

Aline Alfonso Keusseyan

Identificação de genes com potencial de serem alvos terapêuticos para reparar ou regenerar o tecido cardíaco adulto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**São Paulo
2019**

Aline Alfonso Keusseyan

Identificação de genes com potencial de serem alvos terapêuticos para reparar ou regenerar o tecido cardíaco adulto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

**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

Keusseyan, Aline Alfonso

Identificação de genes com potencial de serem
alvos terapêuticos para reparar ou regenerar o
tecido cardíaco adulto / Aline Alfonso Keusseyan. --
São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de

Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Coração 2.Regeneração 3.Ratos
4.Neonatos 5.Peixe-zebra 6.Cardiomiócitos
7.Frequência cardíaca

USP/FM/DBD-176/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esta, bem como todas minhas demais conquistas, à minha mãe e meu pai. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Agradecimentos

Agradeço à **Deus** por ter me dado a chance de terminar este trabalho de Mestrado. Agradeço por ter me dado o sopro da vida e ter perpetuado em mim a fé para que eu trilhasse confiante.

A meus pais, **Maria Cristina e Eduardo**, pois vocês me permitiram ver o quanto a vida é importante, colocando-me sempre como prioridade na vida de vocês. Mãe, muito obrigada por me dar força durante esta jornada, foram anos difíceis, mas a sua presença me alegra sempre. Pai, muito obrigada por ter sido meu companheiro em todas as etapas de minha vida, sinto sua falta todos os dias (que descanse em paz).

Aos meus avós, **Maria Carmen, Antônio, Clarice e Mardiros**, por terem cuidado e carinho especial por mim, por terem me incentivado a fazer pesquisa e estudar cada vez mais.

Ao meu namorado, **William**, por ser a pessoa especial que está ao meu lado em todos os momentos, por me incentivar e motivar nesse trabalho, por acolher minhas dificuldades, tentando me ajudar sempre.

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, por me abrir as portas do laboratório, por confiar em mim e nos meus objetivos, por me apresentar a pesquisa de forma inteligente, aplicando técnicas robustas e inovadoras.

Aos meus co-orientadores, **Dr. Vinícius Bassaneze e Dr. Rafael Dariolli**, por me mostrarem caminhos para alcançar os objetivos desse trabalho, pela parceria e disponibilidade de discutir os resultados.

Aos meus amigos e colaboradores do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, **Agatha Ribeiro, Ana Elisa Carvalho, Ana Marcondes, Elida Neri, Fernanda Marques, Iguaracy Souza, Juan Muñoz, Juliana Alvim, Luiz Fernando Zuleta, Miriam Alaniz, Mariliza Rodrigues, Samantha Teixeira, Thayane Crestani, Thaís Girão e Thiago Turaça**, por compartilharem comigo suas experiências e conhecimento.

Aos meus amigos da Universidade Federal de São Paulo, **Danilo Micali, Fabiana Paz, Fabiano Romão, Felipe Castro, Flávia Juscele e Matheus Trovão**, por estarem sempre estarem presentes na minha vida, e por partilharem bons momentos comigo.

Ao **Prof. Eric Bryan Strauss**, por sintetizar alguns dos vetores virais utilizados nesse trabalho, participar da minha banca de qualificação e se mostrar tão solícito em discutir a evolução do trabalho.

À **Prof. Dra. Mônica Lopes Ferreira e Dra. Carla Lima**, por me darem suporte com as ferramentas para estudo em *peixe-zebra*, por disponibilizarem a estrutura do biotério para cultivo e experimentação em peixes, e por colaborarem com ideias relevantes para esse estudo. Aos alunos **Adolfo Luis Maleski e Maria Alice Galvão** pelos experimentos realizados por eles no mesmo Instituto.

A Profa. Dra. **Daniela Santoro Rosa** da UNIFESP, por ceder o citômetro (FACS) e à operadora do mesmo, **Daniela Teixeira**. Agradeço também aos animais que foram utilizados nesse estudo (ratos e peixes), bem como a doação de células (fibroblastos), feita pela aluna de Doutorado **Samantha Teixeira**.

Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é nunca desistir.

(Albert Einstein)

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos.....	13
Lista de tabelas	15
Lista de Figuras.....	16
Resumo.....	19
Abstract.....	21
1. Introdução.....	23
2. Objetivo	27
3. Métodos.....	29
3.1 Ratos neonatos	29
3.2 Procedimentos de ressecção cardíaca	29
3.3 Sequenciamento de RNA para estudo de expressão diferencial (RNASeq).....	30
3.4 Análise dos dados do RNASEq.....	33
3.5 RT-PCR e qPCR para confirmação dos dados do RNASeq	36
3.6 Avaliação da proteína POP3.....	38
3.7. Experimentos em peixes	42
3.8 Cultivo celular.....	49
3.9 Análise estatística	53
4. Resultados	55
4.1. Seleção do gene candidato.....	55
4.2. Expressão de POP3 em tipos celulares que compõe o coração.....	62
4.3. Viabilidade e alterações cardiovasculares em peixe-zebra com <i>knockdown</i> de <i>popdc3</i> e <i>bves(popdc1)</i>	65
4.4. Fenótipos cardíacos de peixe-zebra com <i>knockdown</i> de mRNA da família Popeye	72
4.5. Alterações morfológicas em outros tecidos/orgão em larvas de peixe- zebra com depleção temporária de <i>bves</i> e <i>popdc3</i>	75

4.6. Nível de expressão do RNA de <i>POPDC3</i> aumenta <i>progressivamente</i> durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos	79
5. Discussão	87
6. Conclusões	97
7. Perspectivas	99
8. Referências	101
Apêndice I.....	109
Apêndice II.....	115
Apêndice A.....	131
Anexos.....	197

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

ANP	peptídeo natriuético atrial
BSA	albumina de soro bovino
DOX	Doxiciclina Hiclato
dTomato	Proteína fluorescente, com comprimento de onda de excitação/emissão igual a 550/585 (avermelhado)
EGFP	Proteína fluorescente verde, do inglês, "enhanced green fluorescent protein", com comprimento de onda de excitação/emissão igual a 488/510)
GATA-4	Gene da família codificante de fatores de transcrição GATA
Gpr123	Gene do rato codificante para o receptor A1 de adesão, acoplado a proteína G
HC	hipertrofia cardíaca
hiPSC-CMS	Cardiomiócitos derivadas de células-tronco humanas de pluripotência induzida
hiPSCs	Células-tronco humanas de pluripotência induzida
KD	Do inglês knockdown (diminuir a expressão do gene)
MI	infarto do miocárdio
Ntsr2	Gene do rato codificante para o receptor de alta afinidade à neurotensina
PCR	reação em cadeia da polimerase
POPDC1	Gene humano codificante para o primeiro membro da família "Popeye domain containing"
POPDC2	Gene humano codificante para o segundo membro da família "Popeye domain containing"
POPDC3	Gene humano codificante para o terceiro membro da família "Popeye domain containing"
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa, real-time
R1D1	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 1 dia após a cirurgia
R1D3	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia
R1D5	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 5 dias após a cirurgia
R7D1	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 1 dia após a cirurgia
R7D3	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia
R7D5	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia
RNASeq	Sequenciamento de RNA
S1D1	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 1 dia após a cirurgia
S1D3	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia

S1D5	ratos ressectados com 1 dia de vida, cujo coração foi coletado para análise 5 dias após a cirurgia
S7D1	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 1 dia após a cirurgia
S7D3	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia
S7D5	ratos ressectados com 7 dias de vida, cujo coração foi coletado para análise 3 dias após a cirurgia
Sfrp1	Gene do rato pertencente à via Wnt, do Inglês, secreted frizzled protein 1
shRNA	Molécula usada para knockdown do gene alvo, do inglês "shorthairpin"
TMM	taxa de mortalidade média (expresso a cada mil animais)
WT	Animal ou células controle, do inglês "wild type"
peixe-zebra	peixe paulistinha (Danio rerio)

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequência de primers para amplificação de genes diferencialmente expressos no RNASeq de ratos neonatos.....	36
Tabela 2: Sequências de morfolidos para knockdown de bves (popdc1) e popdc3 em peixe-zebra.....	44
Tabela 3: Diminuição gradativa do soro no cultivo das células 293t em suspensão.....	51
Tabela 4: Genes diferentemente expressos entre animais R1D5 versus R7D5.....	56
Tabela 5: Arritmia em embriões e larvas de peixe-zebra com depleção temporária de bves e popdc3.....	69
Tabela 6: Knockdown de bves gera aumento global do ventrículo, enquanto que knockdown de popdc3 alonga o ventrículo.....	72
Tabela 7: Incidência de má formações em peixe-zebra de 72hpf.....	76

Lista de Figuras

Figura 1: Procedimentos de cirurgia e coleta em animais ressectados e SHAM ao longo do tempo.....	30
Figura 2: Análise exploratória do RNASeq.....	31
Figura 3: Desenho esquemático representando a análise de expressão diferencial nos animais que sofreram ressecção.....	35
Figura 4: Exemplos de imagens para quantificação da função cardíaca (tamanho das câmaras cardíacas).	47
Figura 5: Representação temporal do curso da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos..	52
Figura 6: Genes DE (diferentemente expressos nas comparações R1D5XR7D5 e em R1D5X9D)..	55
Figura 7: Expressão quantitativa (qPCR) de 4 genes candidatos mais interessantes em diversos tecidos adultos e controles indiferenciados.	58
Figura 8: Expressão quantitativa (qPCR) dos genes candidatos no período pós-natal.	60
Figura 9: Quantidade de genes diferentemente expressos na comparação R1D5 versus R7D5 que foram selecionados segundo 6 critérios.	61
Figura 10: Microscopia confocal de células marcadas em verde (Alexa 488) para POPDC3 (acima) e POPDC1 (abaixo).	63
Figura 11: Taxa de mortalidade é elevada com <i>knockdown</i> de <i>bves</i>	65
Figura 12: O edema pericárdico é prevalente em larvas com <i>knockdown</i> para <i>bves</i>	66
Figura 13: Knockdown de <i>popdc3</i> parece não afetar a frequência cardíaca, enquanto KD de <i>bves</i> levou a um aumento da frequência cardíaca.....	68

Figura 14: Depleção temporária de bves e popdc3 gera arritmia.....	70
Figura 15: Análise da arritmia observada com 24, 48 e 72 pós fertilização de embriões e larvas de peixe-zebra com KD para bves e popdc3.....	71
Figura 16: Knockdown de bves gera aumento global do ventrículo, enquanto que knockdown de popdc3 alonga o ventrículo.....	73
Figura 17: Fração de encurtamento (A), volume sistólico (B) e fração de ejeção(C) e débito cardíaco (D) de peixe-zebras com 72 hpi.....	75
Figura 18: Microscopia de peixe-zebras em estágio embrionário (48hpf) e larval (72hpf), evidenciando o edema de saco vitelino observado no grupo MO-bves.....	76
Figura 19: Morfolinos bves, popcd3a and popcd3b causam malformações em larvas de peixe-zebra com 3 dpf.....	78
Figura 20: Desenvolvimento de larvas de peixe-zebra microinjetadas com morfolinos bves, popdc3a e popdc3b durante 72 horas pós-injeção (hpi).....	79
Figura 21: A expressão dos genes da Família Popeye é crescente ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos.....	81
Figura 22: A expressão dos genes da Família Popeye é crescente ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos.....	83
Figura 23: Aparecimento dos genes Popdc1, 2 e 3 durante o curso da diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos é crescente ao longo do tempo.....	85

Resumo

Keusseyan AA. *Identificação de genes com potencial de serem alvos terapêuticos para reparar ou regenerar o tecido cardíaco adulto* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, são as principais causas de morbimortalidade no Brasil e no mundo. Pacientes acometidos por um infarto apresentam elevada perda de musculatura cardíaca e o coração é um órgão com baixo poder regenerativo comparado a outros órgãos como o fígado e a pele, por exemplo. Deste modo, o desenvolvimento de terapias que auxiliem pacientes acometidos por doenças desta natureza é um grande desafio. Estudos recentes demonstraram que neonatos mamíferos (roedores) preservam a capacidade regenerativa ainda que em uma janela de tempo limitada aos seus primeiros dias de vida. A capacidade de geração de cardiomiócitos na vida pós-natal abre perspectivas para a exploração dos mecanismos envolvidos neste processo. Neste cenário, o objetivo desta dissertação foi identificar por meio de expressão diferencial (DE) genes codificantes de proteínas de membrana como candidatos a influenciar o desenvolvimento e regeneração cardíaca de ratos neonatos submetidos a ressecção e reparação/regeneração cardíaca. Além disto, utilizamos dois modelos, o peixe-zebra e a diferenciação de células humanas iPS em cardiomiócitos (hiPSC-CMs), para validação dos genes selecionados. A análise de enriquecimento do RNA-Seq resultou na seleção do gene *Popdc3*. O *knockdown* (KD) de *popdc3* em zebrafish resultou em fenótipos cardíacos importantes que incluem uma elevada taxa de mortalidade já na fase larval do desenvolvimento, edemas pericárdicos, normalmente presente em anormalidades cardíacas do zebrafish, e elevação da frequência cardíaca associada a presença de arritmias. O tamanho dos corações de animais KD foi superior, sendo mais alongados e mais largos, que em animais controle. A fração de encurtamento, de ejeção, o volume sistólico e débito cardíaco dos animais mutantes foram maiores em relação aos controles. Os fenótipos observados assemelham-se a um grau da síndrome do ventrículo não compactado (SVNC). Esses dados sugerem que o *Popdc3* influencia o desenvolvimento cardíaco e

pode ter papel na regeneração do órgão. Além disto, a expressão de *POPDC3* em se modifica em células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSC-CMs) ao longo da diferenciação cardíaca. Em conjunto nossos dados sugerem que *POPDC3* é um gene importante no processo de diferenciação cardíaca e devido a sua localização na membrana celular poderá ser útil em estratégias para enriquecimento e isolamento de células em diferenciação cardíaca.

Descritores: coração; regeneração; ratos; neonatos; peixe-zebra; cardiomiócitos; frequência cardíaca.

Abstract

Keusseyan AA. *Candidate gene screening to identify novel targets associated to cardiac differentiation* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, are the main cause of morbidity/mortality in Brazil and worldwide. Following a myocardial infarction, there is significant losses of muscle mass and the organ displays low regenerative capacity compared with liver or skin. Thus, the development of therapies to assist these patients is a great challenge. Recent evidence suggests that the neonate heart from rodents presents some regenerative capacity within a limited time window on the first days of life. The ability to generate cardiomyocytes in postnatal life raises the possibility to reveal the underlying mechanisms of this process to be explored for future therapeutics. Thus, the objective of this work is to identify plasma membrane coding genes differently expressed during cardiac regeneration of neonatal rats associated with ventricle resection. We then used the zebrafish model and cardiac differentiation of human iPS cells for validation of the selected genes. The RNA sequencing enrichment analysis resulted in the selection of a single gene, *Popdc3*. Knockdown (KD) of *popdc3* in zebrafish resulted in important cardiac phenotypes including a high mortality rate in the larval stage of development, pericardial edema, which is associated with cardiac abnormalities in the zebrafish, an increase in heart rate and presence of arrhythmia. KD hearts were bigger than control hearts, being more elongated and wider. The shortening fraction, ejection fraction, systolic volume and cardiac output from mutant animals were higher than observed in controls. The cardiac phenotypes resemble a degree of non-ventricle compactation (NVC). These data suggest that *Popdc3* influences the cardiac differentiation and may play a role in regeneration. In addition, the expression pattern of *POPDC3* in cardiomyocytes derived from induced pluripotency stem cells (hiPSC-CMs) increased during the differentiation protocol, suggesting that

the expression of this gene correlates with the process of cardiac differentiation. Together, our data suggest that *POPDC3* is an important gene in the process of cardiac differentiation and it may be used to label cardiac cells undergoing differentiation since it is expressed in the cellular membrane.

Descriptors: heart; regeneration; rats; neonates; zebrafish; cardiomyocytes; heart rate.

1. Introdução

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte (correspondendo a 30% dos óbitos) [1], sendo assim, terapias alternativas de tratamento dos pacientes [2] ou alternativas de suporte para transplante [3] se fazem necessárias para diminuir a mortalidade observada. O infarto do miocárdio é responsável por 7 milhões de óbitos [4], fazendo parte das doenças isquêmicas do coração que causam maior mortalidade no mundo. Nessa patologia, ocorre obstrução de vasos coronários que nutrem o tecido cardíaco, gerando uma resposta inflamatória no local para iniciar o reparo tecidual. Nesse microambiente, os fibroblastos residentes multiplicam-se e sofrem alterações fenotípicas, transformando-se em miofibroblastos secretores de matriz extracelular [5]. Tal processo gera a formação de tecido cicatricial no local, com deposição de fibras colágenas, pouco flexíveis, e que prejudicam a função cardíaca, levando a óbito por insuficiência cardíaca. Apesar do desenvolvimento de terapias para reversão da oclusão (angioplastia, revascularização ou terapia medicamentosa) [6],[7], a regeneração do tecido muscular residente e que foi substituído por fibrose (reparação cardíaca), a qual é mandatória para que não haja remodelamento ventricular danoso, ainda é uma grande desafio [8].

Devido ao aumento da complexidade dos animais ao longo da árvore filogenética dos cordados [9], a possibilidade de regeneração completa diminuiu e então o reparo se torna mais preponderante. A complexidade do animal pode ser vista através da complexidade do sistema circulatório que surgiu nos tunicados (primeiros animais com sistema fechado) e evoluiu, para um coração com duas câmaras nos peixes, chegando a ter quatro câmaras nos mamíferos), no aumento da disponibilidade de oxigênio e na habilidade de regular a temperatura corpórea. Estudos sugerem que o potencial regenerativo cardíaco se correlaciona com um estado de baixo metabolismo, a incapacidade de regular a temperatura corporal,

baixa pressão cardíaca, hipóxia, estrutura de cardiomiócitos imaturos e um sistema imunológico imaturo [10].

Alguns animais são capazes de regenerar o coração mesmo na vida adulta. Nos peixes, como o zebrafish (paulistinha, *peixe-zebra*) a regeneração ocorre independentemente da idade do animal[11]. Nesse caso, através de estudos de *Fate-mapping* (mapeamento da origem/destino celular), descobriu-se que as células epicárdicas assumem camadas adjacentes, sendo capazes de repovoar completamente a região perdida após ablação do tecido cardíaco [12]. Já no caso de anfíbios como as salamandras, os quais são mais evoluídos que peixes, a regeneração também ocorre de forma semelhante, e nesse caso a resposta imune imediata (macrófagos) medeiam a ativação dos fibroblastos, impedindo a fibrose e possibilitando um ambiente extracelular propício para a proliferação de cardiomiócitos pré-existentes [13].

Na última década, uma série de novos estudos têm demonstrado que a regeneração em mamíferos (murinos) é possível, e aparentemente ocorre através da ação de fibroblastos que sofrem transdiferenciação em cardiomiócitos, através de fatores de reprogramação. O fenômeno é regulado pela inervação adrenérgica (endotelina-1 e fator de crescimento de nervos) [14]. Camundongos e peixes paulistinha com sistema simpático inibido tem regeneração simpato-dependente inibida e perdem a capacidade de regenerar após ablação do ápice cardíaco [15]. Diversos fatores parecem ser importantes na resposta regenerativa, como o predomínio de respiração aeróbica em animais de 1 dia de vida [16], e resposta imune diferenciada, com predomínio de macrófagos (resposta imune inata) [17], [18]. Curiosamente, essa capacidade parece se perder com a passagem dos dias pós-nascimento, sendo restrita a poucos dias de vida em roedores (1-3 dias). Animais com sete dias de idade já não são capazes de restaurar o ápice cardíaco pós-resssecção, formando um tecido cicatricial[19], [20].

Recentemente, desenvolvemos em nosso laboratório o primeiro modelo de regeneração cardíaca em ratos através da ressecção do ápice cardíaco destes

animais quando recém-nascidos. Amostras destes animais e respectivos controles foram analisadas por RNASeq para identificar assinaturas moleculares relacionadas ao processo de reparação e regeneração nos animais onde a lesão foi realizada com 1 dia de vida vs. Animais com 7 dias de vida que se comportam de maneira semelhante a animais adultos [20]. Estes dados são comparáveis a dados da literatura produzidos utilizando como modelo o camundongo [21], [22]. O uso de camundongos como modelo para estudar a regeneração é a vantagem de ter ferramentas de edição gênica (*knockouts*), com maior facilidade que nos ratos [23], assim podendo investigar a causalidade de algum gene nesse processo regenerativo. A vantagem de observar esse fenômeno em ratos se dá pelo acúmulo de evidências fisiológicas e fisiopatológicas na literatura[24], [23].

Neste estudo, animais ressectados 1 dia após seu nascimento (denominados daqui em diante de “R1”) foram capazes de regenerar o ápice, com pouca formação de tecido fibroso no local. Já animais ressectados 7 dias após o nascimento (“R7”) perdem essa capacidade, e, portanto, observou-se maciça deposição de colágeno e hipoperfusão tecidual no ápice cardíaco, como comumente é observado em corações de indivíduos adultos que passam por processo de reparo cardíaco pós eventos isquêmicos [25]. Na vida adulta (8-9 semanas de vida), testes funcionais em condições de sobrecarga denotam que os animais que sofreram a ressecção apical ao 1D se assemelham ao grupo controle (animais sadios), enquanto que os animais ressectados em 7D apresentaram sinais funcionais típicos de insuficiência.

Ainda que não esteja completamente elucidado, acredita-se que nesse modelo de regeneração do ápice cardíaco, as células responsáveis pela reconstrução da musculatura perdida sejam os próprios cardiomiócitos (que sofrem reentrada no ciclo celular) e, alternativamente ou adicionalmente, haveria a participação das CPCs-células precursoras cardíacas (células residentes no coração que são capazes de se diferenciarem em cardiomiócitos).

A seleção de marcadores de membrana para identificação de células capazes de regenerar o miocárdio se faz útil pois existe interesse em identificar e

segregar tais células para terapia celular no coração adulto infartado. Através de segregação por FACS (do inglês *fluorescent activated cell sorting*), seria possível marcar as células com anticorpos fluorescentes e separar aquelas com potencial regenerativo. Spater, Al-Maqtari e Valente (et.al.) já realizaram procedimentos semelhantes em precursores cardiogênicos derivados de hiPSCs (células-tronco de pluripotência induzida). Nesses estudos, as populações purificadas a partir de marcadores de membrana (Hcn 4 [26], c-kit [27] e Sca-1 [28]) promoveram melhora funcional cardíaca no infarto do miocárdio. Entretanto, apenas um curto período da diferenciação foi utilizado como fonte de tais precursores, dificultando a obtenção de tais células tal potencial. Esse trabalho de Mestrado visa estabelecer uma plataforma de filtros para seleção de genes candidatos a serem marcadores de membrana de precursores cardíacos com potencial regenerativo a fim de ampliar o painel de marcadores para possível utilização futura em terapia celular.

Neste trabalho propusemos utilizar o modelo de ressecção ventricular do neonato e uma análise exploratória do RNASeq para selecionar genes diferentemente expressos nos animais onde se observa a regeneração e especialmente para transcritos expressos na membrana das células para que possam servir de marcação para enriquecimento e seleção de células específicas para estudos de diferenciação cardíaca e/ou desenvolvimento de estratégias terapêuticas com transplante celular. O segundo aspecto é que utilizamos dois métodos de validação dos genes candidatos selecionados, o modelo do zebrafish, que permite testar a hipótese sobre a importância do gene candidato na diferenciação cardíaca no contexto e complexidade de um organismo vivo e em células humanas iPSCs durante a diferenciação cardíaca. A utilização desta abordagem integrada permitiu selecionar e caracterizar um gene expresso na superfície celular e que influencia a diferenciação cardíaca no zebrafish e apresenta expressão nas células-tronco humanas (hiPSCs) durante a diferenciação cardíaca.

2. Objetivo

Identificar a partir de um modelo animal de regeneração/reparo cardíaco genes diferencialmente expressos na membrana plasmática de células do tecido cardíaco com potencial para modular a diferenciação cardíaca e que sejam candidatos para novas intervenções no processo de regeneração cardíaca.

Objetivos específicos

1. Selecionar, com base nos dados de RNASeq obtidos a partir de um modelo de regeneração cardíaca em ratos, genes codificantes para proteínas de membrana, superexpressos em animais ressectados com 1 dia (R1-regeneração) *versus* animais ressectados com 7 dias de vida (R7 – reparo);
2. Validar a expressão dos genes obtidos no item 1, por real-time PCR (qPCR);
3. Testar a hipótese de que o **knockdown** dos genes candidatos influenciem no desenvolvimento morfofuncional do coração de peixes *peixe-zebra* (*Danio rerio*);
4. Avaliar se a expressão dos genes candidatos se modifica durante a diferenciação de células-tronco humanas de pluripotência induzida hiPSCs em cardiomiócitos (hiPSC-CMs);

3. Métodos

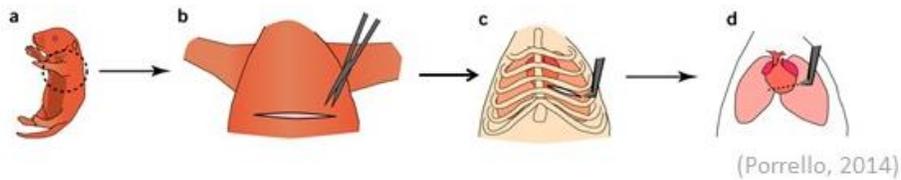
3.1 Ratos neonatos

Nesse trabalho foram utilizados ratos neonatos que sofreram ressecção do ápice cardíaco. A execução dos experimentos foi feita após a aprovação do Comitê de Ética de Uso de animais (CEUA), sob SDC 4260/15/087 (**Anexo A**) e intitulado anteriormente “**O Papel dos Genes da Família Popeye na Regeneração Cardíaca**” seguindo todas as orientações práticas para realização de pesquisas em laboratório [29], incluindo anestesia aos animais, analgesia pós-operatória, e descarte de carcaças de acordo com as regras da prefeitura de São Paulo.

