla disponibilidade e simples cultivo. Porém, se trata de uma abordagem invasiva, uma vez que os fibroblastos são comumente extraídos por meio de biópsia de pele. Outros

tipos celulares comumente utilizados e de fácil obtenção são as células sanguíneas, células da urina e queratinócitos a partir de fios de cabelo [41].

Diversos métodos de reprogramação de células somáticas adultas em hiPSCs foram desenvolvidos e descritos na literatura, utilizando diferentes tipos de vetores ou combinações de genes [42,43]. Estes métodos podem basicamente ser divididos em duas principais categorias: 1) os que geram integração de material exógeno no genoma hospedeiro e 2) os que não possuem integração no genoma (não-integrativos).

Para o primeiro método, no qual pode haver integração do material inserido no genoma hospedeiro, são usados os retrovírus ou lentivírus [44]. O método é considerado bastante eficaz, mas a principal desvantagem é o risco de mutagênese devido à integração de uma ou mais seqüências virais no genoma e o risco da não extinção dos transgenes inseridos, que pode dificultar a posterior diferenciação celular. Já no segundo método, são utilizados vírus não integrativos (vírus Sendai é o mais comum) [45], transfecção por microRNA [46], ou vetores epissomais [47], sendo mais frequentemente utilizados plasmídeos que agrupam os genes responsáveis pela reprogramação. Métodos não-integrativos, têm sido os mais utilizados principalmente no campo da terapia celular, devido ao menor risco já que não apresentam os problemas associados à integração viral.

Alguns estudos mostraram que mutações em iPSCs (anormalidades cariotípicas, variantes no número de cópias (CNV) ou variantes em nucleotídeo único (SNV)) são frequentemente encontradas devido a combinação de alguns fatores, dentre eles: 1) a reprogramação implica a seleção e clonagem de uma única célula que pode (por acaso ou não) possuir mutações pré-existentes devido ao mosaicismo somático; 2) a reprogramação é um processo que induz a rápida proliferação de células com alta demanda metabólica, alta produção de ROS e possível inibição de alguns *checkpoints* no processo mitótico, levando ao descontrole ou não correção de mutações que ocorrem durante a reprogramação; 3) o próprio cultivo das células, de curto e longo prazo, que pode contribuir na seleção de

células com duplicações de oncogenes e/ou deleções supressoras de tumor, por exemplo. [48]

A eficácia da reprogração pode ser influenciada por muitos aspectos, como a natureza das células somáticas de origem, o número de passagens em cultura, a idade do doador e o método propriamente utilizado.

Mediante a reprogramação de células somáticas adultas em hiPSCs, foi possível modelar diversas doenças, como a doença de Parkinson [49], diabetes [50] e doenças cardíacas como a síndrome do Qt Longo [51], entre outras. Assim, é possível estudar de que forma o fenótipo específico de cada paciente pode estar relacionado com o seu genótipo.

Atualmente, as hiPSCs são vistas como um método confiável de produzir diferentes tipos celulares "paciente-específicos" por meio da diferenciação dirigida. A manipulação e análise de células cardíacas humanas em cultura tornou possível a utilização das hiPSC-CMs como uma plataforma robusta para o estudo de doenças cardíacas genéticas e contribuiu para novas perspectivas ou confirmação de hipóteses sobre a patogênese e mecanismo da doença em questão [52].

Um dos principais objetivos no estudo de doenças genéticas por meio do uso de hiPSCs é verificar se as células em cultura de fato se comportam como as células no organismo e, desta forma, buscar coletar evidências que contribuam para o entendimento aprofundado da doença. Trabalhos que utilizaram hiPSC-CMs, evidenciaram um papel importante desta abordagem na avaliação funcional de genes candidatos a serem patogênicos, na estratificação de risco e em testes de alvos terapêuticos e, por enquanto, são ideias iniciais comparadas ao grande potencial dos hiPSC-CMs [53,54,55].

O modelo tem se mostrado complementar ou até superior para doenças genéticas cardíacas, quando comparado com certos modelos animais, uma vez que estes últimos têm limitações por fundamentais diferenças funcionais e de eletrofisiologia cardíaca (por exemplo, entre ratos e seres humanos) e, portanto, da aplicabilidade das conclusões à doença humana [56]. Dados obtidos a partir de amostras de biópsia endomiocárdica

humanas, retiradas de pacientes com CAVD, foram importantes para o melhor conhecimento das mudanças estruturais que ocorrem na doença e sobre complexas interações existentes na ligação de proteínas nos discos intercalados [57]. No entanto, uma limitação dessa abordagem reside no fato que as células e tecidos geralmente não são viáveis, sendo apenas um instrumento de estudo estrutural e não funcional. Assim, mecanismos que exigem o estudo das células para desvendar alterações na eletrofisiologia celular e função de canal iônico cardíaco não podem ser elucidados por tal modelo.

1.4.2 Diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos

Durante o desenvolvimento embrionário são formadas três linhagens germinativas, capazes, em conjunto, de se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo. No caso do tecido cardíaco, os protocolos de diferenciação guiada foram desenvolvidos a partir da compreensão do desenvolvimento do embrião de camundongos [58,59]. Trabalhos nesta área ajudaram na identificação de vias de sinalização críticas, perfis de expressão gênica e marcadores de superfície que direcionam a diferenciação *in vitro* das células-tronco embrionárias [60,61].

De maneira geral, pode se categorizar a diferenciação de células-tronco pluripotentes em dois métodos básicos: 1) a formação de agregados em 3-D, conhecidos como corpos embrióides (do inglês, *embryoid bodies* ou EBs) e 2) diferenciação direta em cardiomiócitos, com cultura de células em monocamada.

Para ambos os métodos, os protocolos existentes seguem uma mesma sequência do desenvolvimento. Basicamente trata-se de uma superexpressão e consequente inibição de fatores associados a via Wnt. No estágio inicial do processo de diferenciação em cardiomiócitos, as células pluripotentes passam por uma ativação da via da Wnt, por meio

da inibição da via glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), dando origem à chamada mesendoderme [62]. Neste ponto do processo, as células são sucetíveis a se tornarem tecidos endodérmicos ou mesodérmicos, a depender do tempo de ação e concentração da molécula utilizada para a ativação desta via [63,64].

Após a formação de mesoderme, a próxima etapa do processo define a especificação cardíaca por meio da formação de células progenitoras cardíacas. Esta etapa ocorre por meio da inativação da via da Wnt, que pode ser realizada por utilização de diversos compostos químicos, novamente variando o tempo de ação e concentração do composto. A inativação da via Wnt provoca a quebra do complexo proteico responsável por manter a β-Catenina no citoplasma. Uma vez livre no citoplasma, a mesma possui a capacidade de migrar para o núcleo, ativando a expressão de fatores de transcrição que levarão para a especificação cardíaca [65]. Durante o processo de amadurecimento das células cardíacas, há um aumento progressivo da expressão de alguns reguladores do desenvolvimento cardíaco (como GATA4, MEF2C, ISL1 e NKX2.5). Com aproximadamente 15-20 dias (tempo variável conforme o protocolo e linhagem celular utilizados), estas células já expressam algumas das proteínas cardíacas (como a Troponina I (TNNi3) e Troponina T (TNNT2). Outras proteínas cardíacas se apresentam conforme o amadurecimento das células [66,67.]

A verificação das propriedades eletrofisiológicas dos cardiomiócitos derivados de hiPSCs permitiu um melhor entendimento do estágio de desenvolvimento dos mesmos. Enquanto muitos aspectos dos cardiomiócitos derivados de hiPSCs são comparáveis aos cardiomiócitos adultos, existem várias diferenças notáveis. Acredita-se que essas diferenças são atribuíveis à natureza imatura dessas células, como por exemplo, sarcômeros desorganizados e um diferente conjunto de canais iônicos em comparação com adultos [68]. O tempo de cultivo das células, demonstrou ser um aspecto importante na maturação [69]. No entanto, outros modelos vêm sendo propostos com o intuito de amadurecimento

dos cardiomiócitos de maneira a acelerar o amadurecimento que ocorre normalmente, baseado no tempo destas células em cultura [70].

Os protocolos de diferenciação em cardiomiócitos tem sido cada vez mais aprimorados, resultando atualmente em eficácias de até 80-90% de cardiomiócitos [71]. Todavia, ainda há uma variabilidade considerável na eficiência de diferenciação entre diferentes linhagens. Estudos sugerem que as diferenças na eficácia podem ser devido ao fato de que cada linhagem celular produz sua própria quantidade (variável) de fatores de crescimento, tornando sua sensibilidade a novos fatores de crescimento ou fatores inibitórios (compostos químicos), usados nos protocolos de diferenciação, específica para cada linhagem [72].

1.4.3 Maturação dos hiPSC-CMs

O coração é um órgão complexo composto de vários tipos celulares (como cardiomiócitos, células endoteliais e fibroblastos) organizados de forma tridimensional (3D). Grande parte dos estudos de modelagem celular são realizados com culturas bidimensionais (2D) *in vitro*. Entretanto, estudos anteriores mostraram que as células recapitulam melhor a fisiologia *in vivo* quando cultivadas em um sistema tridimensional [73]. Além disso, estudos também mostraram que a geração de tecido cardíaco contendo uma mistura apropriada de tipos de células, melhorou a viabilidade das células em estudos que envolvem eletrofisiologia, interações célula-célula ou matriz extracelular, ou teste de novas drogas [74].

Atualmente, diversos grupos têm colocado esforços no desenvolvimento de melhores abordagens para maturar cardiomiócitos diferenciados. O contínuo progresso das técnicas de bioengenharia de tecidos e novos insights sobre epigenética, geraram plataformas que se mostraram eficientes para estudos clínicos e em modelos animais. Estudos mais recentes, mostraram a relevância destas técnicas também para a modelagem de doenças e no desenvolvimento de novas estratégias

terapêuticas, uma vez que buscam reproduzir características importantes presentes durante o desenvolvimento embrionário, tais como a composição de matriz extracelular, tensão e tridimensionalidade [75,76].

Autores mostram que a estimulação hormonal ou o condicionamento com estresse mecânico e estimulação elétrica podem levar a um fenótipo mais maduro, mas até hoje os mecanismos exatos que promovem a maturação ainda não são completamente compreendidos [77,78,79]. Processos epigenéticos têm sido sugeridos como mediadores cruciais tanto nos processos de desenvolvimento como na doença já estabelecida [80,81].

O desenvolvimento de microtecidos cardíacos humanos possibilitou medições não-invasivas de parâmetros funcionais. A partir de estímulos bioquímicos, elétricos e mecânicos, estudos mostram a necessidade de se estimular o tecido para um estágio completamente maduro. Estudos mostraram que os microtecidos estimulados exibiram cardiomiócitos com grau notável de organização ultraestrutural, velocidade de condução e propriedades eletrofisiológicas consistentes com células cardíacas em estágio mais maduro de desenvolvimento, representando um importante avanço para obtenção de cardiomiócitos humanos que se assemelham mais a cardiomiócitos adultos [75,82].

1.4.4 Uso dos cardiomiócitos derivados de hiPSCs para modelagem da CAVD

Até o presente momento, existem apenas alguns poucos estudos que utilizam iPSC-CMs como modelo de estudo para a CAVD. Estes demonstram que algumas das principais características de CAVD, como a patogenicidade desmossomal e o acúmulo de lípidos, podem ser identificadas por meio do uso de hiPSC-CMs, reforçando seu importante papel como uma ferramenta disponível para o estudo desta doença complexa e como potencial estratégia na pesquisa de tratamentos. Os trabalhos mostram que os modelos celulares, mesmo sendo compostos

principalmente por células imaturas, recapitulam diversos aspectos e evidências da doença *in vivo* [83,84,85].

No trabalho de Ma e colaboradores [83], foram geradas hiPSCs por reprogramação retroviral, a partir de fibroblastos da pele, obtidos de um paciente com CAVD. Este paciente possuía uma alteração genética, missense, em heterozigose, no gene *PKP2* (c.1841T>C). Os hiPSC-CMs deste paciente apresentaram uma diminuição de expressão de algumas proteínas desmossomais (PKP2 e PKG) e altos níveis de armazenamento de acúmulo de gotas lipídicas, conferidos por microscopia eletrônica de transmissão e marcação pelo corante Oil Red O. No entanto, enquanto estudos eletrofisiológicos foram feitos em células derivadas de pacientes, eles não foram comparados com as células controle, provando ser uma limitação deste estudo.

O grupo de Kim e colaboradores [84], geraram hiPSCs, também por reprogramação retroviral a partir de fibroblastos da pele de 2 pacientes. O primeiro possuía uma alteração genética em homozigose (c.2484C> T) e o segundo com alteração em heterozigose (c.2013delC) no gene *PKP2*. O trabalho mostrou a translocação nuclear anormal de plakoglobina e baixa atividade e expressão de β-catenina nos cardiomiócitos dos pacientes. Entretanto, o fenótipo da doença não foi totalmente recapitulado em condições de cultivo padrão das células. Fez-se necesssária a exposição das células a um meio de cultura indutor da adipogênese, que resultou em um aumento da lipogênese e apoptose. Nos CAVD-CMs estimulado com o meio adipogênico, o fator PPAR-γ, que é um regulador do metabolismo dos ácidos graxos, foi ativado anormalmente. Com isso, os autores sugeriram a hipótese de que o metabolismo lipídico e energético tem um papel central na fisiopatologia da CAVD.

No trabalho de Caspi e colaboradores [85], foram encontrados resultados semelhantes. O grupo gerou hiPSCs de 2 pacientes com CAVD, a partir de fibroblastos da pele, por reprogramação retroviral. Ambos os pacientes possuíam alterações no gene *PKP2*, uma inserção em heterozigose (c.972InsT>N) e uma deleção em heterozigose

(c.148_151delACAG/N), respectivamente. Os pesquisadores verificaram que os CAVD-CMs tiveram expressão reduzida de *PKP2* (verificada pelo métodos de reação em cadeia da polimerase quantitativa) e expressão reduzida de conexina-43 (verificada pela técnica de imunofluorescência) . A avaliação eletrofisiológica demonstrou um tempo prolongado do potencial de campo nos CAVD-CMs em comparação ao controle. Além disso, o grupo demonstrou que os CAVD-CMs apresentavam distorção desmossômica mais severa comparada aos controles, e que aqueles pacientes com patologica desmossômica mais severa, tinham maior acúmulo lipídico intracelular, uma vez que possuíam expressão do fator de transcrição, PPAR-γ, aumentado. A exposição das células a meios de cultivo indutores da adipogênese aumentou a distorção desmossômica e acúmulo de lipídios observados previamente. Assim, os autores sugeriram que o acúmulo de gotículas lipídicas intracelulares poderia ser previsto com base no grau de anormalidades desmossomais da mesma célula.

A caracterização das células diferenciadas é essencial para mostrar que, no caso, os cardiomiócitos obtidos *in vitro* são funcionais. Os ensaios comumente realizados, conforme a literatura, para estudar as diferenças fenotípicas celulares, são: a avaliação de marcadores moleculares por meio de expressão gênica (RT-PCR), a avaliação de marcadores proteicos por meio da utilização de anticorpos contra proteínas do aparato contrátil ou possivelmente alteradas; a avaliação da ultraestrutura celular por meio de microscopia eletrônica; os ensaios funcionais que indicam uma resposta celular mais complexa, que incluem o estudo eletrofisiológico e de transientes iônicos [86].

Desta forma, além da busca pela confirmação e compreensão da natureza genética da doença, estudos buscam atualmente descobrir a relação entre as alterações genéticas encontradas e anormalidades estruturais celulares (majoritariamente, relacionadas ao complexo desmossomal). Com isso, podem atingir o propósito de se estabelecer uma possível relação com os achados clínicos e patológicos da CAVD.

Neste estudo, hipotetizamos que para os pacientes genotipados pela técnica de *NGS* e posteriormente selecionados de acordo com critérios descritos mais adiante, um modelo celular *in vitro,* a partir de hiPSC–CMs, seja capaz de recapitular fenótipos anormais e se apresenta como uma ferramenta para estudar como diferentes alterações genéticas levam aos diferentes e complexos fenótipos da CAVD.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a relação entre genes associados à CAVD, com a utilização de plataformas de sequenciamento de nova geração (*NGS)*, em pacientes da população brasileira com diagnóstico clínico da doença, e caracterizar, do ponto de vista funcional, cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CMs) de pacientes selecionados com alterações genéticas identificadas, a fim de associar o perfil mutacional e a expressão fenotípica celular.

2.2 Objetivos específicos

1. Otimizar o sequenciamento de nova geração da plataforma *Miseq* (*Illumina*) para painel genético referente aos genes ligados a doença.
2. Sequenciar as amostras de DNA de indivíduos com diagnóstico clínico estabelecido, porém ainda sem diagnóstico molecular.
3. Associar genótipo com aspectos fenotípicos nos pacientes estudados;
4. Gerar hiPSCs de pacientes a partir da urina, caracterizá-las e diferenciá-las em cardiomiócitos funcionais;
5. Avaliar, segundo um estudo funcional celular, a influência das alterações genéticas encontradas no fenótipo dos cardiomiócitos derivados de hiPSCs.

3. Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos propostos estão de acordo com as recomendações e as diretrizes das principais sociedades específicas da área nacional e internacional. Todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual concordam com a realização do do teste genético direcionado. Alguns indivíduos, selecionados ao longo do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adicional, no qual concordam com a utilização do material biológico para estudo funcional. (**ANEXO C**)

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do InCOr/HCFMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (SDC 4042/14/022). (**ANEXO A**).

3.2 Casuística

3.2.1 Probandos

Foram selecionados 47 probandos não aparentados, disponibilizados pelo ambulatório de Arritmias Genéticas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (InCor – HC/FMUSP), com diagnóstico clínico de CAVD e sem diagnóstico molecular prévio. A avaliação dos pacientes incluiu: anamnese, história familiar, exames laboratoriais, eletrocardiograma de 12 derivações, eletrocardiograma de alta

resolução, Holter de 24 horas, ecocardiograma transtorácico e ressonância cardíaca, salvo contraindicações específicas. Portanto, os critérios de inclusão foram: diagnóstico clínico de CAVD conforme critérios *Task Force Criteria* de 2010 [13] e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Como controle ao perfil genético analisado em nosso estudo, foram utilizados os bancos de dados *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) [87], *Genome Aggregation Database* (gnomAD) [88], e *Online Archive of Brazilian Mutations* (ABraOM) [89] para se verificar as frequências das alterações encontradas na população mundial.

Para o estudo funcional em cardiomiócitos diferenciados de hiPSC, dentre os probandos, foram selecionados dois pacientes, previamente sequenciados, após análise de alterações encontradas. O critério de seleção destes pacientes levou em consideração: a predição de patogenicidade das alterações encontradas (sendo pacientes com variantes Patogênicas), sua relevância para o estudo da doença e a confirmação de um fenótipo claro e bem estabelecido dos pacientes diagnosticados com CAVD, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Trata-se de 2 pacientes do sexo masculino, com idades de 34 e 32 anos, portadores de alterações genéticas nos genes *DSC2* e *PKP2*, respectivamente. O paciente denominado de CAVD5 possui uma troca previamente descrita na literatura, de uma Timina por Citosina na posição 2062 do gene *PKP2* (c.2062 T>C), que resulta em uma troca do aminoácido Serina (Ser – S) por Prolina (Pro - P) na posição 688 (p. Ser688Pro). Por sua vez, o paciente denominado CAVD2 possui uma inserção, sem descrição prévia na literatura, de uma Timina entre as posições 929 e 930 do gene *DSC2* (c.929_930insT), o que resulta em uma alteração *frameshift* após o aminoácido Glutamina (Gln – Q) na posição 310 (p.Gln310fs).

O clone-controle de hiPSCs (SS109), previamente gerado e caracterizado a partir do banco de células-controle de nosso laboratório, foi diferenciado e utilizado como controle de nosso estudo funcional celular.

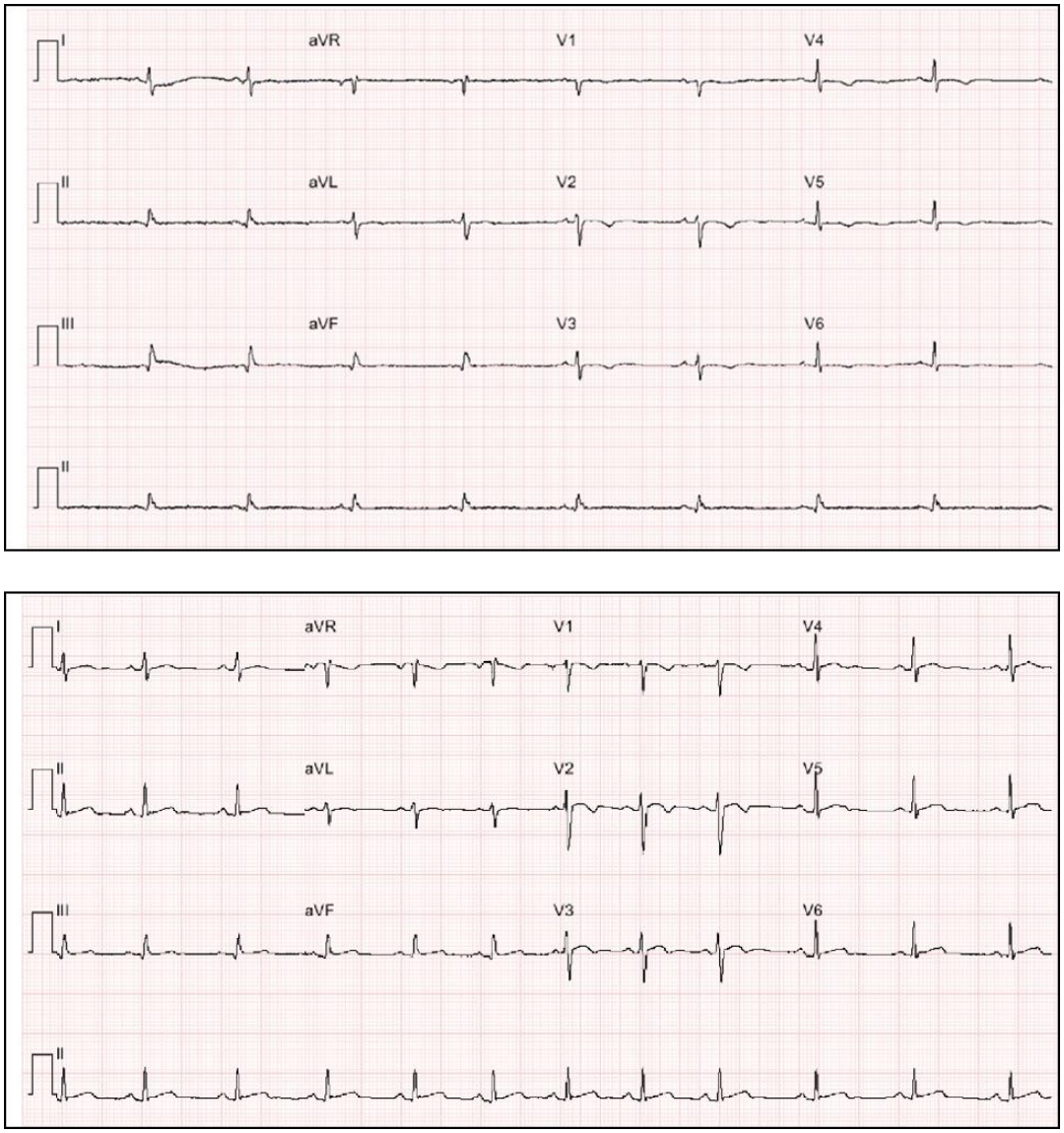

Figura 3: Eletrocardiogramas de 12 derivações dos dois probandos selecionados para o estudo funcional com cardiomiócitos diferenciados. Imagem de cima, paciente CAVD2, mostrando inversão de onda T de V1 a V5; e imagem de baixo, paciente CAVD5, com inversão de onda T de V1 a V3.

3.3 Análise genética de pacientes portadores de Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito (CAVD)

3.3.1 Coleta de sangue e extração do DNA e RNA para sequenciamento

Para extração de DNA, foram coletados 4mL de sangue periférico em tubo de EDTA de cada indivíduo. A extração foi realizada a partir de leucócitos de acordo com o kit comercial QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN®), conforme descrito pelo fabricante. A solução de DNA foi diluída em água (40 ng/mL) e armazenada a -20 ° C.

Para a extração do RNA, foi realizado inicialmente o isolamento da fração mononuclear do sangue. O sangue foi homogeneizado e adicionou-se a ele o mesmo volume de solução fisiológica. A mistura foi despejada suavemente sobre uma camada de Ficoll-Paque ™ (GE, Healthcare) em um tubo falcon de 15 mL. Foram utilizados 10 mL da solução soro/sangue para cada 3 mL de Ficoll, com o devido cuidado para não se misturar as fases. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a solução se separa em 4 fases: na fase superior ficam o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo. A camada monocelular foi colhida junto com o Ficoll e transferida para um tubo falcon de 50 mL limpo, onde foram adicionados 40mL de soro para lavagem. A mistura foi centrifugada 1200 rpm por 5 min, e então o sobrenadante foi descartado. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez. Após a segunda lavagem e descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) e mantido em freezer -20o C até o momento da extração do RNA.

A primeira etapa do processo de extração do RNA consiste em lisar as células com TRIzol® por meio de pipetagem repetitiva, utilizando-se 2 mL do reagente. Logo após as amostras foram incubadas por 5 minutos, entre 15 e

30°C e posteriormente foi adicionado 0,4 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente na mão por 15 segundos e incubados entre 15 e 30°C por 2 a 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos entre 2 e 8°C. Após a centrifugação, a mistura separa-se em uma camada vermelha, a fase fenol clorofórmio, uma interfase e uma fase superior aquosa incolor. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Essa fase foi então transferida para um tubo limpo e o RNA foi precipitado da fase aquosa misturando-se 1 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas entre 15 e 30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos entre 2 e 8°C. O RNA precipitado forma um pellet gelatinoso nos lados e no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o pellet passou por um processo de lavagem uma vez com 2 mL de etanol 75%, onde a amostra foi agitada brevemente e centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos entre 2 e 8°C. Ao final do procedimento, o RNA foi seco rapidamente e dissolvido em água ultrapura livre de RNAse.

3.3.2 Desenho do Painel Genético

O desenho das sondas foi feito a partir da plataforma virtual Design Studio (*Illumina*), na qual foram indicados os genes de interesse (por meio das siglas dos genes conforme constam no NCBI) e a versão do genoma humano referência (hg19). Apenas regiões codificantes foram indicadas como alvo, mantendo 10pb de regiões intrônicas nas extremidades 3’ e 5’ de cada exon.

O painel genético **(ANEXO B)**, constituído por 100 genes no total, incluiu 12 genes que foram claramente associados a CAVD (*CTNNA3, DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, LMNA, PKP2, TGFB3, TMEM43, TTN, RYR2*) e usualmente utilizados em painéis clínicos para a doença, de acordo com uma revisão sistemática da literatura feita nos bancos de dados HGMD, Pubmed e OMIM. O desenho do painel completo (100 genes), foi personalizado para canalopatias e cardiomiopatias, tendo como base os dados coletados da

literatura vigente e amplamente discutido pelo grupo de estudo composto por biólogos, biomédicos e médicos especializados em arritmias e genéticas.

O desenho final consistiu de 3384 regiões alvo para o painel Nextera, abrangendo 960.659pb e cobertura total das regiões alvo foi de 99%.

3.3.3 Processo de enriquecimento, construção da biblioteca e sequenciamento de *high-throughput*

3.3.3.1 Painel de Captura - *Nextera Rapid Capture Custom Enrichment*

O protocolo de enriquecimento e preparo da biblioteca das amostras foi realizado usando o kit *Nextera Rapid Capture Custom Enrichment*, seguindo-se as instruções do fabricante (Illumina). Antes de iniciar o enriquecimento, as amostras foram quantificadas com a utilização do fluorômetro Qubit 2.0 (*Life Technologies*), diluídas em Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 e normalizadas primeiramente a uma concentração de 10 ng/µl, e após segunda quantificação, diluídas novamente em Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 e normalizadas a uma concentração de 5 ng/µl em um volume final de 10µl (50 ng total).

O protocolo de enriquecimento se iniciou com a fragmentação do DNA genômico com o uso do *transposon Nextera* e, na mesma etapa, sequências adaptadoras foram acopladas aos fragmentos de DNA. Após esta etapa, foi feita uma purificação com *beads* específicos para que houvesse a remoção dos transposons restantes que poderiam ter se ligados na terminação dos fragmentos de DNA, impedindo o bom desempenho do protocolo nas etapas seguintes.

O material resultante desta purificação foi então amplificado, e *indexes* (barcodes) foram adicionados as amostras em uma PCR de 10 ciclos. Para cada amostra, foram adicionados dois *indexes (*um i7 e um i5*),* além de uma sequência adaptadora de sequenciamento, necessária para a posterior amplificação dos *clusters*. Novamente, foi feita após adição dos *indexes*, uma

purificação com *beads*, para remoção de produtos indesejados. Após estarem devidamente marcadas com *indexes* únicos, as bibliotecas de DNA foram combinadas em um único *pool* e submetidas a uma primeira hidridização para que ocorresse a ligação das sondas de captura nas regiões alvo do DNA.

Depois desta etapa, esferas magnéticas com estreptavidina foram utilizadas para capturar as sondas hibridizadas com as regiões-alvo. Duas lavagens aquecidas foram realizadas para remover a ligação não específica dos *beads.* A biblioteca enriquecida foi então eluída e preparada para uma segunda etapa de hibridização. Então, os fragmentos passaram por uma segunda hibridização, que lhes conferia alta especificidade das regiões capturadas, e novamente foram lavados da mesma forma que na primeira hibridização.

A biblioteca enriquecida foi então eluída e preparada para o sequenciamento. Uma purificação foi feita com *beads*, antes da etapa de amplificação. A amplificação da biblioteca enriquecida foi então realizada, em uma PCR de 10 ciclos. Novamente uma etapa de purificação com *beads* foi realizada para a remoção de produtos indesejados.

As bibliotecas enriquecidas foram quantificadas com a utilização do fluorômetro Qubit 2.0 (*Life Technologies*). A qualidade e tamanho médio da biblioteca foram avaliados por meio de gel de agarose a 1%.