3.2. Procedimentos de ressecção cardíaca

Os ratos neonatos sofreram ressecção de acordo com o procedimento anteriormente padronizado no laboratório [20]. A ressecção foi realizada com 1 dia de vida (Grupo “R1”) ou 7 dias de vida (Grupo “R7”). Em resumo, os animais ressectados tiveram seu coração exposto por toracotomia anterolateral e remoção de 15% da área do ventrículo esquerdo utilizando uma tesoura de íris. O grupo falso-operado (SHAM) sofreu o procedimento de toracotomia anterolateral, mas sem a remoção de tecido cardíaco (receberam a nomenclatura referente ao procedimento “S” e o dia em que ocorreu o procedimento, sendo animais “S1” para aqueles operados com 1 dia de vida e “S7” para os operados com sete dias de vida).

No primeiro dia após a manipulação (SHAM ou ressectado), os animais foram decapitados e seu coração removido da cavidade torácica. Na sequência, foi coletada a região do ápice cardíaco dos corações (30% dos ventrículos), com o auxílio de uma tesoura esterilizada com álcool 70%, e o material foi armazenado à -80°C para posterior das proteínas ou para extração do RNA. Os animais coletados no primeiro dia após o procedimento foram nomeados de “S1D1”, “S7D1”, “R1D1” ou “R7D1”. O material também foi coletado no quinto dia após o procedimento cirúrgico, perfazendo os grupos “R1D5”, “R1D5”, “S1D5” e “S7D5”. O procedimento cirúrgico e as coletas (amostras para qPCR) estão ilustrados na Figura 1.



A) RESSECÇÃO



B) SHAM



Figura 1: Procedimentos de cirurgia e coleta em animais ressectados e SHAM ao longo do tempo. (a) Demonstração da área de corte no rato neonato. (b) Incisão cutânea torácica dorsal. (c) Corte do 4º espaço intercostal. (d) Procedimento que ocorre nos animais ressectados. Nos animais falso-operados (SHAM) não há remoção do ápice do coração. Os animais sofrem coleta do tecido cardíaco após 1 ou 5 dias do procedimento cirúrgico, seja SHAM ou ressectado, conforme painel abaixo. Figura adaptada do paper de Porrello (a,b,c e d) sobre o procedimento de ablação da porção apical do coração. PAINEL A: grupo dos ratos que sofreram ressecção do ápice cardíaco no 1º e 7º dias de vida (R1 e R7, respectivamente), coletados 1, 3 e 5 dias após a ressecção, respectivamente R_D1, R_D3 e R_D5. PAINEL B: grupo dos ratos que foram falsamente operados nos 1º e 7º dias de vida (S1 e S7, respectivamente), coletados 1, 3 e 5 dias após a ressecção, respectivamente S_D1, S_D3 e S_D5.

3.3 Sequenciamento de RNA para estudo de expressão diferencial (RNASeq)

Em 2014, nosso grupo realizou um estudo piloto de RNASeq, utilizando o modelo de ressecção do ápice cardíaco em ratos, com o objetivo de buscar

marcadores de superfície de células envolvidas no processo de reconstrução da musculatura cardíaca perdida (Processos FAPESP: 13/26440-7 e 13/26246-6. Amostras de animais ressectados com 1 dia de vida após 5 dias do procedimento (R1D5; n=3) foram comparadas às de animais ressectados com sete dias de vida após 5 dias do procedimento (R7D5; n=3), e com animais não-manipulados com nove dias de vida (representa a idade média entre os dois grupos anteriores). Foram selecionados genes diferentemente expressos (DE) entre os animais R1D e R7D que codificassem proteínas de membrana plasmática (Figura 2).

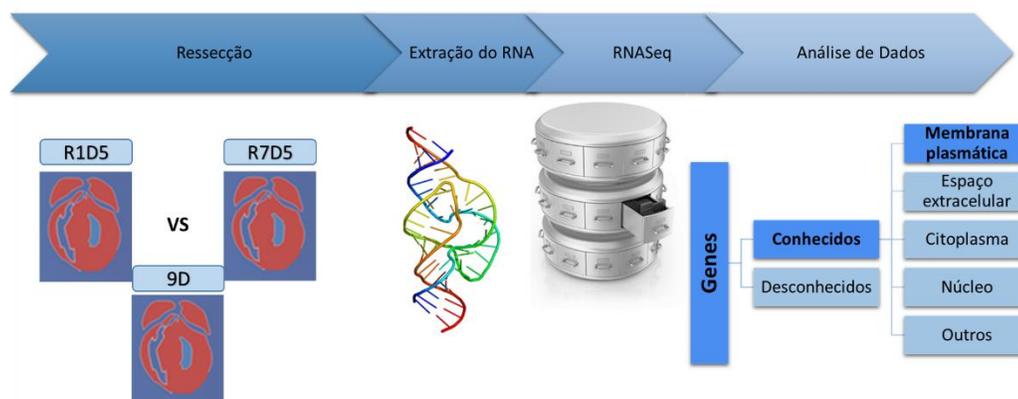


Figura 2: Análise exploratória do RNASeq. Os genes foram selecionados a partir da sua superexpressão em animais capazes de regenerar (R1) em relação ao que não são capazes (R7) e da sua predição de expressão na membrana plasmática segundo a base de dados GeneCards

Diversos genes diferencialmente expressos (DE) foram encontrados na comparação R1D5 vs R7D5, no entanto, houve interesse em identificar aqueles que fossem comuns também a comparação R1D5 vs 9D (ratos não manipulados). Como o grupo 9D representa a idade média entre os animais R1D5 (6 dias de vida) e R7D5 (12 dias de vida), assumimos que fosse um bom grupo para remover genes diferencialmente expressos por conta das idades de R1D5 e R7D5 serem distintas. Assim, obtivemos genes DE e que tivessem expressão predita na membrana celular (segundo o software *Ingenuity™*).

Uma série de filtros foram adicionados essa lista, de forma que fosse escolhido para estudo apenas o gene que fosse específico no contexto cardíaco (segundo a base de dados do GeneCards), que tivesse expressão diferencial entre

animais SHAM (falso-operados) de mesma idade. Além disso, selecionamos o gene cuja expressão segue um padrão temporal de expressão decrescente. Com base nesses filtros de seleção encontramos que o único gene que atende a todos esses critérios é o *Popdc3*.

Para o experimento de RNASeq foram coletadas amostras de coração de ratos neonatos que sofreram ressecção cardíaca com 1 e 7 dias de vida, denominados de R1 e R7. Tais amostras foram coletadas 5 dias após a cirurgia, portanto com 6 dias de vida (R1D5) e com 12 dias de vida (R7D5). Com a finalidade de comparação, foram coletadas amostras de coração de rato neonatos não manipulado com 9 dias de vida.

No segundo RNASeq, as amostras de RNA foram sequenciadas por método de “High throughput” no laboratório dirigido pela Profa. Dra. Sueli Marie no “Laboratório de Sequenciamento de Larga Escala” da Faculdade de Medicina da USP. A preparação de bibliotecas e da técnica de sequenciamento de última geração - RNA-Seq (também conhecido como WTSS – do inglês “Whole transcriptoma Shotgun Sequencing”) foram realizadas em grande escala.

Para isso, o RNA total foi extraído a partir da porção apical dos corações ressectados usando o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). O RNA foi purificado utilizando RNeasy MiniKit (Qiagen, Alemanha). A qualidade do RNA foi verificada no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). As amostras com RIN maior do que 9,5 e A260 / 280 superior a 1,8 foram consideradas boas para a preparação da Biblioteca com o kit *Ribo-Zero Gold* (Illumina). O método escolhido para a obtenção de mRNA foi a depleção do rRNA, usando Stranded Kit Preparação RNA total da amostra com *Ribo-Zero Gold* (Illumina, San Diego, EUA). Bibliotecas foram quantificadas individualmente por meio da PCR em tempo real (qPCR) e sequenciadas em equipamentos HiSeq2500 de acordo com as instruções do fabricante (par-end reads, 2x100 ciclos). Diferente

do primeiro experimento de RNASeq (realizado no Laboratório de Multiusuários Centralizado –Piracicaba- Prof. Dr. Coutinho), nesse caso utilizamos o RNA total (com remoção do ribossômico apenas), e não como anteriormente (capturando apenas o mRNA).

A análise do RNASeq foi terceirizada e utilizou ferramentas da bioinformática. Os reads “paired-end”, ou seja, fragmentos com ambas pontas sequenciadas, foram filtradas usando um PerlScript que removeu todas as leituras com uma qualidade de score médio de 26. Os “reads” foram mapeados com o software Bowtie2 v2.1.0,[30] usando o genoma do rato (*Rattus norvegicus* RN5, NCBI) e o biobnet banco de dados[31] A análise da expressão diferencial foi realizada com pacote DESeq v1.12.1 [32] utilizando o software “R” [33]. Os valores baseMean foram obtidos, e correspondem ao nível de expressão médio de cada transcrito (indicados em TPM, *Transcripts Per Kilobase Million*).

3.4 Análise dos dados do RNASeq

Dados de RNA-Seq foram normalizados por meio da transformação logarítmica e quantificação da expressão gênica foram feitos pelo software DESeq2, no portal de R-Bioconductor, utilizando os parâmetros por defeito do pipeline [34]. As anotações para cada gene foram realizadas pela software Biomart [35](R-Bioconductor) (Durinck, Spellman, Birney, & Huber, 2009). Nessa etapa, objetivou-se encontrar genes de membrana com expressão gênica substancialmente diferente nos animais capazes de regenerar (R1D1 ou R1D5) em comparação aos outros grupos.

As diferenças de expressão de cada gene foram expressas pelo Fold-Change e as diferenças estatísticas consideradas foram para p-valor escolhido como menor do que 0,05 e fold-change (FC) maior que 1,3 ou menor que -1.3. Os critérios de seleção foram: 1) Categorização como gene codificante de proteína de membrana, segundo a localização da expressão (ferramenta de enriquecimento de vias- Ingenuity; 2) Apresentar valor de fold-change R1D5 versus R7D5 >1.3 e p-

valor <0.05 e fold-change R1D5 versus 9D >1.3 e p-valor <0.05 ; 3) Apresentar expressão maior em cardiomiócitos (A), nó atrioventricular (B) e coração (C) em relação à outros tipos celulares e tecidos (D) (célula endotelial, cérebro, monócito, células mielóides, linfócitos, adipócitos,), ou ter expressão semelhante em (A), (B), (C) e (D), segundo o banco de dados de expressão GeneCards; 4) Apresentar produto com banda única nas amostras de neonatos quando realizado RT-PCR e ter expressão menor nos controles adultos (pulmão, cérebro, fígado, baço e tecido adiposo, em relação ao coração e amostras de corações de neonatos); 5) Validar a expressão observada por RT-PCR de modo quantitativo (qPCR). A Figura 3 demonstra o esquema de filtros realizado para encontrar um gene candidato a estudo mais aprofundado.

A ideia de selecionar genes codificantes para proteínas de membrana aumentaria as chances do emprego do gene candidato como alvo para enriquecer a população de células capazes de ativar o processo regenerativo por FACS.

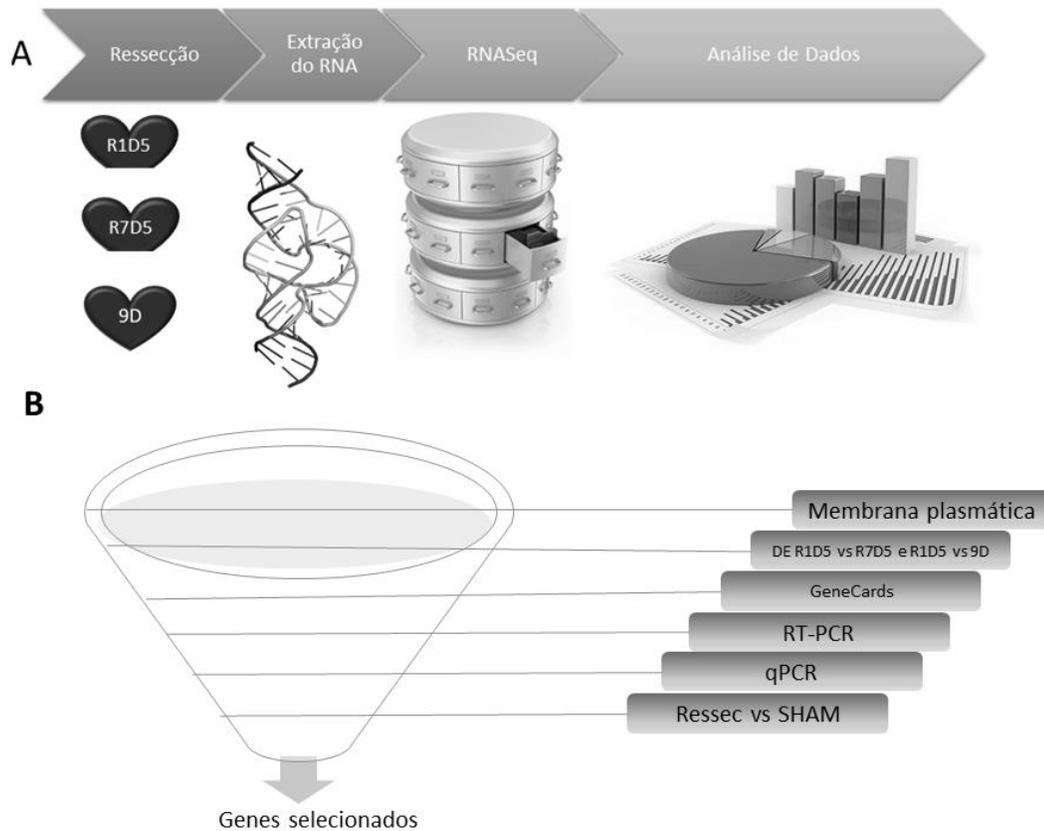


Figura 3: Desenho esquemático representando a análise de expressão diferencial nos animais que sofreram ressecção. (A) Processo de obtenção do RNA das amostras de tecido cardíaco de neonatos para sequenciamento. (B) Representação esquemática dos filtros utilizados para determinação dos genes de interesse na regeneração foi feita com base nos dados do RNaseq de animais ressectados e posterior análise dos dados pela ferramenta de enriquecimento (Ingenuity). Houve interesse em selecionar genes que fossem diferencialmente expressos na comparação R1D5 vs R7D5, que fossem codificantes para proteínas de membrana plasmática e que estivessem especificidade cardíaca em detrimento de outros tecidos (maior expressão no nó atrioventricular, coração e cardiomiócitos, em relação à células endoteliais, adipócitos, células mielóides, monócitos, linfócitos e cérebro) através da base de dados do GeneCards. Na sequência, a expressão destes genes foi validada por RT-PCR, confirmando estarem expressos no R1D5 em relação a outros tecidos de ratos. Por qPCR foi quantificada tal diferença de expressão, inclusive a existente entre R1D5 e R7D5, sendo maior no primeiro grupo. Análises posteriores visaram avaliar e excluir possíveis diferença de expressão gênica devido a idade dos animais. Não foram considerados genes diferencialmente expressos entre R1 e R7, caso não houvesse diferença de expressão em relação ao grupo SHAM (falso-operado).

3.5 RT-PCR e qPCR para confirmação dos dados do RNASeq

O cDNA foi sintetizado a partir de 4 µg foram de RNA total por transcriptase reversa SuperScript III (ThermoFischer, Massachusetts, EUA), de acordo com as indicações do fabricante. O Real-time PCR (reação em cadeia da polimerase) foi executado considerando os *primers* abaixo:

Tabela 1: Sequência de primers para amplificação de genes diferencialmente expressos no RNASeq de ratos neonatos

Gene	Foward	Reverse	Amplicon (p b)
<i>Popdc</i> 3	CAATTGCCCTGAGCTCCGAA	CTCCAGGACACGTATCGA CAG	234
<i>Cdhr1</i>	ACCACATCCTCTATAGGCTCTT GAA	AAGGTTGGAGGGTGGTTG TT	223
<i>Gja5</i>	AGAGCCTGAAGAAGCCAACTC	ACCGTAGAGTGCTTGTGG AC	135
<i>Sfrp1</i>	CGAGTTGAAATCGGAGGCCA	CGGCGCCATTCTTTAGGA AAA	188
<i>Slc16a</i> 3	AGTGACTACTCGTACACCGCT A	AACAGCCAAAGAGGACGG C	165
<i>Slc26a</i> 9	ATGTCCCAGACATGAGCCAG	ACAATGGCTTTGAGCTTG GC	166
<i>Ror2</i>	ACAGACACGGGCTACTACCA	GATCCCTCGGTAAGGTTG GC	159

<i>Gpr12</i> 3	GCTCCTATGTCTCCTTGCCTC	CCGATCCACAGCATGGTA GAA	222
<i>Serinc</i> 2	AAAAATGCAACCCTCACCTGC	TCCTCTGTCTGCATCAAG CTG	184
<i>Ntsr2</i>	GGACAGAAGCACGAAGTGGA	GGAGTAGAGGGCCATCAG GT	192
<i>Hcn4</i>	GCAACCTGGGGTCAACAAA	AGGGGGTGGTGTTCAT C	218

Para o PCR semi-quantitativo, foi utilizado o seguinte protocolo: Água DEPC μ l; Primer forward μ l; Primer reverse μ l; cDNA 1,00 μ l. O protocolo de ciclagem utilizado foi: 95°C por 3 min; 95°C por 1min; 60°C por 1min; 72°C por 1 min; 72°C por 5 min; repetindo-se 32 ciclos de amplificação. Os géis de agarose 2% foram corridos por 1 hora a 100V, e a quantificação das bandas foi feita por meio do programa ImageJ (FijiImage®).

Para a reação quantitativa , 0,32 uL dos primers forward e reverse foram incubados com 12.5ng de cDNA em um volume de SYBRGreen de 10uL . O protocolo foi realizado utilizando o QuantStudio 12 K Flex (ThermoFischer , Massachusetts , EUA) em que o abertura do DNA ocorre durante 5 minutos a 95°C ; o anelamento dos primers ao template ocorre durante 15 segundos a 95°C e extensão do produto ocorre durante 1 minuto sob 60°C . Este processo foi repetido durante quarenta ciclos de amplificação.

3.6 Avaliação da proteína POP3

3.6.1 Microscopia confocal

Células que compõem o tecido cardíaco (o que mimetizam os tipos celulares existentes no coração) foram utilizadas para as marcações de imunofluorescência. Os fibroblastos cardíacos de ratos de 1 dia de vida foram extraídos e plaqueados, bem como os cardiomiócitos derivados da mesma extração. Como controle positivo para as marcações realizadas com anticorpo anti-BVES utilizamos células HUVEC. Como controle positivo para as marcações realizadas com anticorpo anti-POPDC3 utilizamos as células com superexpressão de POPDC3 (HEK-293t- clone E2). Todas as células foram fixadas com PFA4% por 15 minutos e seguiram o protocolo de marcação de POPDC3 com os anticorpos POPDC3 e POPDC1 (Lifespan).

O anti-Pop3 (®) na diluição de 1:125 em BSA 5% foi incubado *overnight* a 4° C. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa555 Donkey anti-goat (A-21432 Molecular Probes®) na concentração de 0,005 µg/µl ou 1:400. Além disso, foi feita uma marcação com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) D1306 (Life Technologies®) 1.10⁻⁶ µg/µl ou 1:100. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem comercial F4680-Fluoromount (Sigma®).

A leitura das marcações foi realizada em um microscópio confocal (LSM 510 Meta - Carl Zeiss) e a quantificação da fluorescência foi feita por meio do programa ImageJ (FijiImage®).

3.6.2 Microscopia de fluorescência

As células 293t foram plaqueadas numa confluência de 4,71 células /cm² em lâminas de cultura de 8 poços cobertas com gelatina 0,1%. Nesse experimento objetivamos verificar se a marcação do anticorpo anti-POPDC3 (Santa Cruz ou Lifespan) era específica para as células com superexpressão, e não marcação das células em que o POPDC3 foi inibido (Informações sobre plasmídeos constam no

APÊNDICE A). Inicialmente verificamos o nível de expressão de POPDC3 nas células “que não receberam o plasmídeo” (controles) quando incubadas com os anticorpos primários e os anticorpos secundários, e na reação controle desta (“células 293t que não receberam o plasmídeo” incubada somente com anticorpo secundário). As células 293t que foram transfectadas pelo plasmídeo para superexpressão de *POPDC3* são vermelhas, e, portanto, o anticorpo secundário utilizado foi o Alexa 488 (verde). Portanto, para estas células houve incubação com o anticorpo primário anti –*POPDC3* da Santa Cruz ou da Lifespan e o anticorpo secundário Alexa 488. Também foi feito uma marcação controle usando estas células e somente o anticorpo secundário.

As células 293t que foram transfectadas pelo plasmídeo para inibição de *POPDC3* são verdes, e, portanto, o anticorpo secundário utilizado foi o Alexa 555 (vermelho). Estas células foram incubadas com o anticorpo primário anti –*POPDC3* da Santa Cruz ou da Lifespan e o secundário Alexa555. Também foi feito uma marcação controle usando estas células e somente o anticorpo secundário.

As células foram previamente fixadas com para formaldeído 4% antes de iniciar as marcações. A seguir foram lavadas por duas vezes com PBS +/-, bloqueadas com solução de BSA 3% em PBST (PBS + Tween 20%) por 10 minutos a temperatura ambiente. O anticorpo primário utilizado foi o Santa Cruz (2µg/mL) ou Lifespan, na mesma concentração, preparados em BSA 1%. Ambos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente à concentração de 1:300 (conforme as recomendações do fabricante- *Alexa 488 e Alexa 555*). A leitura das lâminas foi feita no microscópio de fluorescência (Nikon 2000) e as fotos foram capturadas pela câmera Motic.

3.6.3 Western Blotting

As amostras proteicas foram extraídas utilizando-se de um tampão que contém HEPES ou RIPA. Utilizou-se Triton XD-100 1% como detergente fraco.

A amostras sofreram corrida eletroforética (30mA por cerca de 2,5 horas) em gel de acrilamida 12% em tampão de amostra contendo DTT (dithiothreitol- Life Technologies R0861) e posteriormente utilizando beta-mercaptoetanol. O marcador utilizado para verificação do peso molecular foi o Kaleidoscope (#161-0375 BioRad©). O gel foi transferido para uma membrana PVDF (Trans-Blot Turbo BioRad©) a 12V 2,5A por 1 hora. A membrana foi bloqueada com BSA 5% (bovine serum albumin- A7906 Sigma- Aldrich©) por uma hora a temperatura ambiente. Foi feita a marcação para Pop3 (anti- Pop3 sc-168993- SantaCruz Biotechnology®) 1:500 ou 0,01µg/µl e Rabbit anti-goat (AP106P- Merck©) a $0,5 \times 10^{-3}$ µg/µl. Também foram utilizados os anticorpos anti-Pop3- LS- Lifespan LS-C145698, ProteinTech 11800-1-AP e abcam (ab76388 e ab156426) e Gapdh (abcam ab-22555). Todos esses anticorpos foram incubados overnight a 4°C. Os respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP (do inglês, “horse seradish peroxidase” foram empregados na concentração de 1:2000. A revelação das imagens foi feita pelo emprego de ECL (método quimioluminescente). As imagens foram obtidas no equipamento ImageQuanti LAS 4000 mini (GE©). A quantificação das bandas foi feita por meio do programa ImageJ (FijilImage®).

Os resultados de Western Blotting constam no Apêndice II.

3.6.4. Citometria de fluxo

Foram utilizados quatro métodos de marcação para citometria em um clone (nomeado de C2) transfectado com o plasmídeo para superexpressão de POPDC3. Os métodos diferem em relação aos reagentes das etapas de fixação e permeabilização. Três dos quatro protocolos já são estabelecidos: 1) Método 1 (protocolo de marcação de proteínas intracelulares- R & D); 2) Método 2 (protocolo de marcação de proteínas intracelulares- abcam – formol); 4) Método 4 (protocolo de marcação de utilizado na técnica de Imunofluorescência- vide item 2.6.2). O método 3 é empregado em nosso laboratório para marcação de proteínas intracelulares. Nesse protocolo a fixação é feita com PFA1% a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir as amostras foram permeabilizadas com metanol

90% a 4° C por 10 minutos. Após 2 lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário em BSA 1% a 4° C por 35 minutos. Após duas lavagens com uma solução de triton 0,1% em BSA 1%, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário em triton 0,1% em BSA 1% a 4° C por 30 minutos. O anticorpo secundário foi lavado por três vezes com uma solução de triton 0,1% em BSA 1% e o sobrenadante foi ressuspensionado em BSA 1% até a leitura (que foi feita imediatamente o processo de marcação). Para o procedimento, as células foram dissociadas utilizando tripsina e foram separadas $2 \cdot 10^5$ células para cada condição, exceto para o método 3 em que foram utilizadas $3 \cdot 10^5$ células. Para todos os métodos o secundário utilizado foi goat anti-rabbit Alexa 488, cuja fluorescência é emitida no comprimento do verde (que corresponde a leitura do FL-1) no citômetro.

Os resultados constam no Apêndice II.

3.6.5 Espectrometria de massas

Foi realizada uma análise da especificidade de reconhecimento do anticorpo da Santa Cruz (sc-16898) utilizado nos experimentos de Western Blotting. Foi utilizado o equipamento nanoLC-MS/MS - LTQ Orbitrap Velos situado na Universidade de São Paulo (USP), no CEFAP. Foram encaminhadas cinco amostras para análise, obtidas a partir de um gel de poliacrilamida 15%, em que foram selecionadas bandas de peso molecular aparente mediante revelação com o anticorpo anti-POP3 (Santa Cruz sc-16898) sendo que 4 amostras são provenientes do músculo esquelético de rato: 1) Bandas com aproximadamente 25kDa; 2) Bandas com aproximadamente 37kDa; 3) Bandas com aproximadamente 50kDa e 4) Bandas entre 37 e 59kDa. Além dessas bandas, foi enviada uma banda com 50kDa presente em tecido cardíaco de rato neonato (ressectado com 1 dia de vida), que corresponde à amostra 5.

Os resultados constam no Apêndice II.

3.7. Experimentos em peixes

Peixe-zebra *WT* (*Peixe-zebra International Resource Center*, Eugene, OR) adultos machos e fêmeas (<18 meses de idades) foram mantidos e acasalados sob condições padrão de temperatura, pH e luminosidade (14 h claro/10 h escuro) em aquários individuais em estantes da Tecniplast (Varese, Italy) usando água de sistema (60 µg/ml *Instant Ocean sea salts*). Sua criação foi feita em aquários disponíveis no biotério do Instituto Butantan (CeTICS) e todos experimentos foram realizados no mesmo local, com a colaboração da Dra. Carla Lima e seus alunos de mestrado e doutorado (Adolfo Luis Maleski e Maria Alice Galvão).

Os embriões fertilizados foram mantidos em meio embrionário E2 0,5x (7,5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 1 mM MgSO₄+7H₂O, 1 mM CaCl₂+2H₂O, 0,7 mM NaHCO₃) contendo ou não 0,2 mM de N-feniltioureia (PTU; Sigma Chemical Co.). Os experimentos foram realizados conforme as leis da Comissão Brasileira de Experimento Animal (COBEA). Pares de peixes adultos foram usados para gerar embriões de 0 horas (*hours post fertilization* - hpf). Os ovos não fertilizados ou irregulares foram visualizados no esteriomicroscópio Leica M205C e separados dos com desenvolvimento normal. Os embriões fertilizados foram transferidos para placas de petri plásticas (funda: 100 x 25 mm) e foram seu estágio embrionário foi determinado com base na classificação de Kimmel[36]. A eutanásia foi obtida pela imersão em triclaína a 4% diluída em meio E2 0,5x.

3.7.1. Manipulação genética

Os peixes foram injetados com morfolinóis (moléculas semelhantes a DNA, com modificações nas riboses, que permitem a ligação ao RNA mensageiro impedindo a sua tradução/maturação). Os morfolinóis foram desenhados de forma a serem capazes de bloquear a tradução do mRNA, e não a de forma a modificar o *splicing*, conforme outro estudo publicado anteriormente. Além disso, um grupo injetado com um morfolino capaz de alterar o *splicing* de *bves* (também conhecido como POPDC1), foi utilizado como controle positivo. Esse grupo havia demonstrado

alteração cardíaca, uma vez que possuem *knockdown* descrito com fenótipo de atraso na repolarização ventricular [37].

Tabela 2: Sequências de morfolidos para knockdown de *bves* (*popdc1*) e *popdc3* em peixe-zebra

Nome do morfolido	Sequência do morfolido	Grupos experimentais
Morfolido <i>bves</i>	GATGTTGTGTTGGACATTCTGAGGC	Controle positivo
Morfolido <i>popdc3- a</i>	GTATATGTGAACGAATGCTGC	MO-A
Morfolido <i>popdc3- b</i>	GTTAATAATCGCCCTGTGTAT	MO-B

A necessidade de dois morfolidos desenhados para o alvo de mRNA de *popdc3* se faz pela compreensão da especificidade do morfolido em relação ao alvo escolhido, neste caso, o mRNA do *popdc3*. Para isso, foram desenhadas sequências sem sobreposição ao mRNA do *popdc3*. Caso o fenótipo observado nos dois grupos seja igual, então pode-se concluir que as sequências de morfolidos não possuem outro alvo. Também, pode-se combinar o morfolido *popdc3- a* com morfolido *popdc3-b* a fim de investigar sinergismo (amplificação dos sinais fenotípicos) [38]. Os morfolidos foram desenhados com auxílio do corpo técnico da empresa Gene-Tools e foram adquiridos da mesma empresa.

Realizou-se a depleção temporária do gene *bves* e *popdc3* em embriões de 1 célula (*one-cell stage embryo*) utilizando sequências específicas *antisense de oligonucleotideos morpholino* (morfolido - MOs, GeneTools, 1000 nmol) diluídas nas

concentrações de 1.25, 2.5 e 5 mg/mL (MO-*bves*) e de acordo com os resultados obtidos, a dose de 5 mg/mL foi escolhida para os demais morfolinolinos diluídos em tampão Danieau 1x (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5.0 mM HEPES; pH 7.6). Como controle, foi usado o FITC (EZ-label FITC protein labeling kit Pierce, Rockford, IL) a 25 µg/mL. Os animais foram avaliados diariamente por microscopia no esteriomicroscópio Leica M205C quanto aos possíveis defeitos de desenvolvimento induzidos pela intervenção genética, sobrevivência e principalmente defeitos cardíacos.

3.7.2 Injeções dos morfolinolinos

Embriões com 0 hpf (0 horas pós fertilização) de apenas 1 célula (*one-cell stage embryo*) foram alinhados em sulcos presentes na agarose endurecida, contida em placa de petri e foram injetados, no citoplasma, com microagulha acoplada ao micromanipulador Injectman® 4 *Pneumatic PicoPump microinjector* (Eppendorf) pressurizado em volume de 2 ou 3 nanolitros (pressão de injeção de 4,19 psi); tempo de injeção: 0,20 segundos (s) e pressão de compensação de 0,40 psi). Após a injeção, os animais foram mantidos em estufa INCU-Line VWR em meio E2 0,5x a 28°C durante três dias.

3.7.3 Aquisição dos fenótipos

A cada 24 hpf, os animais foram anestesiados com triclaína 0,4% (etil-3aminobenzoato, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para serem fotografados com o esteriomicroscópio Leica M205C (softwares LAS V4.11) e avaliados quanto a defeitos no desenvolvimento (edema de vitelo, malformação do olho, cauda, coluna, coração, pigmentação e morte). Cada animal foi avaliado individualmente quanto às modificações morfológicas e a frequência cardíaca foi contabilizada e gravada durante 15 s. Após cada avaliação, os animais retornaram ao meio E2 0,5x, para recuperação anestésica e no terceiro mortos com triclaína 4%. Todos os dados foram plotados no programa Prisma 6 (Graph Pad Software, v6.02, 2013)

Foram contabilizadas as taxas de embriões vivos e mortos por tratamento, para determinação da viabilidade dos animais com *popdc3* inibido. A taxa de viabilidade foi obtida através da observação ao microscópio do número de embriões vivos naquele grupo. Também foi considerada a taxa de eclosão em cada grupo, a fim de estabelecer se os tratamentos são incompatíveis com a evolução do peixe, do estágio de embrião para o larval [39].

A porcentagem de larvas com edema pericárdico foi quantificada em cada grupo através de verificação ao microscópio óptico.

O tamanho dos corações foi medido considerando a largura dos átrios e dos ventrículos durante a sístole e diástole (Figura 4). Esses parâmetros foram mensurados em todos os grupos a fim de evidenciar potenciais alterações na morfologia que implicarão em alterações funcionais. As medidas ventriculares foram utilizadas para o cálculo da fração de encurtamento (FS), dada pela seguinte fórmula:

$$FS = \frac{Cd - Cs}{Cd}$$

Onde Cd representa o comprimento ventricular na diástole e Cs representa o comprimento ventricular na sístole. O volume sistólico (V_s) foi estimado pelo método do cubo, sendo expresso pela seguinte equação:

$$V_s = Cd^3 - Cs^3$$

Também foi calculada a fração de ejeção (FE), que é determinada pela seguinte expressão:

$$FE = \frac{V_s}{Cd^3}$$

A partir do volume sistólico e da frequência cardíaca individual (F), também foi possível calcular o débito cardíaco (DC), através da seguinte equação:

$$DC = V_s \times F$$

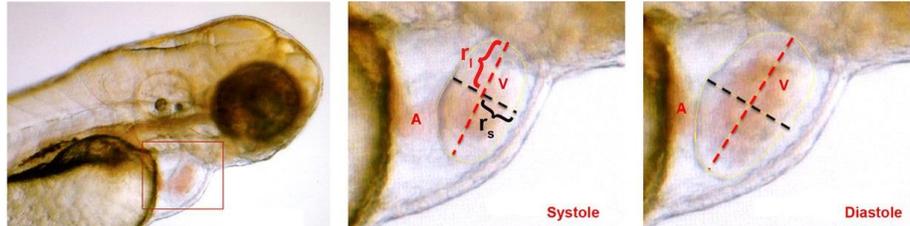


Figura 4: Exemplos de imagens para quantificação da função cardíaca (tamanho das câmaras cardíacas).¹

3.7.3.1. Processamento de vídeos de embriões e larvas

Os vídeos foram gravados em microscópio óptico em aumento de 100X, utilizando-se de uma câmera Nikon, e salvos em formato .avi. O software utilizado para calcular a frequência de batimento foi desenvolvido por William Scaff (aluno de doutorado da USP-POLI). A frequência de batimento é calculada como o número de vezes por minuto em que um conjunto de pixels (blocos) realiza um trajeto cíclico. Para cada vídeo, cerca de 300 blocos são selecionados na imagem e a frequência de batimento deles foi plotada de forma individual. Somente os vídeos pelo menos 7 picos de batimento consecutivos detectáveis foram considerados no cálculo da frequência de batimento. O valor médio dos blocos ($n < 300$) foi considerado como frequência de batimento do vídeo correspondente. Para o cálculo da arritmia, o desvio padrão (DP) em os picos foi considerado como medida. Sendo o desvio

¹ A diástole ventricular máxima (VD) e a sístole ventricular (VS) são mostradas, com a largura representada como uma linha pontilhada branca e o comprimento como uma linha tracejada preta ou cinza. O átrio está marcado em A e o ventrículo está detalhado em V, sua raio maior (rl) e raio menor (rs) estão representados na figura.). Figura adaptada de 40. Folkesson, M., et al., *Differences in cardiovascular toxicities associated with cigarette smoking and snuff use revealed using novel zebrafish models*. Biol Open, 2016. 5(7): p. 970-8.

padrão relativo (razão entre o DP e a frequência), considerada como uma medida de arritmia [41] .

3.8 Cultivo celular

3.8.5. Cultivo celular de fibroblastos cardíacos de ratos neonatos

Animais neonatos com 1 dia de vida foram eutanasiados para extração de fibroblastos cardíacos e de cardiomiócitos. O protocolo estabelecido no laboratório requer digestões do tecido com enzimas (colagenase e pancreatina). A inativação da digestão ocorre por meio do soro fetal bovino contido no meio de cultura. O protocolo já foi publicado, [42] e consegue não só obter os fibroblastos (que se aderem primeiro a superfície das placas de cultura), mas também os cardiomiócitos (que não estão aderidos após 45 minutos de plaqueamento). Os fibroblastos obtidos foram utilizados para marcação de imunofluorescência com anticorpos anti-*Popdc3* e anti-*Bves*.

3.8.6. Cultivo celular de cardiomiócitos de ratos neonatos

No mesmo procedimento de extração de fibroblastos cardíacos, foi possível obter cardiomiócitos de ratos neonatos de 1 dia de vida. O sobrenadante obtido do plaqueamento inicial da extração de células cardíacas, é rico em cardiomiócitos e pobre em fibroblastos. Este, é então plaqueado em placas previamente preparadas com laminina (*coating*). A condição de cultivo desses cardiomiócitos normalmente leva em conta adição de BrdU (análogo da timidina, e intercalante do DNA), que impede a progressão do ciclo celular, assim os fibroblastos remanescentes- e que possuem taxa proliferativa maior que os cardiomiócitos- deixam de proliferar. Os cardiomiócitos obtidos foram utilizados para marcação de imunofluorescência com anticorpos anti-*Popdc3* e anti-*Bves*.

3.8.7. Cultivo celular de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC)

As HUVECs utilizadas para os experimentos de imunofluorescência foram gentilmente cedidas pela aluna de doutorado (Thais Girão). O meio de cultivo das células foi o EBM-2 suplementado com suplementos da Lonza. Por serem células presentes em vaso sanguíneo, foram consideradas para o experimento de imunofluorescência com anticorpos anti-*Popdc3* e anti-*Bves*, uma vez que a obtenção de células de vasos sanguíneos de ratos neonatos não está padronizada em nosso laboratório, até o momento.

3.8.8. Cultivo celular 293t

O cultivo de células de origem humana, como a 293t se deu devido a necessidade de testar a eficácia da superexpressão e inibição de *POPDC3* gerada por plasmídeos adquiridos (por Western Blotting, citometria de fluxo e imunofluorescência). (Vide item Plasmídeos utilizados- Apêndice A). As células 293t foram transfectadas pelo emprego do reagente Lipofectamine 3000, seguindo as indicações do fabricante.

Estas células foram cultivadas na sua forma aderida, bem como em suspensão. Para o cultivo das 293t aderidas foi utilizado meio DMEM High com 10% BCS (Hyclone). Já em suspensão, estas células sofrerão adaptação (retirada gradativa do soro- de 10% BCS para 0% BCS) e introdução de meio para cultivo CDM4 sem soro (Invitrogen). Originalmente, esse meio sem soro é utilizado para cultivo em suspensão de células CHO (células de ovário de hamster chinês). O processo de adaptação seguiu da seguinte forma:

Tabela 3: Diminuição gradativa do soro no cultivo das células 293t em suspensão

	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 2</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 6</i>	<i>Dia 7</i>
Soro	10%	5%	2,5%	1,25%	1%	0%

No dia 9 do processo de adaptação, foi realizada citometria para avaliar o nível de expressão dos marcadores dTomato (referente ao plasmídeo de superexpressão) e EGFP (referente ao plasmídeo de inibição).

3.8.9. Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos

A análise da expressão do gene selecionado a partir do experimento de RNASeq foi observada também durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, através de avaliação de metadados (previamente publicados e disponíveis no Gene Expression Omnibus – GEO, NCBI) e em amostras cardiomiócitos em diferentes estágios de diferenciação derivadas de células-tronco.

3.7.9.1 Análise do padrão de expressão de genes da família Popeye durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos – Metadados

Os dados de expressão gênica gerados a partir da publicação de Barbiarz et. al. 2012 (48800 Microarray probes - Illumina) [43] e da publicação de Funakoshi et. al. 2016 (Microarray-Agilent) [44] foram acessados e analisados através dos *scripts* confeccionados no software MatLab 2018b.

3.7.9.2 Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos- in vitro

O protocolo de diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos *in vitro* foi realizado conforme resumo esquemático apresentado na Figura 5. Este protocolo é

capaz de gerar cardiomiócitos com capacidade contrátil detectável a partir do 7-9º dia após o início da diferenciação.

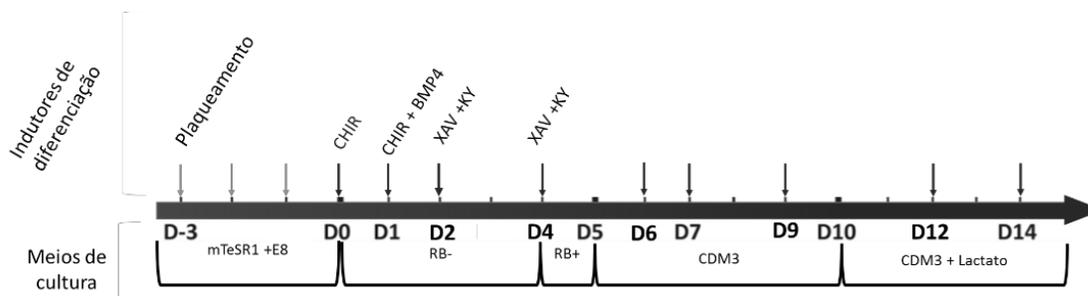


Figura 5: Representação temporal do curso da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. O processo é dividido em dias negativos (aqui representados em azul, como sendo ainda hiPSC até o dia 0). Após o dia 0 já há direcionamento cardíaco das células. As trocas de meio estão representadas pelas setas e os reagentes necessários para cada etapa estão listados acima da linha do tempo.

O protocolo é uma variação do protocolo utilizado pelo grupo do pesquisador Sean Palecek, e leva em consideração ativação e inibição da via da Wnt.

As hiPSC foram cultivadas utilizando mTeSR em placas revestidas utilizando 150 µg/mL de Geltrex. O início da diferenciação se dá quando ~90% de confluência for atingida (cerca de 3 dois dias após o dia de plaqueamento). No dia 0, as células foram lavadas suavemente com RPMI duas vezes e foi adicionado RPMI suplementado com B27 (B27 Minus Insulin (50x), Gibco /Life Technologies) sem insulina (RB-) contendo 9µM CHIR (InSolution™ GSK-3 Inhibitor XVI, CHIR99021 - CAS 252917-06-9 - Calbiochem). No dia 1, 20-22 horas após o início da diferenciação, metade do meio de cultura foi removido e o volume total foi completado usando RB - com 20ng/mL de BMP4 (BMP-4, CF, R & D Systems) e 9µM CHIR. No dia 2, as células foram lavadas utilizando RPMI e foi adicionado RB- com 2,5µM de KY (KY 02111, Cayman Chemical Company) e 2,5µM de XAV (XAV 939, Cayman Chemical Company). No dia 4, o meio foi substituído por RB + Insulina (RB +) (usando Suplemento B27 (50x), (Gibco) contendo 2,5µM de KY e 2,5µM de XAV. Nos dias 5 e 6 as células são mantidas em RB+ (com trocas de meio diárias). A partir do dia 7 até ao dia 10 utilizou-se meio RPMI contendo 213µg/mL de Vitamina C (ácido L-Ascórbico, Sigma-Aldrich) e 500µg /mL de albumina de soro bovino

(BSA, Sigma-Aldrich) (CDM3). Do dia 10 ao dia 20 utilizou-se CDM5- CDM3 + (suplemento antioxidante (1000x) Sigma-Aldrich) + aminoácidos não essenciais (Gibco) foi usado+ 1% P/S (penicilina e estreptavidina) - no meio de cultura. A partir do dia 21, o meio foi trocado a cada dois dias.

No presente estudo foi realizada a análise da expressão (qPCR) do *POPDC1* (*BVES*), *POPDC2* e *POPDC3* em hiPSCs avaliando os dias 0, 1, 3, 7 e 28 do processo de diferenciação em cardiomiócitos.

Estudos preliminares de superexpressão e *knockdown* do gene *POPDC3* foram realizados em hiPSCs. Estes dados preliminares da diferenciação das hiPSCs modificadas para *knockdown* de *POPDC3* encontram-se descritos detalhadamente no **APÊNDICE A** dessa dissertação.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média (EPM). Análises de variância de uma ou duas vias (ANOVA) com testes pos-hoc do tipo Dunnet/Bonferroni, ou testes t de Student não pareados foram utilizados para comparar grupos ou tratamentos quando apropriado. Todas as análises foram feitas utilizando o Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Softwares Inc., CA, USA). Dados com p-valor<0,05, ou seja, com intervalo de confiança de pelo menos 95%, foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. Seleção do gene candidato

Inicialmente, 157 genes codificantes para proteína de membrana apresentavam-se diferentemente expressos na comparação R1D5 vs R7D5 (FC>1,3 e p-valor <0,05). Destes, apenas 34 também se apresentavam diferentemente expressos na comparação R1D5 vs 9D (animais não manipulados com idade igual a média entre os animais R1D5 -6 dias de vida- e R7D5- 12 dias de vida) - Figura 6.

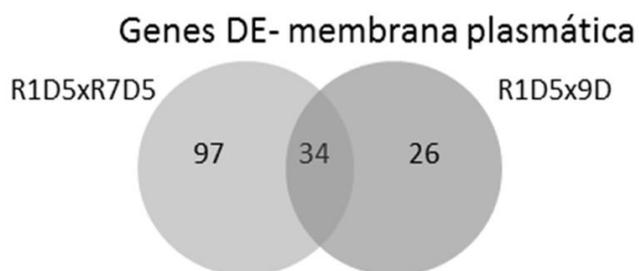


Figura 6: Genes DE (diferentemente expressos nas comparações R1D5XR7D5 e em R1D5X9D). 34 genes de membrana são comuns a essas duas comparações e foram categorizados segundo a base de dados do GeneCards na sequência.

Desses genes, foram selecionados aqueles cuja expressão fosse majoritariamente cardíaca, segundo a base de dados GeneCards (<https://www.genecards.org/>). A expressão deveria ser maior em cardiomiócitos (A), nó atrioventricular (B) e coração (C) em relação à outros tipos celulares e tecidos (D) célula endotelial, cérebro, monócito, células mielóides, linfócitos, adipócitos, ou ter expressão semelhante em (A), (B), (C) e (D). Nessa seleção buscamos os dados de expressão relativa, de tal forma que as primeiras 3 colunas da Tabela 4 referem-se aos tipos celulares / tecidos que a expressão devem ser maior ou igual que as demais. Somente os genes selecionados por tais critérios constam na Tabela 4.

Tabela 4: Genes diferentemente expressos entre animais R1D5 versus R7D5 e que apresentam critérios de seleção adequados segundo a base de dados do GeneCards (valores numéricos representam $(100 \times \text{FPKM})^{1/2}$). Expressão diferencial relativa a R7D5 está representada em *fold change* e a significância estatística pelo p-valor.

Gene	Cardio-miócito	Nó atrioventricular	Coração	Célula endotelial	Cérebro	Monócito	Células mielóides	Linfócitos	Adipócitos	fold change	p-valor
Cdhr1	6	7	6	4	4	5	6	5	4	5,01	9,2E-11
Gja5	5	3	4	3	3	4	4	4	3	1,82	5,00E-02
Gpr123	5	7	7	7	7	7	7	7	7	12,23	1,30E-03
Hcn4	5	3	5	4	3	4	5	4	4	1,61	6,00E-04
Ntsr2	4	3	4	3	8	4	4	4	3	4,09	1,60E-04
Popdc3	4	3	35	3	20	3	4	3	6	1,91	6,00E-04
Ror2	19	13	17	11	8	12	13	11	11	2,36	2,00E-04
Serinc2	5	5	5	6	6	6	6	5	6	2,03	3,00E-02
Sfrp1	9	5	11	5	5	5	6	5	10	3,82	3,4E-11
Slc16a3	183	22	29	17	14	123	217	19	23	3,38	1,00E-31
Slc26a9	36	49	43	51	41	49	47	46	48	2,04	5,00E-02

A partir desses 11 candidatos, selecionamos aqueles que apresentaram banda única quando amplificados por RT-PCR (Apêndice I). Desses, escolhemos apenas os genes que apresentassem expressão maior em R1D5 vs R7D5, e com índice de expressão relativa maior no coração do que em outros tecidos/órgãos/células indiferenciadas (Apêndice I). Para 4 genes, foi possível validar a expressão observada por RT-PCR de modo quantitativo (qPCR) - Figura 7.

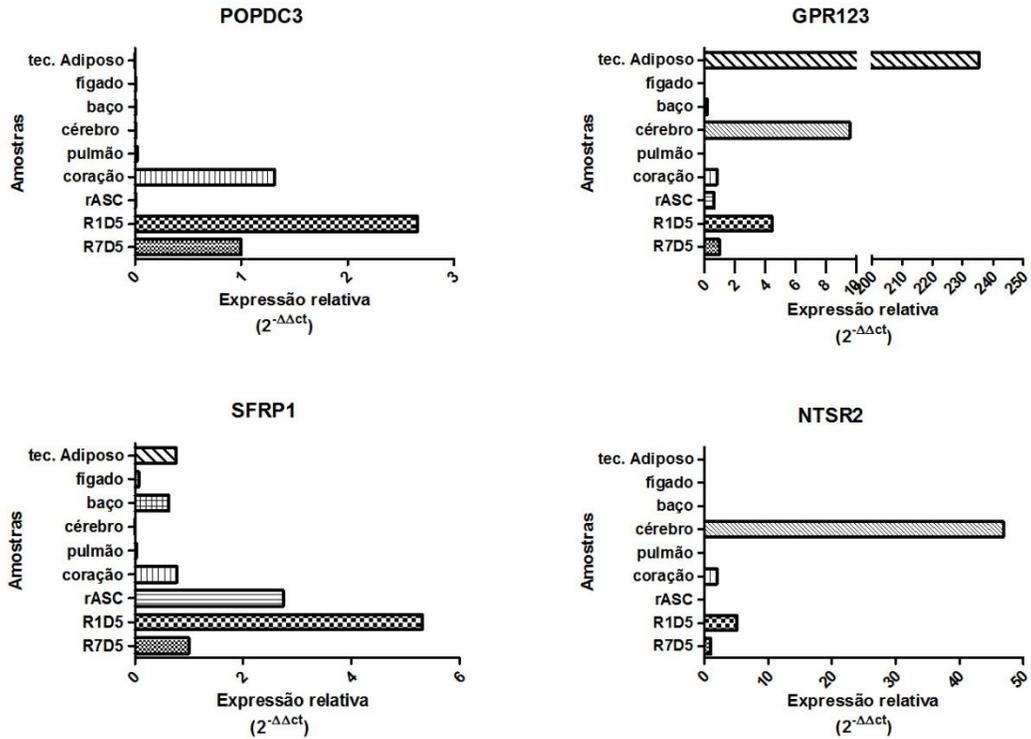


Figura 7: Expressão quantitativa (qPCR) de 4 genes candidatos mais interessantes em diversos tecidos adultos e controles indiferenciados. Amostras: rASC (células-tronco de tecido adiposo de rato); tecido adiposo de rato adulto; fígado de rato adulto; baço de rato adulto; pulmão de rato adulto; coração de rato adulto; R7D5(coração de animais ressectados com 7 dias coletados 5 dias após a operação); R1D5 (coração de animais ressectados com 1 dias de vida e coletados 5 dias após a operação). n=3 para amostras de neonatos e n=1 para controles adultos e indiferenciados.

Na etapa final de filtragem, objetivamos selecionar dentre os 4 candidatos, aquele candidato que tivesse diferença de expressão não apenas entre os animais ressectados nos dias 1 e 7, mas também em relação aos animais SHAM (falso-operado), a fim de excluir possíveis interferências ontogênicas no processo de regeneração. Somente, o gene *Popdc3* apresentou tal diferença de expressão em relação ao animal SHAM -Figura 8.