3.3.4 Preparo de amostras e sequenciamento

Para o sequenciamento na plataforma Miseq as bibliotecas foram desnaturadas e diluídas para serem colocadas no equipamento. A desnaturação garante que a concentração de NaOH na solução final esteja adequada, pois concentrações aumentadas de NaOH podem inibir a hibridização da biblioteca na *flow-cell* (chip de corrida), e consequentemente afetar a densidade de *clusters.* Após esta etapa, as bibliotecas foram inseridas no cartucho de reagentes MiSeq Reagent Kit v3 (150 ciclos), que por sua vez

era inserido no equipamento Miseq® (Illumina). Cada corrida consistiu no sequenciamento de vinte e quatro amostras de DNA, com um output máximo de até 4.5-5.1 Gb, segundo especificações do fabricante.

3.3.5 Análise bioinformática e chamada de variantes

A análise bioinformática, bem como a posterior análise de variantes, foi realizada de acordo com um *pipeline* adaptado ao previamente desenvolvido por Oliveira TGM [90]. Após a corrida de sequenciamento das amostras, as sequências geradas foram processadas e foram gerados arquivos FASTQ. Estes foram analisados pelo software CLC Genomics Workbench 8 (CLCbio, QIAGEN), no qual um *pipeline* apropriado foi desenvolvido para gerar as análises de bioinformática. As principais etapas foram:

a) Tratamento das sequências no qual foram removidos 5pb do final 3' de cada sequência gerada, para evitar que fossem mapeadas bases com baixa acurácia.

b) Tratamento das sequências curtas e com valores de qualidade Phred abaixo de Q30, as quais foram removidas.

c) Mapeamento das sequências contra a referência do genoma humano (hg19), onde foram estabelecidos valores de penalização para mismatches (2), InDels (3) e fração mínima de similaridade entre a sequência alinhada e a referência (80%). Após esta etapa, um arquivo de visualização BAM e um relatório de mapeamento foram gerados.

d) Geração de estatísticas para as regiões alvo do painel, a fim de identificar regiões com baixa cobertura de sequenciamento. As regiões alvo eram definidas como éxons mais 10pb de regiões intronicas flanqueadoras.

e) Chamada de variantes, utilizando a qualidade de sequenciamento das bases vizinhas (raio de 5pb da possível base alterada) como um critério para chamadas efetivas. Como um requisito para a chamada de variantes, era necessária a presença bidirecional de variantes com uma concordância mínima

de 5% entre sequências Forward e Reverse. A cobertura mínima de sequenciamento e frequência de alelo variante (FAV) foram definidos com a cobertura mínima de 10x e com FAV de 20%, respectivamente. Os valores de cobertura mínima e FAV, assim como a requisição da presença das variantes nos sentidos senso e anti-senso foram determinados de acordo com estudos prévios [91,92], incluindo uma validação feita na plataforma Ion Torrent por colaboradores de nosso próprio laboratório [93].

f) Anotação das variantes, incluindo: anotação com informações dos genes (nomes e códigos referência); anotação com números dos éxons nos quais as alterações genéticas se apresentavam; anotação com os dados presentes no dbSNP138 para verificação de alterações já descritas.

Ao final da análise, uma tabela contendo todas as variantes encontradas em cada amostra era gerada no formato XLS. As variantes eram subdivididas em alterações não-sinônimas e de sítio de splicing.

3.3.6 Análise de variantes

Com base na tabela gerada, poderiam ser encontradas alterações causadoras de troca de aminoácido *(missense),* de códon de parada *(nonsense),* que causam mudança no quadro de leitura do gene *(frameshift),* e possivelmente modificadoras de sítio de splicing (**Figura 2**). Foram analisadas alterações em heterozigose e homozigose.

Foram primeiramente filtradas as alterações preditas como causadoras de modificação na sequência das proteínas. Após essa primeira filtragem, as alterações remanescentes foram submetidas à uma análise de três algoritmos de predição de impacto funcional (*in silico*), a qual indica o grau de impacto da substituição do aminoácido original pela variante por meio da análise de conservação evolutiva (entre espécies distintas). Para esta análise, foram utilizados os algoritmos *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) [94], *Sort Intolerant from Tolerant* (SIFT) [95] e *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2) [96].

Em seguida, as frequências populacionais das alterações encontradas foram consultadas nos bancos de dados *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) [87], *Genome Aggregation Database* (gnomAD) [88], e *Online Archive of Brazilian Mutations* (ABraOM) [89].

Descrições prévias de estudos funcionais e sobre a ocorrência de cada alteração na população mundial foram verificadas nos bancos de dados *Human Genome Mutation Database* (HGMD) [97], *ClinVar* [98] e *Pubmed*.

Desta forma, após essas análises, eram consideradas alterações com os seguintes critérios: 1) Alterações com frequência populacional do alelo menor (ou MAF, do inglês, *Minor Allele Frequency)* abaixo de 0,1% ou não descritas nos bancos populacionais; 2) Alterações com impacto funcional considerado deletério ou danoso para a proteína em questão, em pelo menos dois algoritmos de predição *in silico*.

Estas variantes foram consideradas para a etapa seguinte, de classificação quanto a sua patogenicidade.

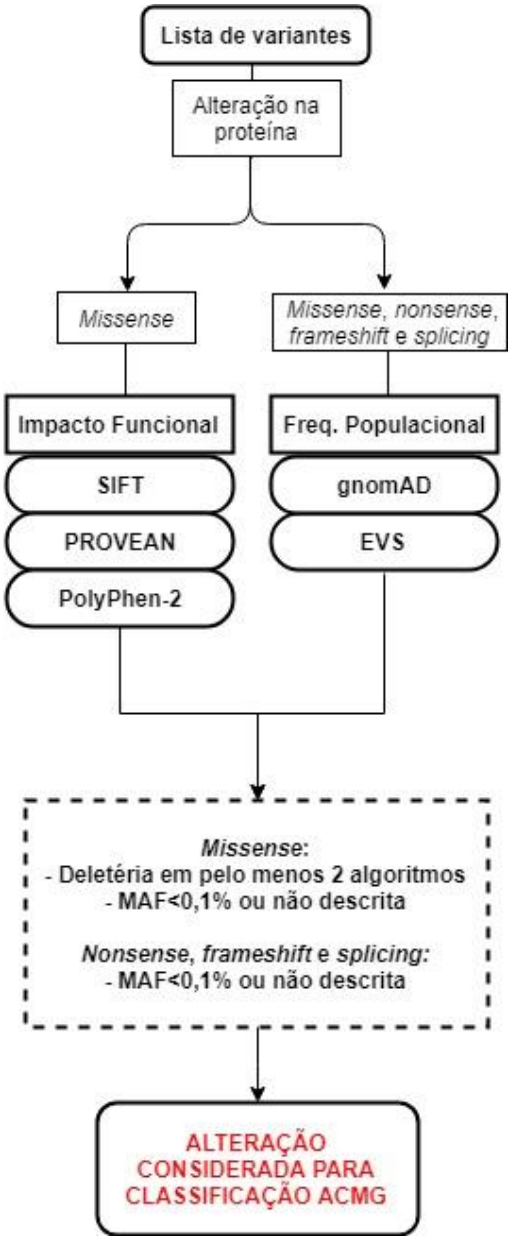

Figura 4: Algoritmo de filtragem das alterações encontradas nos resultados de sequenciamento que foram posteriormente consideradas para a classificação de acordo com ACMG (NGS). Adaptado de Oliveira TGM [90] .

A classificação das variantes nos genes causais foi realizada de acordo com os critérios da diretriz do *American College of Medical Genetics and Genomics* (*ACMG*) [36] (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Critérios para classificação de variantes patogênicas, segundo ACMG.

Evidência de patogenicidade	Categoria	Descrição
Muito elevada PVS1 (*very strong*)	PVS1	Variante nula (nonsense, frameshift, canônica ± 1 ou 2 sítios de *splicing*, início de códon, deleção uni ou multiexon quando o mecanismo é a perda de função dos canais.
Elevada PS (*strong*)	PS1	Troca de aminoácidos já descrita como patogênica, porém, com diferentes trocas de nucleotídeo.
	PS2	Mutação *de novo* com paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença.
	PS3	Comprovação de patogenicidade por estudos funcionais.
	PS4	A prevalência da variante em indivíduos com a doença é significativamente maior que a prevalência em controles.
Moderada PM (*moderate*)	PM1	Variante localizada em região de *hot* spot ou em domínio funcional bem estabelecido, sem variantes benignas.
	PM2	Ausência em controles (ou em baixa frequência para doenças recessivas) nos bancos de dados populacionais.
	PM3	Para doenças recessivas, variantes patogênicas detectadas em *trans.*
	PM4	Mudança no tamanho da proteína decorrente de deleções ou inserções *in frame* em região não repetitiva ou variantes *stop-loss.*
	PM5	Nova troca missense em aminoácido, onde outra troca de bases já foi descrita como patogênica.
	PM6	Mutação *de novo* sem paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença.
Complementar PP (*supporting*)	PP1	Cosegregação genótipo-fenótipo positiva.
	PP2	Variante *missense* em um gene com baixa taxa de variantes *missenses* benignas, quando essas são um mecanismo conhecido da doença.
	PP3	Múltiplas evidências computacionais (predição *in silico*) de diferentes algoritmos que suportam o efeito deletério da troca proteica.
	PP4	O fenótipo e a história familiar do paciente são típicos de doenças monogênicas.
	PP5	Variantes relatadas na literatura como patogênicas.

*Extraída da diretriz americana ACMG (36), tradução nossa.

Tabela 3: Somatória dos critérios para a classificação de variantes, segundo o ACMG.

Patogênicas **(1)**	PVS1 + 1 PS PVS1 + 2 PM PVS1 + 1 PM + 1PP PVS 1 + 2 PP 2 PS 1 PS + 3 PM 1 PS + 2 PM + 2 PP 1 PS + 1 PM + 4 PP
Provavelmente Patogênicas **(2)**	1 PVS + 1 PM 1 PS + 1 PM 1 PS + 2 PP 3 2 PP 1 PM + 4 PP PM 2 PM +
Variantes de Significado Incerto **(VSI)**	Ausência dos critérios acima requeridos
Variantes em Genes de Significado Incerto **(GSI)**	Variante em um gene sem uma associação validada com o fenótipo

*Extraída da diretriz americana ACMG [36], tradução nossa.

Os probandos tiveram suas variantes analisadas para 12 genes relacionados com a CAVD incluindo os genes desmossomais *PKP2, DSC2, DSG2, DSP* e *JUP* e genes não desmossomais *TMEM43, CTNNA3, LMNA, DES, TGFB3, TTN* e *RYR2*. Para variantes no gene *TTN*, apenas variantes truncadas permaneceram para análise de patogenicidade. Quando disponíveis, dados de segregação familiar foram levados em consideração. Para confirmar a existência de um sítio alternativo para as alterações de *splicing*, o RNA total

dos pacientes com este tipo de alteração foi extraído do sangue periférico e transcrito reversamente. O cDNA resultante foi amplificado por PCR (Primers em **ANEXO D**) e os produtos foram sequenciados no sequenciador ABI 3500.

3.3.7 Confirmação pela plataforma *Sanger* de sequenciamento

Algumas variantes encontradas, como inserções e deleções, variantes potencialmente patogênicas que possuiam baixa cobertura por NGS, e todas as regiões com menos do que 90% de cobertura acima de 10x no gene *PKP2*, foram confirmadas por meio do método tradicional de sequenciamento (*Sanger*).

Após a extração do DNA, a reação de PCR convencional foi realizada com *primers* específicos para a região desejada. Após a reação de PCR, foi realizada uma purificação enzimática com ExoSAP-IT® segundo instruções do fabricante para retirada de excesso de *primer* e nucleotídeos livres, seguido de precipitação e sequenciamento das amostras.

A partir da análise do sequenciador automático ABI3500, as sequências foram analisadas no programa de análise *SeqMan* (DNASTAR Lasergene) e comparadas com a sequência referência disponível no banco de dados do NCBI.

3.3.8 Dados clínicos

Todos os casos-índices tiveram seus dados clínicos coletados e tabulados. As informações clínicas obtidas foram sexo, idade, histórico familiar, manifestação clínica inicial (ausência de sintomas, síncope arrítmica, palpitações e parada cardíaca recuperada (recPC)), tempo de seguimento até o momento, tipo de arritmia apresentada, grau de disfunção ventricular (disfunção significativa de VD, disfunção segmentar, isolada de VE ou

biventricular), conduta (CDI ou transplante cardíaco), critérios do *Task Force Criteria* em relação a alterações estruturais e de repolarização (maior ou menor), presença de onda épsilon e taquicardia ventricular sustentada (TV sustentada). Para determinação do predomínio da manifestação arrítmica, foram considerados critérios como a presença de taquicardia ventricular sustentada (TVS), taquicardia ventricular não-sustentada (TVNS), extrassístoles ventriculares (EV) e recPC.

3.3.9 Análise estatística da relação genótipo x fenótipo

As variáveis contínuas foram resumidas em médias e desvios-padrão e comparadas com o teste *T-Student*. As variáveis categóricas foram apresentadas em frequências absolutas e relativas (percentuais) e foram analisadas por meio de tabelas de contingência e comparadas com o teste Chi-Quadrado. Quando o valor absoluto esperado foi menor 5, o teste exato de Fisher foi utilizado. Valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significantes. As variáveis foram selecionadas com base em fatores conhecidos como preditores em estudos publicados anteriormente. Todas as estatísticas foram realizadas no software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA).

3.4 Caracterização funcional em cardiomiócitos diferenciados (hiPSC-CM)

3.4.1 Isolamento e cultivo de células progenitoras de urina (*Urine Progenitor Cells*)

As amostras de urina foram coletadas dos pacientes selecionados do ambulatório de Arritmias Genéticas do Instituto do Coração (Incor) em potes

estéreis, e transferidas para tubos estéreis de 50mL. Os tubos foram então centrifugados, e os *pellets* foram ressuspendidos e colocados em um único tubo com a adição de PBS *(Gibco, Life Technologies)* contendo antibiótico *(Peniciline Streptomicine, Gibco, Life Technologies)*. Depois de um segundo passo de centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em um meio de cultura específico chamado "UPC mix", uma mistura de meio REGM comercial (*Lonza*) e meio DMEM com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*).

As células obtidas foram semeadas em placas de cultura revestidas com gelatina 0,1% e cultivadas no meio "UPC mix" suplementado com FGF2 (fibroblast growth factor 2) (*Life Technologies*) a 2,5 ng/mL. As células não aderentes foram rapidamente removidas durante as trocas de meios diárias. As colónias de UPCs foram observadas entre o dia 3 e o dia 10 após o plaqueamento. Assim que atingiram a confluência, as UPCs foram passadas a outra placa, por meio do método enzimático com Tryple (*Life Technologies*) para amplificação, criopreservação e reprogramação das células em iPSCs.

3.4.2 Biópsia de pele para obtenção e cultivo dos fibroblastos

A biópsia foi realizada em uma sala limpa e por um médico especialista. A área da pele para biópsia foi limpa com Polvidine, e anestesiada subcutaneamente. Um *punch* de 3 mm foi utilizado para coletar o fragmento de pele. O fragmento foi separado em uma solução DMEM adicionado com 20% de FBS e 5% de antibióticos (*Peniciline Streptomicine, Gibco, Life Technologies*). O fragmento foi rapidamente manipulado para a extração dos fibroblastos.

No fluxo laminar, o fragmento foi lavado 4 vezes com PBS adicionado com 5% de antibióticos e cortado com uma tesoura em pequenos pedaços excluindo a parte com gordura da derme e, posteriormente, cortados em pedaços ainda menores utilizando um bisturi. Estes pequenos pedaços foram colocados sobre uma fina camada de FBS numa garrafa de cultura T25 e foram

adicionados 3 mL de DMEM suplementado com 20% de FBS e 2% de antibióticos (denominado D20F2A). A garrafa com células foi deixada na incubadora por 7 dias sem haver troca de meio. Após esse período, foi feita a troca de 3 mL de meio D20F2A a cada 2 dias. Após a garrafa atingir a confluência, as células foram tripsinizadas por 3 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células plaqueadas em uma placa de 100 mm com 10 mL de D20F2A. A troca do meio era realizada a cada 3 dias. Novamente, após atingir confluência, as células passaram por um novo processo de tripsinação, foram contadas e congeladas em meio 60% DMEM, 30% FBS e 10% DMSO.

3.4.3 Reprogramação das UPCs e fibroblastos em hiPSCs usando estratégia de reprogramação não integrativa

As UPCs e os fibroblastos foram reprogramados por meio da estratégia não-integrativa de reprogramação com a utilização de plasmídeos epissomais (método de reprogramação escolhido como padrão em nosso estudo).

As UPCs foram semeadas em um poço de placa de 12 poços revestida com Geltrex (*Life Technologies*) a 10ug/cm^2 com meio de cultura “UPC mix”. No dia 0, as células a serem reprogramadas foram transfectadas com a utilização do Lipofectamine 3000 com plasmídeos de reprogramação (Sistema de Reprogramação Epi5, *Life Technologies*). A troca de meio nos três primeiros dias foi feita utilizando “UPC mix” em seguida, utilizando o meio comercial *Essential 6* (*Gibco, Life Technologies)* suplementado com FGF2 a 10 ng/mL. De acordo com a taxa de crescimento após a transfecção, em torno do dia 7, as células foram passadas a outra placa de 60mm² revestida com Geltrex. Para a passagem foi usada a enzima TryplE. Após cerca de uma semana, colónias de hiPSCs emergiram e o meio *Essential 6* (*Gibco, Life Technologies)* foi substituído pelo meio de cultura *Essential 8* (*Gibco, Life Technologies)* para promover o crescimento adequado das hiPSCs.

Os fibroblastos foram semeados em um poço de placa de 12 poços revestida com Geltrex (*Life Technologies*) a 10ug/cm^2 com meio de cultura D20F2A, específico para fibroblastos. No dia 0, as células a serem reprogramadas foram transfectadas utilizando o Lipofectamine 3000 com plasmídeos de reprogramação (Sistema de Reprogramação Epi5, *Life Technologies*). A troca de meio nos três primeiros dias foi feita com meio D20F2A e, em seguida, com o meio comercial *Essential 8* (*Gibco, Life Technologies).*

O processo completo do isolamento das UPCs e fibroblastos, bem como o processo de reprogramação, pode ser visualizado na **Figura 5**.

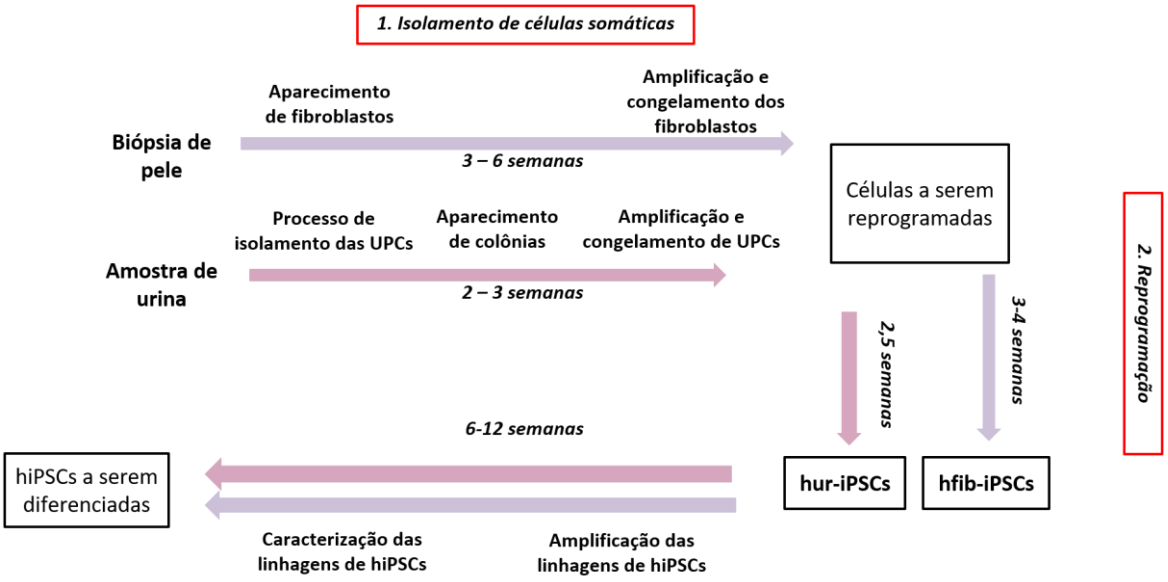

Figura 5: Esquema da cronologia de isolamento das células somáticas (UPCs e fibroblastos) e reprogramação em hiPSC.

3.4.4 Manutenção e expansão das hiPSCs

Os clones de hiPSCs foram escolhidos de acordo com a morfologia típica (colônias homogêneas e bem delimitadas) e foram mantidos em meio de

cultura Essential 8, e foi feita a troca diária do meio. As placas de manutenção eram revestidas previamente com Matrigel (BD BIoscience - #356234).

As passagens das células foram realizadas com o reagente *Versene (*Gibco, Life Technologies) em média a cada 3-4 dias*.* As células foram primeiramente lavadas com PBS estéril e depois foram incubadas com o reagente por 4-5 minutos, para a remoção do cálcio do meio de cultura e liberação das ligações celulares. Optou-se por utilizar o método de dissociação das células por EDTA (*Versene*), de maneira que as células ficam isoladas, sem fazer uso de enzimas de digestão, que por sua vez podem provocar quebra do contato célula-célula, importante para a manutenção do fenótipo das iPSCs. As células foram então replaqueadas em uma nova placa, com diluição dependente da confluência dos poços no dia da passagem, variando de 1:3 a 1:6. As células foram sempre mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO2.

3.4.5 Caracterização das hiPSCs

Os clones de hiPSCs selecionados passaram pela etapa de caracterização para confirmação das propriedades deste tipo celular. Uma das primeiras etapas da caracterização consistiu na avaliação morfológica das células, onde foram analisados aspectos característicos às hiPSCs, que são: células de tamanho pequeno, composição nuclear abrangendo quase todo o citoplasma, sem evidências de diferenciação espontânea anormal e células que podem ser facilmente repicadas, que crescem e aderem bem às placas de cultivo[51]. Foi possível notar a morfologia típica de células-tronco pluripotentes humanas em cutlura pois diferem completamente de UPCs em cultura (células "*mesenquimais-like*", com formato de "grão de arroz e sem crescimento em colônias após a primeira passagem).

Em seguida, verificou-se a expressão dos genes relacionados à pluripotência pela técnica de RT-PCR (genes *SOX2, NANOG, OCT3/4, REX 1*) A presença dos fatores de transcrição, OCT4, SOX2, NANOG, e das proteínas de membrana SSEA-4, TRA-1-61, TRA-1-80, foi verificada por meio da técnica

de imunofluorescência, que permite a confirmação visual e localização das proteínas relacionadas à pluripotência.

Para se confirmar a porcentagem de células positivas para algumas destas proteínas, de maneira quantitativa, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo (valor recomendado >80%).

Além disso, foi verificada a presença da alteração específica de cada paciente na linhagem das células-tronco pluripotentes induzidas presentes na linhagem inicial do paciente. Finalmente, verificou-se a integridade cromossômica de cada clone de hiPSCs, para confirmação do cariótipo.

3.4.6 Diferenciação dos clones de hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs)

Os clones de hiPSCs CAVD (hiPSC-2.5 e hiPSC-5.5) e controle (hiPSC-SS109) foram submetidos ao protocolo de diferenciação adaptado pelo laboratório de Laflamme, M.A. et al baseado no protocolo previamente publicado [99,100.] O protocolo utilizado, gerou os cardiomiócitos posteriormente utilizados para os experimentos.

Durante a etapa pré-diferenciação, as células hiPSC de ambos os clones foram expandidas até que se atingisse aproximadamente 70-80% de confluência, utilizando-se o meio mTESR (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) e em seguida iniciado o processo de diferenciação. Para isso, as hiPSCs foram dissociadas utilizando-se o Versene (Life Technologies - # 15040-066) por 4-5 minutos. As células foram ressuspendidas em meio mTESR suplementado por 10 µM Ri e contadas manualmente. Foram plaqueadas aproximadamente $5x10^5$ células por poço de uma placa de 6 poços.

O dia em que a diferenciação começou foi considerado o dia 0, no qual as hiPSCs receberam o meio de diferenciação de cardiomiócitos, “StemPro básico”- constituído de StemPro (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), L-glutamina (2 mM, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), transferrina (150 µg /

mL, Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, EUA), monotioglicerol (MTG; 50 µg / mL, Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, EUA), ácido ascórbico (50 mg / mL, Sigma-Aldrich , St. Lois, MO, EUA)- junto a ROCK Inhibitor Y-27632 (RI; 10 µM, Tocris Bioscience, Oakville, ON, Canadá) e proteína morfogenética óssea-4 (BMP4, 1 ng / mL, R & D, Minneapolis, MN, EUA) e incubados durante a noite a 37°C, sob constante agitação de 65rpm. Esta primeira etapa é realizada para a agregação das células individuais e formação dos corpos embrióides (ou EBs, do ingês, embryoid bodies). No dia seguinte, os agregados foram tratados em série com activina A (9 ng / mL, R & D, Minneapolis, MN, EUA), proteína morfogenética óssea-4 (BMP4, 10 ng / mL, R & D, Minneapolis, MN, EUA) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF, 5ng / mL, R & D, Minneapolis, MN, EUA) para indução de mesoderme. Dois dias após a indução, o meio foi substituído por “StemPro básico” com iWP2 (2 µM, Tocris Bioscience, Oakville, ON, Canadá), fator de crescimento endotelial (VEGF, 10ng/mL, Stemcell Technologies #78159) e ROCK Inhibitor (10 µM) por dois dias. A última etapa foi seguida por troca completa do meio, com “Stempro básico”, realizada a cada dois dias até o dia 20 da diferenciação, no qual os corpos embrióides foram dissociados para criopreservação e/ou cultivados para experimentos posteriores.

Os corpos embrióides foram dissociados enzimaticamente em células individuais com colagenase tipo 2 (1g/L em HBSS, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) durante a noite em temperatura ambiente, protegidos da luz. No dia seguinte, o precipitado de células foi ressuspenso em TrypLE (Life Technologies, Carlsbad , CA, EUA) com DNase I (10 µg / mL, EMD Millipore, Etobicoke, ON, Canadá), e as células foram criopreservadas como descrito anteriormente [101] com o reagente CryoStor® CS10 (Stem Cells Technologies, #07930).

3.4.7 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para verificação da eficiência do protocolo de diferenciação. Inicialmente, foi verificada a indução de mesoderme nos corpos embrióides, monitorando as células quanto à expressão de CD56 e PdgfR-a, no dia 3 da diferenciação, utilizando-se anticorpos específicos (Hu CD140a PE aR1, BD Pharmigen, #556002; Hu CD56 APC B159, BD Pharmigen, #555518, respectivamente).

Como descrito anteriormente, no dia 20 da diferenciação os corpos embrióides foram dissociados com uma solução de Colagenase II (Hank´s Buffer (HBSS), Thermo Fisher, #14025092 + Colagenase tipo 2, Worthington, #LS004176) durante aproximadamente 16 horas. No dia seguinte, foram primeiramente centrifugados a 1000 rpm por 2 minutos, e em seguida adicionou-se a enzima de dissociação TrypLE (TrypLE Express Enzyme 1x, Thermo Fisher, # 12604013) por 3-5 minutos e incubadas a 37ºC, para a dissociação dos corpos embrióides que ainda não haviam sido completamente dissociados. As células foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem (PBS + 5% FBS), para que não houvessem resquícios de enzima junto às células. Entre as lavagens, foram feitas centrifugações de 1000 rpm por 5 minutos. As células foram então fixadas em 200ul de paraformaldeído (PFA) 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, as células foram novamente lavadas duas vezes e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Após fixadas, as células foram ressuspendidas em 20ul de PBS gelado para que o pellet fosse desfeito e adicionou-se 180ul de metanol 90% gelado por 20 minutos a 4°C, fazendo com que ocorra o processo de permeabilização. Após esta etapa, as células foram centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos e o metanol cuidadosamente retirado. Para cada amostra, $2{,}5x10^5$ células foram separadas em 2 tubos e lavadas duas vezes com a solução de lavagem. Apenas 1 dos tubos de cada amostra teve as células ressuspendidas em 200 µL de solução de lavagem contendo os anticorpos primários cardiac Troponin-T (Thermofisher, #MS295) e MLC2V (Abcam, #79935), durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 4^oC. Na manhã seguinte, as células foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem e centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos. Em seguida, as células de ambos os tubos para cada amostra foram ressuspendidas em 200 µL da solução de

lavagem contendo os anticorpos secundários APC Goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen, #550826) e PE Donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, #711116152) na diluição 1:2000 e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, protegidas da luz. Ao final, as células foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem e transferidas para tubos de citometria (BD Biosciences - #352052). Pelo menos 10.000 eventos foram lidos no citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences) e analisados pelo software Flowing (Perttu Terho).

3.4.8 Imunofluorescência

A imunofluorescência dos cardiomiócitos diferenciados (CAVD-CMs e controle-CM) foi realizada em lâminas de vidro devido à necessidade de visualização adequada no microscópio confocal. As células foram previamente plaqueadas sobre lamínulas circulares de vidro de 12mm de diâmetro revestidas com Matrigel, e o protocolo se iniciou de dois a três dias após o plaqueamento.

As células foram primeiramente lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, as células foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi substituída por PBS + 5% NGS + 0.1% Triton X-100 contendo os anticorpos primários diluídos (**Tabela 4**) durante a noite (em torno de 18 horas) a 4°C. Após incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e uma nova incubação foi feita com os respectivos anticorpos secundários diluídos (**Tabela 4**) em por PBS + 5% NGS + 0.1% Triton X-100 por 1:30h à temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse tempo, foi retirada a solução com os anticorpos secundários e adicionada uma nova solução com marcador Hoechst 33342 (Life Technologies, #H3570) para marcar o DNA (núcleo) celular por 5 minutos a temperatura ambiente e sob proteção da luz. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e analisadas no microscópio confocal de laser invertido Olympus IX81 (Olympus).

As imagens foram analisadas e tratadas no software Olympus FluoView FV100 (Olympus).

Tabela 4: Lista de anticorpos utilizados para imunofluorescência.