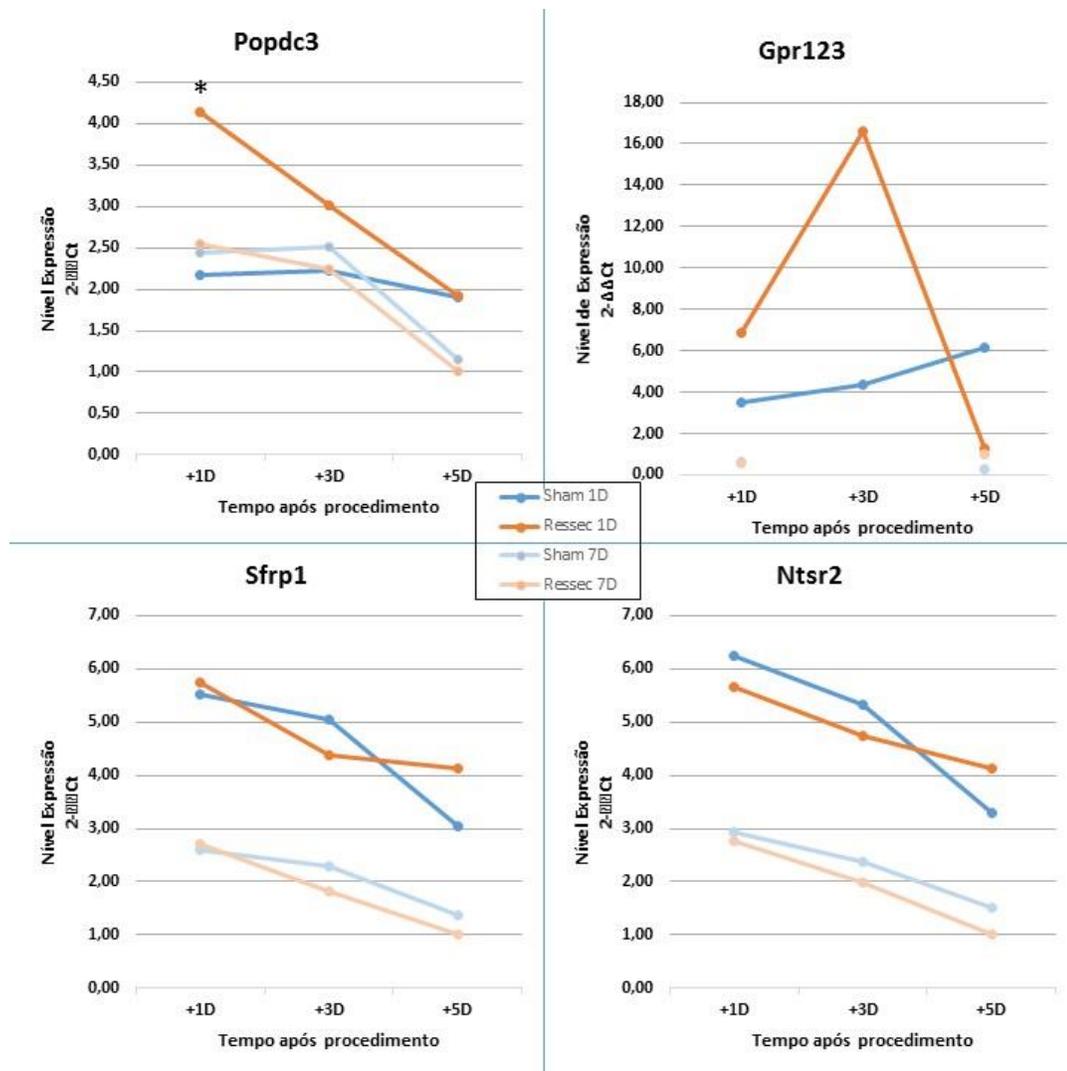


Figura 8: Expressão quantitativa (qPCR) dos genes candidatos no período pós-natal. (A) Gráfico de expressão temporal do gene POPDC3. (B) Gráfico de expressão temporal do gene SFPR1. (C) Gráfico de expressão temporal do gene NTSR2. Amostras de animais ressectados com 1 dia de vida e coletados 1, 3 e 5 dias após a ressecção foram avaliadas em conjunto com amostras de animais falso operados com 1 dia de vida e coletados 1, 3 e 5 dias após o procedimento (a fim de remover o fator da idade, e poder verificar somente as diferenças decorrentes da regeneração). Da mesma forma, amostras de animais ressectados com 7 dias de vida e coletados 1, 3 e 5 dias após a ressecção foram avaliadas em conjunto com amostras de animais falso operados com 7 dia de vida e coletados 1, 3 e 5 dias após o procedimento (a fim de remover o fator da idade) (ANOVA de 2 vias, com teste pos-hoc, n=3-6. * indicam p-valor<0,05 considerando um intervalo de confiança de 95%).

Nesse experimento, foi possível remover o fator idade (incluindo os falso-operados), assim somente as diferenças estatísticas que são inerentes ao procedimento foram consideradas. Para os genes *Gpr123*, *Ntsr2*, e *Sfrp1* não foi observada diferença estatística entre os animais ressectados e seus respectivos SHAM. Para o gene *Popdc3* observou-se que há um fold=1,85; p-valor<0,05 (Ressec1D1 versus SHAM1D1) e um padrão decrescente ao longo do período avaliado (fold= R1D1 versus R7D5, com fold=4.15 p<0,05).

Em resumo, o modelo de regeneração pós-natal permitiu com que diferenças entre os animais capazes de regenerar (R1) e aqueles que não conseguem (R7), fosse explorado de forma ampla. A partir do sequenciamento das amostras de RNA desses animais, foi possível acessar a expressão diferencial de genes. Vários critérios foram empregados de forma a filtrar genes candidato ao estudo (Figura 9), restando apenas o gene *Popdc3* como candidato final do processo de seleção.

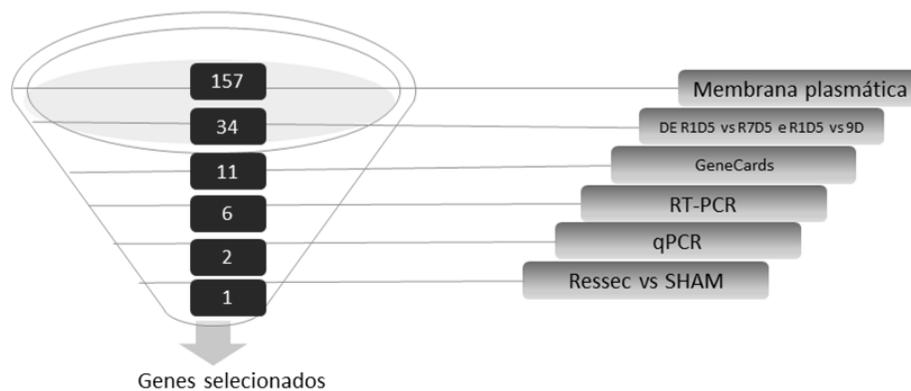
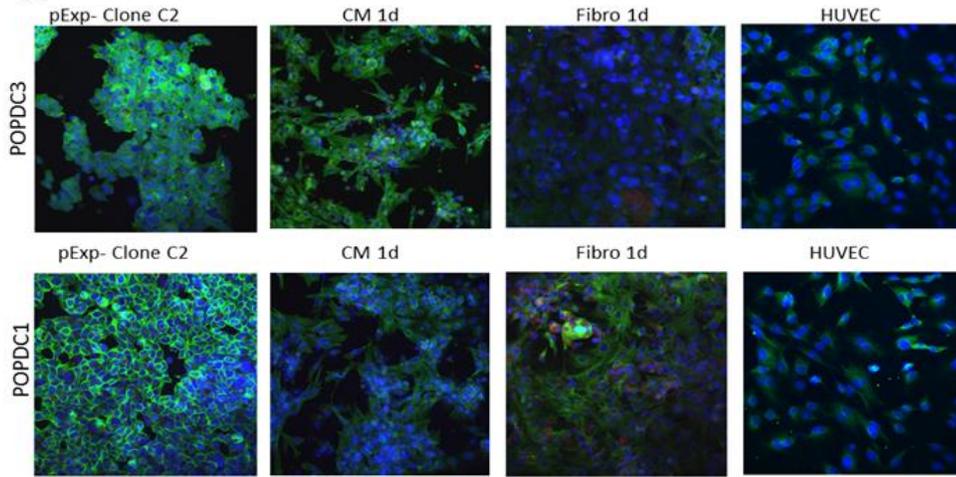
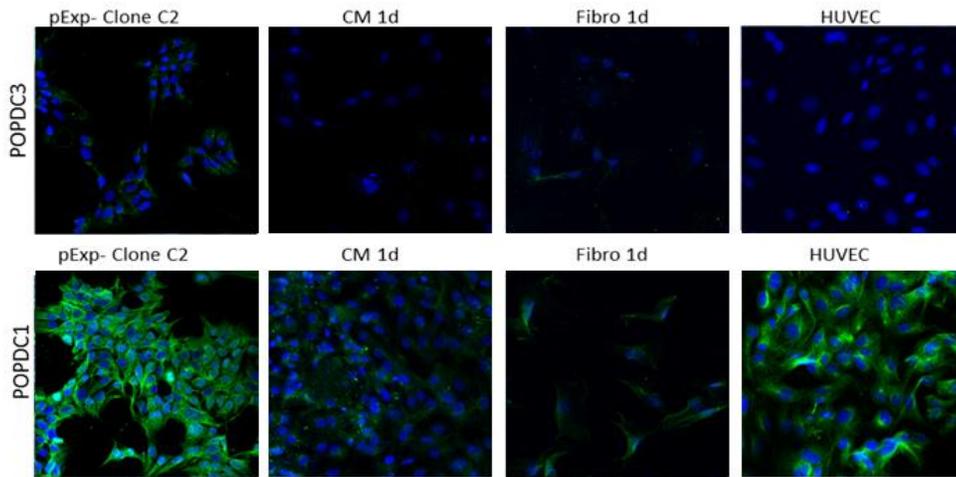
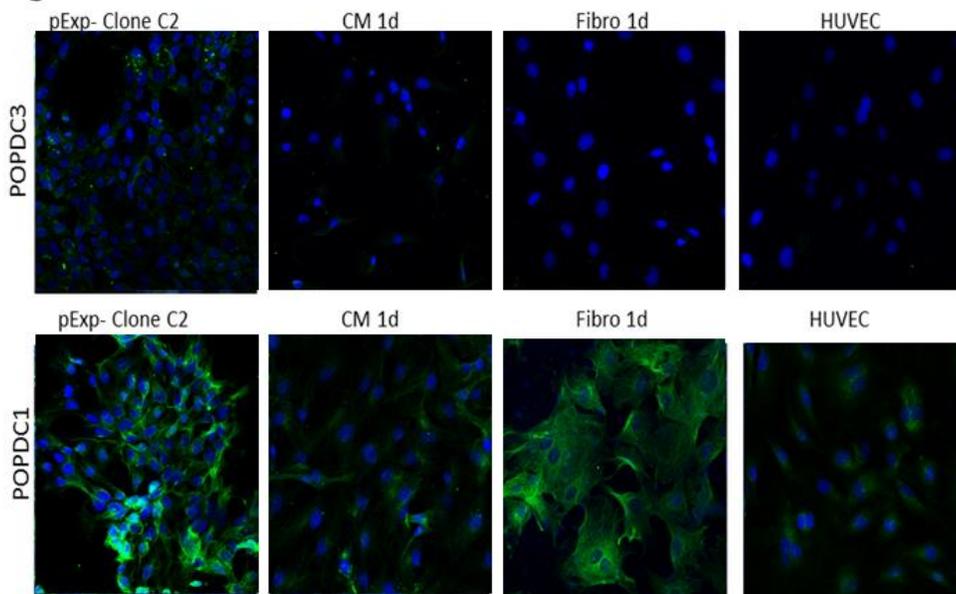


Figura 9: Quantidade de genes diferentemente expressos na comparação R1D5 versus R7D5 que foram selecionados segundo 6 critérios.

4.2. Expressão de POP3 em tipos celulares que compõe o coração

Reações de imunofluorescência foram padronizadas para identificação da proteína Popdc3 (Resultados constantes no Apêndice II). Para o anticorpo anti-Pop3 da empresa Lifespan foi possível determinar as condições de marcação para que o mesmo fosse capaz de reconhecer células transfectadas com plasmídeos de superexpressão de POPDC3 humano, e não fosse capaz de reconhecer as células transfectadas com plasmídeos para inibição de POPDC3 humano (detalhes sobre os plasmídeos constam no APÊNDICE A). Através da imunofluorescência, foi possível verificar se existe especificidade de expressão de Popdc3 em cardiomiócitos em relação a outros tipos celulares presentes no coração (fibroblastos e células de vaso sanguíneo). A expressão de Popdc1 (outro membro da família Popeye, também conhecido como Bves, do inglês “blood vessel epicardial substance”,) também foi avaliada. A fim de mimetizar tais condições foram plaqueadas as seguintes células para um experimento de imunofluorescência: 1) Cardiomiócitos de ratos neonatos de 1 dia de vida (CM 1d); 2) Fibroblastos cardíacos de ratos neonatos de 1 dia de vida (Fibro 1d); 3) HUVEC (do inglês *human umbilical vessel endothelial cells*), que seriam um dos tipos celulares presentes no vaso sanguíneo e 4) controle positivo (clone C2 -293t com superexpressão de POPDC3). Os resultados seguem conforme Figura 10.

A**B****C**

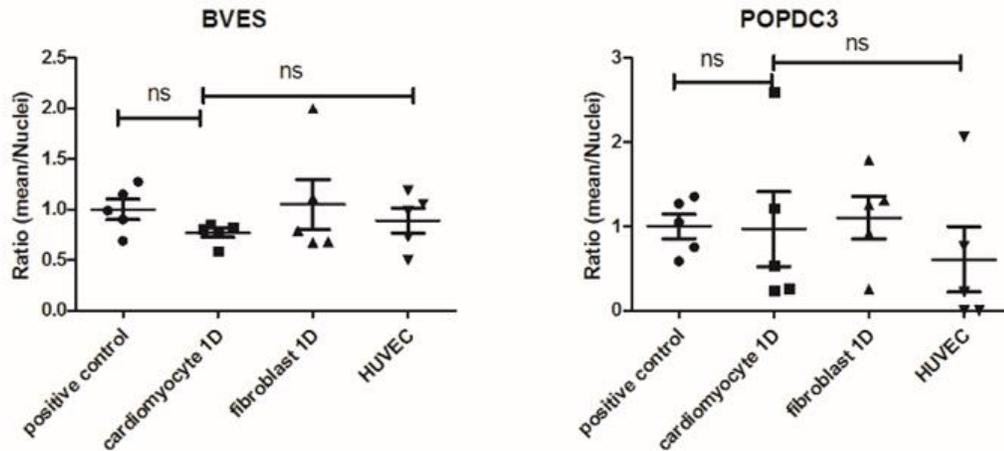
D

Figura 10: Microscopia confocal de células marcadas em verde (Alexa 488) para POPDC3 (acima) e POPDC1 (abaixo)- A-C. O controle positivo está à esquerda (corresponde ao clone para superexpressão de POPDC3- C2). Foi investigado o padrão de expressão de POPDC3 e POPDC1 em cardiomiócitos de ratos neonatos de 1 dia de vida (CM 1d), fibroblastos cardíacos de ratos neonatos de 1 dia de vida (Fibro 1d) e HUVEC (do inglês *human umbilical vessel endothelial cells*). D-Quantificação da expressão de BVES (POPDC1) e POPDC3 entre as amostras. Aumento de 200X.

Os níveis de expressão de POPDC3 e de POPDC1 não variaram entre os tipos celulares estatisticamente. O n=1 (Figura 10- A), no qual os anticorpos haviam sido recentemente adquiridos, sugerem que a expressão de *BVES* e *POPDC3* está maior nos clones de 293t com superexpressão de *POPDC3* (figuras à esquerda). Interessantemente, a expressão de *POPDC3* se mostrou mais presente nos cardiomiócitos neonatais do que nos fibroblastos. No caso do *POPDC1* ocorreu o oposto, ou seja, os níveis de expressão são maiores nos fibroblastos cardíacos do que nos cardiomiócitos. Além disso, o padrão de expressão de *POPDC1* foi observado na membrana plasmática, enquanto para o *POPDC3* houve marcação na membrana e também no citoplasma.

Devido a presença do gene *POPDC3* estar aumentada nas amostras de ratos neonatos capazes de regenerar (qPCR-Figura 8) e pela sugestão de estar relacionada aos cardiomiócitos (Figura 10-A), houve interesse em testar o fenótipo cardíaco mediante depleção deste gene. Para tanto, peixes (peixe-zebra) selvagens foram submetidos a obliteração (KD) de expressão de *popdc3* e de *bves* (ou *popdc1*- controle positivo) a partir de morfolidos para verificação de fenótipos

cardíacos e parâmetros globais (mortalidade, presença de edema pericárdico, má-formações, etc).

4.3. Viabilidade e alterações cardiovasculares em peixe-zebra com *knockdown* de *popdc3* e *bves*(*popdc1*)

A taxa de mortalidade dos grupos KD para *popdc3* foi aproximadamente 3 a 7 vezes superior ao dos grupos controles. Assim sendo, as larvas com KD para *popdc3* apresentaram maior taxa de mortalidade média (56%) em relação ao controle, porém esse grupo é mais viável do que o grupo com KD para *bves*- com taxa de mortalidade média de 91%. A taxa de mortalidade dos animais que foram injetados com morfolinolinos para KD de *bves* foi 9 vezes maior do que a observada para os grupos controles (animais selvagens e FITC), indicando que menores quantidades de embriões atingiram o estágio larval (3dpf- 3 dias pós fertilização) - (Figura 11).

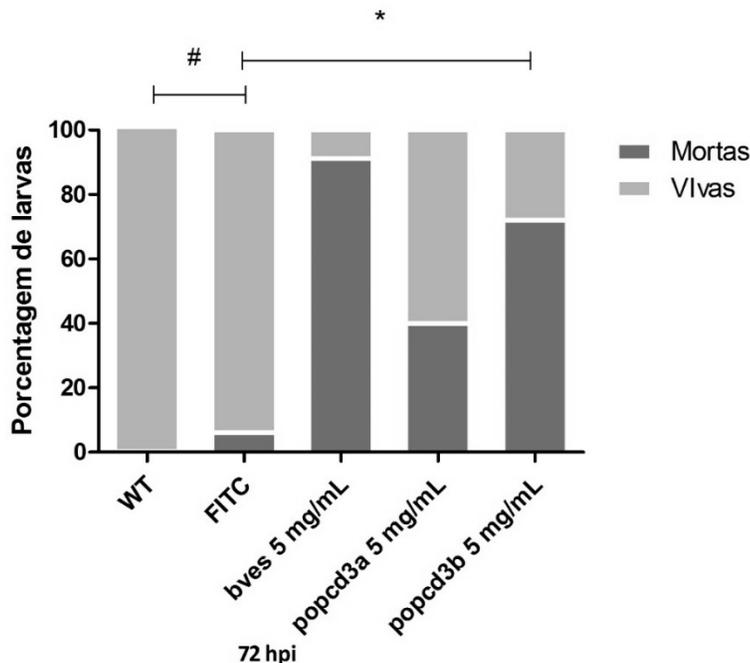


Figura 11: Taxa de mortalidade é elevada com knockdown de *bves*. Larvas com KD para *bves* e *popdc3* foram categorizadas como mortas ou vivas com 3dpf, mostrando que a taxa de mortalidade de KD de *bves* e KD *popdc3* (média dos dois tratamentos) são respectivamente, 15 e 9 vezes maior em relação ao controle FITC. Grupos: WT= *wild type* (selvagens, sem injeção); FITC= controle negativo; bves 5mg/mL= KD para *bves*; *popdc3a*= KD para *popdc3*; *popdc3b*= KD para *popdc3*; (Fisher # indica $p=0,0004$ e * indica $<0,00001$)

A presença de edema pericárdico em peixe-zebra indica paralisia ou perda de movimentos, ou também presença de anomalia cardíaca [45]. Os animais que receberam a injeção de morfolinolinos para knockdown (KD) de *bves* e/ou *popdc3* apresentaram edema pericárdico quando comparados aos animais controle (Figura 12). A taxa de larvas com edema pericárdico foi aproximadamente 2 a 5 vezes maior nos grupos KD *popdc3* quando comparado aos controles e taxa de larvas com edema pericárdico foi aproximadamente 10 vezes maior no grupo KD *bves* quando comparado aos controles e

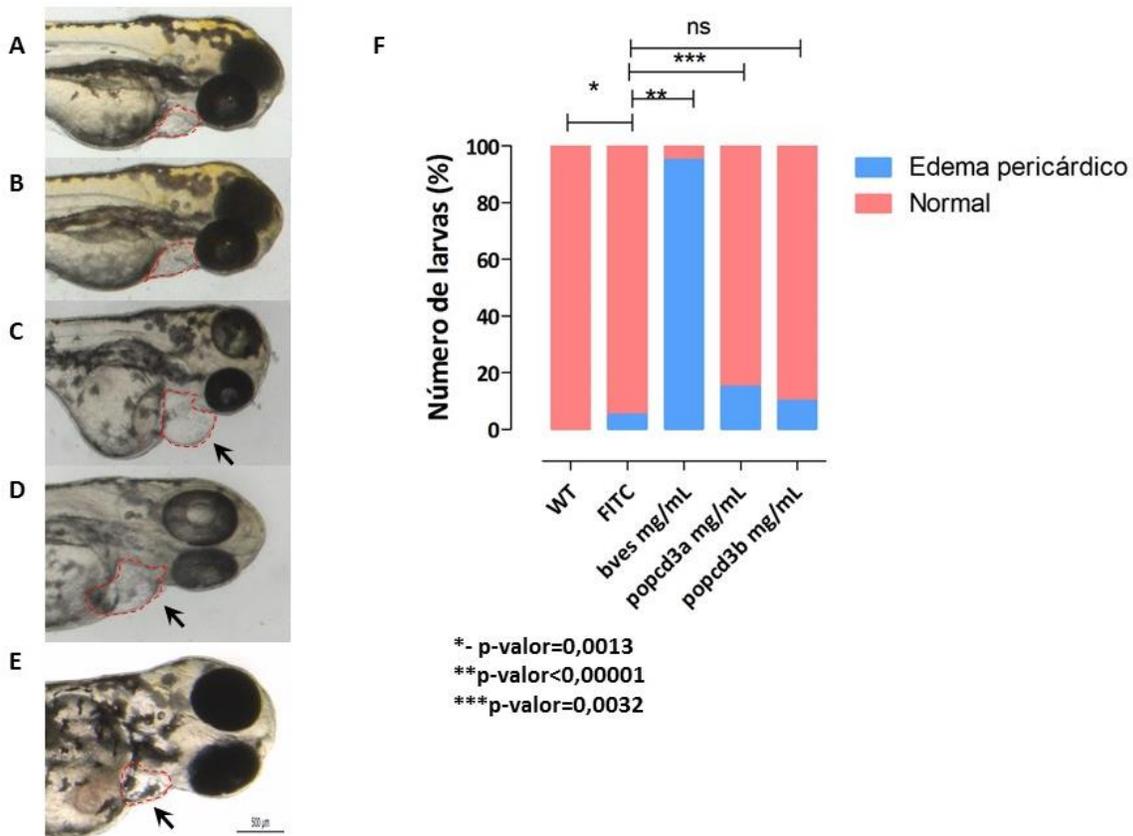


Figura 12: O edema pericárdico é prevalente em larvas com knockdown para *bves*. Larvas com KD para *bves* e *popdc3* foram categorizadas como possuidoras de edema ou normais com 3dpf, mostrando que quantidade de larvas com edema na condição de KD de *bves* e KD *popdc3* (média dos dois tratamentos) são respectivamente, 19 e vezes maior em relação ao controle FITC. Grupos: WT= wild type (sem injeção); FITC= controle negativo; *bves* 5mg/mL= KD para *bves*; *popdc3a*= KD para *popdc3*; *popdc3b*= KD para *popdc3*; (n= 18-120, Fisher * indica p-valor=0,0013, ** indica p-valor<0,00001 e *** indica p-valor=0,0032).

No caso da perda de movimentos, a morte dos cardiomiócitos (gerando o edema) pode levar a queda da frequência de contração do coração [46], [45]. A fim de investigar este fenômeno, a frequência cardíaca dos animais KD de *bves* e *Popdc3* foi registrada em 2 momentos distintos da vida embrionária/larval destes animais (Figura 13).

A frequência cardíaca média observada com 24hpi nas larvas controle foi de 60,6 batimentos por minuto (BPM), sendo estatisticamente inferior ao observado no grupo KD *bves*, que apresentaram frequência cardíaca média de 82,2 BPM. Para os grupos com KD para *popdc3* (*popdc-a* e *popdc3-b*), a frequência cardíaca média foi de 46,1 e 90,6 BPMs, respectivamente, apresentando-se diferentes em relação ao grupo controle.

A frequência cardíaca observada com 48hpi nas larvas controle foi de 92,1 batimentos por minuto (BPM), já os grupos KD para *popdc3* (*popdc-a* e *popdc3-b*), a frequência cardíaca média foi de 98,5 e 91,5 BPM, respectivamente, o grupo para KD de *bves* apresentou frequência cardíaca média de 100,4 BPM.

A frequência cardíaca média observada com 72hpi nas larvas controle foi de 97,05 BPM, sendo estatisticamente inferior ao observado nos grupos KD para *bves* que apresentou frequência cardíaca média de 122,6 BPM. Já os grupos *popdc3-a* e *popdc3-b* apresentaram frequência cardíaca média de 103,9 e 112,5 BMPs, respectivamente.

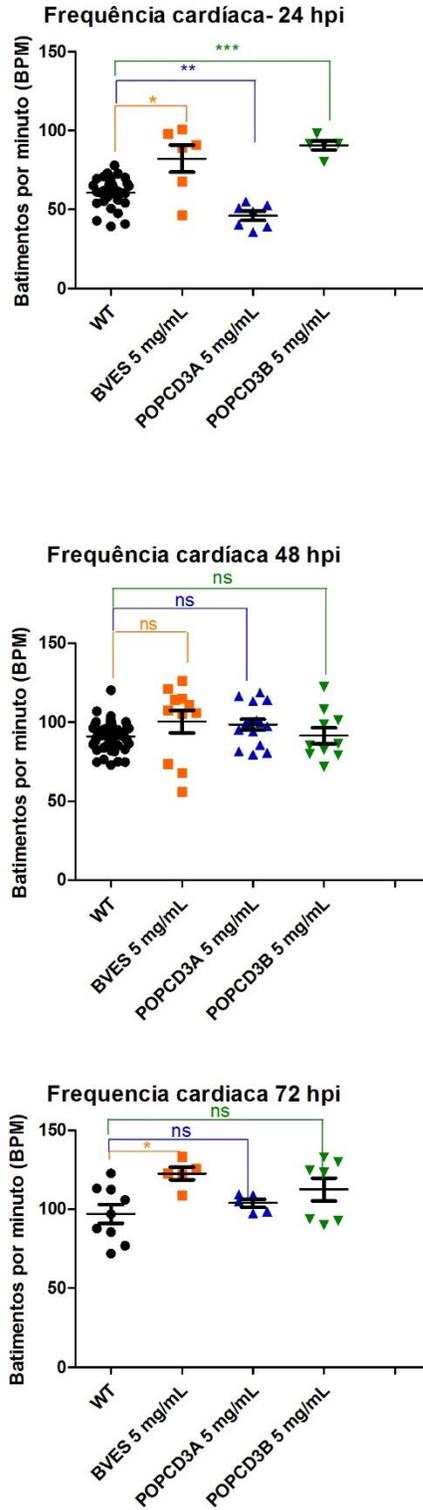


Figura 13: Knockdown de *popdc3* parece não afetar a frequência cardíaca, enquanto KD de *bves* levou a um aumento da frequência cardíaca. Embriões e larvas com 24, 48 e 72hpi tiveram suas frequências de batimento mensuradas, mostrando que a frequência de batimento de KD *bves* foi em média 26 BPM maior do que WT com 72hpi e 9 BPM com 48hpi. (24hpi n= 5-29; 48hpi n= 10- 48 e 72hpi n=5-9) (ANOVA de 1 via não pareado – teste pos-hoc Dunnett; * indica p-valor <0,05).