Anticorpo primário	Hospedeiro	Fabricante	No. Catálogo	Epítopo	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Oct4A	Rabbit	Cellsignaling	#2840S	IgG	1:400	AF anti-rabbit	1:200
Nanog	Rabbit	Cellsignaling	#4903S	IgG	1:600	AF anti-rabbit	1:200
Sox2	Rabbit	Cellsignaling	#3579S	IgG	1:200	AF anti-rabbit	1:200
TRA-1-60	Mouse	Cellsignaling	#4746S	IgM	1:500	AF anti-mouse	1:200
TRA-1-81	Mouse	Cellsignaling	#4745S	IgM	1:500	AF anti-mouse	1:200
SSEA4	Mouse	Cellsignaling	#4755S	IgG3	1:500	AF anti-mouse	1:200
Troponin-T	Mouse	Abcam	Ab8295	IgG1	1:100	AF anti-mouse	1:200
A-actinin	Rabbit	Abcam	Ab137346	IgG	1:100	AF anti-rabbit	1:200
DSC2/3	Mouse	Santa Cruz	Sc-53485	IgG1	1:200	AF anti-mouse	1:200
PKP2	Mouse	Santa Cruz	Sc-393711	IgG2a	1:200	AF anti-mouse	1:200
PPAR-γ	Mouse	Santa Cruz	Sc-7273	IgG1	1:50	AF anti-mouse	1:200

3.4.9 Ensaios funcionais e de caracterização para modelagem da CAVD

Todos os ensaios realizados a fim de caracterizar e comparar a funcionalidade dentro do modelo celular para CAVD, foram feitos em três replicatas biológicas de cada clone, ou seja, três grupos de cardiomiócitos gerados em rodadas diferentes de diferenciações, a fim de se excluir qualquer viés decorrente da análise de uma única diferenciação. Além disso, para cada uma das três replicatas biológicas, foram analisadas três replicatas técnicas, representadas pela repetição de uma mesma amostra para evitar qualquer erro técnico, como por exemplo, diferenças na pipetagem ou quantidade de reagentes por reação.

3.4.9.1 Extração de RNA dos hiPSC-CMs e reação de polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

O RNA total dos cardiomiócitos foi isolado utilizando-se o kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, #12183018A). O Rna mensageiro (RNAm) foi reversamente transcrito e o cDNA gerado utilizando-se o kit contendo a enzima de transcrição reversa iScript Reverse transcription Supermix (BioRad - #1708840) de acordo com os manuais do fabricante.

A reação de qRT-PCR foi realizada no equipamento CFX Connect Real-Time system (BioRad). Os primers utilizados estão listados na **Tabela 5**. O gene GAPDH foi utilizado como normalizador. Todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 amostras (Life Technologies - #4346907).

O ensaio consistiu de reações contendo 5 µl de cDNA template (2,5 ng/µL), 1 µl de cada primer senso e antisenso específicos para cada gene em estudo (200 nM final), 10 µL do SYBR Green Super Mix (BioRad, #172-5271) e 4 µL de água DEPC, totalizando um volume final de 20 µL. O protocolo da reação de amplificação foi: 40 ciclos de 98°C por 30 segundos para a ativação da i-Taq Polymerase, seguido por de 98 °C por 10 segundos (desnaturação do DNA) e 60 °C por 30 segundos (associação do primer e extensão). A coleta do sinal fluorescente foi realizada ao final de cada ciclo.

Para excluir a possibilidade de contaminação, foi realizado um controle negativo para cada gene que consistiu em uma reação com ausência de cDNA (NTC, do inglês No Template Control). As amostras (controle-CM e CAVD-CMs) analisadas para um mesmo gene, incluindo seus respectivos controles negativos, foram realizadas a partir de uma mesma mistura de reagentes (“mix”) e na mesma placa óptica. Todas as reações foram processadas em triplicata.

Os valores médios de Ct para cada gene de interesse foram subtraídos pelos respectivos valores médios de Ct obtidos para o gene normalizador (GAPDH). Esse valor normalizado corresponde ao Ct final para cada amostra. A diferença de expressão gênica nas diferentes amostras foi analisada comparando-se as médias de ΔCt. Foram realizadas comparações

das três médias de ΔCt por meio do teste ANOVA, fazendo-se também comparações múltiplas para cada amostra em relação a todas as outras. Para dados não pareados e em todos os casos foi adotado um nível de significância de 5 % ($p<0.05$). Os dados foram apresentados em expressão relativa, de acordo com 2-ΔΔCt representando quantas vezes cada gene está mais ou menos expresso em relação à amostra controle [102].

Tabela 5: Primers usados para os experimentos de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Gene	Senso	Anti-senso
PPAR-γ	AAGAAGACGGAGACAGACA	GCAACTGGAAGAAGGGAAA
PKP2	GCAAATGGTTTGCTCGATTT	GGCTGGTAATCTGCAATGGT
DSC2	CACTTACTCGGAGTGGCACAGT	AGCTGGAGATCCTCTTCCCTCA

3.4.9.2 Marcação das gotas lipídicas com Nile Red

A marcação das gotas lipídicas intracelulares, para o estudo da biogênese das mesmas, foi realizada com um kit específico contendo o corante fluorescente Nile Red (Lipid Droplets Fluorescence Assay Kit, Cayman, #500001). Após serem dissociados no dia 20 da diferenciação, os cardiomiócitos individuais foram primeiramente fixados com PFA 4%. Posteriormente, as células foram marcadas com o fluoróforo conforme intruções do fabricante. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo, e a variação da intensidade de fluorescência de cada amostra foi quantificada. Ainda, foi utilizado o ácico oleico para induzir a biogênese de gotas lipídicas em uma amostra, que foi considerada como controle positivo para a quantificação.

3.4.9.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão, os corpos embrióides (aproximadamente 1 milhão de células para cada amostra) foram fixados em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. As mesmas foram lavadas em tampão, fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em em seguida colocadas em solução tampão por 2 horas. Após, foram desidratadas em uma série graduada de etanol, 70% a 100% seguido por duas lavagens de óxido de propileno.

Finalmente as amostras foram embebidas em resina Quetol-Spurr e curadas durante a noite a 60 ° C. Secções de 90nm de espessura foram cortadas em um ultramicrótomo Leica EM UC7, coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram então visualizadas e as imagens foram feitas usando-se o microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai 20.

3.4.9.4 Ensaios de *multi-electrode array* (*MEA*) para medição da duração do potencial de campo

Para o estudo eletrofisiológico dos cardiomiócitos e medição da duração de potencial de campo (do inglês*, field potential duration* ou FPD), foi utilizado o sistema MEA (do inglês, *multi electode array*) MED64 (Alpha MED Scientific), que permite gravações simultâneas dos cardiomiócitos em monocamada (*in vitro*). Foram utilizados para os ensaios chips específicos contendo 64 eletrodos de platina ou nanotubos de carbono (50 μm), isolados por 150μm entre eles com poliamida, todos materiais hidrofóbicos (**Figura 6**). Para tornar a superfície mais hidrofílica, o chip foi revestido de Polietilenoimina (PEI) 0.1% e em seguida com Matrigel, para que as células crescessem sobre a superfície dos eletrodos. Ao atingirem o dia 20 da diferenciação, os EBs foram dissociados em células individuais e $3x10^5$ células foram plaqueadas nos chips previamente revestidos (**Figura 7**). O protocolo de plaqueamento das

células e aquisição dos dados, foi feito de acordo com instruções do fabricante. Para aquisição e análise dos dados, utilizou-se o software Mobius, próprio ao sistema MED64. A estimulação das células foi realizada em 2 eletrodos simultaneamente (estimulação dupla), estabelecida com um pulso de amplitude de 50µA com duração de 1ms. O tempo de duração do potencial de campo dos cardiomiócitos sob estimulação, em cada eletrodo, foi determinado como o tempo do valor de amplitude mínima do sinal entre cursores iniciais até o valor de amplitude máxima dos cursores finais (**Figura 8**).

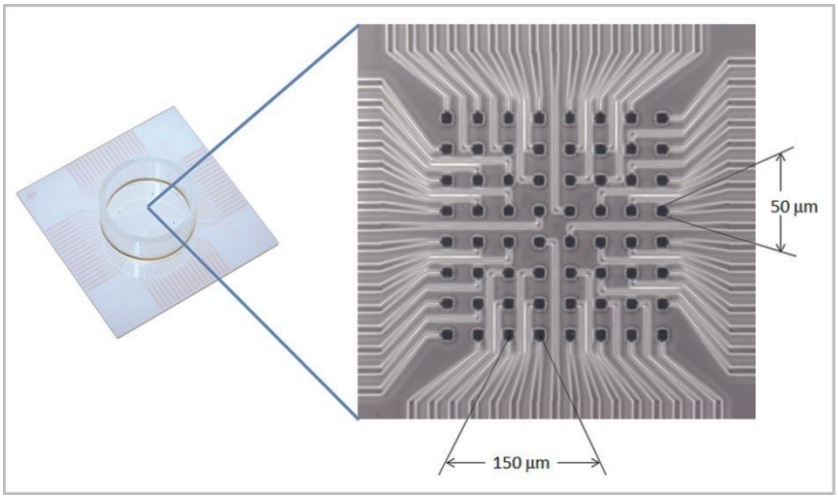

Figura 6: Chip do sistema MED64, contendo os 64 eletrodos de platina ou nanotubos de carbono (50 µm), isolados de 150µm entre eles com poliamida.

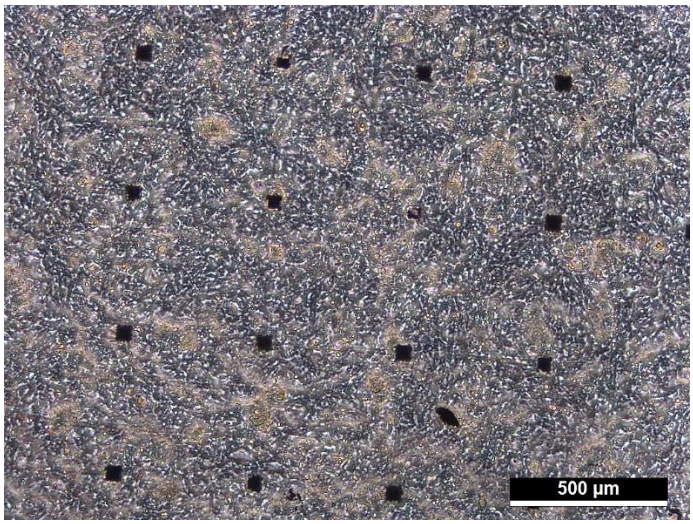

Figura 7: Cardiomiócitos em monocamada plaqueados sob os eletrodos do chip de MEA, antes do início da realização do experimento.

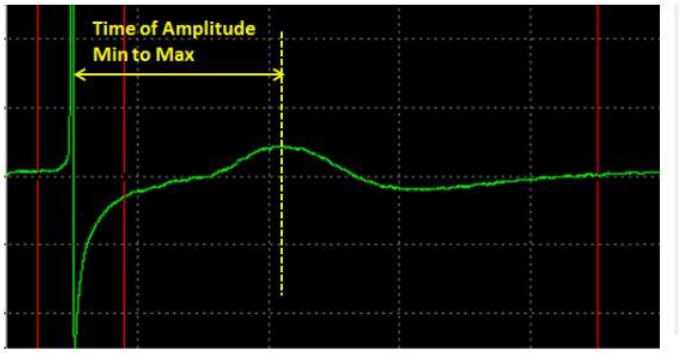

Figura 8: Definição da amplitude mínima (entre os cursores iniciais) e máxima (entre os cursores finais) utilizado para o cálculo da duração do potencial de campo.

3.4.9.5 Criação de um modelo de microtecido cardíaco (*Heart-on-a-chip*)

Com base na limitação de que os cardiomiócitos derivados de hiPSC são majoritariamente imaturos quando comparados com cardiomiócitos ventriculares adultos, e desta forma não serem a melhor forma de reproduzir o modelo da doença *in vitro*, utilizou-se uma plataforma projetada para a criação de um microtecido cardíaco (*Heart-on-a-chip*), em colaboração com Nunes, S.S. e colaboradores. A plataforma foi desenvolvida para fornecer aos cardiomiócitos diferenciados importantes sinais biomiméticos presentes durante o desenvolvimento do embrião, como a cultura de células tridimensionais e composição da matriz extracelular, a fim de induzir e/ou melhorar a maturação dos hiPSC-CMs *in vitro.*

3.4.9.5.1 Preparação do chip de plaqueamento das células

Os dispositivos *Heart-on-a-chip,* que serviram de substrato para os microtecidos cardíacos foram projetados usando o Fusion 360 (Autodesk Canada). Estes dispositivos foram construídos a partir de poli-metil-metacrilato (PMMA) ou poliestireno como base e hastes feitas de polidimetilsiloxano (PDMS). As hastes de PDMS, que possuíam diâmetro de 200µM, foram colocadas em pares horizontalmente nos dispositivos de PMMA ou poliestireno para permitir que os microtecidos cardíacos compactassem entre as hastes após o plaqueamento das células (**Figura 9**). Os dispositivos foram então colocados em placas de petri de 35x15 mm, esterilizadas previamente com etanol 70% e depois lavadas com PBS esterilizado. Para tornar os poços hidrofílicos e para ajudar os tecidos a não se prenderem no substrato, foi adicionado DPBS + 5% BSA estéril nos poços durante uma hora.

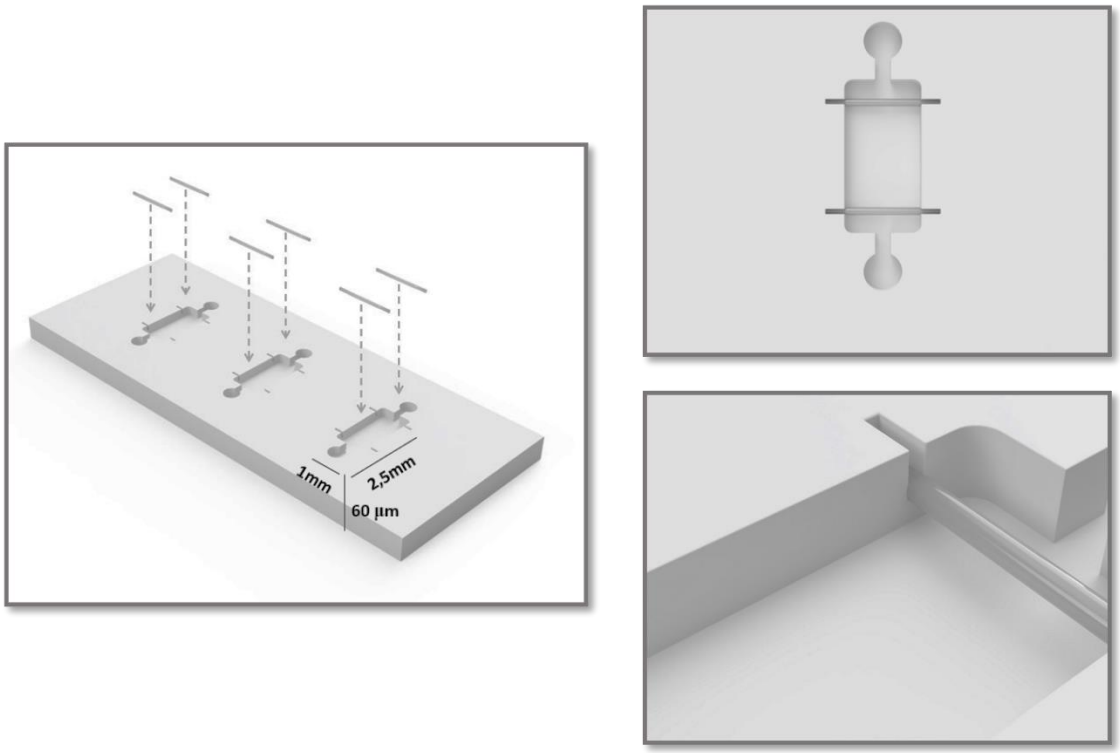

Figura 9 : Dispositivos feitos de poli-metil-metacrilato (PMMA) como base e hastes feitas de polidimetilsiloxano (PDMS). As hastes colocadas em pares horizontalmente nos dispositivos de PMMA para permitir que os microtecidos cardíacos compactassem entre as mesmas após o plaqueamento das células.

3.4.9.5.2 Plaqueamento das células no dispositivo *(Heart-on-a-chip)*

O protocolo de plaqueamento das células no dispositivo foi baseado no protocolo descrito por Breckwoldt et al. 2017 [103], com a utilização de uma preparação de gel de fibrina. A seguinte mistura ("*mix*") foi preparada e mantida em gelo até o momento do plaqueamento celular: Matrigel (1 mg / mL; Corning cat # 354230), fibrinogênio (5 mg / mL; Millipore Sigma cat # F3680), aprotinina (0,00825 mg / mL), Y-27632 (10 nm; STEMCELL cat # 72304) e DMEM -F12 (1x).

Os clones CAVD-CM e controle-CM, previamente caracterizados quanto a sua pureza (>75%), foram descongelados no dia do plaqueamento, contados após descongelamento e combinados a fibroblastos ventriculares humanos (Lonza cat # CC-2904 lote # 0000493460 e 0000565615) numa relação de 4:1 células, respectivamente. As células foram centrifugadas a 180xg a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *mix* de gel de fibrinogênio foi adicionado as células. À medida que as células e o *mix* começaram o processo de gelificação, foram mantidas no gelo para retardar a polimerização. Utilizou-se ponteiras geladas para a adição da trombina (2U/mL; Sigma-Aldrich cat #T7513) ao *mix* de gel de fibrinogênio. Sete (7) µL da preparação de células com a mistura foram rapidamente plaqueados em um dispositivo. Para evitar que os tecidos secassem durante o processo de gelificação, 750µL de meio de cultivo foi adicionado nas placas de Petri com os dispositivos e estes foram incubados a 37°C. Após 48 horas, o meio de cultivo do plaqueamento foi trocado para o um novo meio, livre de soro, contendo os seguintes reagentes: StemPro-34 (ThermoFisher cat # 10639011) suplementado com L-glutamina (2mM), ácido L-ascórbico (50µg/mlL), transferrina, 1-tioglicerol (0,039µL/mL, Sigma-Aldrich cat #M6145) e Gibco Antibiotic-Antimycotic. O meio de cultivo foi substituído a cada dois dias e utilizado durante todo o remodelamento tecidual.

Antes de medir a força contrátil, os tecidos foram deslocados com uma agulha para garantir que estivessem centralizados e não com as extremidades ligadas aos poços **(Figura 10)**. Para as medições de força contrátil, os microtecidos cardíacos foram visualmente capturados em seu batimento espontâneo, bem como quando estimulados eletricamente em seu respectivo limiar de excitação (detalhado abaixo). Foram gravados vídeos das hastes de PDMS por 15 segundos sob uma ampliação de 10X com uma câmera Leica EC3. Após a medição dos tecidos, os mesmos foram realocados em uma nova placa com meio de cultivo fresco, que estivesse próximo de 37°C e 5% de CO2, garantindo assim, a manutenção dos microtecidos e posterior utilização destes para os experimentos seguintes.

Para a estimulação elétrica, os dispositivos com os microtecidos cardíacos foram colocados entre duas hastes paralelas de carbono, (Ladd Research, cat # 30250) espaçadas de 1,5cm entre uma e outra na placa de Petri. O fio de platina (Ladd Research, cat # 30571), um material biocompatível, foi enrolado de forma segura em torno de cada haste de carbono e estendido para o exterior da placa de Petri. Cada fio de platina foi então conectado através de cabos a um estimulador elétrico pulsante (Astro-Med Grass S88X Stimulator). As placas de Petri foram colocadas sob um microscópio, e a voltagem foi gradualmente aumentada de 1V até que o tecido alterasse seu padrão de batimento para coincidir com os pulsos de 1Hz. Também foram gravados vídeos dos tecidos sob estimulação.

A análise de imagens foi realizada com o software ImageJ 1.51 [104] com base nos vídeos adquiridos. Para as medições da força passiva o deslocamento foi calculado com base na distância entre a haste de PDMS no estado relaxado do tecido e a posição original (horizontal) da haste antes da compactação do tecido. Para as medições de força contrátil ativa, o deslocamento foi calculado com base na distância da haste PDMS durante uma batida espontânea ou de 1 Hz (quando sob estímulo elétrico) do tecido contraído em relação a posição das hastes na posição original (hozrizontal). Para o cálculo da força contrátil ativa, a força passiva foi subtraída da força total calculada.

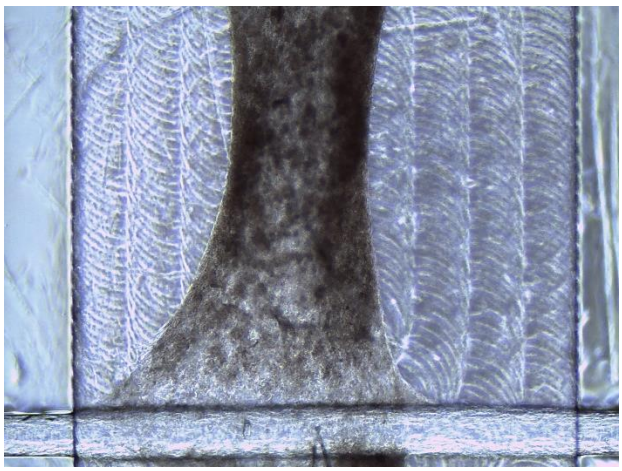

Figura 10: Microtecido do clone controle-CM ligado na parte inferior às hastes de PDMS, após serem deslocados com uma agulha para garantir que estivessem centralizados.

3.4.9.5.3 Análise da força de contração

Foi desenvolvida uma equação de força *versus* o deslocamento para avaliar a força contrátil gerada pelos microtecidos, a partir da medição do deslocamento de hastes de PDMS com diferentes pesos conhecidos. Baseada nos resultados obtidos, uma análise de regressão foi realizada com o MATLAB R2018a usando o Curve Fitting Toolbox. Escolheu-se o seguinte modelo, considerado mais adequado, com um valor de R-quadrado ajustado de 0,9939:

Força Contrátil Ativa (nN mm-2) = (0,002156 y (xa + xp)) + (0,00256 (xa + xp) 2) + (1,55 (xa + xp)) - (0,00256xp2) - (0,002156 xp y) - (1,55 xp)

Onde xp = deslocamento passivo, xa = deslocamento ativo e y = largura.

3.4.9.6 Ensaios de mapeamento óptico para medição da propagação e velocidade de condução do impulso elétrico

O mapeamento ótico (do inglês, *optical mapping*) dos microtecidos foi utilizado como ferramenta para o estudo eletrofisiológico das células, como a propagação e velocidade de condução do impulso elétrico. Os ensaios foram conduzidos em um sistema adaptado, baseado em sistemas previamente descritos [105]. Durante o experimento, as células (microtecidos) foram mantidas em uma base aquecida, cuja a temperatura era controlada em 37º C. Os tecidos foram corados com um corante sensível à voltagem, FluoVolt (FluoVolt™ Membrane Potential Kit, ThermoFisher # F10488), que se liga à camada externa de membranas de bicamada celular de cardiomiócitos. Os microtecidos, que continham as células coradas, foram então excitados por uma fonte de luz com o comprimento de onda de excitação apropriada, que corresponde ao espectro de absorção do corante. Quando o corante retorna ao estado original após ser excitado, emite fótons com um comprimento de onda maior que o da luz de excitação. O sistema ótico então filtra os fótons emitidos e focaliza a luz em um fotodetector, que quantifica a quantidade de luz fluorescente emitida para cada um de seus múltiplos pixels. Os dados foram adquiridos em uma frequência de batimento definida por estimulação externa (por meio de um eletrodo bipolar), na forma de uma série de matrizes de intensidade de fluorescência.

3.4.9.6.1 Marcação dos tecidos com o fluoróforo

Para a realização do experimento, os dispositivos com os microtecidos cardíacos foram transferidos individualmente para uma nova placa com fundo de vidro, Flurodish (WPI Inc, #FD35-100), específica para captação de imagens de alta resolução com a utilização de fluoróforo. Em seguida, cobriu-se os

dispositivos na placa com a solução contendo o fluoróforo FluoVolt™ (Membrane Potential Kit, ThermoFisher # F10488) e foram incubados a 37°C por 30 minutos. A solução continha: 500ul de meio de cultivo (StemPro básico), 1,2 ul da solução estoque de FluoVolt 1000x (componente A) + loading buffer (componente B). Após os 30 minutos de incubação com o fluoróforo, a solução foi retirada e foi feita uma lavagem com solução Tyrode 1x (58,44 g/mol de NaCl + 74,55 g/mol de KCl + 246,47 g/mol MgSO4 + 136,09 g/mol KH2PO4 + 84,01 g/mol NaHCO3 + 180,16 g/mol de Glicose + 110,04 g/mol de Piruvato de Sódio + 147,01 g/mol de CaCl2) aquecida a 37°C. Após a lavagem, foi adicionado 2mL da mesma solução de Tyrode 1x a amostra. Para a captação das imagens foi utilizado o microscópio MVX10 (Olympus) com a objetiva MVPLAPO 0,63X (NA 0,15, WD 87 mm, FN 22, Olympus) onde se obteve um campo de visão de 10 mm x 10 mm. O comprimento de onda utilizado para excitação foi de 490-535nm e o filtro de passagem do fluoróforo FluoVolt foi de 532-588 nm (fluorescência verde).

3.4.9.6.2 Análise das imagens

Foi utilizado o software MetaMorph® (Molecular Devices) para a aquisição das imagens dos transientes, dos microtecidos em batimento espontâneo e sob estimulação. Os parâmetros foram definidos em 2ms de tempo de exposição e 9000 *frames*, o que resultou em uma taxa de 500 *frames* por segundo. Os mesmos parâmetros foram utilizados para a aquisição das imagens dos microtecidos estimulados. Para a estimulação pontual das células, foi utilizado um eletrodo bipolar. O sistema usado para a estimulação elétrica dos microtecidos foi o software PowerLab (ADInstruments), a uma frequência de 1Hz até 3 Hz, aumentando-se o estímulo a cada 0,5Hz, com duração do pulso ajustada em 5ms e voltagem de 10V. A duração dos potenciais de ação óticos (do inglês, *optical action potential duration* ou oAPD) dos microtecidos, foram medidos utizando-se o software MetaMorph. As análises e processamento final das imagens adquiridas foram realizadas no software

MATLAB, utilizando-se um script adaptado de Laughner JI, [105] no laboratório de Laflamme e colaboradores, para a criação de mapas de ativação, duração do potencial de ação e velocidade de condução. Foram selecionadas as regiões de interesse (do inglês, *regions of interest* ou ROI) de cada microtecido, e os potenciais de ação de cada tecido foram determinados manualmente, de acordo com a intensidade de fluorescência média da região ao longo do tempo. A duração de potencial de ação ótico para cada microtecido foi calculado com base na média de 5 APDo medidos.

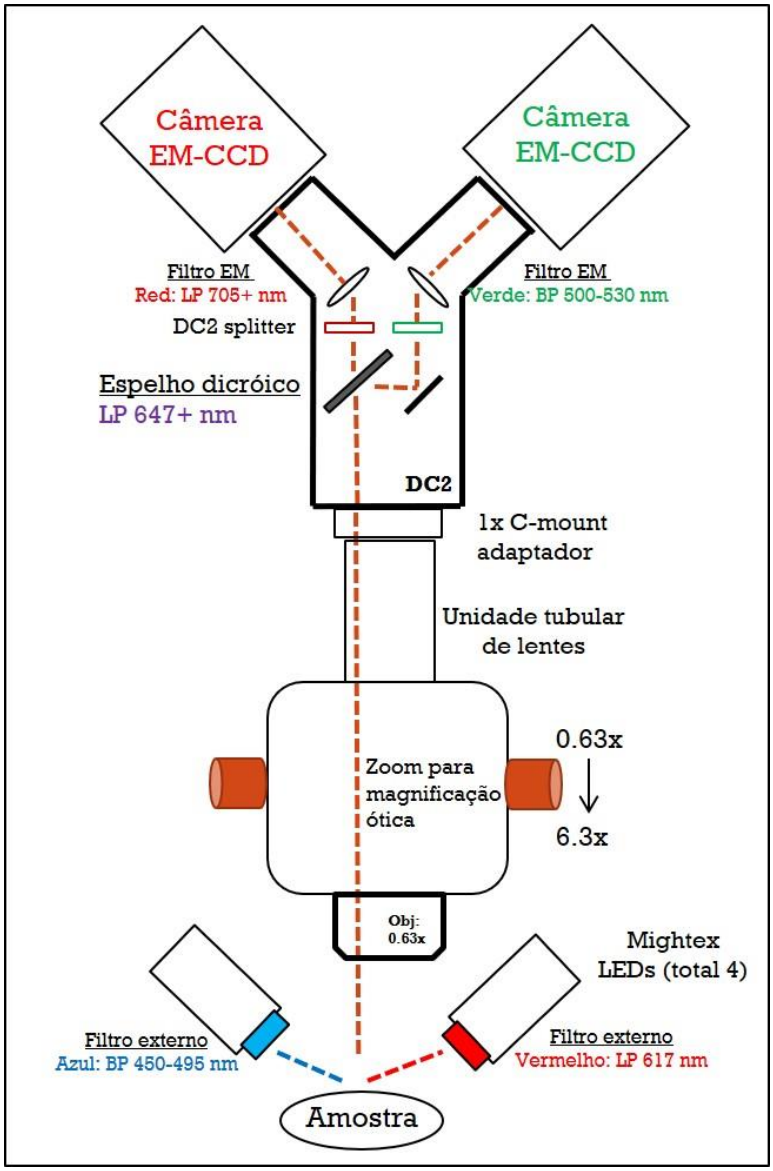

Figura 11: Esquema do sistema de de mapeamento ótico por imagem baseado em dupla câmera EM-CCD e conjunto de filtros utilizados para excitação e emissão. Resumidamente, a luz de excitação é direcionada e filtrada entre uma

banda de 450-490 nm antes de ser refletida na amostra. A luz emitida é dividida nos canais “verde” e “vermelho” primeiramente por um espelho dicróico de 647 nm de extensão dentro do divisor de canal duplo DC2. O sinal de luz "verde" (no caso, FluoVolt) foi então novamente filtrado por banda adicional de 500-530 nm antes de ser visualizado por uma câmara EM-CCD de alta velocidade. Durante o experimento o microtecido foi continuamente aquecido por uma câmara de água com temperatura ajustada (37^0C). A estimulação nas frequências desejadas foi realizada usando-se um eletrodo externo bipolar.

3.4.10 Análise estatística da caracterização funcional com CM diferenciados

As variáveis contínuas foram resumidas em médias e desvios-padrão e as variáveis categóricas foram expressas como frequências. Diferenças entre as médias dos três grupos (2.5 CAVD-CM, 5.5 CAVD-CM e controle-CM) foram calculadas pelo teste de via-única ANOVA, com comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni. Para a análise entre apenas um dos grupos CAVD e o controle, foi realizado o teste *T-student*. Valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Todas as estatísticas foram realizadas no software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA).

4. Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas da casuística analisada

Os dados clínicos dos 47 probandos foram resumidos na

Tabela 6. A média de idade dos pacientes foi de 40,2 anos ± 15,6, dos quais 38 pacientes (81%) eram do sexo masculino. A manifestação clínica mais frequente foi palpitação sustentada (32/47, 68%), seguida de síncope (17/47, 36%) e morte súbita recuperada (4/47, 9%). Cinco pacientes eram assintomáticos (5/47, 11%). Em relação à função ventricular direita avaliada por ressonância magnética cardíaca (RNM) ou ecocardiograma, 21/47 (45%) pacientes apresentaram disfunção importante do ventrículo direito, 16/47 (34%) disfunção moderada e 8/47 (17%) disfunção discreta. Um (1) paciente (2%) apresentou disfunção segmentar isolada e 1 paciente (2%) apresentou disfunção isolada do ventrículo esquerdo. Em 4/47 (9%) pacientes a doença progrediu para disfunção biventricular, necessitando de transplante cardíaco em 3 pacientes (6%). Quarenta e um pacientes (41/47, 87%) apresentaram manifestação arrítmica da doença, enquanto seis pacientes (6/47, 13%) apresentaram insuficiência cardíaca, mostrando um predomínio da manifestação arrítmica da doença. Em relação à presença de CDIs, 33/47 (70%) pacientes possuíam o dispositivo.

Tabela 6: Características clínicas da população analisada.

	Coorte total (n= 47, 100%)	
	n	**%**
Sexo masculino	38	80,85
Idade, média ± DP, anos	40,2 ± 15,56	
Manifestações clínicas iniciais		
Síncope	17	36,17
Palpitação	32	68,09
RecPC	4	8,51
Assintomáticos	5	10,64
Tipo de disfunção		
Disfunção importante de VD	21	44,68
Disfunção moderada de VD	16	34,04
Disfunção discreta de VD	8	17,02
Disfunção segmentar isolada	1	2,13
Disfunção isolada de VE	1	2,13
Disfunção biventricular	4	8,51
Alterações estruturais		
Critério maior	34	72,34
Critério menor	8	17,02
Alterações de repolarização		
Critério maior	37	78,72
Critério menor	5	10,63
Onda épsilon	13	27,65
Eventos		
TV sustentada	26	55,31
CDI	33	70,21
Transplante	3	6,4
Acompanhamento, média ± DP, meses	235,23 ± 79,7	
Clínica prevalente		
Arritmia	41	87,23
ICC	6	12,76

Abreviações: Recuperação de parada cardíaca (recPC); Cardiodesfibrilador implantável (CDI), Taquicardia ventricular (TV), Insuficiência cardíaca (ICC), ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE).

4.1.1 Cobertura média dos genes relacionados à CAVD

Os genes relacionados à CAVD obtiveram suas porcentagens médias de cobertura (acima de 10x) apresentadas na **Tabela 7** e plotadas conforme **Figura 12**. O gene que apresentou maior porcentagem de cobertura média acima de 10x foi o *CTNNA3* (99,42%) e o gene que apresentou o menor percentual de cobertura média foi o *JUP* (87,63%).

Tabela 7: Porcentagens médias de cobertura acima de 10x, para os genes de CAVD, para todas as amostras.

	CTNNA3	***DES***	***DSC2***	***DSG2***	***DSP***	***JUP***	***LMNA***	***PKP2***	***TGFB3***	***TMEM43***	***TTN***	***RYR2***
MÉDIA (%)	99,42	98,78	91,40	90,58	92,89	87,63	87,98	94,51	90,80	91,27	90,04	90,63

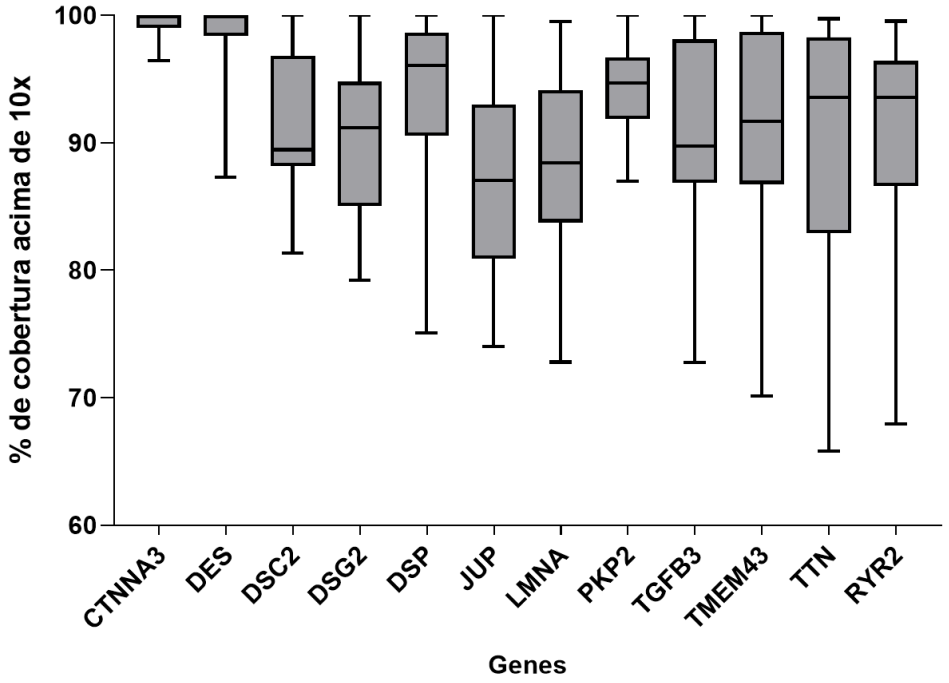

Figura 12: Boxplot da distribuição das porcentagens de cobertura média acima de 10x dos genes associados a CAVD. As caixas representam o intervalo interquartil (IQR). A linha horizontal preta representa a mediana. Barras de erro representam erro padrão da média.

4.2 Alterações encontradas

As amostras foram analisadas de acordo com os critérios descritos anteriormente. Entre os 47 casos-índice, foram encontradas variantes "patogênicas" (1) ou "provavelmente patogênicas" (2) em 18 (38,3%) pacientes, por sua vez considerados casos positivos em relação ao diagnóstico molecular **(Tabela 8).** Entre os casos positivos, encontramos 13 variantes causais distintas em genes comumente associados à CAVD (10 variantes foram consideradas patogênicas (1), 3 variantes foram consideradas provavelmente patogênicas (2)). Quatro delas eram novas variantes raras (não descritas anteriormente). Quatro variantes foram encontradas em mais de um paciente.

Entre os casos positivos, o gene que apresentou maior frequência de alterações foi o *PKP2* (38,8%), com ocorrência de 7 variantes causais distintas, seguido pelo gene *DSC2* com 3 (16,6%), *DSG2* com 2 (11,1%) e *DSP* com 1 (5,5%). Em relação ao tipo de variante causal, 2 foram do tipo *missense*, 1 *non-sense*, 2 inserções, 2 deleções e 6 alterações de sítio de *splicing*. Um dos pacientes da casuística apresentou tanto uma variante “patogênica” quanto uma “variante de significado incerto” (VSI). De acordo com a classificação da ACMG, 16 (34,1%) pacientes apresentavam uma VSI **(Tabela 9).** Dentre os pacientes portadores de VSI, três deles possuíam alteração em mais de um gene relacionado a CAVD. Além disso, foram encontradas VSI em genes não desmossomais (*TTN, RYR2, FLNC*), sendo a maioria das variantes previamente relatadas na literatura. Em 4 (8,5%) pacientes, encontramos variante rara em um “gene de significância incerta” (GSI) **(Tabela 10).** Metade das variantes encontradas em GSI foram previamente relatadas como associadas a fenótipos similares a CAVD, embora em genes que não são comumente associados à doença.

Todas as variantes encontradas e as informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG, são apresentadas na **Tabela 11**.

Tabela 8: Variantes consideradas patogênicas (1) ou provavelmente patogênicas (2) de acordo com a classificação ACMG.

Gene	Alteração de nucleotídeo	Alteração proteica	Número de casos-índices	Descrita ou nova	Classificação ACMG
PKP2	c. 2578-2 A>C #	X	2	D	1
	c.1170+2 T>A #	X	3	D	1
	c.2062T>C	p.Ser688Pro	2	D	2
	c.1689-1C>G	X	1	D	2
	c.1378+1G>C	X	1	D	1
	c.2489+1G>A	X	1	D	1
	c.148_151delACAG	p.Thr50Serfs	1	D	1
DSC2	c.929_930insT	p.Gln310fs	1	N	1
	c.2471C>T	p.Ser824Leu	1	D	2
	c.923C>G	p.Ser308*	1	N	1
DSG2	c.523+1G>C #	X	2	D	1
	c.878_879insA	p.Val295fs	1	N	1
DSP	c.2572delG	p.Glu858fs	1	N	1

Variantes que foram funcionalmente confirmadas pela verificação do RNA. Abreviações: alteração previamente descrita na literatura (D), nova alteração (N).

Tabela 9: Variantes consideradas Variantes de significado incerto (VSI) para CAVD de acordo com a classificação ACMG.

Gene	Alteração de nucleotídeo	Alteração proteica	Número de casos-índices	Descrita ou nova	Classificação ACMG
PKP2	c.2383G>C	p.Ala795Pro	1	N	VSI
	c.1187G>A	p.Gly396Asp	1	N	VSI
DSC2	c.2194T>G	p.Leu732Val	1	D	VSI
	c.813T>A	p.Asp271Glu	1	N	VSI
DSG2	c.354T>A	p.Asp118Glu	1	N	VSI
	c.1003A>G	p.Thr335Ala	1	D	VSI
	c.1478A>G	p.Asn493Ser	2	D	VSI
DSP	c.6188G>A	p.Arg2063Gln	1	D	VSI
	c.1352G>A	p.Arg451His	1	D	VSI
TTN	c.22240G>T	p.Glu7414*	1	D	VSI
RYR2	c.3380 A>G	p.Glu1127Gly	1	D	VSI
	c.3361G>C	p.Gly1121Arg	1	D	VSI
FLNC	c.1606G>A	p.Glu536Lys	1	D	VSI
	c.8053A>T	p.Lys2685*	1	N	VSI
	c.7094A>G	p.Lys2365Arg	1	N	VSI

Abreviações: alteração previamente descrita na literatura (D), nova alteração (N).

Tabela 10: Variantes consideradas Genes de significado incerto (GSI) para CAVD de acordo com a classificação ACMG.

Gene	Alteração de nucleotídeo	Alteração proteica	Número de casos-índices	Descrita ou nova	Classificação ACMG
SCN10A	c.5200G>A	p.Glu1734Lys	1	N	GSI
	c.2441G>A	p.Arg814His	1	D	GSI
	c.472T>G	p.Tyr158Asp	1	D	GSI
LDB3	c.1502T>C	p.Phe501Ser	1	N	GSI

Abreviações: alteração previamente descrita na literatura (D), nova alteração (N).

Tabela 11: Variantes encontradas e informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG. Abreviações: Amostra (AM); PROVEAN (Pr); SIFT (S); PolyPhen-2 (P2); *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG); negativa (neg). Legenda da Classificação ACMG: Patogênica (1); Possivelmente Patogênica (2); Variante de Significado Incerto (VSI), Gene de Significado Incerto (GSI).

AM	**Gene**	**Alteração**	**Predição *in silico***			**gnomAD (%)**	**ClinVar**	**ACMG**	***Task Force Criteria***	
			Pr	**S**	**P2**				**Maiores**	**Menores**
1	*PKP2*	c. 2578-2 A>C	---	---	---	---	---	1	2	1
2	*PKP2*	c.1170+2 T>A	---	---	---	---	Pathogenic/Likely Pathogenic	1	1	2
3	*DSC2*	929_930insT	---	---	---	---	---	1	2	1
4	ausente	---	---	---	---	---	---	---	1	1
5	*DSC2*	2194T>G	x	x	---	0,0012	Conflicting interpretations	VSI	2	3
	PKP2	2383G>C	x	x	---	---	---	VSI		
6	*DSC2*	2471C>T	x	x	x	0,0108	Uncertain Significance	2	2	2
7	*PKP2*	2062T>C	x	x	x	0,0043	Conflicting interpretations	2	1	1
8	*FLNC*	c.1606G>A	x	x	x	0,0079	Uncertain Significance	VSI	2	3
9	*RYR2*	3380A>G	x	x	x	0,0010	Conflicting interpretations	VSI	2	3

Tabela 11: Variantes encontradas e informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG.

AM	Gene	Alteração	Predição *in silico*			gnomAD (%)	ClinVar	ACMG	*Task Force Criteria*	
			Pr	S	P2				Maiores	Menores
10	*LDB3*	c.1502T>C	x	---	x	0,0067	---	GSI	1	1
11	*FLNC*	c.8053A>T	---	---	---	---	---	VSI	3	2
12	*DSC2*	923C>G	---	---	---	---	---	1	2	2
13	*SCN10A*	c.2441G>A	---	x	x	0.0307	Uncertain Significance	GSI	2	2
	SCN10A	c.472T>G	x	x	x	0.0259	---	GSI		
14	*DSC2*	c.813T>A	x	x	x	---	---	VSI	2	1
15	ausente	---	---	---	---	---	---	---	2	2
16	*DSG2*	c.354T>A	x	x	---	---	---	VSI	2	2
17	*SCN10A*	c.5200G>A	x	x	x	0.0170	---	GSI	2	
18	*DSP*	c.2572delG	---	---	---	---	---	1	1	2
19	*PKP2*	c. 2578-2 A>C	---	---	---	---	---	1	1	3

Tabela 11: Variantes encontradas e informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG.

20	ausente	---	---	---	---	---	---	---	3	2
21	ausente	---	---	---	---	---	---	---	2	2
22	*RYR2*	c.3361G>C	x	---	x	0,0018	---	VSI	1	3
	DSG2	c.523+1G>C	---	---	---	0,0017	Likely Pathogenic	1		
23	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	3	1
24	*PKP2*	C.148_151delACAG	---	---	---	---	Pathogenic	1	1	2
25	*FLNC*	c.7094A>G	x	---	x	0.0021	---	VSI	3	1
26	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	1	2
27	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	2	2
28	*PKP2*	c.1170+2T>A	---	---	---	---	Pathogenic/Likely Pathogenic	1	3	0
29	*DSG2*	c.878_879insA	---	---	---	---	---	1	1	1
30	*PKP2*	c.1187G>A	x	x	---	---	---	VSI	1	2
31	*DSG2*	c.1003A>G	---	x	x	0.0509	Conflicting interpretations	VSI	2	1
32	*DSP*	c.6188G>A	---	x	x	0.0028	Uncertain significance	VSI	2	1
33	*DSP*	c.1352G>A	x	x	---	---	Uncertain significance	VSI	1	2
34	*DSG2*	c.523+1G>C	---	---	---	0.0017	Likely Pathogenic	1	1	1
35	*PKP2*	2062T>C	x	x	x	0,0043	Conflicting interpretations	2	2	0
36	*TTN*	c.22240G>T	---	---	---	---	---	VSI	3	0
37	*PKP2*	c.1689-1C>G	---	---	---	0,0018	Pathogenic	1	2	2

Tabela 12: Variantes encontradas e informações utilizadas na análise e classificação das mesmas, baseadas no ACMG.

AM	Gene	Alteração	Predição *in silico*			gnomAD (%)	ClinVar	ACMG	*Task Force Criteria*	
			Pr	S	P2				Maiores	Menores
38	*PKP2*	c.1170+2T>A	---	---	---	---	Pathogenic/Likely Pathogenic	1	2	3
39	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	3	3
40	*PKP2*	c.1378+1G>C	---	---	---	0.04073	Pathogenic/Likely Pathogenic	1	2	4
41	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	2	1
42	*DSG2*	c.1478A>G	x	---	x	0.006054	Uncertain significance	VSI	2	1
43	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	3	1
44	*DSG2*	c.1478A>G	x	x	x	0.006054	Uncertain significance	VSI	1	2
45	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	2	1
46	ausente	---	---	---	---	---	---	neg	3	1
47	*PKP2*	c.2489+1G>A	---	---	---	0.0028%	Pathogenic	1	2	2

Abreviações: Amostra (AM); PROVEAN (Pr); SIFT (S); PolyPhen-2 (P2); *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG); negativa (neg). Legenda da Classificação ACMG: Patogênica (1); Possivelmente Patogênica (2); Variante de Significado Incerto (VSI), Gene de significado incerto (GSI).

4.3 Associação Genótipo- Fenótipo

As variáveis clínicas foram primeiramente analisadas conforme a presença de alteração *versus* ausência de alteração (**Tabela 12**). Ambos os grupos apresentaram maior prevalência do sexo masculino (78% e 83%) e a idade de início foi semelhante (40,21 ± 15,56 e 40,24 ± 16,11).

A variável história familiar de morte súbita cardíaca abaixo de 35 anos foi significativamente associada a portadores de variantes causais (p=0,04). Além disso, os 5 pacientes assintomáticos da coorte apresentaram uma variante patogênica ou provavelmente patogênica.

As variáveis taquicardia ventricular sustentada, presença de onda T invertida e épsilon, tiveram frequências semelhantes entre aqueles com e sem variantes causais (p=0,07, p=0,11, e p=0,22, respectivamente). Pacientes com disfunção importante do ventrículo direito ou disfunção biventricular não apresentaram diferenças significativas entre portadores e não portadores de variantes causais (p=0,98 e p=0,28, respectivamente). Além disso, não houve diferença significativa na comparação no desenvolvimento de insuficiência cardíaca entre os grupos (P> 0,999).

Curiosamente, os 3 pacientes portadores de mais de uma variante causal eram mais velhos (40, 45 e 58 anos) quando comparados à idade média de apresentação clínica da doença em nossa casuística. Nenhum dos três pacientes com múltiplas alterações apresentou disfunção significativa do VD.

Em seguida, foi realizada uma comparação entre as variáveis clínicas dos pacientes portadores de variantes causais (1 ou 2) no gene *PKP2* ou em outros genes desmossomais, apresentados na **Tabela 13**. Ambos os grupos apresentaram maior prevalência do sexo masculino (82% e 71%) e a idade de início foi semelhante (39,55 ± 12,52 e 39,85 ± 13,39).

A presença de CDI nos pacientes foi significativamente associada a portadores de variantes causais no gene *PKP2* (p=**0,01**). Além disso, dentre os pacientes assintomáticos da coorte, a ausência de sintomas estava mais relacionada a pacientes portadores de uma variante causal em algum gene

desmossomal que não o *PKP2* (p=0,04). Para as demais variáveis clínicas, não houveram diferenças significativas entre os dois grupos.

Tabela 12: Características clínicas dos casos-índice de CAVD relacionados á presença ou ausência de variantes causais (Patogênicas ou Provavelmente Patogênicas).

Total (n=47)	**Presença de variantes causais (n=18)**	**Ausência de variantes causais (n=29)**	***p-valor****
	n (%)	**n (%)**	
Gênero			0,7155*
Masculino (n=38)	14 (77,7%)	24 (82,75%)	
Feminino (n=9)	4 (22,2%)	5 (17,2%)	
Idade de apresentação clínica, média ± DP,anos	40,21 ± 15,56	40,24 ± 16,11	0,8224**
Manifestações clínicas iniciais			
Síncope	7 (38,9%)	10 (34,5%)	0,7599
CDI	10 (55,5%)	19 (65,5%)	0,4946
RecPC	2 (11,1%)	2 (6,9%)	0,6313*
Assintomáticos	5 (27,7%)	0 (0%)	**0,0056***
Alterações estruturais			
Critério maior	13 (72,2%)	21 (72,4%)	0,9886
Critério menor	1 (5,5%)	7 (24,1%)	0,0994
Onda T invertida (critério maior)	15 (83,3%)	28 (96,5%)	0,1144
Epsilon (critério maior)	4 (22,2%)	12 (41,4%)	0,2185*
TV sustentada	7 (38,8%)	19 (65,5%)	0,0743
ICC	2 (11,1%)	4 (13,8%)	>0,9999*
Disfunção importante de VD	8 (44,4%)	13 (44,8%)	0,9795
Disfunção biventricular	0 (0%)	4 (13,8%)	0,2830*
Transplante	1 (5,5%)	2 (6,9%)	>0,9999*
História familiar para MS cardíaca (<35 years)	8 (44,4%)	4 (13,8%)	**0,0366***

Testes utilizados: Chi-Quadrado, *Teste Exato de Fisher, ** Teste T-student. Abreviações: Cardio desfibrilador implantável (CDI); parada cardíaca recuperada (RecPC); taquicardia ventricular (TV), insuficiência cardíaca (ICC), ventrículo direito (VD).
p<=0.05 - resultado significativo

Tabela 13: Características clínicas dos pacientes dos casos-índice de CAVD relacionadas ao gene desmossomal causal (*PKP2* ou outros genes desmossomais) (Patogênicas ou Provavelmente Patogênicas).

Total (n=18)	***PKP2* (n=11)**	**Outros genes desmossomais (n=7)**	***p-valor****
	n (%)	**n (%)**	
Gênero			>0,9999*
Masculino (n=38)	9 (81,8%)	5 (71,4%)	
Feminino (n=9)	2 (18,2%)	2 (28,6%)	
Idade de apresentação clínica, média ± DP,anos	39,55 ± 12,52	39,85 ± 13,39	0,7993**
Manifestações clínicas iniciais			
Síncope	5 (45,4%)	2 (28,6%)	0,6371*
CDI	9 (81,8%)	1 (14,3%)	**0,0128***
RecPC	2 (18,2%)	0 (0%)	0,4967*
Assintomáticos	1 (9,1%)	4 (57,2%)	**0,0474***
Alterações estruturais			
Critério maior	8 (72,7%)	5 (71,4%)	>0,9999*
Critério menor	1 (9,1%)	1 (14,3%)	>0,9999*
Onda T invertida	10 (90,9%)	5 (71,4%)	0,5282*
Epsilon	3 (27,3%)	1 (14,3%)	>0,9999*
TV sustentada	5 (45,4%)	2 (28,6%)	0,6371*
ICC	1 (9,1%)	1 (14,3%)	>0,9999*
Disfunção importante de VD	4 (36,4%)	4 (57,1%)	0,6305*
Disfunção biventricular	0 (0%)	0 (0%)	NA
Transplante	1 (9,1%)	0 (0%)	>0,9999*
História familiar para MS cardíaca (<35 years)	6 (54,5%)	2 (28,6%)	0,3665*

Testes utilizados: *Teste Exato de Fisher, ** Teste T-student. Abreviações: Cardio desfibrilador implantável (CDI); parada cardíaca recuperada (RecPC); taquicardia ventricular (TV), insuficiência cardíaca (ICC), ventrículo direito (VD), não avaliado (NA).
p<=0.05 - resultado significativo

4.4 Isolamento de UPCs

O isolamento das células de urina foi realizado para os pacientes CAVD 5 e CAVD 2. Foram coletados 198 mL de urina do paciente CAVD 5, e 480 mL de urina do paciente CAVD 2. As UPCs da primeira amostra (CAVD 5) foram isoladas com sucesso, com a obtenção das primeiras colônias após 6 dias do isolamento (**Figura 13**). Já para a segunda amostra (*CAVD 2*) não obtivemos sucesso em três tentativas de isolamento, uma vez que as células não aderiram à placa e não formaram colônias. As células isoladas do paciente CAVD 5 foram mantidas em cultura e passadas conforme foram atingindo a confluência, até a passagem 3, quando foram congeladas para criopreservação e utilizadas para a reprogramação.

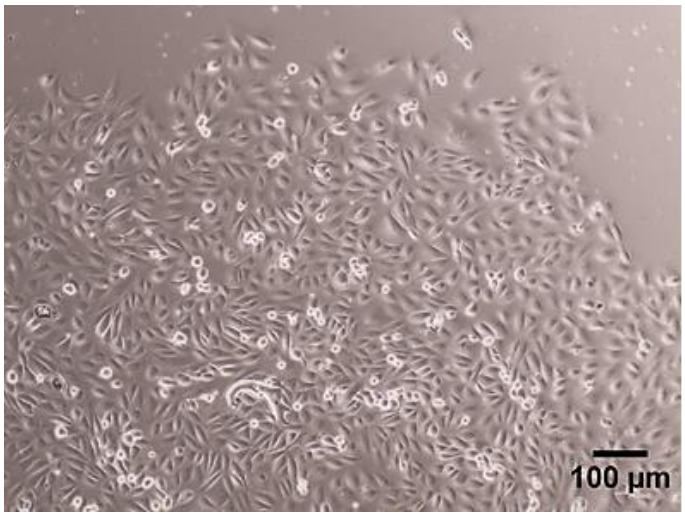

Figura 13: Células presentes em colônia de UPCs do paciente CAVD 5 no dia 6 depois do isolamento Objetiva utilizada para imagem: 20x.

4.5 Extração de fibroblastos

A extração dos fibroblastos foi realizada no paciente CAVD 2, uma vez que não foi possível o isolamento das UPCs a partir da urina para este paciente. Um fragmento de 3mm da pele foi coletado. Os fibroblastos foram extraídos com sucesso, com a obtenção das primeiras células após 20 dias do plaqueamento **(Figura 14).** As células foram mantidas em cultura e passadas conforme foram atingindo a confluência, até a passagem 2, quando foram congeladas para criopreservação e utilizadas para a reprogramação.

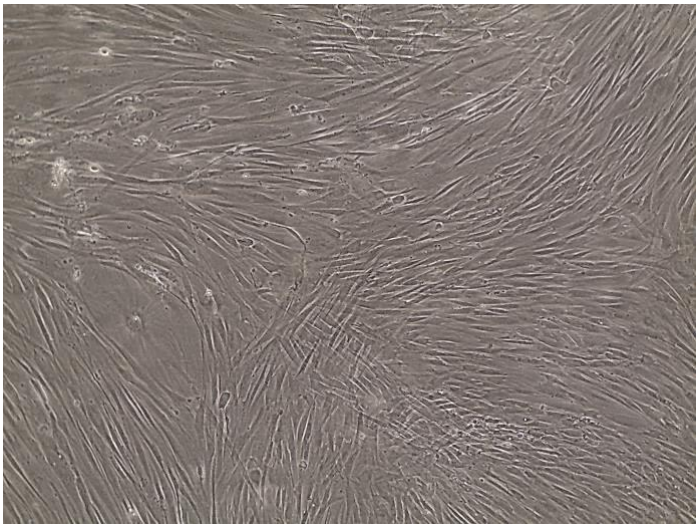

Figura 14: Fibroblastos do paciente CAVD 2 no dia 18 depois da extração. Objetiva utilizada para imagem:10x.

4.6 Reprogramação das UPCs e fibroblastos em hiPSCs

Antes da diferenciação das células em cardiomiócitos para o estudo fenotípico das alterações, as células passaram pela etapa de reprogramação para se tornarem hiPSC. As UPCs e fibroblastos dos respectivos pacientes foram submetidos a reprogramação por meio da transfecção episomal.

Os primeiros clones de iPSCs provenientes das UPCs (CAVD 5) foram morfologicamente identificados entre 12-21 dias de cultivo. Conforme **Figura**

15, foi observada uma camada de UPCs (células alongadas) com a presença de alguns *clusters* compactos com morfologia diferente. Estes clusters eram potenciais colônias de iPSCs que surgiram no poço. Já os primeiros clones de iPSCs provenientes dos fibroblastos (CAVD 2) foram morfologicamente identificados após 30 dias de cultivo. Neste processo, foram selecionados 20 clones de iPSCs para o paciente CAVD 5 e 15 clones para o paciente CAVD 2.

As colônias individuais de iPSC que melhor se adaptaram às condições de cultivo (mantiveram morfologia adequada e baixa taxa de diferenciação espontânea) e proliferaram, foram expandidas, ou seja, passadas isoladamente para múltiplos novos poços. Os clones gerados foram congelados para criopreservação e/ou utilizados para posterior caracterização antes da diferenciação destes em cardiomiócitos.

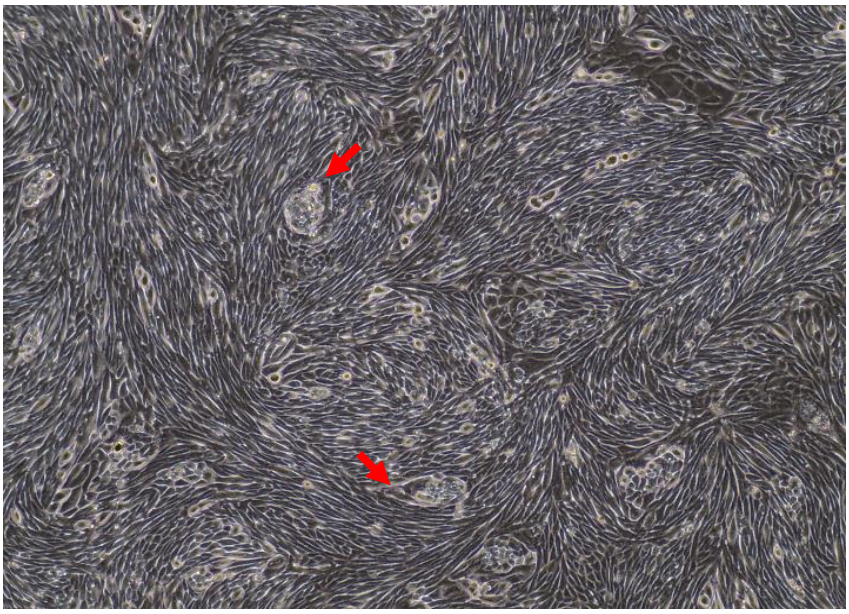

Figura 15: Primeiros clusters de potenciais clones de hiPSCs (paciente CAVD 5) aparentes após 21 dias de cultivo. Objetiva utilizada para imagem: 10x. As setas vermelhas reprentam os clusters emergentes, com morfologia diferente das células ao redor.

4.7 Caracterização dos clones de hiPSCs

Foram feitas algumas análises de caraterização de pelo menos 2 clones de cada paciente. Como controle positivo das células pluripotentes, foram utilizados dois clones de duas linhagens celulares diferentes, ambos gerados e caracterizados previamente por nosso laboratório (LGCM): o primeiro, SS109, a partir de fibroblastos e o segundo, UMVP5, a partir de UPCs.

Os ensaios realizados para a caracterização dos clones quanto à sua pluripotência foram descritos abaixo.

4.7.1 Morfologia

A morfologia das células foi analisada e os clones apresentaram colônias bem definidas, células pequenas, justapostas e composição nuclear abrangendo quase todo o citoplasma, sem evidências de diferenciação espontânea anormal **(Figura 16)**. Além disso, notou-se o fato de que se tratavam de células que puderam ser facilmente repicadas, que cresciam e aderiam bem às placas de cultivo, características estas comuns de hiPSCs.