A arritmia foi mensurada nos grupos, para todos os momentos observados (24, 48 e 72hpi), sendo considerada como arrítmicos, os animais que apresentem desvio padrão relativo (DPR) superior ao observado nos animais controle (CTRL). Observamos que com 24h, todos os grupos têm DPR semelhante ao grupo CTRL. Com 48h, tanto os grupos com KD para *bves* e para *popdc3* apresentam DPR acima dos animais controles, correspondendo a 1,67 vezes maior em *popdc3-a* e 2,9 vezes maior em *popdc3-b*. O grupo KD *bves* também apresentou DPR superior ao CTRL em 2 vezes. Com 72h, os grupos KD *bves* e KD *popdc3-a* apresentam DPR semelhante ao grupo CTRL, mas os animais no grupo *popdc3-b* apresentam DPR 2,7 vezes maior que os animais controle.

Tabela 5: Arritmia em embriões e larvas de peixe-zebra com depleção temporária de *bves* e *popdc3*. DPR é o desvio padrão relativo.

Tempo	Medidas	CTRL	BVES	POPA	POPB
24h	DPR	9%	14%	9%	9%
48h		6%	12%	10%	17%
72h		7%	9%	7%	18%

Os traçados de frequência cardíaca de alguns animais de cada grupo estão expostos na Figura 14. A quantificação dos desvios padrões relativos sugerem que em 48 e 72hpf os animais com KD para *bves* e *popdc3* apresentam arritmia em relação ao controle (CTRL), mas em 72 horas pós fertilização, apenas o grupo KD para *popdc3-b* apresentou arritmia, com diferença estatística em relação ao grupo controle- Figura 15.

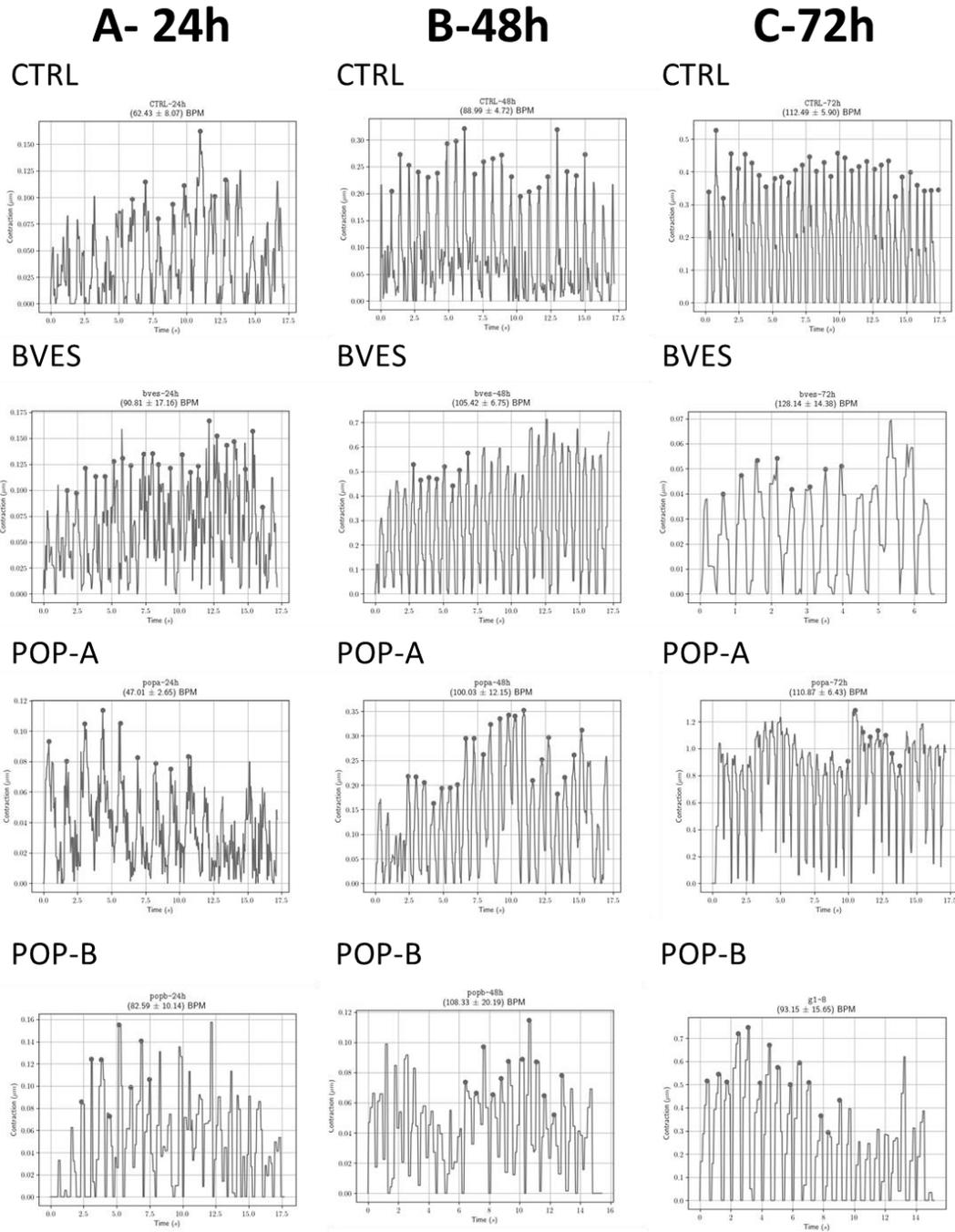


Figura 14: Depleção temporária de *bves* e *popdc3* gera arritmia. Traçados de frequência cardíaca de embriões e larvas de peixe-zebra com knockdown de *bves* e *popdc3* (n=10-50, 300 blocos de análise por animal).

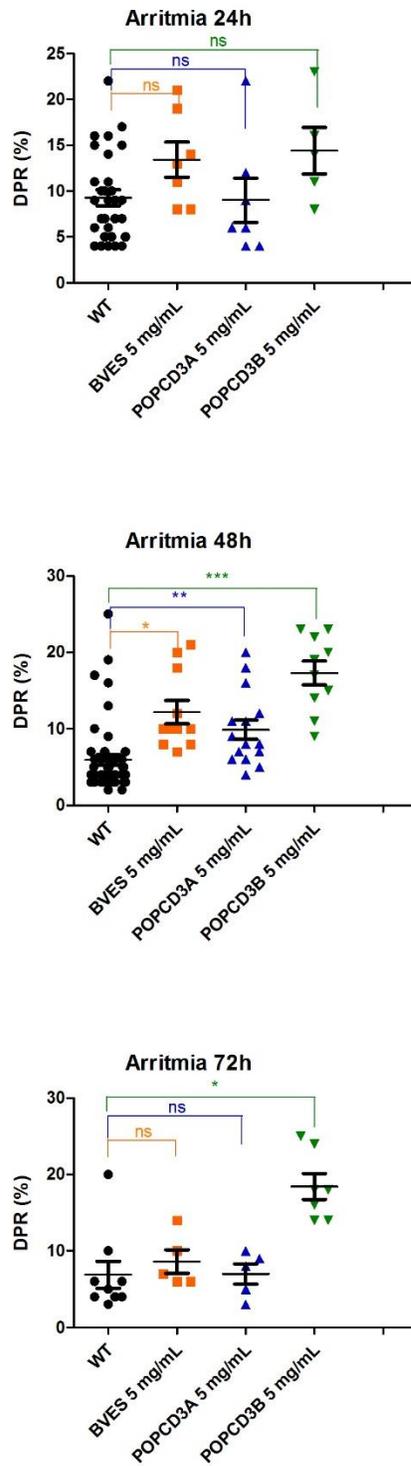


Figura 15: Análise da arritmia observada com 24,48 e 72 pós fertilização de embriões e larvas de peixe-zebra com KD para *bves* e *popdc3* (n=10, até 300 pontos avaliados por vídeo- ANOVA 1 via, com pós teste de Dunnet, *, ** e *** indicam p-valor <0,05).

4.4. Fenótipos cardíacos de peixe-zebra com knockdown de mRNA da família Popeye

As medidas das câmaras cardíacas foram contabilizadas para os animais nas condições de sístole e diástole (Tabela 6). Podemos verificar que o coração dos animais com KD para bves são maiores do que os WT na diástole. Os corações com KD para popdc3 apresentaram ventrículo mais alongado na diástole (Figura 16).

Tabela 6: Knockdown de bves gera aumento global do ventrículo na diástole, enquanto que knockdown de popdc3 alonga o ventrículo na diástole. Ventrículos de larvas de peixe-zebra foram mensuradas com 3dpf (média com respectivos desvios padrões; n=4-10).

Diástole	Comprimento ventricular médio (μm)	Largura ventricular média (μm)	Significativo em relação a WT? (nível de significância de 95%)
WT	79,3 +/-11	55 +/- 7,5	-
bves	122,1 +/-16,6	78,1 +/- 10,3	comprimento e largura
popdc3-a	102,5 +/-7,2	62,5 +/- 7,1	não
popdc3-b	105,7 +/-19,7	65 +/- 16,7	comprimento

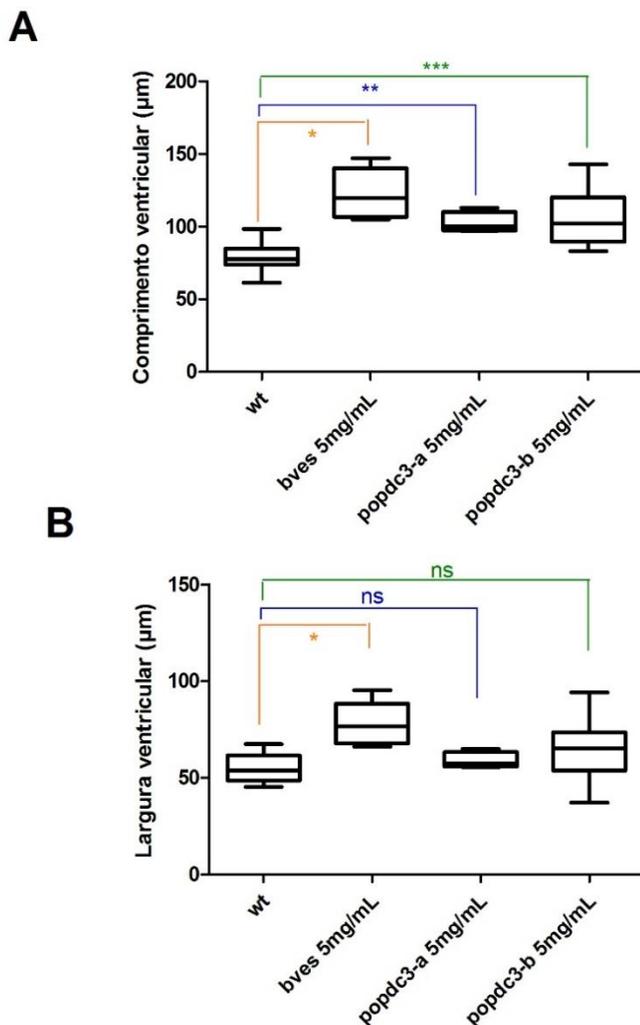


Figura 16: Knockdown de *bves* gera aumento global do ventrículo, enquanto que knockdown de *popdc3* alonga o ventrículo. Box-plot de medidas diastólicas de comprimento (A) e de largura (B) de ventrículos de larvas de peixe-zebra foram mensuradas com 3dpf (média com respectivos desvios padrões). (n=4-10; ANOVA 1 via, teste post-hoc Dunnet *, ** e *** indicam p-valor<0,05, n=4-10).

A fim de investigar possíveis defeitos funcionais nos corações dos peixes, foi calculada a fração de encurtamento, volume sistólico, fração de ejeção débito cardíaco para os animais controle e para os animais que apresentaram edema e que sofreram injeção de morfolinós (Figura 17).

Os animais pertencentes ao grupo popdc3-a apresentaram a maior fração de encurtamento (correspondendo a 29%) observada, sendo estatisticamente superior à do grupo controle (correspondendo a 11%). As larvas do grupo KD popdc3-b apresentaram média da fração de encurtamento igual a 21%. As larvas do grupo KD *bves* apresentaram fração de encurtamento médio de 22% (Figura 17-A).

O volume sistólico (VS) calculado através das medidas ventriculares, foi observado e verificamos que o grupo KD *bves* apresenta VS estatisticamente superior ao grupo controle, apresentando uma média de $0,96 \cdot 10^6 \mu\text{L}^3$ /batimento enquanto o grupo controle apresenta VS médio $0,17 \cdot 10^6 \mu\text{L}^3$ /batimento. Já os grupos KD popdc3-a e popdc3-b apresentam em média $0,5 \cdot 10^6 \mu\text{L}^3$ /batimento e $0,65 \cdot 10^6 \mu\text{L}^3$ /batimento, não apresentando diferença estatística em relação ao controle (Figura 17-B).

Já no caso da fração de ejeção estimada pelas medidas ventriculares, os grupos injetados com MO- *bves* e MO-popdc3-b apresentaram maior fração de ejeção em relação ao controle, sendo em média respectivamente (50 e 50,3%) indicando maior capacidade de ejeção de sangue do que o controle (28%). O grupo KD popdc3a apresentou fração de ejeção média de 37%, não se diferenciando estatisticamente dos animais controle (Figura 17-C).

Também foi calculado o débito cardíaco das larvas de peixe-zebra com 3dpf. Esse parâmetro foi mais elevado (em 8,71 vezes) nos animais KD para *bves*, em relação ao controle. Já no caso dos grupos KD popdc3-a e popdc3-b, não há diferença estatística em relação ao controle, sendo 1,09 e 1,22 vezes maior que o controle, em média. (Figura 17-D).

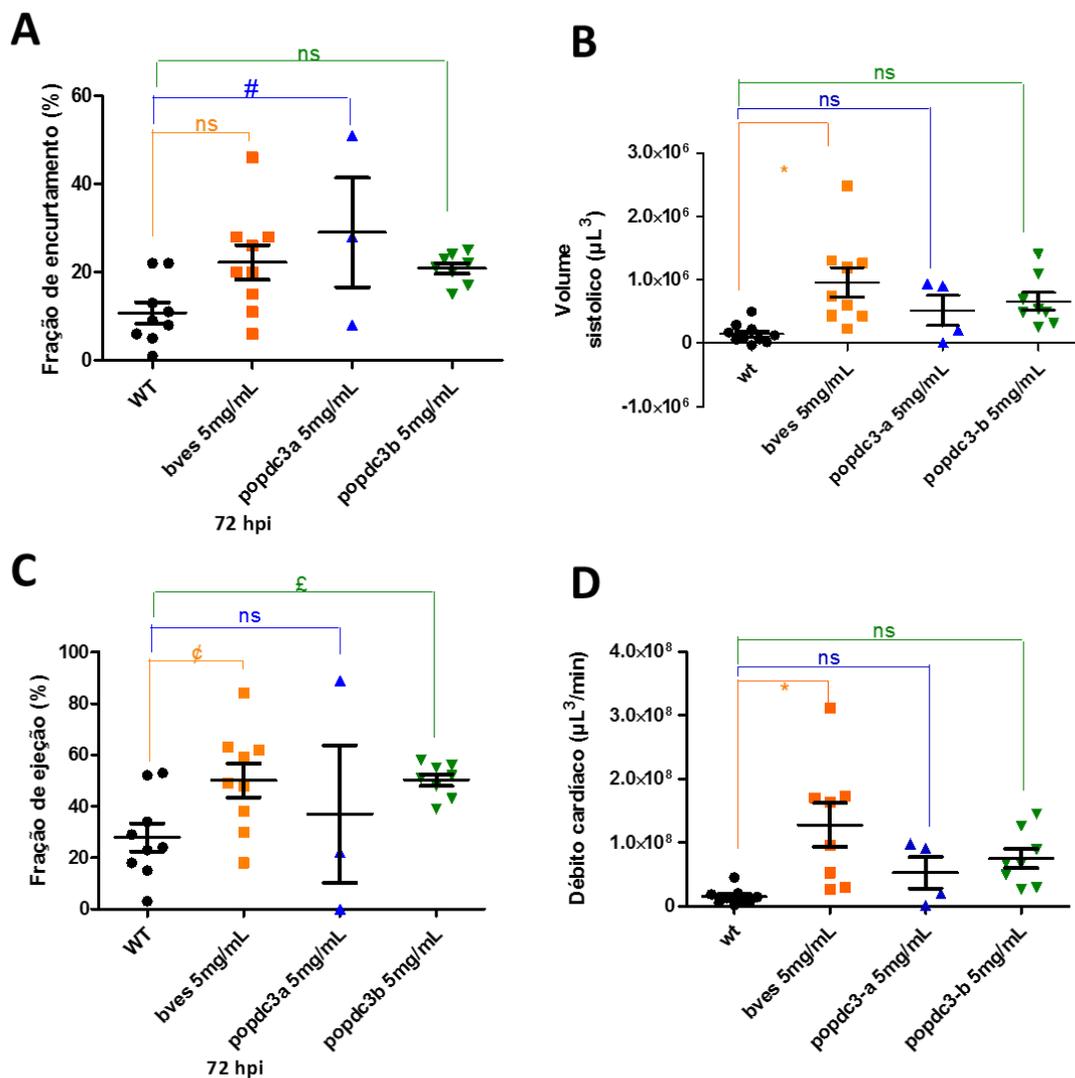


Figura 17: Fração de encurtamento (A), volume sistólico (B) e fração de ejeção (C) e débito cardíaco (D) de peixe-zebras com 72 hpi.

4.5. Alterações morfológicas em outros tecidos/orgão em larvas de peixe-zebra com depleção temporária de *bves* e *popdc3*

Defeitos morfológicos também foram constatados em animais injetados com morfólino sendo o mais frequente deles a má formação do saco vitelino (Tabela 7). As imagens sugerem que o saco vitelino está aumentado em 72hpi, pois apresenta um volume semelhante ao saco vitelino WT (controle) com 48hpi (Figura 18). Isso sugere que essas larvas estão com atraso de desenvolvimento, pois devem

absorver o saco vitelino em até 5 dias pós-fertilização. A partir daí se alimentarão de paramécios contidos na água dos aquários.

Tabela 7: Incidência de má formações em peixe-zebra de 72hpf.

Má- formação/grupos	WT (n=24)	MO-bves 5mg/mL (n=10)	MO-popdc3-a 5mg/ml (n=22)	MO-popdc3-b 5mg/mL (n=19)	total
<i>Coluna</i>	0/(0%)	0/(0%)	2/(11%)	4/(20%)	6
<i>Saco vitelino edemaciado</i>	0/(0%)	6/(55%)	0/(0%)	2/(10%)	8
<i>Cauda</i>	0/(0%)	0/(0%)	0/(0%)	7/(35%)	7
total	0/(0%)	6/(55%)	2/(11%)	13(65%)	21

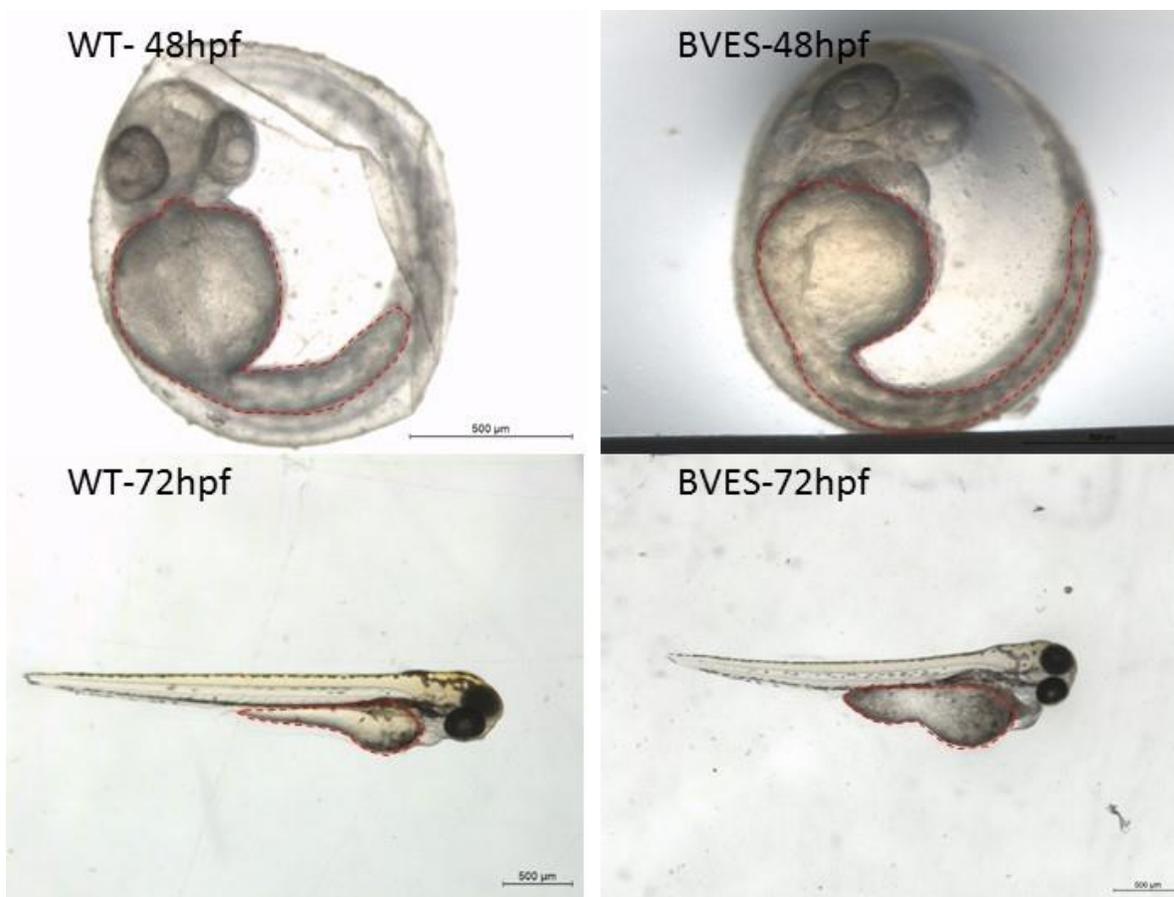


Figura 18: Microscopia de peixe-zebras em estágio embrionário (48hpf) e larval (72hpf), evidenciando o edema de saco vitelino observado no grupo MO-bves.

As larvas com maior taxa de má formação do saco vitelino correspondem as injetadas com MO KD bves (Figura 19-**B-seta vermelha**, seguidas pelo grupo MO KD popdc3b (Figura 19-**D-seta vermelha**).

Má formações na coluna (Figura 19- **setas azuis**) foram observadas quase que exclusivamente nos animais KD para popdc3, sendo que 11% das larvas popdc3-a apresentaram defeitos na coluna e 20% das larvas KD popdc3-b tiveram essa anomalia.

Defeitos na forma da cauda (Figura 19- **setas verdes**) também foram observadas, sendo mais frequentes no grupos KD para popdc3. As larvas popdc3-a e popdc3-b apresentaram respectivamente, 0,4% e 35% de indivíduos com tal deformação.

A quantificação de todas anomalias observadas nos grupos sugere que a mais prevalente seja a anomalia de saco vitelino, mas prevalente no grupo KD bves, seguida pela má formação na cauda (onde os animais KD popdc-b são os mais afetados), e por último, a má formação na coluna (onde as taxas de indivíduos afetados é semelhante nos grupos popdc3-a e popdc3-b) (Figura 19-E).

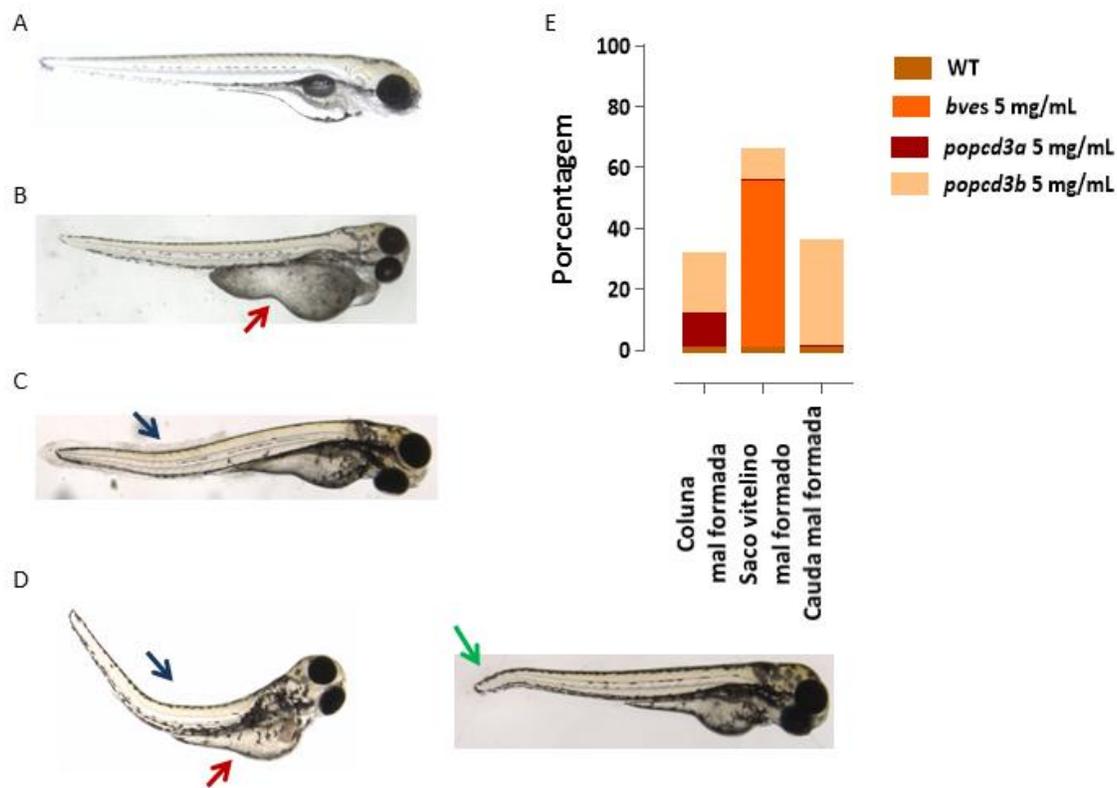


Figura 19: Morfolinos *bves*, *popcd3a* and *popcd3b* causam malformações em larvas de peixe-zebra com 3 dpf. Embriões de peixe-zebra com 0 hpf ($n= 50$) foram (A) não injetados, sendo controles; (B) microinjetados com morfoline (MO) *bves* 5 mg/mL, (C) MO *popcd3a* 5 mg/mL e (D) MO *popcd3b* 5 mg/mL. Larvas com 3 dpf foram analisadas no estereomicroscópio Leica M205C (Aumento de 65.5x -software LAS V4.11), para visualização dos sacovitelino: setas vermelhas, das má formações de colunas: setas azuis e das má formações na cauda: setas verdes.