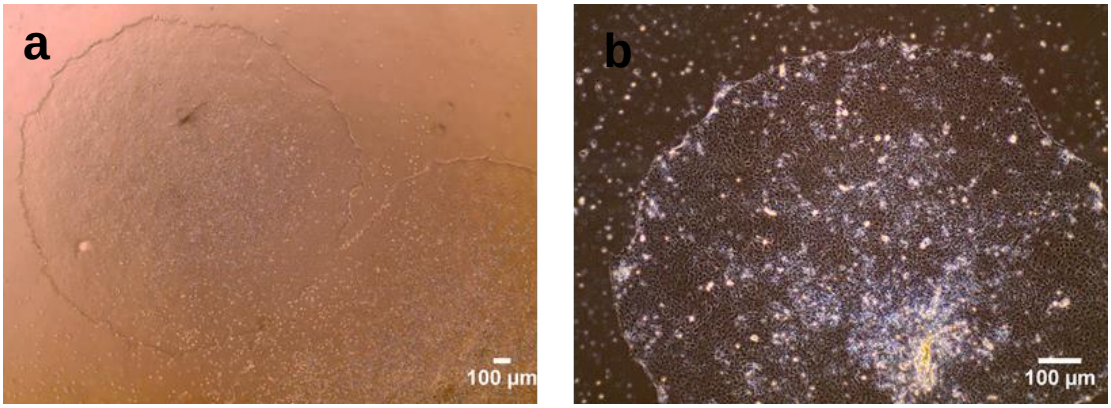

Figura 16: Clones de hiPSCs amplificados apresentando morfologia tipica de hiPSCs. **(a)** paciente CAVD 2 - clone 2.5 (40x). **(b)** paciente CAVD 5 - clone 5.5. Objetiva utilizada para imagem a)10x b) 20x. Escala: 100µm.

4.7.2 Marcadores moleculares

A RT-PCR foi realizada a fim de verificar a expressão gênica de marcadores moleculares presentes em hiPSCs. O ensaio demonstrou que o clone de hiPSCs *CAVD 5.5*, bem como *CAVD 2.5*, expressavam os genes relacionados a pluripotência (*SOX2, NANOG, OCT3/4, REX 1*) (**Figura 17)**. As UPCs (CAVD 5), expressaram em menor quantidade ou não expressaram alguns destes genes (como o *SOX2 e REX1*). Já os fibroblastos (CAVD 2) não expressaram nenhum dos genes. O ensaio reforçou as mudanças profundas que ocorrem nas células durante a reprogramação.

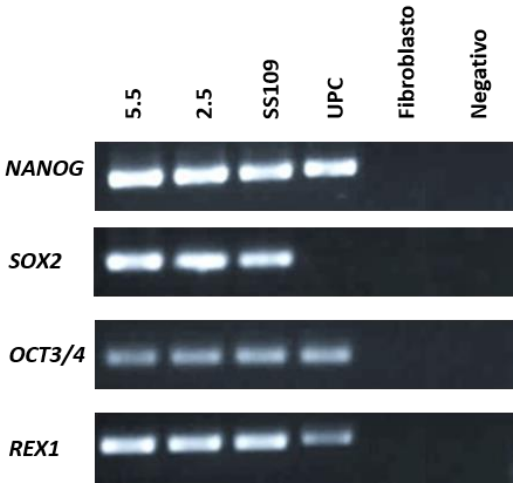

Figura 17: Gel de agarose (1%) da RT-PCR realizada a partir do RNA das células para a verificação da presença dos genes marcadores de pluripotência.

4.7.3 Marcadores proteicos

As hiPSCs geradas foram testadas quanto à expressão de proteínas marcadoras, por meio dos ensaios de imunofluorescência e de citometria de fluxo.

Os resultados da imunofluorescência de um dos clones (5.5) foram apresentados como exemplo na **Figura 18**, onde podemos observar a

presença dos fatores de transcrição SOX2, NANOG, OCT3/4, bem como os marcadores de membrana SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, comumente encontradas em células-tronco pluripotentes. Observamos também na **Figura 18**, que possui imagens da intercalação com DAPI (em azul, marcador inespecífico de DNA), que a maioria das células expressam as proteínas marcadas, e que as mesmas estão localizadas conforme o esperado (fatores de transcrição no núcleo e proteínas de membrana na membrana celular).

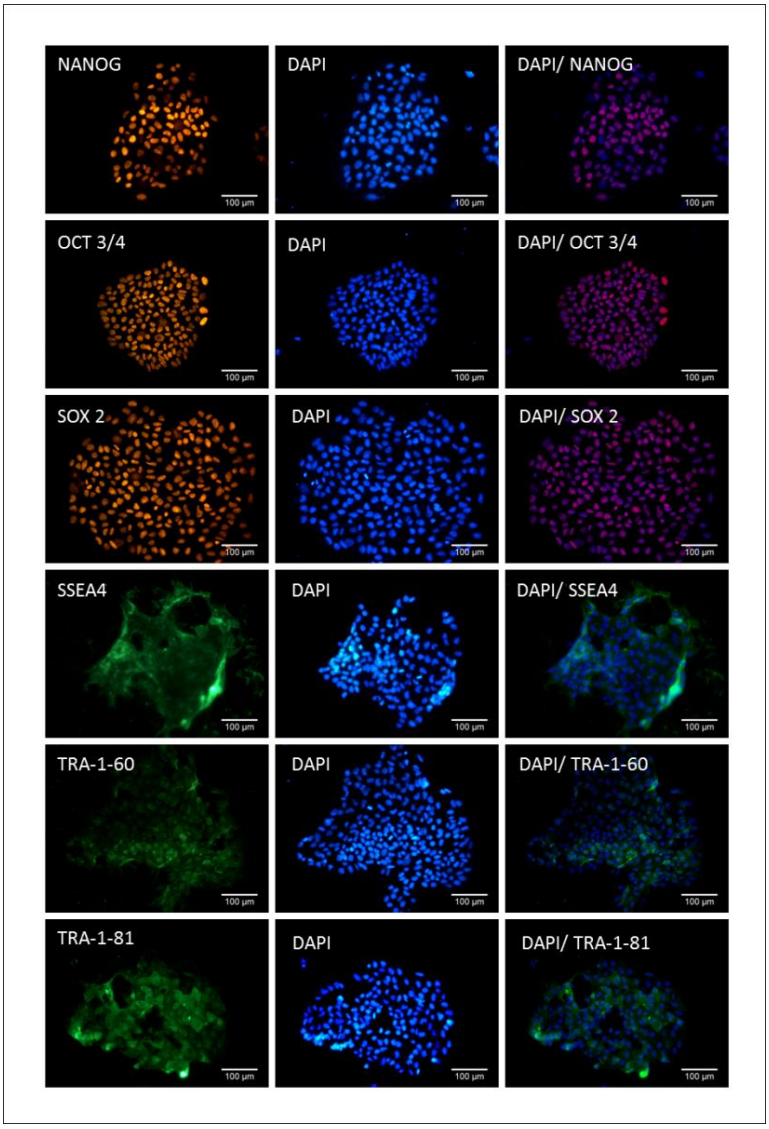

Figura 18: Colônias de hiPSCs do clone 5.5 com expressão das proteínas relacionadas a pluripotência nucleares (OCT 3/4, NANOG e SOX2) e de membrana (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81). DAPI (em azul) marca os núcleos celulares. Barra de escala: 100µm.

Os resultados do experimento de citometria de fluxo são apresentados na **Figura 19** (clone 5.5), na qual pudemos observar que 97,7% das células são positivas para a marcação do anticorpo SSEA-4 e 63,6% das células são positivas para a marcação do anticorpo TRA-1-60. Também foi possível observar a homogeneidade da população de hiPSCs, sendo que a área delimitada (denominada "gate") demarca os eventos (células) com perfil considerado positivo para as análises. Na imagem, vê-se um gráfico que mostra a presença das células sem marcação específica (0%) e um gráfico que mostra a presença de células marcadas apenas com o anticorpo secundário para eliminação do *background*.

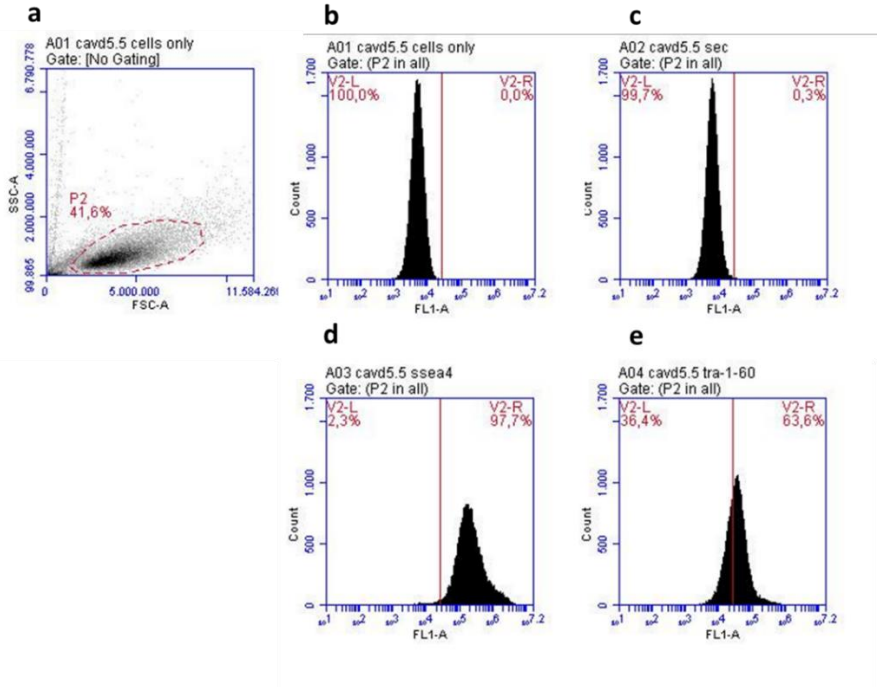

Figura 19: Análise de citometria de fluxo do clone 5.5 (P30) sobre a porcentagem de células que exprimem os marcadores específicos. (a) "Gate" morfológico. (b) células sem marcação. (c) células marcadas com o anticorpo secundário.(d) células marcadas com o anticorpo SSEA-4. (e) células marcadas com o anticorpo TRA-1-60.

4.7.4 Integridade cromossômica e presença das alterações genéticas

O clone controle (SS109) e pelo menos três clones de cada paciente tiveram sua integridade cromossômica verificadas. Alguns clones de ambos os pacientes apresentaram cariótipos anormais, com anormalidades diversas. Os clones que apresentaram cariótipo normal foram selecionados e posteriormente utilizados para a diferenciação em cardiomiócitos. Além do controle, os clones que apresentaram cariótipo normal, 46, XY, foram: 5.5 **(Figura 20)** e 5.17 (CAVD 5), 2.5 e 2.6 (CAVD 2). Desta forma, estes foram os clones utilizados posteriormente. Também foram verificados os cariótipos das células somáticas (UPCs) dos pacientes. Para o paciente CAVD 5, o resultado foi um cariótipo mosaico, 45,X/46,XY, enquanto para o paciente CAVD 2, o resultado foi de cariótipo normal.

Por meio do método de sequenciamento *Sanger*, foi confirmada a presença das alterações nas células UPC e hiPSCs dos pacientes.

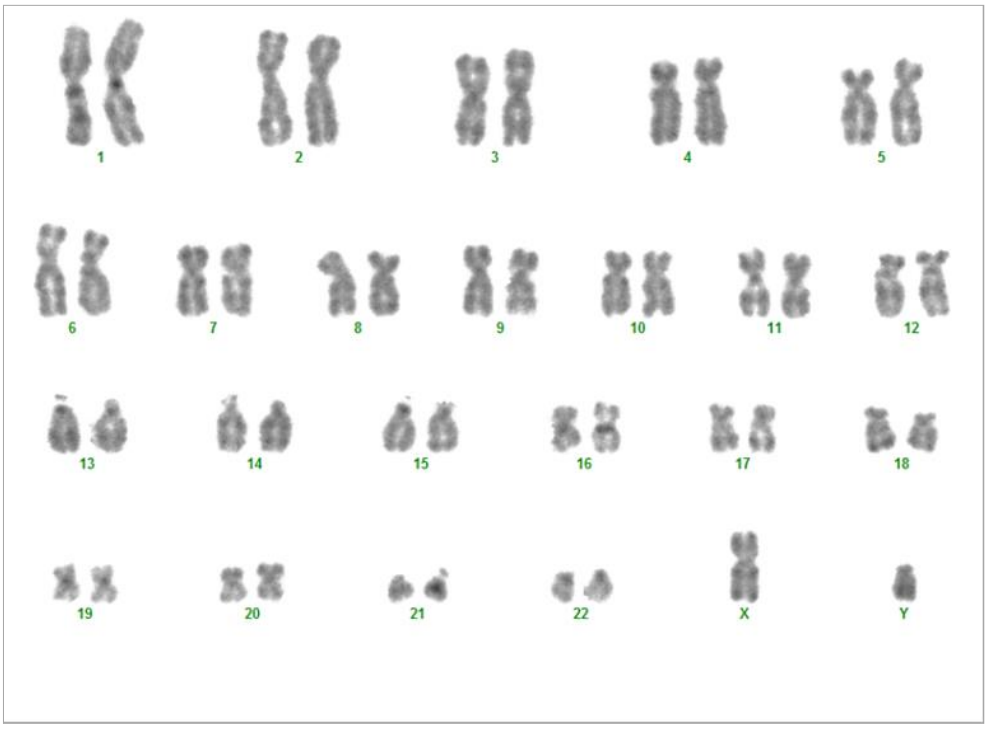

Figura 20: Cariótipo normal 46,XY do clone de hiPSC 5.5.

4.8 Diferenciação dos clones de hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs)

4.8.1 Padronização do protocolo de diferenciação

As diferenciações das hiPSCs em cardiomiócitos foram feitas com protocolo adaptado conforme previamente descrito, que se mostrou eficiente para as hiPSCs utilizadas em nosso estudo. Como ponto de partida na utilização deste protocolo, foram realizados ensaios de padronização para cada clone no que diz respeito a concentração das ´small-molecules´, BMP4 e Activina A, uma vez que cada linhagem celular possui diferente resposta à estas moléculas e, consequentemente, à diferenciação. Foi realizada uma curva de concentrações para estas moléculas, para comparação e determinação da concentração ideal de BMP4 e Activina A. Comparou-se 24 condições: 3, 5, 10, 15 ng/mL de BMP4 combinados a 1,3,6,9,12 e 15 ng/mL de Activina A **(Figura 21).**

Entretanto, após diversas tentativas e ensaios de padronização feitos em 2 clones para cada paciente e 2 clones controles (que possuíam cariótipo normal), foi observada reprodutibilidade quanto a pureza, eficiência e viabilidade dos cardiomiócitos nas diferenciações de apenas 1 clone de cada paciente e 1 clone controle (2.5-CAVD-CM, 5.5 CAVD-CM e controle-CM (SS109)). Portanto, estes foram os clones utilizados para a realização de todos os experimentos subsequentes.

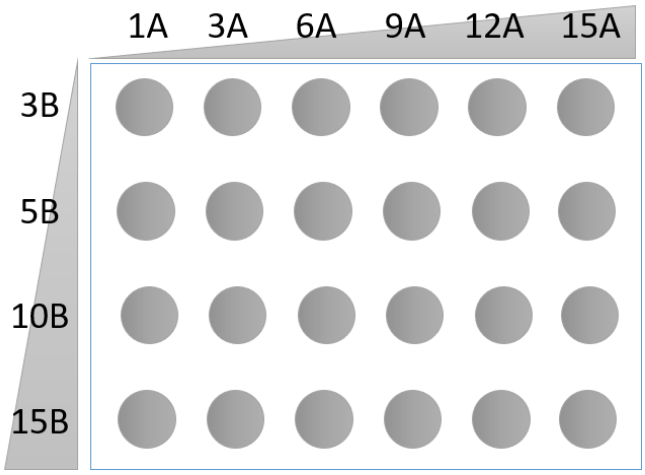

Figura 21: Esquema da placa de 24 poços com a estratégia de combinações das concentrações de BMP4 e Activina A utilizada para otimização do protocolo para cada clone de nosso estudo.

4.8.1.1 Eficiência do protocolo de diferenciação em cardiomiócitos

As medidas de eficiência das diferenciações foram realizadas por citometria de fluxo. O surgimento de uma população duplamente positiva (> 80%) no dia 3, com a marcação das amostras com os anticorpos CD56 e PdgfR-a, indicava a presença de progenitores mesoderme e a diferenciação prosseguiu a partir deste primeiro ponto de verificação. Para avaliação final de eficiência, realizou-se no dia 20 da diferenciação, a verificação da presença da proteína específica de cardiomiócitos, Troponina T e a proteína específica de progenitores de cardiomiócitos ventriculares, miosina de cadeia leve 2v (MLC2v). Os valores de eficiência foram considerados quando a população de cardiomiócitos apresentou pureza acima de 75% (cTnT), baseado em informações da literatura quanto a pureza de cardiomiócitos utilizados em estudos de modelagem de doenças. O valor de reprodutibilidade foi considerado alto quando, pelo menos, três em quatro diferenciações apresentaram eficiência aceitável.

Identificou-se que a combinação de 10 ng/mL de BMP4 junto a 9ng/mL de Activina A, foi a que apresentou melhor eficiência geral, na medida que

procurou-se escolher uma mesma concentração a ser utilizada em todos os clones estudados.

No entanto, após diversas tentativas e ensaios de padronização feitos em 2 clones para cada paciente e 2 clones controles (que possuíam cariótipo normal), foi observada reprodutibilidade quanto a pureza, eficiência e viabilidade dos cardiomiócitos nas diferenciações de apenas 1 clone de cada paciente e 1 clone controle (2.5-CAVD-CM, 5.5 CAVD-CM e controle-CM (SS109)). Portanto, estes foram os clones utilizados para a realização das diferenciações e todos os experimentos subsequentes. A **Figura 22** mostra todo processo, desde a pré-diferenciação (hiPSCs) até o momento em que as células foram dissociadas para se realizar os experimentos.

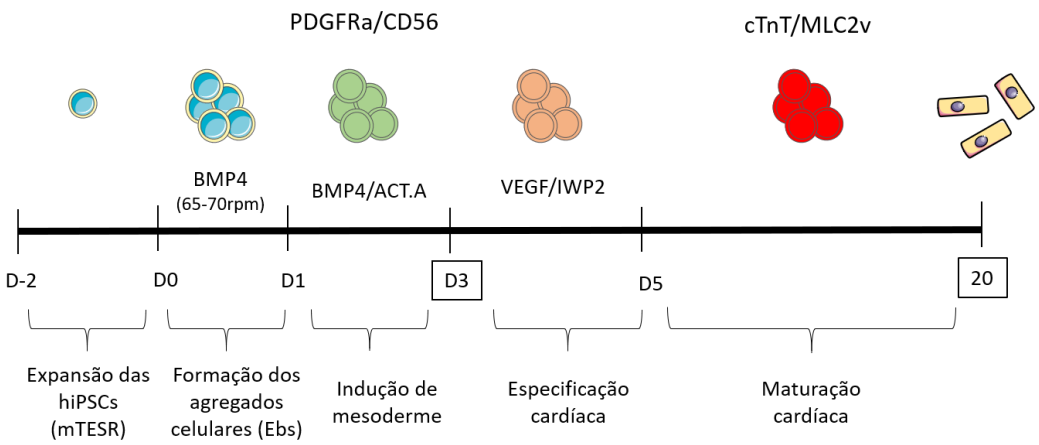

Figura 22: Linha do tempo sobre o processo da diferenciação dos clones até o momento em que as células foram dissociadas (no dia 20) para experimentos posteriores e/ou criopreservação.

4.8.2 Caracterização dos cardiomiócitos

Os primeiros corpos embrióides formados por cardiomiócitos, do clone-controle (SS109) foram morfologicamente identificados e começaram a bater entre os dias 8-12 da diferenciação. Já os clones dos pacientes (CAVD-CMs), começaram a bater tardiamente quando comparados aos clones-controle, por volta do dia 13-16 da diferenciação **(Figura 23)**. Ao

atingirem o dia 20 da diferenciação, os corpos embrióides eram dissociados para que se tornassem células individuais, que foram posterirormente utilizadas para experimentos e/ou criopreservação.

Além da caracterização dos cardiomiócitos feita por citometria de fluxo no dia 20 da diferenciação, a fim de se verificar a presença da proteína cardio-específica Troponina-T, também foi realizada a análise por microscopia confocal das células plaqueadas em monocamada no dia 30 da diferenciação, quanto a proteína cardio-específica α-actinina. A avaliação das imagens do ensaio de microscopia confocal dos hiPSC-CMs (CAVD-CMs e controle-CM), evidenciou a presença e organização da proteína estrutural e contrátil dos cardiomiócitos adultos, necessária na fixação dos filamentos de actina no disco-Z (**Figura 24**).

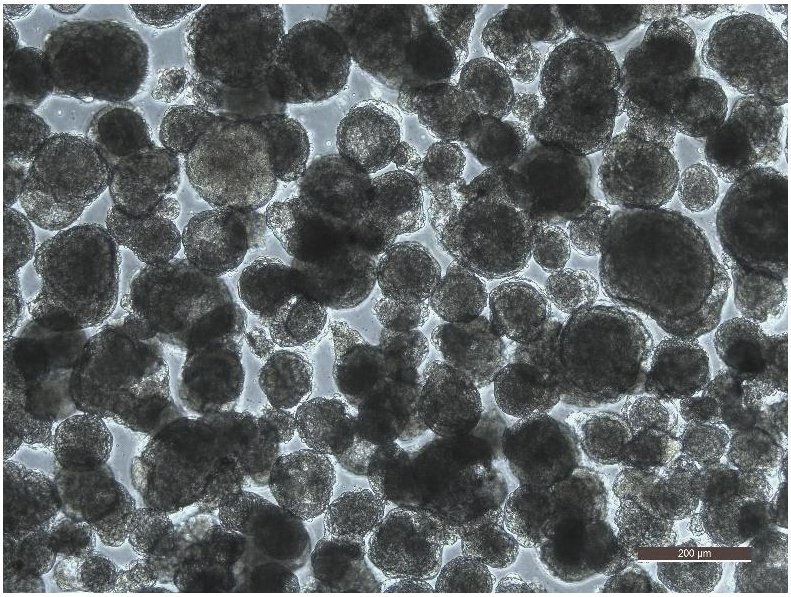

Figura 23: Corpos embrióides de cardiomiócitos no dia 15 da diferenciação (clone 5.5). (Escala:200µM).

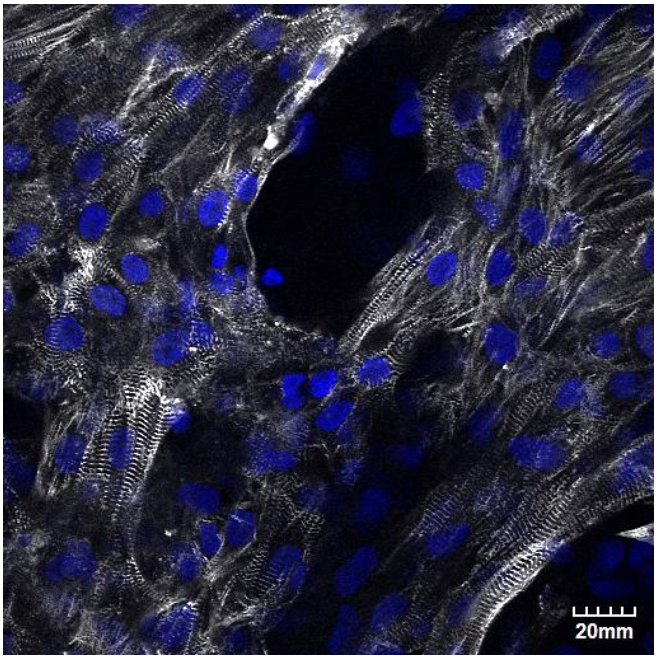

Figura 24: Imagem de microscopia confocal do ensaio de imunofluorescência dos cardiomiócitos do clone 2.5 CAVD-CM no dia 30 da diferenciação, com marcação da proteína específica de cardiomiócitos (α-actinina). DAPI (em azul) marca os núcleos celulares. Objetiva utilizada para imagem: 60x. Escala: 20mm.

4.9 Ensaios fenotípicos e funcionais – modelagem celular da CAVD

Após o estabelecimento do protocolo e caracterizações realizadas, os cardiomiócitos diferenciados, controle-CM (SS109) e os clones dos pacientes (clones 5.5 CAVD-CM e 2.5 CAVD-CM), foram submetidos a uma série de experimentos a fim de se verificar potenciais diferenças fenotípicas e funcionais.

Foram realizados experimentos para verificação da organização ultra-estrutural das células, verificação da expressão das proteínas do complexo desmossomal (PKP2, DSC2) e do marcador pro-adipogênico PPAR-γ, análise do perfil de gotas lipídicas presentes nas células, análise do tempo de duração do potencial de campo, propagação e velocidade de condução do impulso elétrico, força de contração de organoides cardíacos.

4.9.1 Expressão das proteínas desmossomais

Visto que as alterações genéticas associadas a CAVD envolvem principalmente proteínas desmossomais, realizamos uma análise para verificar se os pacientes expressavam uma quantidade alterada dessas proteínas em relação aos controles também nas células. Para isso, foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real por transcriptase reversa (qRT-PCR) para a quantificação da expressão dos genes *PKP2* e *DSC2* nos respectivos clones CAVD-CM e também no controle-CM.

Notou-se uma diminuição significativa de expressão dos mesmos, nos respectivos clones dos pacientes, quando comparados ao clone-controle (5.5 CAVD-CM, p=0.036; e 2.5 CAVD-CM, p<0.0001, respectivamente) **(Figura 25)**, o que confirmou a alteração da expressão destas proteínas nos cardiomiócitos diferenciados.

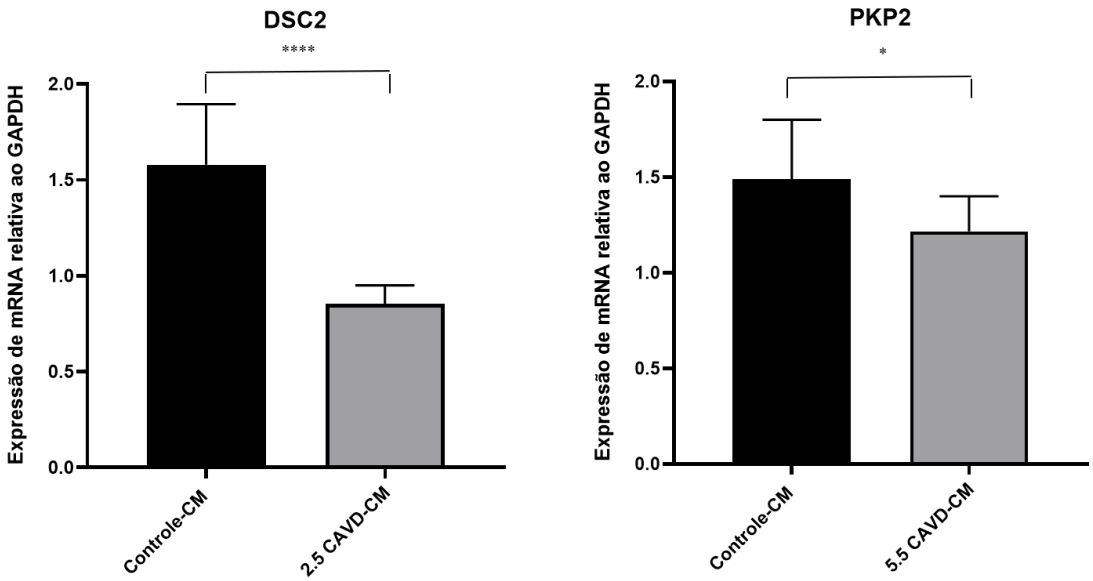

Figura 25: Expressão dos genes desmossomais *PKP2* e *DSC2*. A qPCR mostrou uma diminuição significativa de expressão nos clones CAVD-CMs em

relação ao controle-CM (5.5 CAVD-CM, p=0.036; e 2.5 CAVD-CM, p<0.0001, respectivamente). * representa diferença estatística.

4.9.2 Análise ultra-estrutural

Um dos principais efeitos das alterações genéticas em proteínas do complexo desomossomal, que levam à CAVD, é o desarranjo estrutural a nível celular. Para avaliar o efeito das variantes encontradas nos pacientes em relação as propriedades ultra-estruturais, realizou-se a análise de microscopia eletrônica de transmissão nos cardiomiócitos diferenciados. Tanto o controle-CM quanto os clones CAVD-CMs exibiram sarcômeros típicos, separados por bandas Z paralelas (**Figura 26**). Ao analisarmos a estrutura dos desmossomos, observou-se diferença morfológica entre os cardiomiócitos controle-CM (ss109-CM; Figura 18A e 18B) e os clones CAVD-CM (2.5-CAVD-CM; Figura 18C e 18D e 5.5-CAVD-CM; Figura 18E e 18F). Pôde-se notar distorção estrutural assimétrica e aparência nebulosa nos desmossomos dos CAVD-CMs (em graus variáveis), ausente no controle saudável (controle-CM), que por sua vez apresentou desmossomos de aspecto comum. Ao realizarmos uma análise quantitativa morfométrica da largura desmossomal, foi observado desmossomos significativamente mais largos em ambos os clones CAVD-CM, quando comparados ao controle-CM (p<0,0001 para ambos) **(Figura 27)**. Ainda, notou-se uma diferença significativa na largura desmossomal do clone 5.5 CAVD-CM, sendo estes maiores em comparação aos desmossomos do clone 2.5 CAVD-CM (p=0,0058).