O desenvolvimento embrionário foi fotografado por microscopia de contraste de fase com 24, 48 e 72 horas após injeção (hpi)- Figura 20. Os resultados demonstram que a com 48hpi, os embriões com KD para *bves* apresentam saco vitelino aumentado, mantendo-se assim até as 72hpi. Também notamos que nesses animais a presença de edema pericárdico é notável.

Má formações na cauda e coluna foram observadas em animais com KD para *popdc3* com 72hpi, sendo mais evidentes no grupo injetado com o morfolino *popdc3-b*.

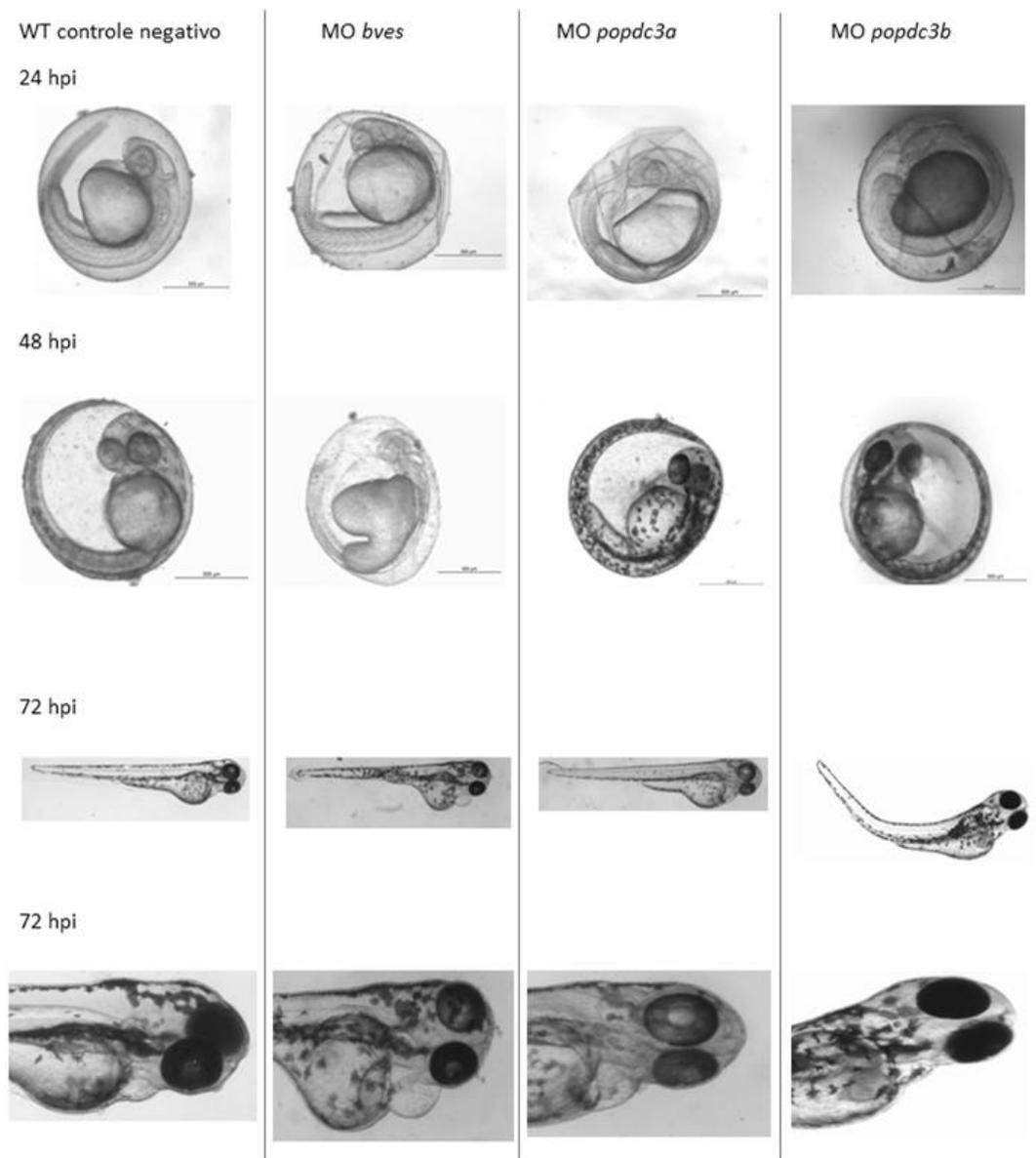


Figura 20: Desenvolvimento de larvas de peixe-zebra microinjetadas com morfolidos *bves*, *popdc3a* e *popdc3b* durante 72 horas pós-injeção (hpi). Embriões de peixe-zebra com 0 hpf (n = 50) foram deixados sem injeções, como controle ou microinjetado com morfolidos para *knockdown* de *bves* (MO) 5 mg / mL, MO *popdc3a* 5 mg / mL e MO *popdc3b* 5 mg / mL. Todas as larvas foram analisadas e fotografadas a cada 24 horas com estereomicroscópio Leica M205C a 65,5x (software LAS V4.11), para visualização do desenvolvimento.

4.6. Nível de expressão do RNA de *POPDC3* aumenta *progressivamente* durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos

A fim de avaliar o perfil da expressão dos genes da família Popeye durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, foi feita a análise de expressão com base em dois bancos de dados de expressão gênica em modelos de diferenciação

cardíaca, e disponíveis na literatura (GEO - publicações de Barbiarz (2012) e Funakoshi (2016)).

Dados de expressão gênica obtidos em amostras durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos foram avaliados temporalmente quanto a expressão de genes da família Popeye. As amostras coletadas nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 28, 35, 45, 60, 90 e 120 dias de diferenciação (barras azuis da Figura 21 foram comparadas a tecidos pós-natais humanos (coração fetal, coração adulto e ventrículo esquerdo). Dados sugerem que para o gene *POPDC1*, a expressão aumenta ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, seguindo um padrão de crescimento sigmóide. A expressão parece aumentar a partir do dia 10 da diferenciação. Com relação às amostras pós-natais, observa-se que sua expressão diminui com o passar do tempo (sendo mais baixa no coração adulto do que no coração fetal), também foi visto que a sua expressão não foi restrita ao ventrículo esquerdo- VE- (a expressão global é maior do que a expressão no VE) (Figura 21-A).

O padrão de expressão de *POPDC2* segue um curso temporal semelhante ao *POPDC1*, aumentando expressivamente sua expressão a partir do dia 10 e atingindo seu pico de expressão no dia 20 da diferenciação. Nos tecidos cardíacos, sua expressão parece ser menos afetada pelo tempo do que *POPDC1*, (sendo um pouco mais alta no coração fetal em relação ao coração adulto). *POPDC2*, da mesma forma que *POPDC1*, não possui expressão restrita ao ventrículo esquerdo, pois a expressão global é maior que em VE. (Figura 21-B).

O padrão de expressão de *POPDC3* segue um curso temporal semelhante ao *POPDC1* e *POPDC2*, aumentando expressivamente sua expressão a partir do dia 10 e atingindo seu pico de expressão no dia 20 da diferenciação. No coração fetal, sua expressão é menor do que a observada nos cardiomiócitos do 120º dia de diferenciação. A expressão de *POPDC3* parece ser menos afetada pelo tempo do que *POPDC1*, (sendo um pouco mais alta no coração fetal em relação ao coração adulto). *POPDC3*, diferentemente de *POPDC1* e *POPDC2*, possui expressão no ventrículo esquerdo semelhante a expressão global do coração adulto (Figura 21-

C). *POPDC3* é o gene menos expresso durante a diferenciação, em relação a *POPDC2* e *POPDC1* (Figura 21-D)

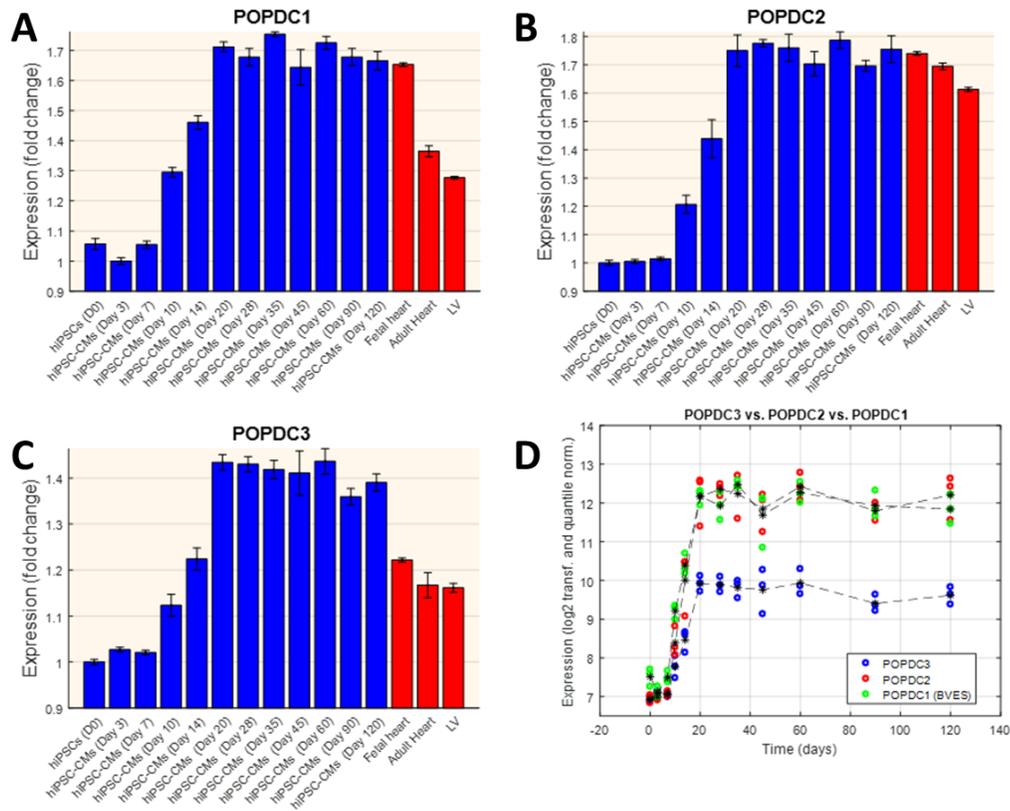


Figura 21: A expressão dos genes da Família Popeye é crescente ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. Dias 0, 3, 7, 10, 14, 28, 35, 45, 60, 90 e 120 da diferenciação são representados pelas barras azuis e a expressão pontual em tecidos cardíacos (fetal, adulto e ventrículo esquerdo) estão representados pelas barras vermelhas.. Dados analisados segundo a base de dados gerada por Barbiarz, 2012 (Expressão média \pm erro padrão da média, n=3/ grupo ou dia avaliado).

Resultados referentes a base de dados de Funakoshi avaliaram a expressão de genes durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos (nos dias 0, 4, 8, 20 e 30) e no coração fetal e adulto. Nesta base de dados, vimos que o padrão de expressão temporal do gene *POPDC1* aumenta progressivamente ao longo da diferenciação, sendo observado aumento expressivo a partir do dia 8 (correspondendo a 16 vezes mais que o nível do dia 0), e atingindo sua expressão máxima no 30º dia (Sendo 22 vezes mais expresso que no dia 0). Nas amostras de

coração, observamos uma queda importante na expressão ao longo do tempo (expressão maior em amostras de coração fetal em relação a corações adultos) (Figura 22-A). A expressão temporal do gene *POPDC2* foi analisado através de duas *probes*. O padrão de expressão ao longo da diferenciação de hiPSC-CMs foi semelhante à observada em *POPDC1*, com aumento expressivo a partir do dia 8 (representando 300 vezes mais expressão que no dia 0), e atingindo sua expressão máxima no dia 30º dia da diferenciação (com aumento gradativo entre nesse intervalo entre os dias 8 e 30, chegando a ser 800 vezes mais expresso que no dia 0). Nas amostras de coração, a *probe 1* identifica que o coração fetal tem menor expressão de *POPDC2* em relação à corações adultos, já a *probe 2*, identifica que a expressão de *POPDC2* é semelhante no coração fetal e adulto (Figura 22- B e C).

A expressão temporal do gene *POPDC3* ao longo da diferenciação de hiPSC-CMs foi semelhante à observada em *POPDC1*, com aumento expressivo a partir do dia 8 (representando 15 vezes mais expressão que no dia 0), e atingindo sua expressão máxima no dia 30º dia da diferenciação, chegando a ser 18 vezes mais expresso que no dia 0). Nas amostras de coração, a média da expressão no coração fetal é maior do que a média de corações adultos, (Figura 22- D).

Da mesma forma que nos dados de Barbiarz, os dados sugerem que *POPDC3* seja o gene da família Popeye menos expresso em relação a *POPDC1* e *POPDC2* (Figura 22- E).

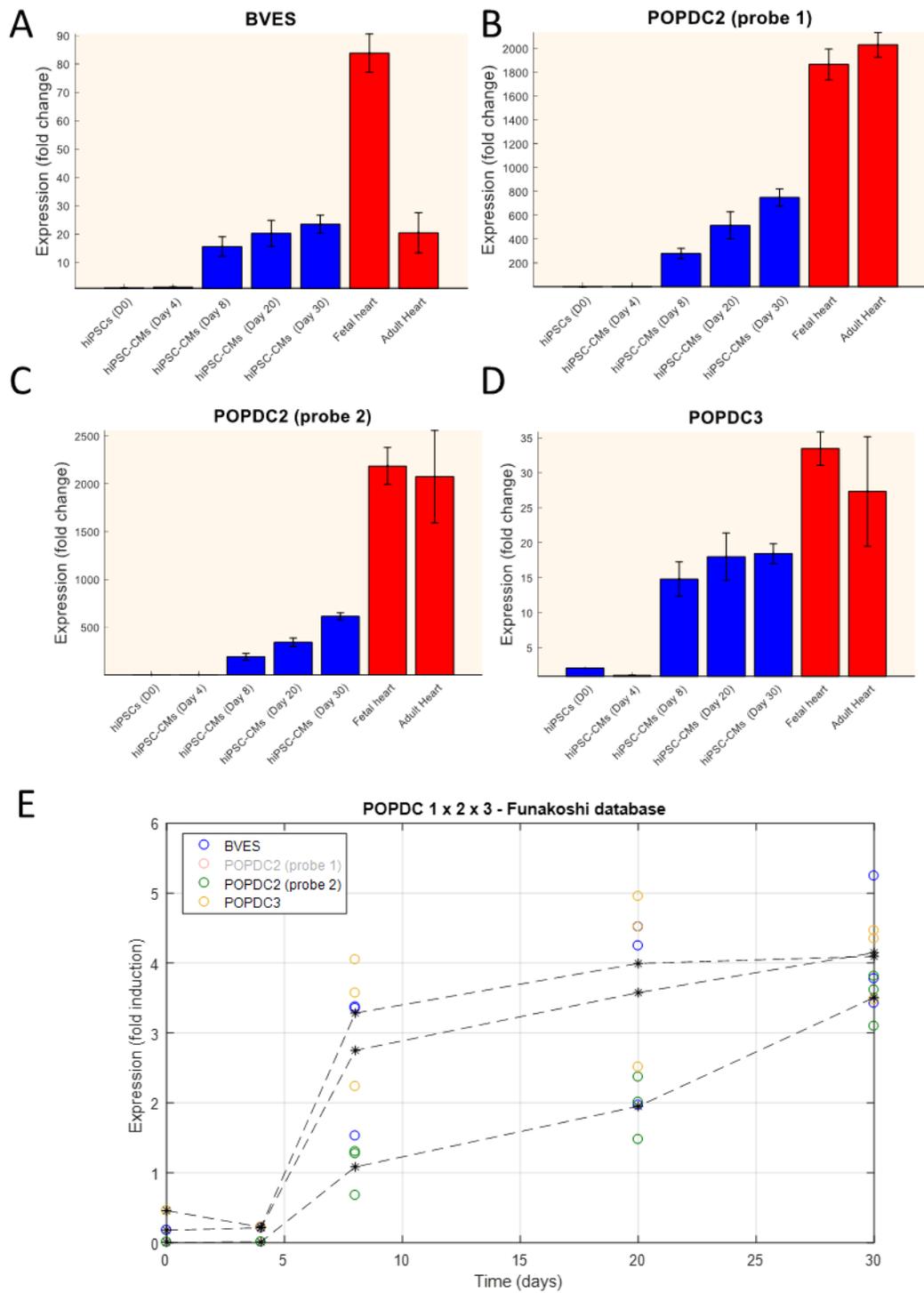


Figura 22: A expressão dos genes da Família Popeye é crescente ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. Dias 0, 4, 8, 20 e 30 da diferenciação são representados pelas barras azuis e a expressão pontual em tecidos cardíacos (fetal e adulto) estão representados pelas barras vermelhas. Dados analisados segundo a base de dados gerada por Funakoshi, 2016, (Expressão média \pm erro padrão da média, n=3/ grupo ou dia avaliado).

Conjuntamente, esses dados referentes a essas bases de dados permitem inferir que o padrão de expressão de *POPDC3* aumenta progressivamente ao longo da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. O aumento da expressão de *POPDC3* se inicia no dia 8-10 da diferenciação e atinge seu máximo no dia 20-30.

Em nosso laboratório, a rotina de diferenciações de hiPSC em cardiomiócitos permitiu a coleta de amostras durante o curso da diferenciação (0, 2, 4, 6, 8, 15 e 30 dias) Afim de validar o padrão de expressão dos genes da família Popeye observado por outros grupos (cujo protocolo varia em relação ao aplicado rotineiramente em nosso laboratório em pouco aspectos), coletamos amostras de células nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 15 e 30 da diferenciação., utilizando o protocolo descrito no Item 3.7.9.2 Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos- in vitro.

O gene *POPDC1*, mostrou ter expressão aumentada a partir do dia 6 (sendo em média, 5 vezes mais expresso que no dia 0), atingindo seu pico de expressão no dia 15 (chegando a ser 26 vezes mais expresso que no dia 0) e diminuindo seus níveis de expressão no dia 30 (regredindo a 7,5 vezes mais expresso que o dia 0)- Figura 23-A. Para o gene *POPDC2* observamos aumento de expressão mais tardio que em *POPDC1* e *POPDC3*, sendo cerca de 7,2 vezes mais expresso no dia 30 em relação ao dia 0- Figura 23-B.

O padrão crescente de expressão de *POPDC3* observado indica que nos estágios mais avançados da diferenciação (dia 30) há maior expressão do *POPDC3* em relação ao dia 0, sendo cerca de 6,8 vezes mais expresso (n=9, p<0,05) nos cardiomiócitos de 30 dias diferenciados do que nas células iPS humanas de origem. O pico de expressão de *POPDC3* durante o período avaliado foi no 15º dia da diferenciação (em que a expressão foi em média 8 vezes maior que as hiPSC no dia 0)- Figura 23-C. Da mesma forma que os estudos supra citados, nossos dados sugerem que o *POPDC3* é o gene da Família Popeye menos expresso durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos - Figura 23-D.

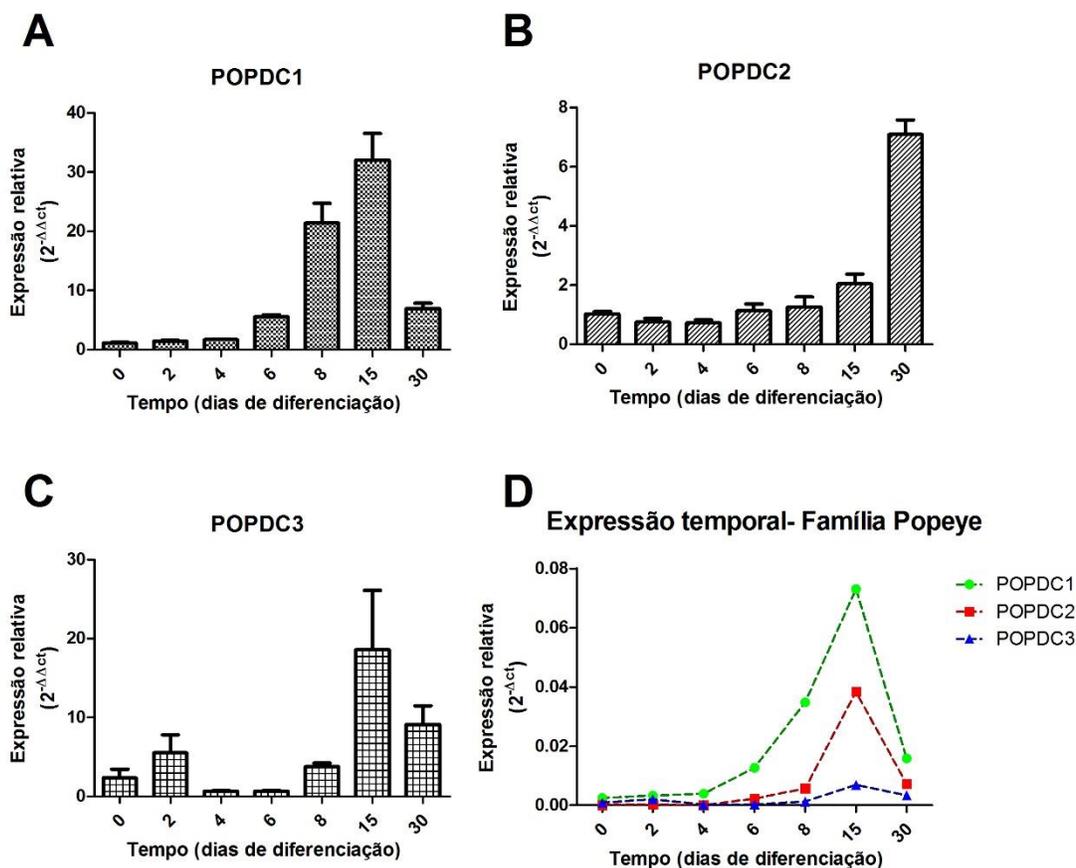


Figura 23: Aparecimento dos genes *Popdc1*, 2 e 3 durante o curso da diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos é crescente ao longo do tempo. Avaliação por qPCR nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 15 e 30 da diferenciação em cardiomiócitos (CMs) de POPDC1 (A), POPDC2 (B) e POPDC3 (C). O fold foi calculado por meio do método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em que o normalizador utilizado foi a média entre ciclofilina e GAPDH. (Expressão média \pm erro padrão da média, n=9). (D) Expressão dos genes POPDC1, POPDC2 e POPDC3 plotada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=9).

Da mesma forma que em outros estudos, o perfil de expressão dos genes da família Popeye se mostrou crescente durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos em nosso laboratório, assim permitindo que nosso modelo de diferenciação possa servir como plataforma de estudo da função desses genes no comprometimento cardiogênico.

A partir desses resultados, a superexpressão e inibição de *POPDC3* foi delineada, de forma a compreender os fenótipos gerados nos cardiomiócitos

derivados de hiPSC. Devido à baixa quantidade de números amostrais, as conclusões referentes a esses experimentos são limitadas e os resultados preliminares estão descritos no APÊNDICE A desta dissertação.

5. Discussão

A família dos genes Popeye

As proteínas Popeye têm sido descritas como proteínas transmembranares que contêm três hélices hidrofóbicas [47]. Devido ao fato de terem sido descritas pela primeira vez no músculo esquelético, foram denominadas *Popeye Family*. Apesar da pouca homologia existente entre os três membros dessa família, o domínio Popeye está presente em todos os membros.

O domínio Popeye presente nessas proteínas, é um sítio de ligação ao AMP cíclico (AMPC), uma molécula ativa no citosol,[47] que é liberada quando a célula está sob ativação adrenérgica.. Outra molécula que interage com a Família Popeye é TREK-1, um canal de potássio, que forma um complexo com proteínas Popeye, dependendo da concentração de AMPC intracelular. Assim, acredita-se que a regulação da frequência cardíaca seja modulada pelas interações das proteínas Popeye na com esses dois ligantes[48].

Demonstrou-se que os genes pertencentes à essa família estão envolvidos na regeneração do músculo estriado esquelético, particularmente o *Popdc1* (*Bves*) parece ser essencial para tal processo [49]. A análise histológica da capacidade regenerativa muscular de animais *POP1* nulos (*POP1* *-/-*) comparada a animais *POP1* heterozigotos demonstra que animais KO (knockout) para *POP1* têm capacidade regenerativa muscular reduzida após injeção de cardiotoxina.

Na cardiologia, foi visto que a ausência de *Popdc1* ou de *Popdc2* leva a alterações estruturais nas células marca-passo presentes no nó sinusal [50] de ratos idosos sob estresse. Assim, associa-se a família dos Pops ao controle do ritmo cardíaco, dado que mutantes nulos apresentam bradicardia em condições de estresse[51].

Os corações de mutantes nulos (*Popdc1**-/-*) são mais vulneráveis à isquemia/reperfusão apresentando uma área de infarto maior do que os animais controle. Em animais *Popdc1* *-/-*, há desligamento da interação de *Popdc1* e *Cav3*

no sarcolema, túbulo T e discos intercalares. A isquemia/reperfusão em mutantes nulos promoveu considerável diminuição do número de cavéolas. Assim, conclui-se que a presença de *Popdc1* possa ser cardioprotetora [52].