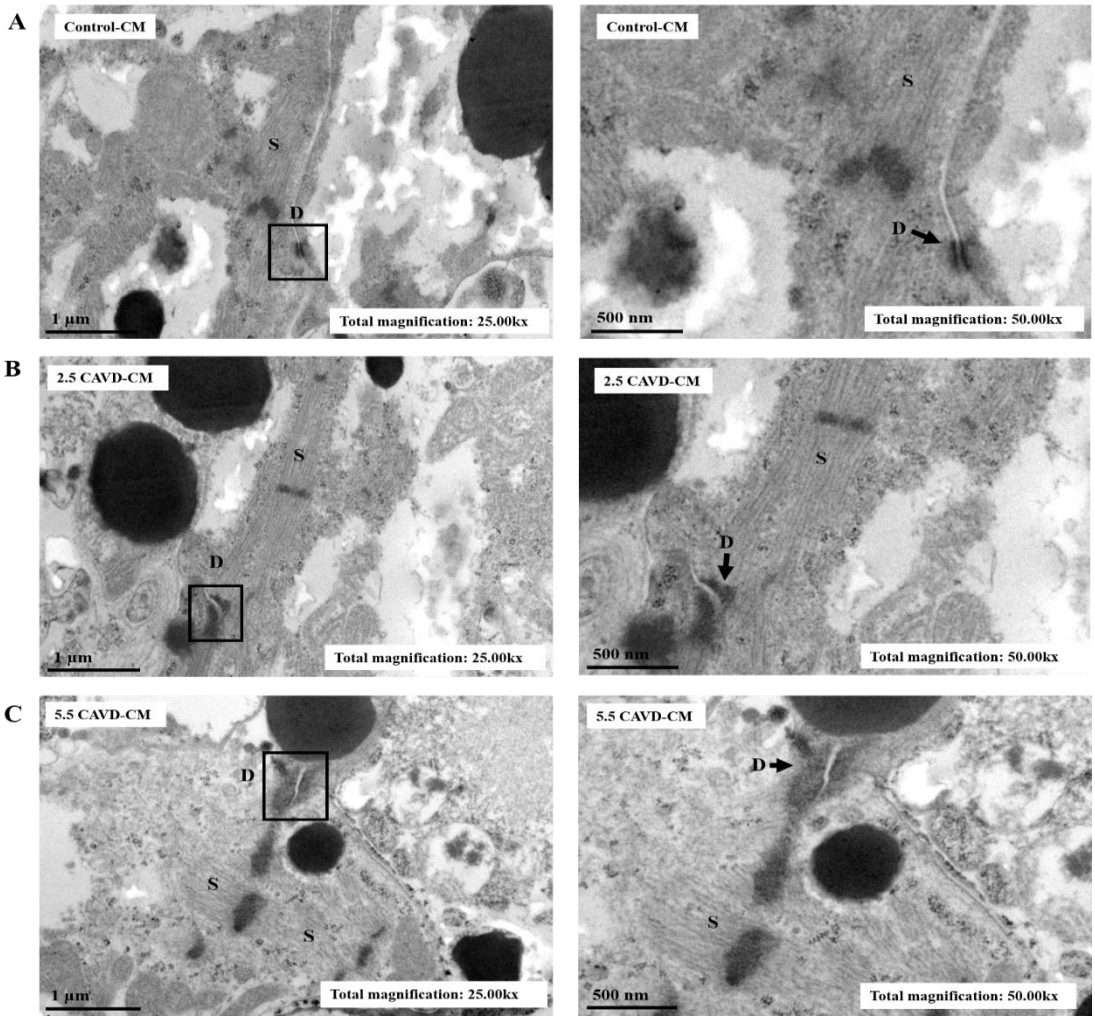

Figura 26: Caracterização ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão dos cardiomiócitos derivados de hiPSC. A) do controle saudável (controle-CMs) com presença de sarcômeros típicos e desmossomos de aspecto comum. B) do clone 2.5-CAVD-CM com presença de uma estrutura anormal do desmossomo, distorcido e assimétrico. C) do clone 5.5-CAVD-CM com presença uma estrutura anormal do desmossomo, distorcido e assimétrico. CAVD indica Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito; D, desmossomo; S, sarcômero. Escala das imagens á direita: 1µm; á esquerda: 500nm.

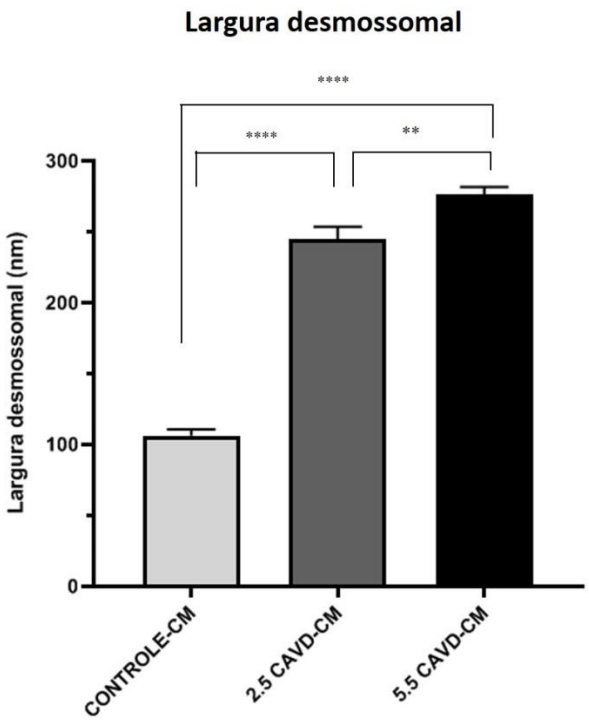

Figura 27: Avaliação quantitativa morfométrica da largura desmossomal. Nota-se aumento significativo desses parâmetros nos clones CAVD-CMs, 2.5 CAVD-CM e 5.5 CAVD-CM em relação ao controle-CM, bem como, um aumento da largura do clone 5.5 CAVD-CM em relação ao clone 2.5 CAVD-CM. (ANOVA, p<0,0001, p<0,0001 e p=0,0058)

4.9.3 Expressão do gene marcador pró-adipogênico (*PPAR-γ*)

A fim de caracterizar a doença no modelo celular, foi feita uma avaliação do nível de expressão do fator de transcrição pro-adipogênico *peroxisome proliferator-activated receptor gamma´ (PPAR*-γ), nos clones CAVD-CM e controle saudável de hiPSC-CMs, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real por transcriptase reversa (RT-qPCR).

Por meio de uma análise estatística comparativa entre as médias de expressão relativa de *PPAR-γ* (ANOVA), observou-se que os cardiomiócitos do paciente CAVD 2 (2.5-CAVD-CM) apresentaram expressão significativamente maior que os cardiomiócitos-controle (p=0,0165) **(Figura 28)**. Não foi observada diferença estatística de expressão gênica entre o clone 5.5 CAVD-

CM em relação ao controle-CM (p=0,1817) e nem entre os CAVD-CMs (2.5 CAVD-CM *versus* 5.5 CAVD-CM, p=0,872).

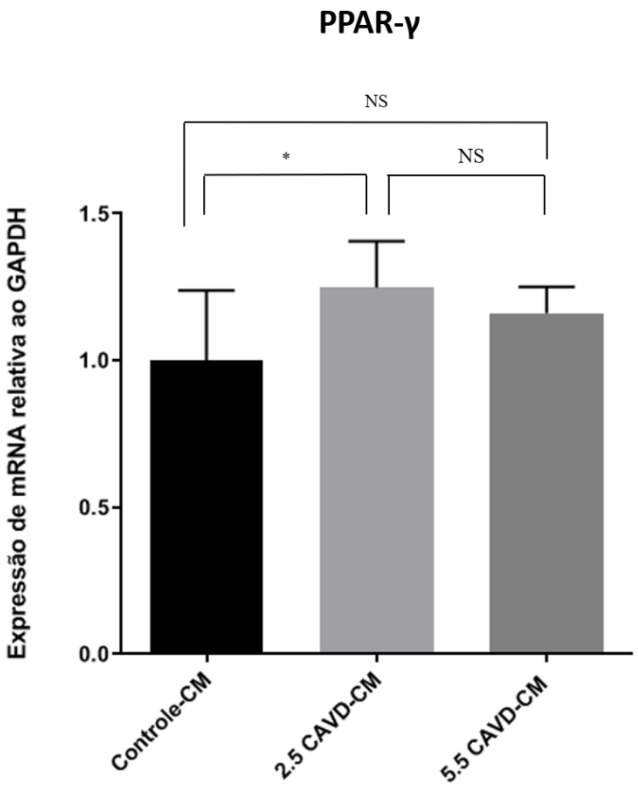

Figura 28: Comparação da expressão do marcador pró adipogênico *PPAR-γ*. A qPCR mostrou um aumento significativo de expressão do gene no clone 2.5 CAVD-CM em relação ao controle (p=0.0165).* representa diferença estatística entre paciente x controle.

4.9.4 Análise do perfil de gotas lipídicas das células

Para a detecção de gotículas lipídicas dentro das células, como uma análise complementar a expressão do marcador pró-adipogênico PPAR-γ, foi realizada a marcação das células com o fluoróforo Nile Red, analisada por citometria de fluxo.

Uma proporção significativamente maior de cardiomiócitos de ambos os pacientes CAVD foi marcada positivamente pelo fluoróforo em comparação

com o clone-controle (SS109-controle-CM) (2.5 CAVD-CM, p= 0,0232; e 5.5-CAVD-CM, p=0,0438). Entretanto, não foi observada diferença significativa de expressão entre os clones CAVD **(Figura 29)**.

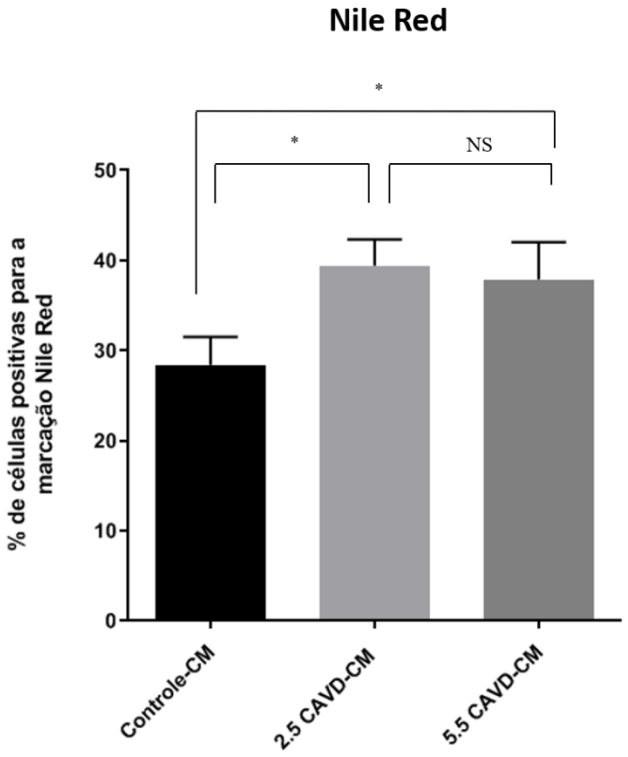

Figura 29: Quantificação da expressão média do marcador Nile Red para análise do perfil de gotas lipídicas. Observa-se um aumento significativo de células positivas para a marcação nos clones CAVD-CM em relação ao controle (2.5 CAVD-CM, p= 0,0232 e 5.5 CAVD-CM, p= 0,0438). * representa diferença estatística entre paciente x controle.

4.9.5 Duração do potencial de campo celular

A análise da duração do potencial de campo (FPD, do inglês, *field potential duration*) foi realizada de forma automatizada pelo software Mobius, compatível ao equipamento MED64 utilizado para MEA (*multi-electrode array*). A análise do tempo de duração do potencial de campo serve como marcador similar e/ou substituto para análise da duração do potencial de ação celular. A análise randomizada da distribuição de FPD dos clones ao longo dos eletrodos

do chip do *MEA* revelou uma distribuição uniforme dos potenciais de ação, sem variação significativa entre os eletrodos (**Figura 30**). A análise do tempo médio de FPD revelou um prolongamento significativo deste parâmetro nos clones CAVD-CM (2.5 CAVD-CM e 5.5 CAVD-CM) quando comparados com o controle-CM saudável (SS109) (721,87 ± 39,77 ms; 684,92 ± 10,26 ms *versus* 452,77 ± 26,64 ms, respectivamente; P <0.0001; **Figura 31**). Além disso, pôde-se observar um leve prolongamento do parâmetro entre os clones CAVD, sendo de maior duração no clone 2.5 CAVD-CM do que no 5.5 CAVD-CM (p=0.0298).

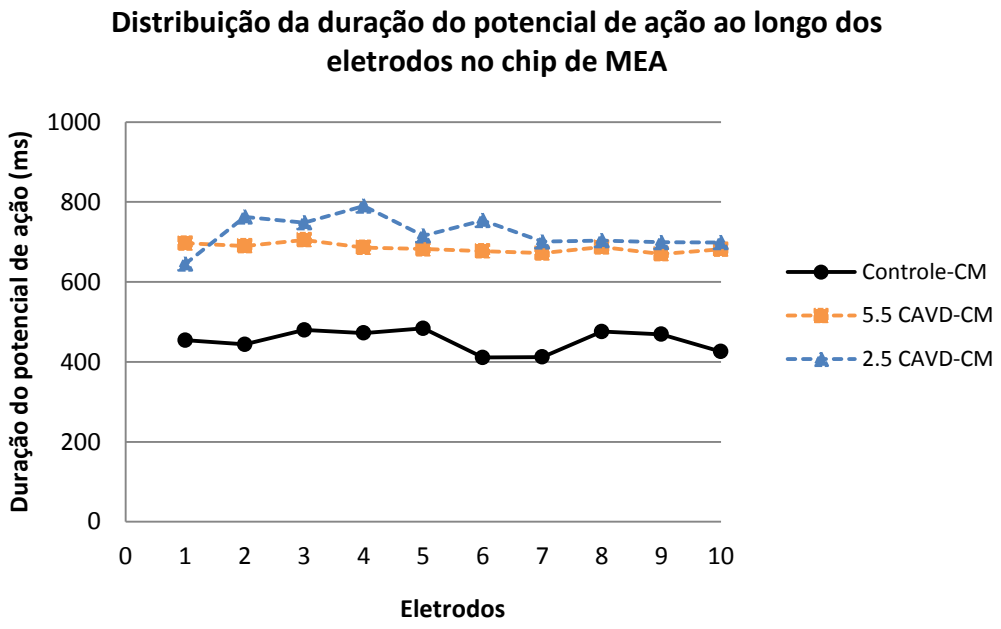

Figura 30: Análise randomizada da distribuição de FPD dos clones ao longo dos eletrodos do chip do *MEA*, revelou uma distribuição uniforme dos potenciais de ação, sem variação significativa entre os eletrodos.

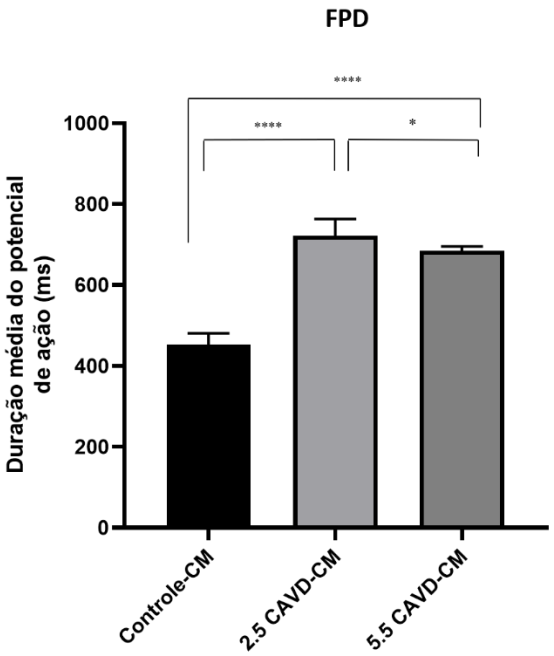

Figura 31: Comparação da duração média de potencial de ação (FPD) entre os clones CAVD e controle. Observa-se um prolongamento significativo do parâmetro nos clones CAVD-CM em relação ao controle-CM (ANOVA, $p<0.0001$), bem como um leve prolongamento no clone 2.5 CAVD-CM em comparação ao 5.5 CAVD-CM ($p=0.0298$). * representa diferença estatística entre os clones.

4.9.6 Propagação e velocidade de condução do impulso elétrico nos microtecidos cardíacos (*Heart-on-a-chip*)

O mapeamento óptico foi utilizado para caracterizar a eletrofisiologia dos microtecidos gerados, quanto ao perfil de propagação, duração e velocidade de condução do impulso elétrico, conforme descrição nos métodos. Os microtecidos dos clones controle-CM, 2.5 CAVD-CM e 5.5 CAVD-CM, apresentaram um batimento espontâneo médio de 24 ± 14 bpm, 15 ± 7 bpm e 12 ± 8 bpm, no dia 10, respectivamente (n= 9 microtecidos de cada clone). Ao estimulá-los pontualmente com um eletrodo bipolar, a uma frequência de 1hz, a duração média de APD_{90} (do inglês, *action potential duration at 90% of repolarization*) óptica dos microtecidos foi significativamente maior nos clones 2.5 CAVD-CM e 5.5 CAVD-CM, de 405,0 ± 26,21 ms e de 397,33 ± 7,23 ms,

enquanto para o clone-controle SS109-CM foi de 310,17 ± 2,56 ms (ANOVA, p=0,0006). A velocidade média de condução da propagação elétrica dos microtecidos CAVD-CM estimulados foi de de 10,39 ± 3,81 cm/s (2.5 CAVD-CM) e de 10,91 ± 0,35 cm/s (5.5 CAVD-CM), que é baixa em comparação com a velocidade de condução do impulso elétrico no controle-CM, que foi de 26,08 ± 6,54 cm/s (ANOVA, p=0,0073) **(Figuras 32, 33 e 34)**.

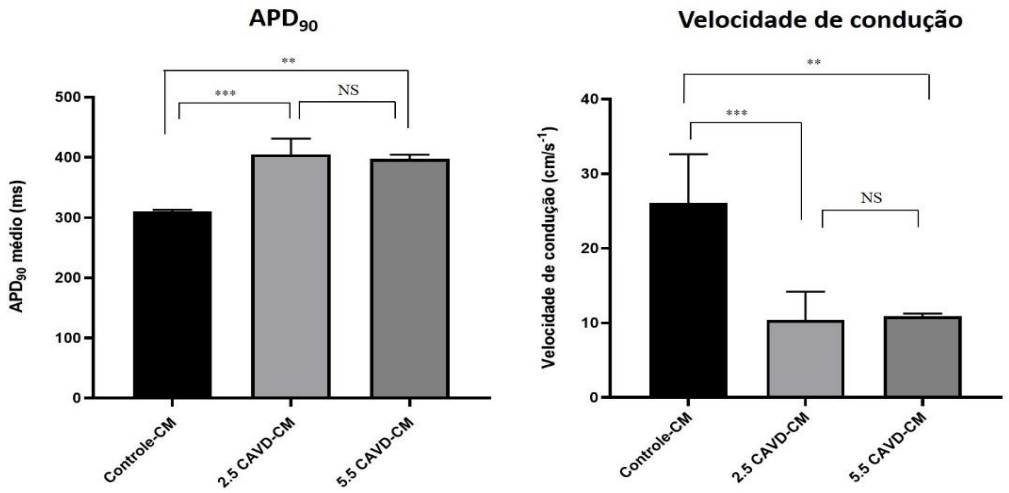

Figura 32: Gráficos comparativos da média APD_{90} e velocidade média de condução do impulso elétrico entre os clones CAVD-CM e controle-CM. * representa diferença estatística entre paciente x controle.

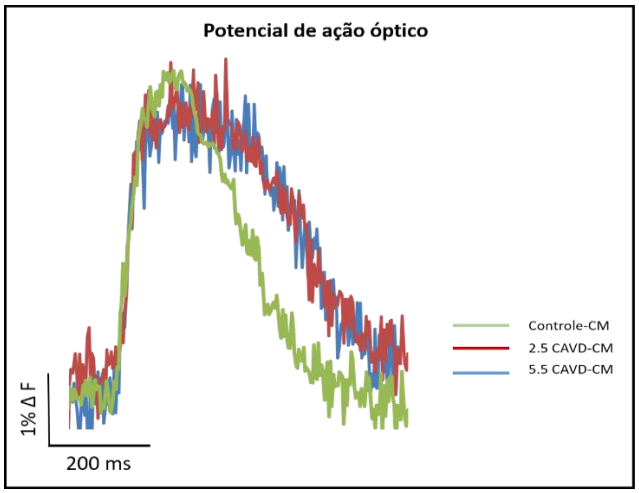

Figura 33: Potenciais de ação ópticos únicos, de cada clone CAVD-CM (2.5 CAVD-CM em vermelho; 5.5 CAVD-CM em azul) e controle-CM (verde). Nota-se um aumento visual significativo da duração do potencial nos clones CAVD-CMs.

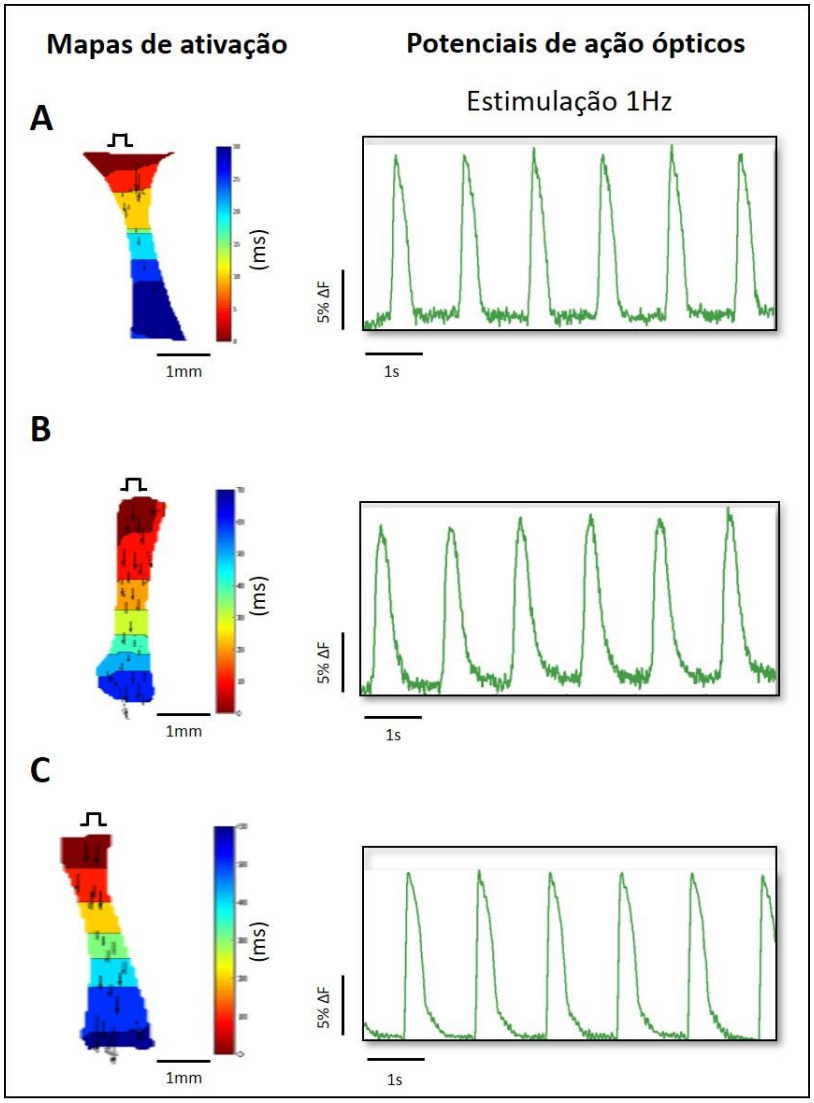

Figura 34: Processamento dos sinais ópticos representados em mapas de propagação do impulso elétrico (a esquerda) e potenciais de ação ópticos (á direita). Os microtecidos foram analisados sob estimulação controlada a 1Hz. A) controle-CM; B) 2.5 CAVD-CM e C) 5.5 CAVD -CM. = estímulo elétrico pontual.

4.9.7 Força de contração dos microtecidos

Devido ao fato dos microtecidos estarem ligados às hastes de PDMS, nas extremidades dos dispositivos, foi possível estimar de forma não invasiva as forças geradas pelos microtecidos em resposta à contração durante o período de cultura, de acordo com a avaliação das imagens que levaram em

consideração os padrões de curvatura das hastes flexíveis. De acordo com o método descrito anteriormente, as medidas de força de contração dos tecidos foram analisadas **(Figura 35)** e observou-se que a força de contração ativa dos microtecidos foi significativamente maior no clone controle-CM do que nos CAVD-CMs (2.5 CAVD-CM e 5.5. CAVD-CM), tanto após 5 dias (p=0,0157), como após 10 dias (p=0,0237) em cultura. No entanto, não foi observada diferença significativa na força de contração entre os clones dos pacientes.

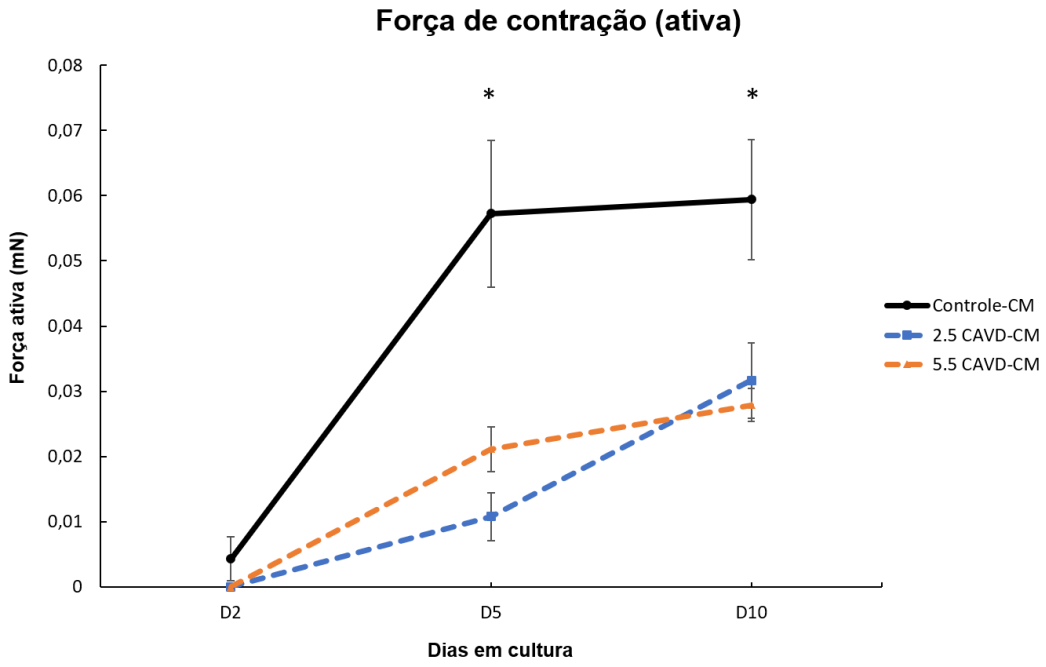

Figura 35: Gráfico representando a força de contração ativa média para cada clone, nos dias 2, 5 e 10 após o plaqueamento das células no dispositivo. Observa-se uma maior força de contração ativa no clone controle-CM nos dias 5 (ANOVA, p=0,0157) e 10 (p=0,0237), em comparação aos clones dos pacientes (2.5 CAVD-CM e 5.5 CAVD-CM).

5. Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise do perfil genético da casuística CAVD

Neste trabalho relatamos o primeiro estudo abrangente sobre o perfil genético de uma casuística de pacientes brasileiros portadores de formas familiares ou esporádicas de CAVD. Contamos com a utilização de um painel genético estendido, desenhado especificamente para a detecção de alterações associadas a arritmias e cardiomiopatia hereditárias, usando plataforma de sequenciamento de nova geração (NGS).

É reconhecido que o perfil genético de determinada população é dependente da interação de genes que podem caracterizar o fenótipo, juntamente com fatores ambientais. Até hoje, coortes não descendentes de europeus são pouco caracterizadas em termos do perfil genético e, portanto, não são contempladas na prática clínica. Há uma falta de informação disponível sobre o perfil genético dos pacientes com CAVD no Brasil, que possui alto grau de miscigenação.

Em 2015, o *American College of Medical Genetics* publicou uma diretriz americana de análise e classificação de variantes [36]. Durante o estudo, baseamos a análise das variantes encontradas nesta diretriz, a fim de seguir um critério mais rigoroso e internacional de classificação de variantes.

Estudos prévios mostraram que a porcentagem de positividade da análise genética para CAVD é em torno de 50-60% [16,106]. O bom desempenho do sequenciamento de nova geração (NGS) e o uso dos critérios da ACMG para interpretação e classificação das variantes nos permitiram obter um número considerável de casos positivos para o teste genético, 18 (38,3%) pacientes portadores de variantes causais (“patogênica” ou “provável patogênica”) entre os 47 casos-índice.

Em nosso estudo, o percentual de positividade leva em consideração os critérios de classificação de patogenicidade estabelecidos pela ACMG, o

que não foi contemplado em muitos dos estudos anteriores, que utilizaram critérios diferentes para definir patogenicidade, freqüentemente de acordo com critérios definidos arbitrariamente. Enquanto, com base na classificação da ACMG, consideramos amostras positivas apenas aquelas classificadas como “Patogênicas” ou “Provavelmente Patogênicas”, estudos anteriores podem ter levado em consideração variantes que agora classificamos como VSI, em cálculos de positividade. Este fato poderia explicar a diferença na positividade encontrada em nosso estudo em comparação com a porcentagem encontrada na literatura não recente. Novos estudos que passem a classificar variantes genéticas encontradas de acordo com os critérios da ACMG, possivelmente encontrarão uma positividade similar à de nosso estudo.

Em um trabalho realizado por Andreasen *et al*. [107], foi questionada a patogenicidade atribuída a alterações depositadas como causais e a presença de variantes falso-positivas para algumas cardiomiopatias hereditárias (inclusive CAVD). O grupo revisou as frequências populacionais das alterações depositadas no banco de dados ESP e foi observado, por exemplo, que as alterações nos genes *PKP2, DSP* e *DSG2* se apresentavam com frequências acima do que o esperado sobre a prevalência fenotípica da doença na população geral. Desta forma, os autores sugeriram que a estimação elevada das variantes causais pode estar relacionada a uma forma não monogênica da CAVD. Estes dados apenas reforçam a importância de uma estratégia e critérios de classificação de patogenicidade complexa e abrangente, com múltiplas informações, uma vez que são encontradas informações frequentemente conflitantes na literatura e em bancos de dados.

A maior parte das variantes causais encontradas em nosso estudo estão relacionadas ao gene *PKP2*. Identificamos 7 (53,84%) variantes no gene *PKP2*, enquanto outras 6 (46,15%) alterações estão distribuídas entre outros genes desmossomais (*DSG2, DSC2, DSP*). Embora a variação clínica de pacientes com ARVC seja um fator crítico, a frequência de alterações encontradas no gene *PKP2* está dentro da faixa de variação relatada em estudos anteriores, que apresentam uma presença de 20-80% de alterações genéticas nesse gene para casos de CAVD. Esse conjunto de resultados, aliado ao fato de que a proteína PKP2 é parte do complexo desmossômal e

tem um papel importante na sinalização celular, reforça a importância do gene *PKP2* na patogênese da doença [108,109,110].