O gene *Popdc1* é mais bem estudado e foi identificado durante o processo de ativação de progenitores vasculares durante o infarto do miocárdio (MI). Camundongos tratados com timosina beta 4 mostraram maior angiogênese quando comparados aos controles, e essa expressão correlaciona-se ao aumento de expressão de *Popdc1* pelas células epicárdicas [53].

O gene *Popdc3* e a proteína codificada por ele: POP3

O gene *Popdc3*, pertencente à família dos genes que contém o domínio *Popeye*, nunca foi caracterizado em condições de regeneração, assim como já foi descrito o *Popdc1* na regeneração muscular em murinos [49]. Um estudo *in vitro* demonstrou que tanto em cardiomiócitos (CMs) neonatais em cultura como no coração adulto de ratos há expressão de *Popdc3*. Foi visto também que a expressão do gene *Popdc3* no coração diminui no período pós-natal [54].

A expressão de *POPDC3* já foi vista em coração de humanos, sendo mais expresso em regiões ventriculares (como o ventrículo esquerdo, VE e VD, do que nos átrios) [55]. Além disso, pacientes com insuficiência cardíaca diagnosticada clinicamente apresentam menor nível de expressão de *POPDC1*. Ademais, neste estudo foi demonstrada uma correlação positiva nos níveis de expressão de *POPDC1* e *POPDC3* (quando um está sendo mais expresso o outro aumenta concomitantemente). Sugere-se que a correlação positiva se deva ao fato de ambos terem localização muito próxima no cromossomo 6. As alterações estruturais observadas na insuficiência cardíaca indicam um provável envolvimento estrutural da família de genes *Popeye* no coração.

Apesar de os três membros da família conterem o domínio *Popeye*, não se sabe a real função dessas proteínas. Estudos de homologia revelam que as proteínas pertencentes à família *Popeye* são bastante interessantes, pois não são

homólogas à nenhuma outra proteína conhecida, por isso existe grande interesse em compreender sua função [56].

Popdc3 na regeneração cardíaca pós-natal de ratos

O modelo de ressecção de partes do coração roedores de poucos dias de vida (corte cirúrgico de parte do tecido cardíaco) é um dos raros modelos onde se observa alguma capacidade intrínseca de regeneração anatômica e funcional da musculatura cardíaca lesada, em mamíferos. Em um estudo de RNASeq e utilizando do modelo de regeneração cardíaca em ratos neonatos, fomos capazes de selecionar um gene candidato com aparente participação no processo da cardiogênese devido aos seus perfis de expressão, bem como sua importância durante o desenvolvimento cardíaco (observado através da obliteração de sua expressão em modelo desenvolvimento em peixes). A expressão do gene *Popdc3* também foi demonstrada em um modelo de diferenciação de células-tronco pluripotentes humanas para a geração de cardiomiócitos (hiPSC-CMs).

A expressão de *Popdc3* se mostrou decrescente no período pós-natal de ratos neonatos, sendo quatro vezes menor no animal R7D5 (o qual não tem mais capacidade regenerativa, mas apenas reparativa) em relação ao animal R1D1 (nosso animal foco do estudo). Além disso, os animais R1D1 diferem dos animais falso-operados (SHAM, o que reduz a importância ontogênica deste gene no processo de desenvolvimento pura e simplesmente, dando contornos regenerativos a sua ação), mostrando que após o procedimento de ressecção ocorre elevação no nível de expressão de POPDC3 de maneira aguda e transiente (R1D1-S1D1). Neste sentido, Haubner e colaboradores demonstraram que a expressão de *Popdc3* diminui em camundongos submetidos a ligadura da coronária DA (artéria descendente anterior direita) ao longo da regeneração/reparo (comparando-se do dia 1 com dia 3) [21]. De forma semelhante, Lee e colaboradores verificaram que *Popdc3* está mais expresso em animais falso operados (SHAM) com 1 dia de vida em relação a SHAM com 7 dias de vida, porém, não observou diferença de expressão entre R1 e falso-operados de mesma idade (SHAM) [22], talvez porque avaliaram a expressão diferencial 7 dias após o procedimento de ressecção. Nós

observamos diferença estatística somente quando comparamos os grupos R1 vs SHAM de mesma idade, 1 dia após o procedimento de ressecção do ápice cardíaco.

Fenótipos oriundos da diminuição da expressão de *popdc3* em peixes-zebra

Apesar de o modelo de regeneração pós-natal trazer informações relevantes para o entendimento do processo regenerativo, modelos para estudo de desenvolvimento do coração como o peixe-zebra também se tornam uma alternativa atraente. Nesse modelo pode-se estudar o coração observando seu desenvolvimento através da pele (devido a sua transparência), sem eutanasiar o animal, permitindo seu acompanhamento ao longo do tempo. Assim sendo, foi possível acompanhar as alterações morfofuncionais no coração e em outros órgãos do animal, decorrentes do *knockdown* (KD) de *popdc3* e *bves* (*popdc1*, outro gene bastante conhecido por sua importância no sistema cardiovascular e também membro da família POP) promovidos pela injeção de morfolidos. Os morfolidos promovem redução da expressão do gene alvo por se ligarem ao mRNA produzindo alterações no *splicing* ou bloqueando a tradução das proteínas. Outras ferramentas para diminuir a expressão em peixes também estão disponíveis, a exemplo de CRISPR, TALEN e Cre-Lox [57], [11], no entanto tais alternativas promovem a depleção da expressão de forma permanente, uma vez que modificam o DNA. Os morfolidos são ferramentas de *knockdown* temporário, assim, seu efeito não perdura por toda a vida do animal, uma vez que sua concentração diminui à medida que ocorre a multiplicação celular, sendo uma ferramenta interessante quando o *knockout* é incompatível com a vida [58].

A taxa de mortalidade dos peixes que foram injetados com morfolidos para KD de *bves* foi 9 vezes maior do que nos grupos controles, indicando que menores quantidades de embriões que chegaram ao estágio de larva (3dpf- 3 dias pós fertilização). A taxa de mortalidade dos grupos KD *popdc3* foi aproximadamente 3 a 7 vezes maior que nos grupos controles. Como o grupo controle FITC apresentou mais mortes que WT, então existe uma chance de morte do peixe, oriunda da injeção. Mesmo assim, as taxas de morte observadas nos animais com KD são muito superiores às dos grupos controles FITC, podendo sugerir então que o KD de

bves e *popdc3* pode ser letal, sendo o primeiro mais importante que o segundo. Dados da literatura sugerem que peixes com KD para *bves* têm elevada taxa de mortalidade em condição hiperosmótica [59], fato que se explica pela diminuição das junções intercelulares (junção oclusiva), diminuindo a barreira de entrada de solutos, levando a condição do edema pericárdico e deformações corporais.

Observamos que os animais que receberam a injeção de morfolinóis para KD de *bves* e/ou *popdc3* apresentaram edema pericárdico quando comparados aos animais controle. A taxa de larvas com edema pericárdico foi aproximadamente 10 vezes maior no grupo KD *bves* quando comparado aos controles e a taxa de larvas com edema pericárdico foi aproximadamente 2 a 5 vezes maior nos grupos KD *popdc3* quando comparado aos controles. Em outro estudo com knockdown de *bves*, o edema foi observado em cerca de 70% das larvas de peixe-zebra [60], sendo semelhante a taxa encontrada nesse estudo (95%). A presença de edema pericárdico é explicada pela ausência de *bves* nas junções intercelulares (*zona ocludens*), favorecendo a formação do edema pericárdico, e outras estruturas anômalas decorrentes da diminuição da migração celular durante a gastrulação [59]. Nos peixes com KD de *popdc3*, a presença de edema pericárdico ainda não havia sido descrita.

Os dados de frequência cardíaca sugerem que ao longo do tempo, os animais com KD para *popdc3* apresentam frequência cardíaca diferente dos animais controle, sendo mais proeminente a diferença observada em 24hpf. Dados semelhantes nunca foram reportados na literatura para KD de *popdc3*, entretanto há evidência de que no modelo de *peixe-zebra* com KD para *bves* ocorre uma diminuição da duração do potencial de ação (sugerindo aumento da frequência de contração) [37]. Nossos dados sugerem que o grupo KD *bves* apresenta-se taquicárdico em relação ao controle em 24 e 7hpf. Outro estudo indica que *peixe-zebras* com depleção de *popdc2* apresentam severa arritmia, com diminuição da frequência observada [61]. Nossos dados sugerem que arritmia também foi observada em animais em depleção de *bves* e *popdc3*, sendo mais proeminente nos animais do grupo KD *bves* (*popdc3-b*), com 48 e 72hpf.

As medidas das câmaras cardíacas dos animais KD para *bves* e *popdc3* são superiores aos animais controle, indicando que estes animais apresentam um coração hipervolumétrico. Na literatura, existe evidência de que a diminuição da expressão de *bves* possa causar um defeito no arranjo das miofibrilas e formação dos sarcômeros no músculo esquelético [62]. Apesar de não termos elucidado os mecanismos referentes a essas alterações, acreditamos que tais alterações cardíacas observadas em KD de *popdc3* sejam referentes ao mesmo mecanismo observado em peixes com diminuição da expressão de *bves*. Assim sendo, os peixes com diminuição de genes da família *Popeye*, aqui representados por *bves* e *popdc3*, apresentariam coração com fibras mais afrouxadas (miocárdio não compactado).

Diferenças na função cardíaca também foram observadas entre os animais submetidos ao KD dos genes *Pop* e animais selvagens. Observamos que os animais com KD para *popdc3* (*popdc3-a*) apresentam maior fração de encurtamento em relação aos controles, dado nunca antes observado. A fração de encurtamento aumentada sugere que a contratilidade esteja aumentada, pois leva em consideração as medidas finais do ventrículo na sístole e diástole. Diferentemente do gene importante para o desenvolvimento cardíaco (*tbx5*), em que a fração de encurtamento diminui quando há sua depleção [63], nossos experimentos sugerem que a fração de encurtamento esteja aumentada quando há depleção temporária de *popdc3*.

Outro parâmetro de função cardíaca, como o volume sistólico, também está aumentado quando depletamos *bves*, muito provavelmente porquê o cálculo de volume sistólico representa as medidas na sístole e diástole, que estão aumentadas nos animais com depleção dos genes da família *Popeye*. Outro grupo já reportou que o volume sistólico diminui quando há depleção de *bves* em peixe-zebra [60]. Além disso, nossos dados indicam que os animais com KD para *bves* e *popdc3* (*popdc3-b*) apresentam fração de ejeção aumentada relação às larvas controle. Finalmente, larvas com KD para *bves* apresentam débito cardíaco aumentado em relação ao controle. Como os cálculos de fração de ejeção e débito cardíaco

derivam do volume sistólico, então o que observamos pode ser decorrente apenas do volume sistólico aumentado. Acreditamos que o débito cardíaco em KD *bves* também possa estar aumentado nesse grupo em decorrência da taquicardia observada, somada ao volume sistólico elevado.

Os defeitos morfológicos também foram constatados em animais injetados com morfolidos e controles, sendo o mais frequente deles a má formação do saco vitelino. As larvas com maior volume de saco vitelino correspondem as injetadas com MO KD *bves*. Má formações na coluna e na cauda também foram observadas, sendo mais frequentes no grupos KD para *popdc3*. As alterações observadas no saco vitelino dos animais KD *bves* já foram antes reportadas, e são decorrentes de alterações na gastrulação [59]. Já as alterações observadas na formação de coluna e cauda do grupo KD *popdc3*, muito provavelmente se relacionam com a falha no desenvolvimento de miótomos (tecido muscular embrionário), cuja má formação já foi descrita previamente, mas somente no caso de KD para *popdc2* em peixes. Má formação em músculo esquelético também foi verificada no caso de variantes humanas de POPDC1 (BVES) com perda de sítio ativo da proteína na região de ligação ao AMPc [60].

A presença de alterações no desenvolvimento muscular esquelético e cardíaco podem sugerir que o gene *popdc3* possa estar envolvido no processo de cardiogênese. Durante esse processo, as células presentes na mesododerme (*Brachury* e *Mesp 1+*) sofrem ação de vias *BPM* e *Wnt* que podem gerar precursores cardiogênicos, hematopoéticos e esqueléticos [64]. Alguns genes são conhecidos por determinar a cardiogênese, a partir desse momento, sendo a maior parte deles, fatores de transcrição, como o *Nkx2.5*[65], *Tbx5* [66] e *Gata-4* [67], por exemplo.

POPDC3 durante a diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos

Algumas moléculas expressas na membrana celular de precursores cardíacos derivados de hiPSC, como o *Hcn4* [26], *c-kit* [27] e *Sca-1* [28], demonstraram se úteis na seleção de populações purificadas (entre os dias 6 e 10 da diferenciação), mostrando que esse período é crucial para a obtenção de cardiomiócitos capazes

de serem enxertados no adulto promovendo melhora funcional após infarto do miocárdio. Assim, objetivamos identificar o perfil de expressão temporal de *POPDC3* e dos outros genes da família Popeye (*BVES* e *POPDC2*), a fim de verificar a possibilidade de serem úteis para caracterização de precursores cardíacos, por serem moléculas de expressão na membrana plasmática. O potencial de geração de cardiomiócitos a partir de culturas purificadas de células *Popdc3⁺* ainda não foi testado, mas no modelo de diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos, o padrão de expressão de *POPDC3* foi crescente e linear, sendo que do dia 0 ao dia 28 a expressão do *POPDC3* aumentou 7 vezes. O momento em que a família dos genes Popeye apresentou pico de expressão genica foi a partir do 8º dia da diferenciação. Nossos dados corroboram com análises da literatura no que diz respeito ao curso da expressão dos genes Popeye ao longo do tempo [43], [44].

O padrão de expressão de Popeye durante a diferenciação sugere que ele está temporalmente associado com o pico de expressão de *Nkx2.5*. Apesar de o modelo de diferenciação de hiPSC em CMs gerar informações a respeito do fenótipo de células com relação a maturidade células (expressa pela frequência de batimento [68], pela substituição de proteínas da maquinaria contrátil por outras mais eficientes [69] e presença de marcadores [70]), é um modelo que dispende muito gasto e cujos fenótipos podem tardar a aparecer, uma vez que os cardiomiócitos fetais humanos são comparáveis a células com 30 dias de diferenciação [70].

Dessa forma, neste trabalho, o modelo de *peixe-zebra* trouxe informações referentes a alterações na frequência cardíaca, mais especificamente na arritmia, que devem ser exploradas no modelo de hiPSC-CMs. Particularmente, esse trabalho faz referência a alterações que sugerem que peixes possuem alterações no tamanho das câmaras cardíacas, sendo mais alongados que os animais controle. Alterações em genes que controlam tamanho de órgãos (como a via de sinalização *Hippo*) suportam a ideia de que alterações no tamanho das câmaras podem ser decorrentes de efetores *downstream* da via (no caso da via *Hippo*, o *wwtr1*), que podem regular a maturação de câmara cardíaca, como a trabeculação ventricular, implicando em fenótipo hipoplásico e de bradicardia, porém sem alteração funcional

cardíaca evidente [71]. Devido a formação embrionária das trabéculas e do miocárdio compacto estarem temporalmente e fisicamente envolvidas com a formação dos sistemas de condução ventricular (fibras de *Purkinje*), normalmente a má-formação de trabéculas (a partir de 60 hpf em peixe-zebra), gerando trabéculas maiores e com maiores recessos entre trabéculas, leva a alterações no sistema de condução, promovendo arritmias. Os dados, em conjunto, podem sugerir uma alteração no sistema de maturação das câmaras cardíacas, trabeculação ou da compactação ventricular esteja ocorrendo

Com base no apresentado em peixe-zebras, o modelo de hiPSC-CMs pode ser explorado de forma a verificar fenótipos decorrentes da depleção de *POPDC3*, cujos resultados preliminares constam no Apêndice A.

6. Conclusões

Conclusões sumarizadas

- O gene POPDC3 apresenta-se como marcador de membrana no modelo de regeneração pós-natal em ratos;
- A proteína POPDC3 parece estar mais expressa em cardiomiócitos neonatais do que em fibroblastos cardíacos;
- Peixes paulistinha com knockdown (KD) para popdc3 apresentam elevada mortalidade;
- Peixes paulistinha com KD para popdc3 apresentam edema pericárdico;
- Peixes paulistinha com KD para popdc3 apresentam ventrículos mais longos que larvas controle;
- Peixes com KD para popdc3 apresentam alterações de frequência cardíaca em 24hpi, em relação aos controles;
- Peixes com KD para popdc3 apresentam maior fração de encurtamento e fração de ejeção do que controles;
- Cardiomiócitos derivados de células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSC-CMs) apresentam genes da família Popeye. O padrão de expressão temporal é sigmóide, apresentando aumento de expressão a partir do dia 8-10, e atingindo seu máximo no dia 20-30, mantendo-se a expressão a partir desse momento estável (platô);

Conclusão geral

Em conjunto nossos dados sugerem que *POPDC3* é um gene importante no processo de diferenciação cardíaca e devido a sua localização na membrana celular poderá ser útil em estratégias para enriquecimento e isolamento de células em diferenciação cardíaca.

7. Perspectivas

Uma vez tendo realizado KD de *popdc3* e *bves* e observado alterações de mortalidade elevada, seria interessante cultivar os peixes em condições hiposmóticas ou isosmóticas para reduzir as más-formações observadas durante a gastrulação e poder avaliar o peixe na vida adulta.

Em trabalhos futuros, seria interessante averiguar se o mecanismo observado (perda da adesão intercelular- zona oclusiva) também ocorre para peixes com KD para *popdc3*.

Com relação a frequência cardíaca, seria interessante averiguar como se comporta ao longo da vida larval e adulta. Nesse trabalho reportamos alterações na frequência de batimento em larvas de até 72hpi, porém na literatura há sugestão de que animais com KD para *popdc2* apresentem uma redução da frequência cardíaca com 5-6 dias pós-injeção [61].

Como as medidas das câmaras cardíacas das larvas KD são superiores às das larvas controle, então seria interessante investigar se está ocorrendo a ativação de vias de aumento de órgãos (como Hippo Pathway, nesse caso o aumento das dimensões dos órgãos seria sistêmico, ou seja, menos provável, pois observamos larvas do mesmo tamanho dos controles, apenas o coração ficou aumentado); ou testar a hipótese verificada no caso de KD de *Popdc2* no músculo esquelético, verificando a formação das junções miotendíneas. Nessa etapa, seria interessante verificar se estaria ocorrendo uma má formação no átrio e ventrículo, com essa finalidade, as linhagens que possuímos no laboratório Tb (*cmcl2: GFP*) e Tb (*vmhc: mCherry*), podem responder à questão, uma vez que os corações desses animais são fluorescentes em verde, e o átrio é fluorescente em vermelho.

Os peixes apresentaram alterações importantes de arritmia, principalmente no grupo com depleção de *popdc3* (*popdc3-b*). Seria interessante investigar a

etiologia da tal arritmia, sendo ela atrial (no nó sinoatrial, afetando as células *pacemaker*, geradoras do potencial de ação) ou por alterações no nó atrioventricular (onde normalmente o potencial de ação é atrasado para promover a contração de átrio e ventrículo em momento distintos) ou ainda no sistema de condução ventricular (constituído majoritariamente pelas células de Purkinje). Tais observações poderão ser feitas à medida que peixes fluorescentes mutantes (átrio vermelho e coração eGFP positivo) forem injetados com morfolidos para aquisição de fenótipos.

Referências

1. Writing Group, M., et al., *Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2016. **133**(4): p. 447-54.
2. Chen, A.A. and M.S. Sabatine, *The management of unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction*. *Minerva Cardioangiol*, 2003. **51**(5): p. 433-45.
3. Mancini, D. and P.C. Colombo, *Left Ventricular Assist Devices: A Rapidly Evolving Alternative to Transplant*. *J Am Coll Cardiol*, 2015. **65**(23): p. 2542-55.
4. Butler, D., *UN targets top killers*. *Nature*, 2011. **477**(7364): p. 260-1.
5. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair*. *Exp Mol Pathol*, 2016. **101**(2): p. 231-240.
6. Alonso-Coello, P., et al., *Antithrombotic therapy in peripheral artery disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest*, 2012. **141**(2 Suppl): p. e669S-e690S.
7. Shishehbor, M.H. and M.R. Jaff, *Percutaneous Therapies for Peripheral Artery Disease*. *Circulation*, 2016. **134**(24): p. 2008-2027.
8. Lin, Z. and W.T. Pu, *Strategies for cardiac regeneration and repair*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(239): p. 239rv1.
9. Davidson, B. and M. Levine, *Evolutionary origins of the vertebrate heart: Specification of the cardiac lineage in *Ciona intestinalis**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11469-73.
10. Vivien, C.J., J.E. Hudson, and E.R. Porrello, *Evolution, comparative biology and ontogeny of vertebrate heart regeneration*. *NPJ Regen Med*, 2016. **1**: p. 16012.
11. Jopling, C., et al., *Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 606-9.
12. Gonzalez-Rosa, J.M., C.E. Burns, and C.G. Burns, *Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries*. *Regeneration (Oxf)*, 2017. **4**(3): p. 105-123.
13. Godwin, J.W., et al., *Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape*. *NPJ Regen Med*, 2017. **2**.

14. Ieda, M., et al., *Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression*. J Clin Invest, 2004. **113**(6): p. 876-84.
15. Mahmoud, A.I., et al., *Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration*. Dev Cell, 2015. **34**(4): p. 387-99.
16. de Carvalho, A., et al., *Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative Energy Metabolism*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15434.
17. Gentek, R. and G. Hoeffel, *The Innate Immune Response in Myocardial Infarction, Repair, and Regeneration*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1003**: p. 251-272.
18. Aurora, A.B., et al., *Macrophages are required for neonatal heart regeneration*. J Clin Invest, 2014. **124**(3): p. 1382-92.
19. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
20. Zogbi, C., et al., *Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion*. Physiol Rep, 2014. **2**(8).
21. Haubner, B.J., et al., *Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(12): p. 966-77.
22. O'Meara, C.C., et al., *Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration*. Circ Res, 2015. **116**(5): p. 804-15.
23. Zheng, S., et al., *Retake the center stage--new development of rat genetics*. J Genet Genomics, 2012. **39**(6): p. 261-8.
24. Zhao, S., et al., *Human, mouse, and rat genome large-scale rearrangements: stability versus speciation*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1851-60.
25. Eskerud, I., et al., *Global Coronary Artery Plaque Area is Associated with Myocardial Hypoperfusion in Women with Non-ST Elevation Myocardial Infarction*. J Womens Health (Larchmt), 2015. **24**(5): p. 367-73.
26. Spater, D., et al., *A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(9): p. 1098-106.
27. Al-Maqtari, T., et al., *Transcription factor-induced activation of cardiac gene expression in human c-kit+ cardiac progenitor cells*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0174242.

28. Valente, M., et al., *Sca-1+ cardiac progenitor cells and heart-making: a critical synopsis*. *Stem Cells Dev*, 2014. **23**(19): p. 2263-73.
29. Pansera, C., et al., *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal*.
30. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nature methods*, 2012. **9**(4): p. 357-359.
31. Mudunuri, U., et al., *bioDBnet: the biological database network*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(4): p. 555-556.
32. Li, H., et al., *The sequence alignment/map format and SAMtools*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(16): p. 2078-2079.
33. Anders, S. and W. Huber, *Differential expression analysis for sequence count data*. *Genome biology*, 2010. **11**(10): p. 1.
34. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
35. Durinck, S., et al., *Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(8): p. 1184-91.
36. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(3): p. 253-310.
37. Wang, X., et al., *Discovery and validation of sub-threshold genome-wide association study loci using epigenomic signatures*. *Elife*, 2016. **5**.
38. Moulton, J.D., *Using Morpholinos to Control Gene Expression*. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2017. **68**: p. 4 30 1-4 30 29.
39. Kumari, P., et al., *Mechanistic insight to ROS and Apoptosis regulated cytotoxicity inferred by Green synthesized CuO nanoparticles from *Calotropis gigantea* to Embryonic Zebrafish*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 16284.
40. Folkesson, M., et al., *Differences in cardiovascular toxicities associated with cigarette smoking and snuff use revealed using novel zebrafish models*. *Biol Open*, 2016. **5**(7): p. 970-8.
41. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology*. *Circulation*, 1996. **93**(5): p. 1043-65.

42. Jensen, L., et al., *Integrated molecular, biochemical, and physiological assessment unravels key extraction method mediated influences on rat neonatal cardiomyocytes*. J Cell Physiol, 2018. **233**(7): p. 5420-5430.
43. Babiarz, J.E., et al., *Determination of the human cardiomyocyte mRNA and miRNA differentiation network by fine-scale profiling*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(11): p. 1956-65.
44. Funakoshi, S., et al., *Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19111.
45. Roman, B.L., et al., *Disruption of acvrl1 increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels*. Development, 2002. **129**(12): p. 3009-19.
46. Sehnert, A.J. and D.Y. Stainier, *A window to the heart: can zebrafish mutants help us understand heart disease in humans?* Trends Genet, 2002. **18**(10): p. 491-4.
47. Andrée, B., et al., *Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart*. Developmental biology, 2000. **223**(2): p. 371-382.
48. Boukens, B.J. and V.M. Christoffels, *Popeye proteins: muscle for the aging sinus node*. The Journal of clinical investigation, 2012. **122**(3): p. 810.
49. Andree, B., et al., *Mouse Pop1 is required for muscle regeneration in adult skeletal muscle*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1504-12.
50. Simrick, S., et al., *Popeye domain-containing proteins and stress-mediated modulation of cardiac pacemaking*. Trends Cardiovasc Med, 2013. **23**(7): p. 257-63.
51. Schindler, R.F., et al., *The Popeye domain containing genes: essential elements in heart rate control*. Cardiovasc Diagn Ther, 2012. **2**(4): p. 308-19.
52. Alcalay, Y., et al., *Popeye domain containing 1 (Popdc1/Bves) is a caveolae-associated protein involved in ischemia tolerance*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e71100.
53. Bock-Marquette, I., et al., *Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(5): p. 728-38.
54. Parnes, D., et al., *The Popdc gene family in the rat: molecular cloning, characterization and expression analysis in the heart and cultured cardiomyocytes*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1769**(9-10): p. 586-92.