É interessante notar a presença de um número considerável de casos com dupla heterozigose. Em nosso estudo, 3 (6,38%) pacientes apresentaram mais de uma variante (considerando VSI), porcentagem esta que se mostrou concordante com outros estudos, em que se são encontradas em 4-20% dos casos. A literatura apresenta alguns casos de pacientes com CAVD com múltiplas variantes, incluindo heterozigosidade composta ou dupla, e a relação genótipo-fenótipo geralmente mostrou um maior risco de eventos malignos em comparação a portadores de uma única variante [111,112]. No entanto, isso não foi confirmado em nossa casuística. Os pacientes portadores de mais de uma alteração, apresentaram a mesma gravidade de eventos do que aqueles com uma única variante causal (1 ou 2). Este fato, reforça o entendimento sobre a expressão fenotípica variável da doença, podendo também variar de acordo com a população estudada [113].

Em relação às alterações encontradas nos sítios de *splicing*, foi realizado um estudo do RNA (por meio da técnica RT-PCR) para comprovar a alteração do quadro de leitura do gene, uma vez que as alterações em splicing não são analisáveis nas ferramentas *in silico*. Dentre as variantes que foram confirmadas, todas de fato alteravam o sítio doador ou receptor, interrompendo ou excluíndo um éxon no processo transcricional e, consequentemente, alteravam a proteína. Diversos autores descreveram que alterações em sítios de *splicing* em genes desmossomais como sendo patogênicas e altamente danosas na CAVD, e encontramos uma alta prevalência (21,3%) dessas alterações genéticas na nossa casuística [114].

Contrariamente a descrições prévias [16,115], a idade média da manifestação inicial da doença, em nossa casuística, não foi diferente entre portadores e não portadores de variante causal rara. Esses achados poderiam ser explicados por diferenças populacionais, pelo complexo papel dos fatores ambientais e pelos diferentes critérios de classificação de patogenicidade [116].

Um dos principais desafios clínicos é a identificação de indivíduos que se encontram em maior risco de desenvolver um primeiro evento clínico arrítmico grave após o diagnóstico ou até mesmo na ausência de diagnóstico

[117]. Nossos resultados mostraram uma porcentagem maior de portadores de uma variante causal com história familiar positiva de morte súbita cardíaca (MSC) em indivíduos menores do que 35 anos, o que é considerado um critério menor de acordo com os critérios *Task Force Criteria* 2010. Estes resultados sugerem a possibilidade de reconhecer um subgrupo de pacientes com CAVD na população brasileira, que têm critérios menores quanto ao histórico familiar, e que são propensos a portar uma variante patogênica ou provavelmente patogênica. Os achados indicam que a presença de variante causal, para este subgrupo de pacientes, é um fator de risco para morte súbita cardíaca. Isso destaca a importância da realização da avaliação genética para todos os pacientes com história familiar de MSC ou CAVD, independentemente se possuem critérios maiores ou menores quanto ao histórico familiar. Desta forma, para estes pacientes, pode ser indicado um tratamento clínico diferente e um rigoroso rastreamento clínico e genético de seus familiares.

Aditivamente, nossos resultados mostraram uma maior porcentagem e uma relação significativa dos pacientes portadores de CDI com alteração causal no gene *PKP2*. Uma vez que a presença de CDI por indicação de profilaxia secundária está associada a um fenótipo mais grave, os achados sugerem que pacientes com alteração causal em *PKP2* tem uma maior gravidade da apresentação fenotípica arrimtogênica.

Ademais, nossos achados mostraram uma relação significativa entre pacientes assintomáticos, com a presença de alguma variante causal em um gene desmossomal que não o *PKP2.* Este fato reforça mais uma vez o papel do gene *PKP2* na patogenicidade e manifestação clínica da doença e sugere que, pacientes diagnosticados com CAVD mas com ausência de sintomas inciais, têm maior propensão a apresentarem uma variante causal e esta se encontrar em algum gene desmossomal que não o *PKP2*.

É importante notar a presença de um elevado número de variantes consideradas de significado incerto (VSI). Estas alterações não foram informativas para o rastreamento familiar. Contudo, para essas variantes, estudos de segregação familiar, bem como estudos funcionais, podem ser um fator determinante para a elucidação da variante em questão quanto à sua patogenicidade (podendo ainda ser classificada como uma variante patogênica

ou patogênica provável). Rastrear as VSI ao longo do tempo é relevante, uma vez que essas variantes são elegíveis para reclassificação se novos critérios forem adicionados e, consequentemente, podem afetar o a conduta clínica para estes pacientes. Desta forma, a classificação das variantes é dinâmica, e depende de constante revisão dos aspectos levados em consideração na decisão final.

A associação entre variantes em GSI e o fenótipo ainda é controversa. Várias cardiopatias têm sinais e sintomas similares aos da CAVD, algumas delas, cardiomiopatias arritmogênicas, que podem ser erroneamente diagnoticadas e consideradas uma forma da doença. Alguns casos podem ser diagnosticados como sendo parte de um espectro de doenças arritmogênicas com envolvimento primário do músculo cardíaco (miopatias cardíacas arritmogênicas). Ademais, alguns estudos descrevem a sobreposição clínica e genética de algumas cardiopatias ou canalopatias arritmogênicas, como por exemplo, a Sindrome de Brugada e a CAVD, e não infrequentemente, alterações em genes até então associados a uma determinada cardiopatia ou canalopatia são encontradas em casos de pacientes diagnosticados com alguma outra cardiopatia/canalopatia [118,119]. Um exemplo disso seriam alterações no gene *SCN5A*, incialmente e comumente associado a casos de pacientes portadores da Síndrome de Brugada, que foram recentemente encontradas em pacientes com CAVD [120,121]. Esse *overlap* clínico e genético é um campo que ainda deverá ser melhor esclarecido a fim de elucidar o papel dos genes comuns a mais de uma doença, especificamente para cada uma delas, na busca do aperfeiçoamento da análise genética para fins de diagnóstico diferencial para cada uma das doenças.

A ausência completa de uma variante genética rara estava presente em 25,5% dos pacientes da casuística. Uma possível explicação para estes casos, seria que a base genética da doença pode estar relacionada a genes que ainda são desconhecidos e possivelmente serão identificados no futuro.

Os resultados de nosso estudo, específicos para esta casuística, confirmam o diagnóstico molecular como uma abordagem adicional e relevante para o prognóstico na prática clínica. Entretanto, pudemos perceber que a avaliação necessita ser realizada com cuidado e rigor, já que a associação

entre uma variante rara e a doença não é trivial de ser estabelecida e que a falta de sistematização na interpretação dos resultados ou de uma equipe multidisciplinar para análise dos dados, pode resultar em problemas de manejo clínico dos pacientes em risco e suas famílias. Além disso, fatores como a penetrância incompleta e a possível influência de diversos fatores genéticos e ambientais no fenótipo clínico, realçam a importância de aconselhamento genético adequado para pacientes com a doença e membros da família que estejam em risco.

Não foi possível relacionar outras variáveis clínicas com a gravidade da doença e a presença ou ausência de alterações genéticas em nossa casuística. Entretanto, é sabido que muitos fatores podem interferir nesta análise e relação, como por exemplo, baixa acurácia nos exames de imagem (ecocardiografia e/ou ressonância magnética) ou número pequeno de representantes para inferir determinada informação.

5.2 Geração de hiPSCs e hiPSC-CMs para a o modelo celular da CAVD

A identificação e confirmação de alterações genéticas que são consideradas causadoras de doenças cardíacas, inclusive a CAVD, são em sua maioria baseadas na segregação familiar da alteração genética ou também em análises *in silico* que, por meio de softwares de predição da conservação da alteração proteica, podem sugerir a causalidade ou não de uma alteração encontrada [122].

Atualmente, é sabido que estudos genéticos moleculares tem um papel significativo no conhecimento da base genética da CAVD. O presente estudo, que une o estudo do perfil genético a um estudo sobre o mecanismo molecular e funcional da doença, oferece a oportunidade de verificação da possível patogenicidade de alterações específicas. No caso, isso foi possível por meio de um estudo funcional *in vitro* em cardiomiócitos que apresentam tais alterações genéticas (hiPSC-CMs), contribuindo para um maior entendimento

dos processos envolvidos na patogênese da CAVD e da interação genótipo-fenótipo.

Estes cardiomiócitos podem ser diferenciados a partir de células-tronco pluripotentes induzidas paciente-específicas ou modificados geneticamente de maneira a se inserir a alteração genética em uma célula de um indivíduo saudável [123]. No presente estudo, optou-se pela geração das hiPSCs dos próprios pacientes.

A técnica para geração de hiPSCs a partir das células progenitoras da urina (UPCs), foi descrita em estudos recentes [124] e por nosso grupo [125], nos quais foi confirmada a possibilidade de utilizá-las como substrato para a reprogramação em células-tronco. Essa estratégia foi a escolhida por se tratar de um procedimento não-invasivo, que pode ser facilmente obtido de quase todos os indivíduos. Os pacientes podem ser facilmente convencidos a coletar urina, uma vez que se trata de um procedimento de rotina. Além disso, as UPCs demonstram ter uma alta propensão a serem reprogramadas, uma vez que estas já expressam alguns marcadores de pluripotência e são multipotentes [126].

No caso de um dos pacientes (CAVD 2), não foi possível a obtenção as UPCs mesmo após 3 tentativas. Assim sendo, realizamos a extração dos fibroblastos do paciente. De acordo com outros trabalhos que vêm sendo realizados em nosso laboratório, podemos observar uma taxa de sucesso em torno de 50% dos casos para esta metodologia de isolamento de UPCs (dados não publicados). Esta taxa pode variar de acordo com diversos critérios, não bem estabelecidos ainda, mas que estão sendo pesquisados.

No presente estudo, foram geradas células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) de dois pacientes por meio do método de reprogramação não-integrativo epissomal. Tal método de reprogramação foi escolhido pelo fato dos plasmídeos epissomais não apresentarem capacidade de se integrar ao genoma. Já o método de integração viral (antes bastante utilizado), possui grande desvantagem ao apresentar riscos de mutagênese insercional, causada pela integração de uma ou mais sequências virais no genoma, podendo interferir na posterior capacidade de diferenciação [39].

As hiPSCs geradas, bem como as hiPSCs-controle, foram caracterizadas quanto ao seu potencial de pluripotência a partir da realização de ensaios padronizados na literatura e apresentaram positividade na expressão de marcadores moleculares e proteicos para hiPSCs *in vitro*, conforme esperado para este tipo celular.

Um ponto importante, que diz respeito a um controle de qualidade das hiPSCs geradas, é a análise do cariótipo. Atualmente é notadamente reconhecido que as hiPSCs frequentemente apresentam anormalidade do cariótipo, alterações genéticas pontuais ou até variação no número de cópias (*CNV- Copy Number Variations*) [127,128]. Estes dados reforçam a necessidade da verificação da integridade cromossômica logo no início do processo da seleção dos clones.

Foram encontrados alguns clones de hiPSCs dos pacientes com cariótipos anormais. Entretanto, não acreditamos que as alterações possam estar relacionadas ao processo de reprogramação, uma vez que outros clones dos mesmos pacientes possuem cariótipo normal, o que sugere uma possível seleção ao acaso no momento em que os clones foram selecionados e amplificados. A interpretação dos resultados de cariótipo depende das futuras aplicações das iPSCs no contexto do estudo (como exemplo, poderia ser complicado usar células diferenciadas a partir iPSC que carregam anomalias e alterações genéticas com impacto desconhecido para propósitos de terapia celular). Tratando-se de um modelo, a presença de uma alteração cromossômica não é ideal e por isso, optamos por apenas utilizar os clones que apresentaram cariótipo normal.

Apesar de terem sido feitos apenas alguns ensaios para a verificação da pluripotência das hiPSCs, dentre uma gama de ensaios ideias, acreditamos que foram testes suficientes para a execução do estudo, uma vez que os clones selecionados puderam ser diferenciados em cardiomiócitos eficientemente. Dessa forma, evitou-se a experimentação animal para realização do ensaio de formação de teratoma.

A etapa de diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos foi a mais laboriosa e extensa, devido à dificuldade de reproduzir a mesma eficiência entre as diferenciações dos diversos clones. Além disso, a otimização das

concentrações das citocinas (BMP4 e Activina A) para cada linhagem celular demandou um tempo considerável ao longo do projeto.

Conforme descrição nos resultados, a tentativa de diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos foi realizada utilizando-se inicialmente dois clones para cada paciente e dois clones controles. No entanto, após um longo período, mesmo com a otimização das concentrações ideais de citocinas para cada clone, a diferenciação foi apenas reprodutível para 1 clone de cada paciente e 1 controle. Desta forma, estes foram os clones utilizados nos experimentos subsequentes. Esta falta de reprodutibilidade na eficiência entre linhagens e clones celulares, frequentemente é discutida na literatura. Sabe-se atualmente que a variabilidade genética, padrão de expressão de marcadores de pluripotência ou de fatores de crescimento, inerentes de cada linhagem celular, podem interferir no processo de diferenciação.

Para os clones em que protocolo de diferenciação foi eficiente, buscamos atender a critérios que minimizassem vieses de comparação entre os clones e do modelo próprio modelo *in vitro*. O primeiro deles, foi a determinação de uma concentração ideal e semelhante de citocinas utilizadas durante o protocolo, para todos os clones estudados. Contudo, variações na pureza da população de cardiomiócitos gerados podem ocorrer. Desta forma, determinamos uma medida de eficiência mínima aceitável de pureza das diferenciações (>75% de cardiomiócitos na população celular gerada), baseado em dados da literatura, para que pudessem ser utilizadas para os experimentos funcionais e de caracterização da doença.

5.3 Modelagem e estudo funcional da CAVD com hiPSC-CMs

Um grande passo para o uso de cardiomiócitos derivados de hiPSC para a modelagem de doenças, foi o entendimento aprofundado sobre o desenvolvimento embrionário e as características responsáveis por direcionar

as células de forma específica no embrião, de forma a mimetizar estas condições *in vitro* para a diferenciação das hiPSCs em cardiomiócitos.

Conforme descrição na introdução deste trabalho, alguns estudos foram realizados e demonstraram a capacidade de modelagem da CAVD e/ou de distúrbios elétricos cardíacos, a nível celular, com o uso de hiPSC-CMs [83,84,85]. No entanto, até onde pudemos pesquisar, este é o primeiro estudo que apresenta um modelo que compara alterações não contempladas em estudos prévios (uma delas sem descrição prévia na literatura), em 2 genes diferentes relacionados a CAVD, com a utilização de uma plataforma que permitiu a formação de microtecidos (*Heart-on-a-chip*) e a análise funcional dos mesmos. Acreditamos que isso aporta importantes implicações para o estudo da CAVD, com grande potencial para traduzir o nosso avanço na compreensão dos fatores genéticos da doença na busca de terapias e medicina personalizada.

De forma geral, nossos resultados demonstraram diferenças fenotípicas significativas entre os CAVD-CMs comparados com os controle-CMs, como: (i) identificação de reduções significativas de expressão de genes e proteínas desmossomais e desmossomos estruturalmente alterados nos CAVD-CMs pela técnica de qRT-PCR e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente; (ii) detecção da presença de marcadores do acúmulo de gotículas lipídicas e regulação aumentada do fator de transcrição proadipogênico PPAR-γ nos clones CAVD-CMs ; (iii) identificação de um aumento de duração do potencial de campo (FPD) e de do potencial de ação em 90% de repolarização (APD_{90}) nos clones CAVD-CMs; (iiii) observação de uma velocidade de condução mais lenta e uma força de contração menor nos clones CAVD-CM.

Consistente com os achados genéticos nos dois pacientes estudados, também identificamos em ambos, redução da expressão das respectivas proteínas desmossomais. Este fato, confirma a patogenicidade da alteração genética no modelo celular e a reforça a possibilidade de se usar cardiomiócitos derivados de hiPSC paciente-específicos como modelo apto a replicar características da doença *in vitro*. Como esperado da natureza de tais alterações (no caso da inserção em *DSC2*, levando a uma proteína truncada e no caso da alteração missense em *PKP2*, a uma proteína com aminoácido

trocado), obtivemos como resultado uma redução significativa nos níveis de expressão dos genes *DSC2* e uma redução menor, dos níveis de *PKP2*.

Em ambos os pacientes, o modelo *in vitro* foi capaz de recapitular a alteração estrutural desmossomal, que é uma característica central da patogênese da CAVD. Isso se manifestou na análise ultraestrutural pela significativa presença de desmossomos anormais, dissimétricos e distorcidos, fato semelhante a relatos anteriores em pacientes com CAVD e modelos murinos [85,132]. Interessantemente, quando quantificamos a largura dos desmossomos analisados por microscopia eletrônica, os desmossomos do clone 5.5 CAVD-CM se mostraram mais largos quando comparados ao clone 2.5 CAVD-CM. No entanto, este aumento da largura desmossomal para o paciente em questão, não se relacionou com nenhum outro achado nos ensaios eletrofisiológicos, podendo se tratar de uma diferença estrutural sem influência funcional grave.

No presente estudo pudemos detectar a presença elevada de marcadores de gotículas lipídicas, além de um aumento significativo da expressão do fator de transcrição proadipogênico PPAR-γ nos CAVD-CMs. Embora o acúmulo de lipídios seja considerado uma característica da CAVD, a visualização e quantificação direta do conjunto de deposição fibro-gordurosa no coração, por exames de imagem (como ressonância magnética), é de difícil identificação em escala macroscópica [16]. Autores descreveram a presença desta característica nos modelos celulares quando sob influência de algum meio lipogênico, indutor desta condição [83,84]. No entanto, existe uma incerteza na literatura se este fenômeno ocorre por acumulação lipídica intramiocárdica ou substituição por tecido fibro-adiposo no lugar do tecido miocárdico necrótico.

5.3.1 Eletrofisiologia do modelo

Para avaliar se nossos achados estruturais e de expressão se traduziam em alterações funcionais, medimos a duração do potencial de campo, duração de potencial de ação (em 90% de repolarização) e a

velocidade de condução tanto nos CAVD-CMs como no controle-CMs. Halbach *et al*. [129] realizaram gravações extracelulares por microeletrodos simultâneos e medições de potencial de ação intracelular de cardiomiócitos de embriões, e demonstraram que o potencial de campo se correlaciona altamente com o potencial de ação e que tanto a excitabilidade, como a velocidade de condução reduzida podem ser identificadas associadas ao prolongamento deste parâmetro. Nossos resultados foram coerentes com estes achados prévios, onde vimos um prolongamento da duração do potencial de campo e de APD_{90} e uma diminuição da velocidade de condução nos CAVD-CMs. Entretanto, não foi observada diferença estatística quanto a estes parâmetros eletrofisiológicos, entre os dois clones CAVD-CMs.

As alterações eletrocardiográficas características na CAVD, como a presença de ondas épsilon e prolongamento do intervalo QRS podem refletir em um defeito de condução elétrica, lenta e heterogêna. Como já sugerido em trabalhos anteriores, embora nao se saiba ao certo que mecanismo explicaria esse fenômeno, estes fatores podem contribuir para o aumento da arritmogênese observada em pacientes com a doença, independentemente do desenvolvimento de alterações estruturais significativas [130].

As velocidades de condução do impulso elétrico dos microtecidos de CAVD-CMs, observadas em nosso modelo, se mostraram mais lentas do que as do controle-CM. Um dos principais fatores que influenciam a velocidade de condução é a densidade e organização de junções comunicantes (do inglês, *gap junctions*), que se co-localizam com canais de sódio nos discos intercalados. O remodelamento das junções comunicantes foi incialmente reportado em pacientes com manifestações cardiocutâneas da doença (síndrome de Naxos e Carvajal) [131,132,133] e diversos estudos já demonstraram á nível celular, como as alterações nas proteínas desmossomais, podem afetar outros componentes relacionados ao disco intercalado, inclusive as junções comunicantes e os canais de sódio [134].

Atualmente, diversos grupos tem colocado esforços na busca por estratégias para induzir a maturação dos hiPSC-CMs. Estudos mais recentes demonstram que, ao longo do tempo e com aumento da maturidade dos cardiomiócitos em cultura, estes têm suas estruturas mais bem desenvolvidas,

como os discos intercalados, e isso associou-se com o aumento da velocidade de condução do impulso elétrico nas células cardíacas [135]. Ao realizarmos alguns ensaios iniciais para se medir a velocidade de condução nos cardiomiócitos em monocamada, observamos uma alta taxa de rotores espontâneos. Ao oprtarmos pelo modelo dos microtecidos cardíacos (*Heart-on-a-chip*), baseado em modelos previamente descritos [75], a nossa observação de rotores espontâneos nas culturas em monocamadas, não eram vistas. Acreditamos que isso se deva ao fato de que os cardiomiócitos, quando colocados no dispositivo, sofreram processo de maturação e com isso, a velocidade de condução nas células pôde ser medida.

Outro ponto importante, relaciona-se com a população de não cardiomiócitos presente em nosso modelo organoide cardíaco (*Heart-on-a-chip*), onde adicionou-se de forma controlada, miofibroblastos. A avaliação da propagação do impulso elétrico, geralmente baseia-se no pressuposto de que cada célula do circuito cardíaco é um miócito cardíaco excitável, quando na realidade, o coração é um sistema multicelular em que pelo menos metade das células não são miócitos. Entre as populações de células cardíacas não-miócitos, os miofibroblastos representam a maior porcentagem. Sabe-se atualmente que os miofibroblastos podem servir como uma ponte elétrica entre miócitos. Portanto, uma vez que os miofibroblastos não são células excitáveis, seria esperado que estes se comportassem como dissipadores ou bloqueadores elétricos. Entretanto, diversos estudos sugerem efeitos positivos das populações mistas e heterogêneas cardíacas na velocidade de condução [136,137]. É sabido que, em níveis muito baixos de acoplamento entre fibroblastos e miócitos, um impulso elétrico vindo através dos miofibroblastos é insuficiente para ser transmitido aos cardiomiócitos. Assim, hipotetizamos que no caso da CAVD, como o acoplamento entre as células cardíacas sejam alteradas, além de áreas de excessiva fibrose, os miofibroblastos cardíacos se comportam como dissipadores do impulso elétrico e dificultam a propagação bem-sucedida, como visto nos clones CAVD-CM. Isso posto, é importante ressaltar que as consequências do acoplamento miofibroblasto-miócito são complexas, e tal complexidade pode levar a implicações clínicas importantes. Ademais, é importante ressaltar que os miofibroblastos adicionados em conjunto aos

cardiomiócitos nos microtecidos, não são paciente-específicos, o que nos leva a questionar se os efeitos fenotípicos poderiam ser intensificados ou simplesmente diferentes, caso ambos os tipos celulares fossem paciente-específicos e tivessem a mesma alteração genética.

Em relação aos achados de prolongamento da duração do potencial de ação (em 90% de repolarização) e uma menor força de contração dos CAVD-CMs, há diversos mecanismos que podem contribuir e poderiam explicar este resultado. De modo geral, o desacoplamento dos cardiomiócitos, pode gerar um aumento dos efeitos de qualquer mecanismo de prolongamento do potencial de ação. Este desacoplamento miocárdico facilita gradientes na repolarização, diminuindo o acoplamento eletrotônico entre as células, e como consequência, vemos um alargamento do intervalo QRS [138,139]. Além disso, mudanças funcionais nos canais iônicos, foram relacionados em estudos prévios á alterações genéticas na CAVD. A exemplo, estudos associando a corrente I_{Na} a alterações genéticas no gene *PKP2, ou* a colocalização da subunidade alfa do canal de sódio, Nav1.5 com *PKP2*, forneceram evidências de que a CAVD apresenta algumas características de uma canalopatia [140,141]. Outro mecanismo que pode contribuir para a repolarização prolongada é a progressão do fenótipo de insuficiência cardíaca associado à CAVD. A insuficiência cardíaca é uma complicação, geralmente relacionada a um estágio final da doença, no entanto o comprometimento sistólico em pode ocorrer em graus variados em ambos os ventrículos na ausência de insuficiência cardíaca clínica [142,143].

Embora nossa amostragem não seja suficiente para tirar conclusões sobre este fenômeno, a partir de nossos resultados, sugerimos que o potencial de ação prolongado nos pacientes com CAVD pode ser uma marca importante a nível celular.

Ainda que tenha sido possível observar diversas diferenças fenotípicas, estruturais, e funcionais nos clones CAVD-CMs em comparação ao clone controle-CM, há uma limitação quanto ao clone controle utilizado, uma vez que um dos objetivos era de se entender o papel das diferentes alterações causais no fenótipo celular. Em publicações mais recentes, estudos de modelagem de doenças têm utilizado controles isogênicos, ou seja, células que são

selecionadas ou projetadas para modelar com precisão a genética específica de pacientes, *in vitro*. No momento inicial da realização deste trabalho, a técnica de CRISPR/Cas9 já existia e era empregada para a geração de linhagens projetadas. No entanto, esta abordagem não era comumente vista nos estudos de modelagem para a doença em questão ou para outras cardiopatias usando-se hiPSC-CMs. Além disso, em nosso grupo de pesquisa ainda não havia experiência prática para a geração de controles isogênicos por meio desta técnica, e optou-se por utilizar os clones controles já caracterizados e utilizados em trabalhos prévios do laboratório. Todavia, acreditamos que a melhor estratégia para o entendimento do acometimento das variantes encontradas no fenótipo celular seria modificar o genoma das células, por meio da técnica de CRISPR/Cas9, de forma a corrigir as alterações genéticas pontualmente, e analisar se o fenótipo celular observado seria revertido.

Embora não tenha sido possível a validação destes resultados em um segundo clone de cada indivíduo, e, portanto, nossos achados não serem suficientes para tirar conclusões sobre a distinção fenotípica celular sob alguns aspectos funcionais entre os dois pacientes CAVD, podemos sugerir que o modelo celular aqui proposto, reproduziu diversas características fenotípicas da CAVD. Além disso, foi possível observar uma considerável semelhança fenotípica entre os clones dos pacientes, enquanto que os mesmos diferiram significativamente do controle. A congruência fenotípica encontrada nos clones de ambos os pacientes, sugere que os diferentes genótipos levam a fenótipos muito similares em nosso modelo celular para a CAVD.

A fim de realizarmos a validação de nosso modelo, nosso grupo pretende especificamente investir na melhora da eficiência entre diferentes linhagens celulares, para serem usados na possível reprodução dos resultados aqui obtidos.

6. Conclusões

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho que caracteriza o perfil genético da CAVD, abrangendo todos os genes descritos até o momento relacionados à doença, na população brasileira. No presente estudo, mais de um terço dos casos-índices com CAVD (38,3%) apresentaram uma variante patogênica ou provável patogênica, e estas se encontraram principalmente no gene *PKP2*.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que, pacientes com diagnóstico clínico confirmado e história familiar de MSC (<35 anos) têm maior probabilidade de portar uma variante causal. Para estes pacientes, pode ser indicado um rigoroso rastreamento clínico e genético de seus familiares. Além disso, nossos resultados mostraram uma maior porcentagem e uma relação significativa dos pacientes portadores de CDI, por indicação de profilaxia secundária, com alteração causal no gene *PKP2*. Este resultado sugere que pacientes com alteração causal em *PKP2* tem uma maior gravidade da apresentação fenotípica arrítmica.

O trabalho nos ajudou a reforçar que a interpretação e classificação das variantes podem ser desafiadoras. Assim, destacamos a importância de atenção e rigor na classificação das variantes, baseadas no fenótipo clínico, a fim de não superestimar os casos positivos. Da mesma forma, o rastreamento das VSI ao longo do tempo é algo importante de se ressaltar, uma vez que estas podem ser reclassificadas de acordo com mudanças nos critérios ou aumento da quantidade de dados disponíveis, e consequentemente, afetar o manejo dos pacientes.

Neste trabalho, foi possível estabelecer um protocolo robusto de reprogramação de hiPSCs a partir de células progenitoras de urina (UPCs), que foi publicado. As hiPSCs foram posteriormente diferenciadas em cardiomiócitos funcionais com sucesso. Uma vez que estes protocolos se mostraram eficazes, os cardiomiócitos foram utilizados para uma série de ensaios para a caracterização e avaliação da funcionalidade para a modelagem da CAVD.

Nós demonstramos neste estudo que os cardiomiócitos derivados de hiPSC dos pacientes com CAVD selecionados a partir de nossa casuística, exibem algumas das principais características da doença. Dentre elas, uma redução das proteínas desmossomais, alterações nos desmossomos, um fenótipo sugestivo de adipogênese, bem como alterações eletrofisiológicas. Além disso, foi possível observar uma considerável semelhança fenotípica entre os clones dos pacientes, enquanto que os mesmos diferiram significativamente do controle. A congruência fenotípica encontrada nos clones de ambos os pacientes, sugere que os diferentes genótipos levam a fenótipos muito similares em nosso modelo celular para a CAVD. O presente modelo, que contemplou células paciente-específicas com diferentes alterações das estudadas até o presente momento, pode ser um acréscimo ás ferramentas disponíveis para estudar o mecanismo desta doença complexa.

Mais estudos envolvendo modelos e abordagens funcionais e moleculares para estudar as conseqüências de alterações genéticas em genes desmossomais ou não-desmossomais podem ajudar na compreensão dos mecanismos moleculares da CAVD e servir como informação adicional para a classificação de variantes em relação a patogenicidade. Ainda, existem outros fatores que podem ter um papel relevante na patogênese e mecanismo da doença, como as interações entre diversos tipos celulares, as propriedades tridimensionais do tecido e forças mecânicas externas, que poderão ser melhor compreendidas conforme os avanços no campo da engenharia de tecidos *in vitro*.

Com base na experiência da realização deste trabalho e todas as limitações envolvidas, acreditamos que nosso estudo direciona a algumas possíveis perspectivas na continuação deste ou de trabalhos futuros. Seriam elas: 1) o rastreamento genético em cascata para os familiares dos casos-índices portadores de uma alteração genética causal confirmada 2) o desenvolvimento de modelos preditivos da positividade do teste genético; 3) a validação dos resultados obtidos até o presente momento no modelo celular; 4) o aperfeiçoamento do modelo celular, incluindo a geração de linhagens controles isogênicas, para estudar a doença e possivelmente outras cardiomiopatias/canalopatias pesquisadas em nosso laboratório; 5) a utilização

do modelo celular proposto para responder a novas questões sobre o mecanismo molecular que possam ser clinicamente relevantes; 6) a utilização do modelo celular como substrato para a pesquisa de alvos terapêuticos, terapia celular e medicina personalizada para a CAVD.

7. Anexos

7. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

4042/14/022

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO GENÉTICO EM ARRITMIAS CARDÍACAS: AVALIAÇÃO DE PACIENTES E FAMILIARES.
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca **Versão: 3**
Pesquisador Executante: Dra. Luciana Sacilotto **CAAE:** 39327214.8.0000.0068
Coautores: Dra. Denise Tessariol Hachul, Dr. Francisco Carlos da Costa Darrieux, Dr. Alexandre da Costa Pereira
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Dr. Francisco Carlos da Costa Darrieux
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11113

Número do Parecer: 1.152.883

Data da Relatoria: 15/07/2015

Apresentação do Projeto: Trata-se do subprojeto de dissertação de mestrado da aluna Fanny Wulkan, sob orientação do Dr. Alexandre da Costa Pereira, intitulado "Análise Genética de Pacientes Portadores de Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD) e Caracterização Funcional em Cardiomiócitos Diferenciados (iPSC-CM)", que apresenta como objetivo a padronização e aplicação de plataformas de sequenciamento de nova geração no diagnóstico molecular da DAVD e a correlação entre carga mutacional e a expressão fenotípica da doença.Os objetivos estão claros, metodologia adequada e o desenvolvimento do projeto não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo para a dissertação de mestrado será estudar a relação de diversos genes que podem ser responsáveis pela herança oligogênica da DAVD e correlacionar a carga de mutações com a expressão fenotípica celular em casos familiares. O objetivo está claro e a metodologia aplicada é pertinente a proposta do projeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos para os sujeitos da pesquisa são mínimos, serão coletadas amostras de sangue que posteriormente serão submetidas à avaliação genética

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

molecular e poderão trazer benefícios futuros não só para os sujeitos da pesquisa, assim como para seus familiares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Um projeto de relevância na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresenta-se adequado e dentro das normas éticas desta comissão.

Recomendações: Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Recomendamos suas aprovação.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
27 / 07 / 2015
Anna Lucia

São Paulo, 15 de Julho de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO B – Painel de Genes personalizado para miocardiopatias e canalopatias.

GENE	DOENÇA RELACIONADA	GENE	DOENÇA RELACIONADA
ABCC9	FA, SB	***KCNJ2***	LQT7, FA, LQT3
ACTA2	AC	***KCNJ5***	LQT13, SÍNCOPE
ACTC1	CMH, MNC	***KCNJ8***	SB, RP
ACTN2	CMH	***KCNK17***	FA
AGTR1	FA	***KCNN3***	FA
AKAP9	LQT11	***KCNQ1***	LQT1, FA
ANK2	LQT4, TVPC	***LMF1***	HTG
ASPH	FA	***LMNA***	CMD, CAVD
C9ORF3	FA	***MYBPC3***	CMH, MNC
CACNA1C	SB, LQT8, RP	***MYL2***	CMH
CACNA2D1	SB, SQT	***MYL3***	CMH
CACNB2	SB, RP	***MYLK2***	CMH
CALM1	LQT14	***MYOZ2***	CMH
CALM2	LQT15	***MYPN***	CMH
CALR3	CMH	***NEXN***	CMH
CASQ2	TVPC	***NKX2-5***	FA
CAV1	FA	***NPPA***	FA
CAV3	LQT9	***PDLIM3***	CMH
CTNNA3	CAVD	***PITX2***	FA
DES	CAVD	***PKP2***	CAVD
DMD	CMD	***PRKAG2***	CMH
DSC2	CAVD	***PRRX1***	FA
DSG2	CAVD	***RANGRF***	SB
DSP	CAVD	***RYR2***	TVPC, CAVD
DTNA	NCVE	***SCN10A***	SB
EMD	CMD	***SCN1B***	SB
EYA4	AC	***SCN2B***	FA, SB
FBN1	Fibrilinopatias	***SCN3B***	SB
FHL2	CMH	***SCN4B***	LQT10
FKTN	CMD	***SCN5A***	SB, LQT3, FA
FLNC	CMH	***SLMAP***	SB12
GJA1	MSI	***SNTA1***	LQT12
GJA5	FA	***SYNE2***	FA
GLA	CMH	***SYNPO2L***	FA
GPD1L	MSI	***TAZ***	CMD
HCN1	MULTI	***TBX5***	CMH
HCN2	MULTI	***TCAP***	CMH, CMD
HCN4	SB, FA	***TGFB3***	CAVD
ILK	CMD	***TMEM43***	CMH, CAVD
JPH2	CMH, FA	***TNNC1***	CMH
JUP	CAVD	***TNNI3***	CMH
KCNA5	FA	***TNNI3K***	FA
KCND2	MS	***TNNT2***	CMH, MNC
KCND3	SB	***TPM1***	CMH
KCNE1	LQT5, FA	***TRDN***	TVPC

KCNE1L	FA	***TRIM63***	CMH
KCNE2	LQT6	***TRPM4***	SB
KCNE3	SB	***TTN***	MS, CMD, CMH, SB, CAVD
KCNE4	FA	***ZFHX3***	FA
KCNH2	LQT2	***PMVK***	FA

Legenda: FA - Fibrilação Atrial, SB - Síndrome de Brugada, LQT- Síndrome do QT longo, CAVD - Cardiomiopatia Arritmogênica do Ventrículo Direito, CMH - Cardiomiopatia Hipertrófica, MNC - Miocardiopatia não-compactada , MULTI - múltiplas arritmias , MSI - Morte Súbita Infantil , TVPC - Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica, AC - Anomalias Cardiovasculares, SQT - Síndrome do QT curto, HTG - Hipertrigliceridemia, CMD - Cardiomiopatia dilatada, NCVE - Não Compactação do Ventrículo Esquerdo, MS - Morte Súbita.

ANEXO C – Termos de Consentimento Livre e Esclarescido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:
BAIRRO: ..... CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo genético em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.

SUBPROJETO: Análise Genética de Pacientes Portadores de Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD) e Caracterização Funcional em Cardiomiócitos Diferenciados (iPSC-CM).

PESQUISADOR: Mauricio Ibrahim Scanavacca

NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 33507

CARGO/FUNÇÃO: Médico Diretor da Unidade Clínica de Arritmia e Marcapasso

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Descrição e objetivo da pesquisa:

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar uma doença genética (hereditária) que leva a alguns tipos de problemas do ritmo do coração (arritmias). A arritmia genética que será investigada é a Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD), que é uma doença que você possa ter ou algum membro da sua família.
Neste projeto vamos estudar um tipo de célula semelhante às células de seu coração. O objetivo do estudo é saber como a alteração no seu material genético (DNA) vai levar à mudanças na célula do coração e consequentemente à doença do coração.

II – PROCEDIMENTOS QUE PODERÃO SER REALIZADOS:

Coleta de urina*:* será coletada uma quantidade entre 50ml e 250ml de urina em frascos coletores estéreis de 50ml. Não é necessário estar de jejum e é aconselhável ingerir líquidos entre 1:00h e 30 minutos antes da coleta.

***Biópsia de pele**:* será feita uma pequena incisão através de uma agulha de ponta arredondada que irá retirar um pequeno fragmento de aproximadamente 3mm da pele da porção anterior do antebraço (região que tem menor quantidade de vasos sanguineos). Antes da realização dessa punção de pele o local será cuidadosamente limpo para se evitar infecção e a pele será anestesiada no local, para que o Sr(a), não sinta dor.

Tanto as células da urina, quanto as da pele terão como propósito ser o ponto de partida para uma provável obtenção final de uma célula do coração.

III - RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:

***Coleta de urina*:** Risco ausente.

Biópsia de pele: O local será anestesiado e limpo durante o procedimento para se evitar infecção, entretanto, poderá ocorrer infecção local, porém caso o Sr(a). manipule o local após o procedimento poderá haver infecção. O Sr(a). poderá sentir um pequeno ardor no momento da aplicação da agulha com anestésico, que passará rapidamente com a infusão do líquido de anestésico na pele. Também pode apresentar uma sensação de formigamento no momento da aplicação da anestesia, que também passará rapidamente. Durante o processo de cicatrização o Sr(a). deve manter o curativo (ponto falso) para que as bordas da cicatriz não se abram e evite tanto infecção, quanto a formação de um tecido fibroso no local (queloide). Uma pequena marca cicatricial, de 3mm, pode aparecer no local. Esse procedimento é considerado de muito baixo risco.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNADO

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas;
2. O Sr.(a) tem plena liberdade de não autorizar a utilização da coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após a

leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.

3. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento de participar do estudo.
4. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
5. Os resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
6. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
7. Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Instituto do Coração/HCFMUSP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
8. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, n° 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5341. Se o Sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
9. O sangue coletado será processado e armazenado em banco/repositório do InCor. O mesmo será utilizado para sequenciamento de DNA e identificação da presença de mutação. Após os testes, o DNA será mantido no banco/repositório, localizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - 10º andar, Bloco 2 – InCor, para identificações futuras de novas mutações e para futuros estudos envolvendo este ou outro projeto relacionado ás Arritmias Cardíacas. O material será mantido no banco/repositório durante os três anos de vigor do Projeto, mas este prazo poderá ser maior caso o Projeto seja renovado.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo genético em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.

SUBPROJETO: Análise Genética de Pacientes Portadores de Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD) e Caracterização Funcional em Cardiomiócitos Diferenciados (iPSC-CM).

PESQUISADOR: Mauricio Ibrahim Scanavacca

NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 33507

CARGO/FUNÇÃO: Médico Diretor da Unidade Clínica de Arritmia e Marcapasso

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Descrição e objetivo da pesquisa:

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar uma doença genética (hereditária) que leva a alguns tipos de problemas do ritmo do coração (arritmias). A arritmia genética que será investigada é a Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito (DAVD), que é uma doença que você possa ter ou algum membro da sua família.

Com este estudo poderemos buscar informações importantes, por exemplo, em relação aos diferentes sintomas e as respostas ao tratamento entre pessoas com o mesmo tipo de doença. O exame genético pode identificar melhor a doença em seus familiares, que devem realizar acompanhamento médico, quando indicado. Além disso, será possível identificar familiares portadores da alteração genética, mesmo com exames cardiológico normais.

Para participar desse projeto de pesquisa, basta ceder uma amostra de sangue. Será efetuada coleta de 10ml de sangue em tubo com EDTA. A coleta deve seguir todas as normas de higiene e segurança estabelecidas para este fim. Esta será efetuada por

profissionais enfermeiros treinados e participantes do projeto. Desta amostra de sangue será pesquisada a alteração genética.

III - RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:

O único desconforto pode ser a picada de agulha em seu braço (como em qualquer exame de sangue). O risco mínimo, neste caso, se refere à possibilidade de um pequeno hematoma (roxo ou vermelhidão) no local da coleta de sangue, além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado.
Benefícios: Trata-se de estudo genético observacional, que visa identificar a alteração genética que causa as Arritmias Cardíacas. Caso seja possível identificar a mutação, você terá o benefício de diagnosticar os seus familiares que podem estar afetados e não sabem. O diagnóstico precoce possibilita um melhor tratamento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNADO

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas;
2. O Sr.(a) tem plena liberdade de não autorizar a utilização da coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após a leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.
3. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento de participar do estudo.
4. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.

5. Os resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
6. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
7. Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Instituto do Coração/HCFMUSP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
8. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, n° 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5341. Se o Sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
9. O sangue coletado será processado e armazenado em banco/repositório do InCor. O mesmo será utilizado para sequenciamento de DNA e identificação da presença de mutação. Após os testes, o DNA será mantido no banco/repositório, localizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - 10º andar, Bloco 2 – InCor, para identificações futuras de novas mutações e para futuros estudos envolvendo este ou outro projeto relacionado ás Arritmias Cardíacas. O material será mantido no banco/repositório durante os três anos de vigor do Projeto, mas este prazo poderá ser maior caso o Projeto seja renovado.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO D – Primers utilizados para o estudo das alterações em *splicing*.

Gene - localização	**Senso**	**Anti-senso**
PKP2 - íntron 13-14	ATGCACGCGACCTTCTAAAC	CCACTATTTGTCGAGCCTGTG
PKP2 – íntron 3-4	GGGAAGTGGGAATCTGCTC	AGTTTCTCAAGGCCCCACAC
DSG2 – íntron 5-6	TGATCTTGCAGAAGAAAGAGGA	GAGGATAAGCAGGCTCCAGA

8. Referências

1. Fontaine G, Guiraudon G, Frank R et al - Stimulation studies and epicardial mapping in ventricular tachycardia: study of mechanisms and selection for surgery. In: Kulbertus HE - Reentrant Arrhythmias, ed. Lancaster: MTP Pub, 1977; 334-50.

2. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C. et al. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982;65(2):384-98.

3. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;373(9671):1289-300

4. Lindström L, Nylander E, Larsson H, Wranne B. Left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy - a scintigraphic and echocardiographic study. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2005;25(3):171-7.

5. Daliento L, Turrini P, Nava A, Rizzoli G, Angelini A, Buja G, *et al.* Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in young versus adult patients: Similarities and differences. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25(3):655-64.

6. Corrado, D., Link, M. S. & Calkins, H. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med*.2017;376: 61–72.

7. Nava A, Martini B, Thiene G, Buja GF, Canciani B, Scognamiglio R, et al. [Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Study of a selected population]. *G Ital Cardiol*. 1988;18(1):2-9.

8. Peters S, Trümmel M, Meyners W. Prevalence of right ventricular dysplasia-cardiomyopathy in a non-referral hospital. *Int J Cardiol*. 2004;97(3):499-501.

9. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Pantazis A, Quarta G, McKenna WJ, Chambers JC. Mutational Heterogeneity, Modifier Genes, and Environmental Influences Contribute to Phenotypic Diversity of Arrhythmogenic Cardiomyopathy*. Circ Cardiovasc Genet.* 2010 ;3(4):323-30.

10. Battipaglia I, Scalone G, Macchione A, Pinnacchio G, Laurito M, Milo M. *et al.* Association of Heart Rate Variability With Arrhythmic Events in Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *Circ J*. 2012;76(3):618-23.

11. Dalal D, Nasir K, Bomma C, Prakasa K, Tandri H, *et al.* Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a United States experience. *Circulation*. 2005 Dec 20;112(25):3823-32.

12. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G. *et al.* Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J*. 1994;71(3):215-8.

13. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, *et al.* Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J*. 2010;31(7):806-14.

14. Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, *et al.* Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet*. 2000 ;9(18):2761-6.

15. Awad MM, Dalal D, Tichnell C, James C, Tucker A, Abraham T, *et al.* Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. *Hum Mutat*. 2006;27(11):1157.

16. Gandjbakhch E, Redheuil A, Pousset F, Charron P, Frank R..Clinical Diagnosis, Imaging, and Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(7):784-804

17. Delmar M, McKenna WJ. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: from gene to disease. *Circ Res*. 2010;107(6):700-14.

18. Fressart V, Duthoit G, Donal E, Probst V, Deharo JC, Chevalier P, *et al.* Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. *Europace*. 2010;12(6):861-8.

19. Quarta G, Muir A, Pantazis A, Syrris P, Gehmlich K, Garcia-Pavia P, *et al.* Familial evaluation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: impact of genetics and revised task force criteria. *Circulation*. 2011;123(23):2701-9.

20. Campuzano O, Alcalde M, Allegue C, Iglesias A, García-Pavía P, Partemi S, *et al.* Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. J Med Genet. 2013;50(5):280-9.

21. Roux-Buisson N, Gandjbakhch E, Donal E, Probst V, Deharo JC, Chevalier P. *et al.* Prevalence and significance of rare RYR2 variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Results of a systematic screening. Heart Rhythm. 2014;11(11):1999-2009.

22. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, *et al.* Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001;10(3):189-94.

23. Gandjbakhch E, Vite A, Gary F, Fressart V, Donal E, Simon F, *et al.* Screening of genes encoding junctional candidates in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Europace*. 2013;15(10):1522-5.

24. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Role of genetic analysis in the management of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Nov 6;50(19):1813-21.

25. Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna WJ, Davies MJ, Fontaliran F, *et al.* Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(6):1512-20.

26. Basso, C. *et al.* Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation* . 1996;94**:**983–991.

27. Lombardi R, Marian AJ. Molecular Genetics and Pathogenesis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: A Disease of Cardiac Stem Cells. *Pediatr Cardiol.* 2011;32(3):360-5.

28. Barahona-Dussault C, Benito B, Campuzano O, Iglesias A, Leung TL, Robb L, *et al.* Role of genetic testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Clin Genet*. 2010;77(1):37-48

29. Li CH, Lin YJ, Huang JL, Wu TJ, Cheng CC, Lin WS, *et al.* Long-term follow-up in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2012;23(7):750-6

30. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005;16(8):927-35.

31. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Desmoplakin disease in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: early genotype-phenotype studies. *Eur Heart J*. 2005 ;26(16):1582-4

32. Mardis, ER. A decade´s perspective on DNA sequencing technology. Nature.2011

33. Polychronakos C, Seng KC. Exome diagnostics: already a reality? *J Med Genet.* 2011 ;48(9):579.

34. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet*. 2013;14:295-300.

35. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. *Cancer Lett*. 2013;340(2):284-295.

36. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

37. Sommariva E, Stadiotti I, Perrucci GL, Tondo C, Pompilio G. Cell models of arrhythmogenic cardiomyopathy: advances and opportunities. Dis Model Mech. 2017;10(7):823–835.

38. Wong WT, Sayed N, Cooke JP. Induced pluripotent stem cells: how they will change the practice of cardiovascular medicine. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2013 ;9(4):206-9.

39. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76

40. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S.. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2007;2(12):3081-9..

41. Raab S, Klingenstein M, Liebau S, Linta L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells* Int. 2014;2014:768391.

42. González F, Boué S, Belmonte J. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet*. nature; 2011;12(4):231–42.

43. Mochiduki Y, Okita K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J.* 2012;7(6):789-97.

44. Somers A, Jean J, Sommer C, Omari A, Ford C, Mills J, et al. Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette. *STEM CELLS*. 2010;28(10):1728–40

45. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation research*. 2013;112(3):523–33.

46. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-30.

47. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*. 2011;8(5):409–12.

48. Assou S, Bouckenheimer J, De Vos J. Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics?. *Stem Cells*. 2018;36(6):814-821.

49. Xu L, Tan YY, Ding JQ, Chen SD. The iPS Technique Provides Hope for Parkinson's Disease Treatment. *Stem Cell Rev*. 2010;6(3):398-404.

50. Abdelalim EM, Bonnefond A, Bennaceur-Griscelli A, Froguel P. Pluripotent Stem Cells as a Potential Tool for Disease Modelling and Cell Therapy in Diabetes. *Stem Cell Rev*. 2014;10(3):327-37.

51. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 20107;363(15):1397-409.

52. Wong WT, Sayed N, Cooke JP. Induced pluripotent stem cells: how they will change the practice of cardiovascular medicine. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2013;9(4):206-9.

53. Lahti AL, Kujala VJ, Chapman H, Koivisto AP, Pekkanen-Mattila M, Kerkelä E, *et al.* Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech*. 2012;5(2):220-30.

54. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Caspi O, *et al.* Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(11):990-1000.

55. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L *et al.* Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2013;12(1):101-13.

56. Sallam K, Kodo K, Wu JC.Modeling inherited cardiac disorders. Circ J. 2014;78(4):784-94.

57. Saffitz JE, Asimaki A, Huang H.. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: new insights into disease mechanisms and diagnosis. *J Investig Med*. 2009 ;57(8):861-4.

58. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. Science [Internet]. *American Association for the Advancement of Science*; 2006;313(5795):1922–7.

59. Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. Annu *Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:45–68.

60. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular Regulation of Cardiomyocyte Differentiation. *Circ Res*. 2015;116(2):341–53.

61. Meganathan K, Sotiriadou I, Natarajan K, Hescheler J, Sachinidis A. Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from in-vivo and in-vitro models for the regulation of cardiac development. International Journal of Cardiology. sciencedirect; 2015;

62. Tam P, Behringer R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev. sciencedirect*; 1997

63. Tan K, Eminli S, Hettmer S, Hochedlinger K, Wagers A. Efficient Generation of iPS Cells from Skeletal Muscle Stem Cells. *PLoS ONE*. 2011;6(10).

64. Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, et al. Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem Cells Dev*. 2013;22(9):1419-32

65. Zanella F, Lyon R, Sheikh F. Modeling heart disease in a dish: From somatic cells to disease-relevant cardiomyocytes. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2014;24(1):3244

66. Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, et al. Tri-iodo-l-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:296–304.

67. Yang X, Pabon L, Murry C. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation* research. 2014;114(3):511–523.

68. van den Heuvel NH, van Veen TA, Lim B, Jonsson MK. Lessons from the heart: mirroring electrophysiological characteristics during cardiac development to in vitro differentiation of stem cell derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;67:12-25

69. Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(14):1991-2002

70. Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, et al. Tri-iodo-l-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:296–304.

71. Lee JH, Protze SI, Laksman Z, Backx PH, Keller GM .Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell*. 20173;21(2):179-194.e4.

72. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):228-40.

73. Elliott NT, Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. J Pharm Sci 2011;100:59–74.

74. Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ et al. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. Am J Phys.1999;277:H433–H444.

75. Nunes SS, Miklas JW, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, et al. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Nature methods. 2013; 10(8):781–787.

76. Hoes MF, Bomer N, van der Meer P. Concise Review: The Current State of Human In Vitro Cardiac Disease Modeling: A Focus on Gene Editing and Tissue Engineering. Stem Cells Transl Med. 2019;8(1):66-74.

77. Ruan JL, Tulloch NL, Razumova MV, Saiget M, Muskheli V, Pabon L,et al. Mechanical stress conditioning and electrical stimulation promote contractility and force maturation of induced pluripotent stem cell- derived human cardiac tissue. Circulation 2016;134:1557–1567.

78. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D,et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. Nature 2018;556:239–243.

79. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. Circ Res 2007;100:263–272.

80. Han P, Li W, Lin CH, Yang J, Shang C, Nuernberg ST, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. Nature 2014;514:102–106.

81. Anand P, Brown JD, Lin CY, Qi J, Zhang R, Artero PC, et al. BET bromodomains mediate transcriptional pause realease in heart failure. *Cell* 2013; 154: 569-582.

82. Zhao Y, Feric NT, Thavandiran N, Nunes SS, Radisic M. The role of tissue engineering and biomaterials in cardiac regenerative medicine. *Can J Cardiol*. 2014;30(11):1307–1322.

83. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, *et al.* Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Eur Heart J. 2013 ;34(15):1122-33

84. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, *et al.* Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. Nature. 2013;494(7435):105-10.

85. Caspi O, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Maizels L, Boulos M, *et al.* Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. Circ Cardiovasc Genet. 2013;6(6):557-68.

86. Mummery C, Zhang J, Ng E, Elliott D, Elefanty A, Kamp T. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes A Methods Overview. Circulation Research. 2012;111(3):344–58.

87. Sherry, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res 2001;* 29**:**308–311.

88. Fu W, O'Connor TD, Jun G, Kang HM, Abecasis G, Leal SM, *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. Nature. 2013 Jan 10;493(7431):216-20.

89. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho Net al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. Human Mut. 2017; 38 (7): 751-763

90. Oliveira, TGM. Aplicação do sequenciamento de nova geração no diagnóstico molecular da cardiomiopatia hipertrófica [dissertação online]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2015. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5166/tde-29102015-115502/pt-br.php.

91. Zook JM, Chapman B, Wang J, Mittelman D, Hofmann O, Hide W, *et al.* Integrating human sequence data sets provides a resource of benchmark SNP and indel genotype calls. *Nat Biotechno*l. 2014 ;32(3):246-51.

92. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T, *et al.* Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol*. 2012;30(11):1033-6.

93. Oliveira TG, Mitne-Neto M, Cerdeira LT, Marsiglia JD, Arteaga-Fernandez E, Krieger JE, *et al.* A Variant Detection Pipeline for Inherited Cardiomyopathy–Associated Genes Using Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2015;17(4):420-30.

94. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.

95. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001 ;11(5):863-74.

96. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 ;7(4):248-9.

97. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS. *et al.* Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577-81.

98. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S. *et al.* ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D862-8.

99. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273–277.

100. Zhu WZ, Van Biber B, Laflamme MA. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;767:419–431.

101. Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, et al. Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Regen Med.* 2011;6(1):53-66.

102. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.

103. Breckwoldt K et al. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc.* 2017;12(6):1177-1197.

104. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data", *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):529.

105. Laughner JI, Ng FS, Sulkin MS, Arthur RM, Efimov IR.. Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(7):H753-65.

106. Basso C, Bauce B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol. 2011;9(4):223-33

107. Andreasen C, Nielsen JB, Refsgaard L, Holst AG, Christensen AH, Andreasen L, et al. New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. Eur J Hum Genet. 2013 ;21(9):918-28

108. Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Eviden ce for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10512-22.

109. Huber, O. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. Cell Mol Life Sci. 2003;60(9):1872-90.

110. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Wilde AA, et al. Plakophilin-2 Mutations Are the Major Determinant of Familial Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;113(13):1650-8.

111. Xu T, Yang Z, Vatta M, Rampazzo A, Beffagna G, Pilichou K, et al. Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55: 587–597.

112. Rigato I, Bauce B, Rampazzo A, Zorzi A, Pilichou K, Mazzotti E, et al. Compound and digenic heterozygosity predicts lifetime arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(6):533-42.

113. Bauce B, Nava A, Beffagna G, Basso C, Lorenzon A, Smaniotto G, et al. Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. Heart Rhythm 2010;7:22–9.

114. Fressart V, Duthoit G, Donal E, Probst V, Deharo JC, Chevalier P, et al. Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. Europace. 2010;12(6):861-8.

115. Cox MG, van der Zwaag PA, van der Werf C, van der Smagt JJ, Noorman M, Bhuiyan ZA, *et al.* Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Pathogenic Desmosome Mutations in Index-Patients Predict Outcome of Family Screening: Dutch Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Genotype-Phenotype Follow-Up Study. *Circulation*. 2011;123(23):2690-700.

116. Tan BY, Jain R, den Haan AD, Chen Y, Dalal D, Tandri H, et al. Shared desmosome gene findings in early and late onset Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomiopathy.J Cardiovasc Transl Res. 2010; 3 (6), 663–673.

117. Calkins H, Corrado D, Marcus F. Risk Stratification in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Circulation. 2017;136(21):2068–2082.

118. Corrado D, Zorzi A, Cerrone M, Rigato I, Mongillo M, Bauce B, et al. Relationship Between Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Brugada Syndrome: New Insights From Molecular Biology and Clinical Implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9(4):e003631.

119. Te Riele AS, Agullo-Pascual E, James CA, Leo-Macias A, Cerrone M, Zhang M, et al. Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. *Cardiovasc Res*. 2017;113(1):102-111.

120. Yu J, Hu J, Dai X, Cao Q, Xiong Q, Liu X, et al. SCN5A mutation in Chinese patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Herz* 2014;39:271–5.

121. Kataoka S, Serizawa N, Kitamura K, Suzuki A, Suzuki T, Shiga T, et al. An overlap of Brugada syndrome and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. J Arrhythm. 2015;32(1):70-3.

122. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013l;31(7):397-405.

123. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*. 2012 ;7(12):2080-9.

124. Zhou, T. *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Urine. *J. Am. Soc. Nephrol.2011;* 22**:**1221–1228.

125. Steichen C, Si-Tayeb K, Wulkan F, Crestani T, Rosas G[5], Dariolli R, et al. Human induced pluripotent stem (hips) cells from urine samples: a non-integrative and feeder-free reprogramming strategy. Curr. Protoc. Hum. Genet. 2017;92:21.7.1-21.7.22.

126. Zhang D, Wei G, Li P, Zhou X, Zhang Y. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis*. 2014;1(1):8-17.

127. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E. *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 2011;471(7336):58-62

128. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, *et al.* Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ESCs and iPSCs during Reprogramming and Time in Culture. *Cell Stem Cell*. 2011;8(1):106-18

129. Halbach M, Egert U, Hescheler J, Banach K. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures. *Cell Physiol Biochem*. 2003;13:271–28.

130. Rizzo S, Lodder EM, Verkerk AO, Wolswinkel R, Beekman L, Pilichou K, et al. Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovasc Res*. 2012;95:409–418.

131. Asimaki A, Saffitz JE. Gap junctions and arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm*. 2011;9(6):992–995.

132. Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, et al. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm*. 2004;1(1):3-11.

133. Kaplan SR, Gard JJ, Carvajal-Huerta L, Ruiz-Cabezas JC, Thiene G, Saffitz JE. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13(1):26-32.

134. Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Musa H, Oxford E, Taffet S, Delmar M.. Characterization of the molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations. Heart Rhythm. 2008;5(12):1715-23.

135. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J*. 2013;34(15):1147-56

136. Camelliti P, McCulloch AD, Kohl P. Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*. 2005; 11(3):249–259.

137. Radisic M, Park H, Martens TP, Salazar-Lazaro JE, Geng W, Wang Y, et al. Pre-treatment of synthetic elastomeric scaffolds by cardiac fibroblasts improves engineered heart tissue. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86(3):713-24.

138. Viswanathan PC, Shaw RM, Rudy Y. Effects of IKr and IKs heterogeneity on action potential duration and its rate dependence: a simulation study. *Circulation*. 1999;99:2466–2474.

139. Andrews CM, Srinivasan NT, Rosmini S, et al. Electrical and Structural Substrate of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Determined Using Noninvasive Electrocardiographic Imaging and Late Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2017;10(7):e005105.

140. Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;105:523–526.

141. Mays DJ, Foose JM, Philipson LH, Tamkun MM. Localization of the Kv1.5 K+ channel protein in explanted cardiac tissue. J *Clin Invest*. 1995;96:282–292.

142. Corrado D, Wichter T, Link MS, Hauer RNW, Marchlinski FE, Anastasakis A, Bauce B, Basso C, Brunckhorst C, Tsatsopoulou A, Tandri H, Paul M, Schmied C, Pelliccia A, Duru F, Protonotarios N, Estes NM, McKenna WJ, Thiene G, Marcus FI, Calkins H. Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. American Heart Association Journals. 2015:441–453

143. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. Circulation. 2007; 115:1710–1720.

144. Jacob Marks, Yale Scientific, 2014. Face lifts for skin cells: Fast cell cycles leads to eficiente reprogramming. Periódico online. Disponível em: http://www.yalescientific.org/2014/07/face-lifts-for-skin-cells-fast-cell-cycles-lead-to-efficient-reprogramming/