55. Gingold-Belfer, R., et al., *Popeye domain-containing 1 is down-regulated in failing human hearts*. International journal of molecular medicine, 2011. **27**(1): p. 25.
56. Brand, T., et al., *The cAMP-binding Popdc proteins have a redundant function in the heart*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(2): p. 295-301.
57. Hein, S.J., et al., *Advanced echocardiography in adult zebrafish reveals delayed recovery of heart function after myocardial cryoinjury*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122665.
58. Stainier, D.Y.R., et al., *Guidelines for morpholino use in zebrafish*. PLoS Genet, 2017. **13**(10): p. e1007000.
59. Wu, Y.C., et al., *Blood vessel epicardial substance (Bves) regulates epidermal tight junction integrity through atypical protein kinase C*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 39887-97.
60. Schindler, R.F., et al., *POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking*. J Clin Invest, 2016. **126**(1): p. 239-53.
61. Kirchmaier, B.C., et al., *The Popeye domain containing 2 (popdc2) gene in zebrafish is required for heart and skeletal muscle development*. Dev Biol, 2012. **363**(2): p. 438-50.
62. Xu, Q.H., et al., *Silver nanoparticles impair zebrafish skeletal and cardiac myofibrillogenesis and sarcomere formation*. Aquat Toxicol, 2018. **200**: p. 102-113.
63. Fink, M., et al., *A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in Drosophila, zebrafish, and embryonic mouse hearts*. Biotechniques, 2009. **46**(2): p. 101-13.
64. Chan, S.S., et al., *Mesp1 patterns mesoderm into cardiac, hematopoietic, or skeletal myogenic progenitors in a context-dependent manner*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(5): p. 587-601.
65. Valimaki, M.J., et al., *Discovery of Small Molecules Targeting the Synergy of Cardiac Transcription Factors GATA4 and NKX2-5*. J Med Chem, 2017. **60**(18): p. 7781-7798.
66. Bruneau, B.G., et al., *A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease*. Cell, 2001. **106**(6): p. 709-21.
67. Ang, Y.S., et al., *Disease Model of GATA4 Mutation Reveals Transcription Factor Cooperativity in Human Cardiogenesis*. Cell, 2016. **167**(7): p. 1734-1749 e22.

68. Izumi-Nakaseko, H., et al., *Characterization of human iPS cell-derived cardiomyocyte sheets as a model to detect drug-induced conduction disturbance*. J Toxicol Sci, 2017. **42**(2): p. 183-192.
69. Saggin, L., et al., *Troponin I switching in the developing heart*. J Biol Chem, 1989. **264**(27): p. 16299-302.
70. Herron, T.J., et al., *Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2016. **9**(4): p. e003638.
71. Lai, J.K.H., et al., *The Hippo pathway effector Wwtr1 regulates cardiac wall maturation in zebrafish*. Development, 2018. **145**(10).

APÊNDICE I

Expressão por RT-PCR dos 11 genes candidatos no modelo de regeneração pós-natal

Após a determinação do ciclo mais adequado para a amplificação daquele gene, foi feita uma análise da expressão dos genes em outras amostras, sendo elas: 3 amostras de coração de animais ressectados R1D5 (A1; A2 ; A3); 3 amostras de coração de animais ressectados R7D5 (B1;B2;B3) , coração adulto(C); pulmão adulto(D); cérebro adulto(E); baço adulto(F); fígado adulto(G); tecido adiposo adulto(H); iPS- induced pluripotent stem cell (I); rASC rat adipose-derived stromal/stem cells(J).

Dessa estratégia com 11 genes, apenas 6 foram mantidos considerados de interesse (Figura1 - Painel A), uma vez que foram obedecidos os critérios da tabela a seguir.

Tabela 1: Critérios de seleção incidentes sobre os 11 genes selecionados a partir do RNASeq e GeneCards

<i>Critério</i>	<i>Descrição</i>
1	Expressão inferior em tecidos controle adultos ¹ em relação aos animais R1D5
2	Ausência de bandas duplas em RT-PCR
3	Confirmação do dado de RT-PCR por qPCR (R1D5>R7D5)

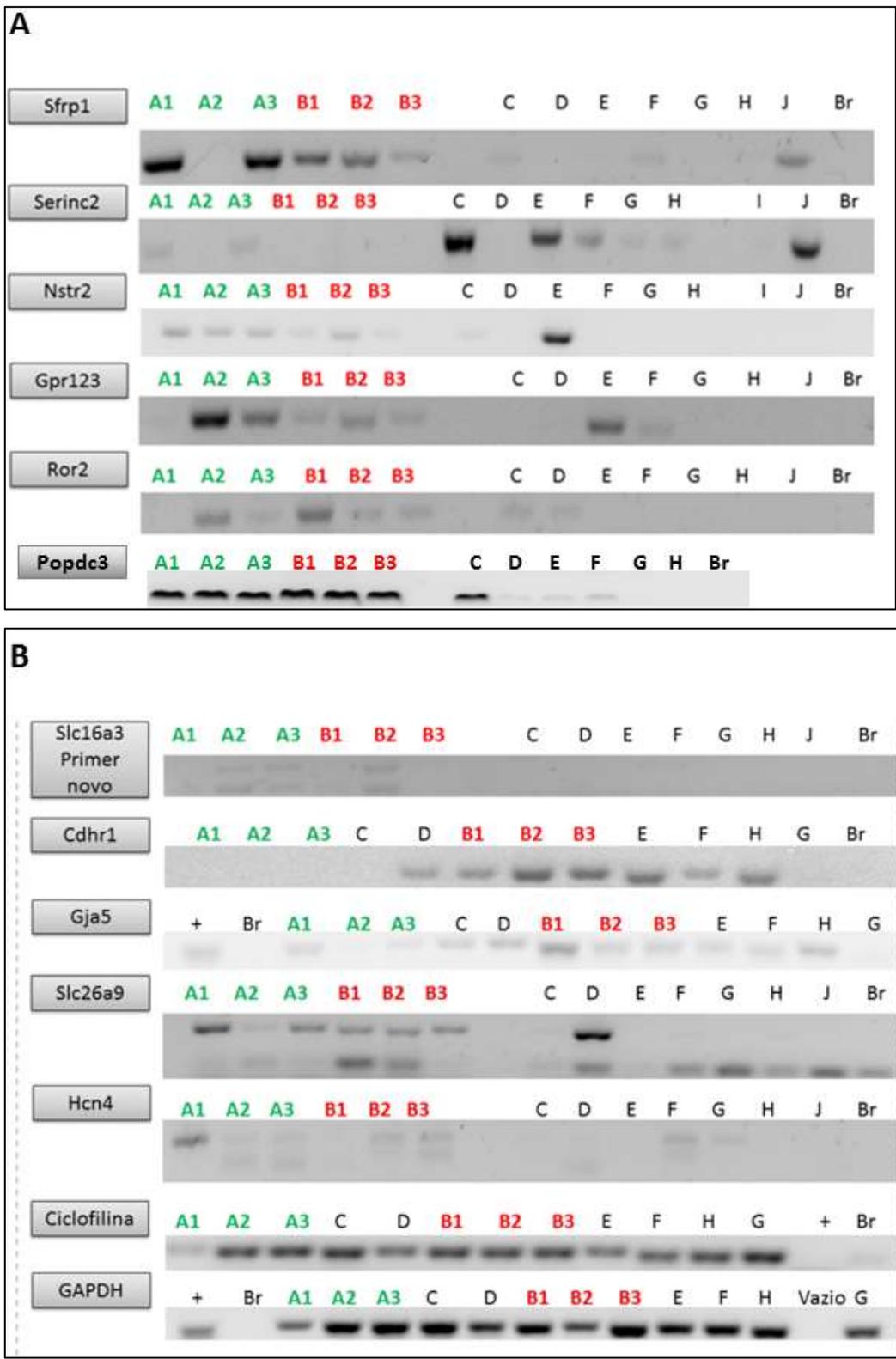


Figura 1: Análise da expressão dos genes em diversos tecidos. A) Painel dos genes considerados bons candidatos. Note que a expressão de tais genes está baixa nos tecidos controle (C ,D ,E ,F ,G ,H, I e J). B) Painel de genes considerados fracos candidatos. Note que a expressão de tais genes está elevada nos controles ou que existem produtos inespecíficos.

Os candidatos que apresentaram as características descritas na Tabela I, foram o SFRP1, SERINC2, NTSR2, GPR123, ROR2 e POPDC3 e constam no Figura 1- A. Já os candidatos menos interessantes, SLC16A3, CDHR1, GJA5, SLC26A9 e HCN4, não obedeceram algum dos itens constantes na Tabela I, e por isso não tiveram sua expressão confirmada por qPCR.

APÊNDICE II

Detecção de POPDC3 por anticorpos

Padronização Western Blotting para POPDC3

Por meio da técnica do Western Blotting procurou-se confirmar os resultados de RNAm na expressão proteica. Utilizou-se inicialmente o anticorpo da empresa Santa Cruz (cat. Num. Sc-16898). Entretanto, conforme os resultados que seguem abaixo (Figura 1) pode-se concluir que o anticorpo não estava identificando corretamente a proteína Pop3. Assim procurou-se por alternativas.

Por *Western Blotting* (Figura 1 A-B), conseguiu-se identificar duas bandas nos géis. Elas possuíam aproximadamente 50kDa, enquanto o fornecedor, no *datasheet*, sugeria o aparecimento de bandas de 34kDa. Por vezes as proteínas sofrem processos de alteração pós-transcricional tais como glicosilação [1], que mesmo desnaturadas, mudam o seu perfil de corrida em gel de acrilamida, gerando pesos supostamente maiores. Assim, são apresentados os dados relativos à banda superior, que acreditamos ter maior possibilidade de ser a relacionada com POP3. Como pode ser constatado no gráfico, não foi possível detectar diferença estatística entre os animais.

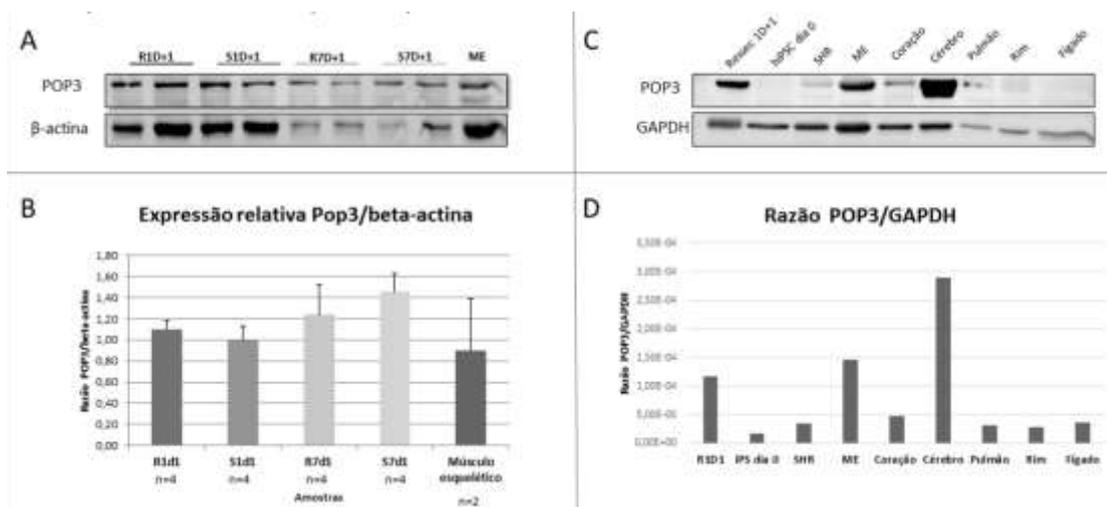


Figura 1: Resultados da quantificação proteica de POP3 utilizando o anticorpo da empresa Santa Cruz. (A) Western Blotting de amostras cardíacas de ratos neonatos um dia após o procedimento (R1D1, S1D1, R7D1 e S7D1) (n=4 animais independentes) e músculo esquelético (n=2). (B) Quantificação da quimioluminescência obtida da figura (A), considerando a razão entre POP3 e beta-actina (gene normalizador). (C) Western Blotting de diversas amostras. Da esquerda para a direita: R1D1= coração de ratos neonatos (R1D1), hiPSCs dia 0= células-tronco pluripotentes induzidas humanas antes da diferenciação; SHR= coração de ratos adultos hipertensos; ME= músculo esquelético de rato adulto. Os tecidos denominados de coração, cérebro, rim e fígado são amostras dos órgãos provenientes de ratos adultos

De maneira a certificar-se de que essa seria a banca correta, foi feita uma análise por espectrometria de massas a fim de investigar quais proteínas estavam presentes no gel na altura correspondente à banda considerada.

Espectrometria de massas

Com o objetivo de determinar a especificidade do anticorpo anti-POP3 da empresa Santa Cruz, foi realizado uma corrida eletroforética das amostras de ratos neonatos e de músculo esquelético adulto de ratos. Foram recortadas as bandas nas quais havia sinal detectado pelo método de revelação quimioluminescente (listadas na Figura 2 de 1 a 5). Tais amostras foram enviadas para o sistema de verificação de proteínas por espectrometria (CEFAP) e o resultado consta na tabela 6.

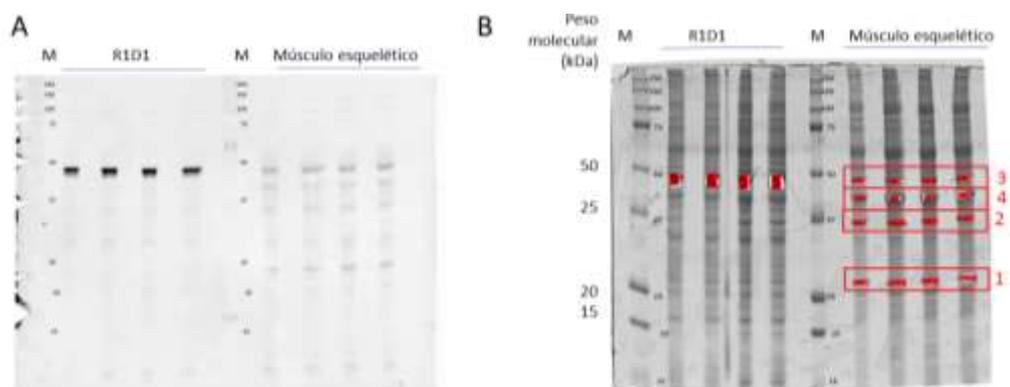


Figura 2: (A) Membrana de PVDF incubada com anticorpo anti-POP3 (Santa Cruz). (B) Gel corado com Coomassie Blue com os cortes enviados para espectrometria de massas (CEFAP).

As cinco bandas enviadas para análise do espectrômetro de massas geraram cerca de 1000 proteínas identificadas (aproximadamente 200 proteínas/banda). Mesmo após filtragem de alta restringência por *score* (>1000) e por cobertura (>70%), que reduz a lista de proteínas à apenas 1-2 por banda, não é possível encontrar o PODC3. Estão presentes proteínas abundantes que não possuem semelhança estrutural com POPDC3. (Tabela 1). Assim sendo, pode-se concluir que não temos evidência com essa metodologia de que o anticorpo anti-POP3 (Santa Cruz) não possua especificidade para seu uso pela técnica do Western Blotting.

Tabela 1: Análise dos resultados gerados das bandas enviadas para análise por espectrometria de massas.

APÊNDICE II

Banda	1	2	3	4	5
Altura analisada	25kDa	37kDa	50kDa	43,5kDa	50kDa
Proteínas identificadas	215	225	245	110	284
Parâmetros: - cobertura >70% e - score >1000	2	1	1	2	1
	Carbonic anhydrase 3 OS=Rattus norvegicus GN=Ca3 PE=1 SV=3 - [CAH3_RAT] Phosphoglycerate mutase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam2 PE=2 SV=2 - [PGAM2_RAT]	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Aldoa PE=1 SV=2 - [ALDOA_RAT]	Beta-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno3 PE=1 SV=3 - [ENOB_RAT]	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 PE=1 SV=1 - [ACT5_RAT] Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1 PE=2 SV=1 - [ACTC_RAT]	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4 - [ENOA_RAT]

Os resultados da espectrometria indicam que dentre todas as proteínas identificadas nas bandas enviadas para análise o POPDC1, POPDC2 e POPDC3 não apareceram. Assim, pode se concluir que o anticorpo se mostra inespecífico para POPDC3 para a técnica do Western Blotting com amostras de ratos neonatos.

Assim, substituímos a marca do anticorpo para anticorpo anti-POP3 (LifeSpan), que chegou recentemente ao nosso laboratório, entretanto continuamos com dificuldade de identificação do Pop3, conforme Figura 3.

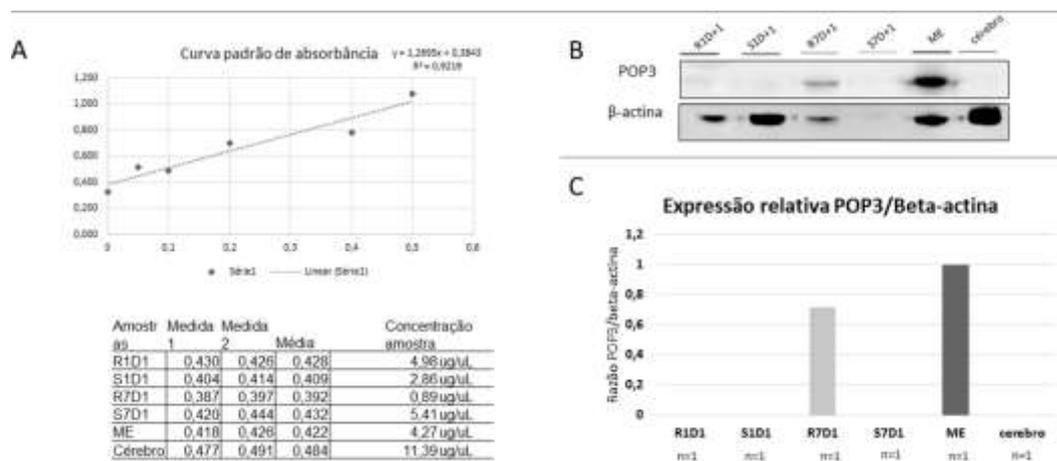


Figura 3: Western Blotting em amostras de ratos neonatos submetidos à coleta 1 dia após o procedimento cirúrgico, tecido muscular esquelético de rato adulto (ME) e cérebro de rato adulto. (A) Dosagens obtidas pelo método colorimétrico (Bradford) das amostras de ratos neonatos, ME e cérebro adulto. (B) Imagens das membranas de PVDF após revelação quimioluminescente. (Acima) Imagem obtida com o emprego do anticorpo anti-POP3 (LifeSpan) (n=1). (Abaixo) Imagem obtida com o emprego do anticorpo anti-beta-actina (gene normalizador). (C) Quantificação por densitometria das bandas da figura A.

Novamente, as bandas de POP3 apresentadas são referentes à altura de 50kDa, pois não haviam bandas na altura esperada (34kDa). Nessa corrida,

apesar de as dosagens pelo método de Bradford terem sido feitas com acurácia, os níveis de beta-actina ficaram variáveis para as amostras de coração de ratos neonatos, de músculo esquelético e cérebro. O resultado indicaria que a expressão do POP3 é maior no animal R7D1 em detrimento dos demais animais neonatos, e cerca de 30% menor do que no músculo esquelético (quando a normalização pela beta-actina é calculada). Além disso, podemos concluir que a expressão de POPDC3 no cérebro é desprezível. Apesar de os resultados mostrarem esses apontamentos, é necessário ter cautela na interpretação dos dados uma vez que a normalização está prejudicada.

A fim de estabelecer se o anticorpo anti- POP3 da empresa Lifespan é adequado para identificar as diferenças de expressão a nível proteico entre células com superexpressão e inibição POPDC3 realizou-se o western Blotting a partir de células 293t transfectadas com plasmídeos e previamente quantificadas com relação a sua inibição e superexpressão a nível de mRNA. As células empregadas nesse experimento foram 293t cultivadas no modo aderido e no modo suspenso (sem soro)- Vide Padronização da indução de superexpressão e da inibição de POPDC3 em células 293t-neste Apêndice.

Os dados de Western Blotting sugerem que nas amostras que contenham soro (ou seja, em células 293t cultivadas em seu modo aderido) há presença de bandas com aproximadamente 50kDa (que são as mais proeminentes), conforme pode ser verificado na Figura 4 (esquerda). A presença de uma marcação de bandas com 50kDa, pode indicar certa afinidade do anticorpo pela proteína albumina presente no soro (que tem 50kDa) e também estaria presente nos tecidos [2]. Na avaliação da presença de POP3 nas culturas celulares de 293t em suspensão, (condição sem soro), utilizamos clones a fim de estabelecer uma diferença entre as amostras passível de quantificação. Entretanto, ao fazermos uma avaliação prévia dos marcadores fluorescentes para averiguar se o processo de adaptação à condição sem soro faria com que as células alterassem seu padrão de expressão dos marcadores fluorescentes, notamos que houve uma perda significativa (Figura 4- membrana central). Por fim, após cultivar tais clones por mais 2 meses na condição de suspensão, obtivemos maiores níveis de fluorescência e por conseguinte, diferenças foram observadas

no western Blotting (Figura 4- direita). Interessantemente o peso molecular observado nas 293t em suspensão está entre 25kDa e 37kDa. (em conformidade com os dados do manual de instruções (*datasheet*) do anticorpo), mas difere dos pesos moleculares encontrados nas amostras de ratos neonatos e nas 293t aderidas. Esse dado será explorado futuramente a fim de estabelecer se existe alguma alteração pós-transcricional contexto-dependente na proteína. Além disso, um novo anticorpo, da marca ProteinTech foi adquirido, porém não obtivemos nenhum resultado de bandas únicas com esse anticorpo.

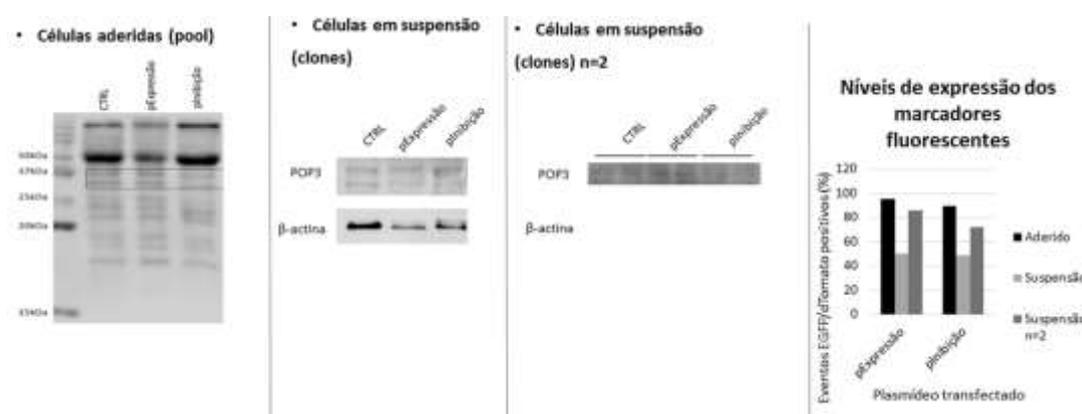


Figura 4: Western Blotting da proteína Pop3 em células 293t na condição aderida versus suspensão. O resultado obtido na condição aderida (imagem à esquerda) refere-se a população (“pool”). Note que a banda de 50kDa é mais proeminente do que a banda esperada em 34kDa. Com o cultivo das células em suspensão (imagem central), a banda mais proeminente é a de 50kDa, porém não se observa diferença estatística entre os tratamentos (os clones utilizados para esses experimentos têm sua fluorescência representada no gráfico de barras à direita e corresponde a barra em cinza). O cultivo em suspensão foi feito por maior tempo de forma que as células foram capazes de estar adaptadas a condição de suspensão e também retornaram a exibir níveis de fluorescência mais próximos da condição aderida (barras em azul). A revelação do western blotting desse experimento (n=2) consta na figura à direita. A bandas mostradas estão entre 37 e 50kDa.

Padronização Citometria de fluxo para Popdc3

Além do Western Blotting, foi possível utilizar as células 293t transfectadas com os plasmídeos para realizar uma padronização de citometria de fluxo para marcação de POP3 com o anticorpo Lifespan. Nesse experimento foi utilizado com clone C2- pExpressão aderido, que possui alta expressão.

Foram utilizados quatro métodos de marcação para citometria em um clone (nomeado de C2) transfectado com o plasmídeo para superexpressão de POPDC3. Os métodos diferem em relação aos reagentes das etapas de fixação e permeabilização. Três dos quatro protocolos já são estabelecidos: 1) Método 1 (Protocolo de marcação de proteínas intracelulares _R &D); 2) Método 2 (Protocolo de marcação de proteínas intracelulares –Abcam-formol) ;3) Método 3 (laboratório- descrição abaixo); 4) Método 4 (mesmo protocolo utilizado para imunofluorescência, usando anticorpo primário 1:50 e secundário 1:100) . O método 3 é empregado em nosso laboratório para marcação de proteínas intracelulares. Nesse protocolo a fixação é feita com PFA1% a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir as amostras foram permeabilizadas com metanol 90% a 4° C por 10 minutos. Após 2 lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário em BSA 1% 4° C por 35 minutos. Após duas lavagens com uma solução de triton 0,1% em BSA 1%, foram incubadas com o anticorpo secundário em triton 0,1% em BSA 1% a 4° C por 30 minutos. O anticorpo secundário foi lavado por três vezes com uma solução de triton 0,1% em BSA 1% e o sobrenadante foi ressuspendido em BSA 1% até a leitura (que foi feita imediatamente o processo de marcação). Para o procedimento, as células foram dissociadas utilizando tripsina e foram separadas 2. 10⁵ células para cada condição, exceto para o método 3 em que foram utilizadas 3.10⁵ células. Para todos os métodos o secundário utilizado foi goat anti-rabbit Alexa 488, cuja fluorescência é emitida no comprimento do verde (que corresponde a leitura do FL-1) no citômetro.

Os quatro métodos diferem quando às etapas de fixação e permeabilização, sendo que no método 1 utilizou-se PFA1% para fixação, assim como no método 3. Esses dois protocolos utilizam como permeabilizador o

metanol, porém em porcentagens diferentes (sendo 100% no primeiro e 90% no segundo) e por tempos diferentes (sendo superior no método 1). O método 3 possui etapas de lavagem com um detergente fraco (triton 0,1% em BSA 1%), o que não ocorre no método 1. O método 2 utiliza formol 0,01% para fixação, já o método 4 utiliza PFA 4% como fixador. Nesse último ocorre a permeabilização por um detergente forte (Tween 0,5%). Além disso, no método 4 o anticorpo primário foi incubado em uma solução contendo Tween 0,1%, o que não ocorre nos demais protocolos (utilizou-se BSA1% para incubar o anticorpo primário).

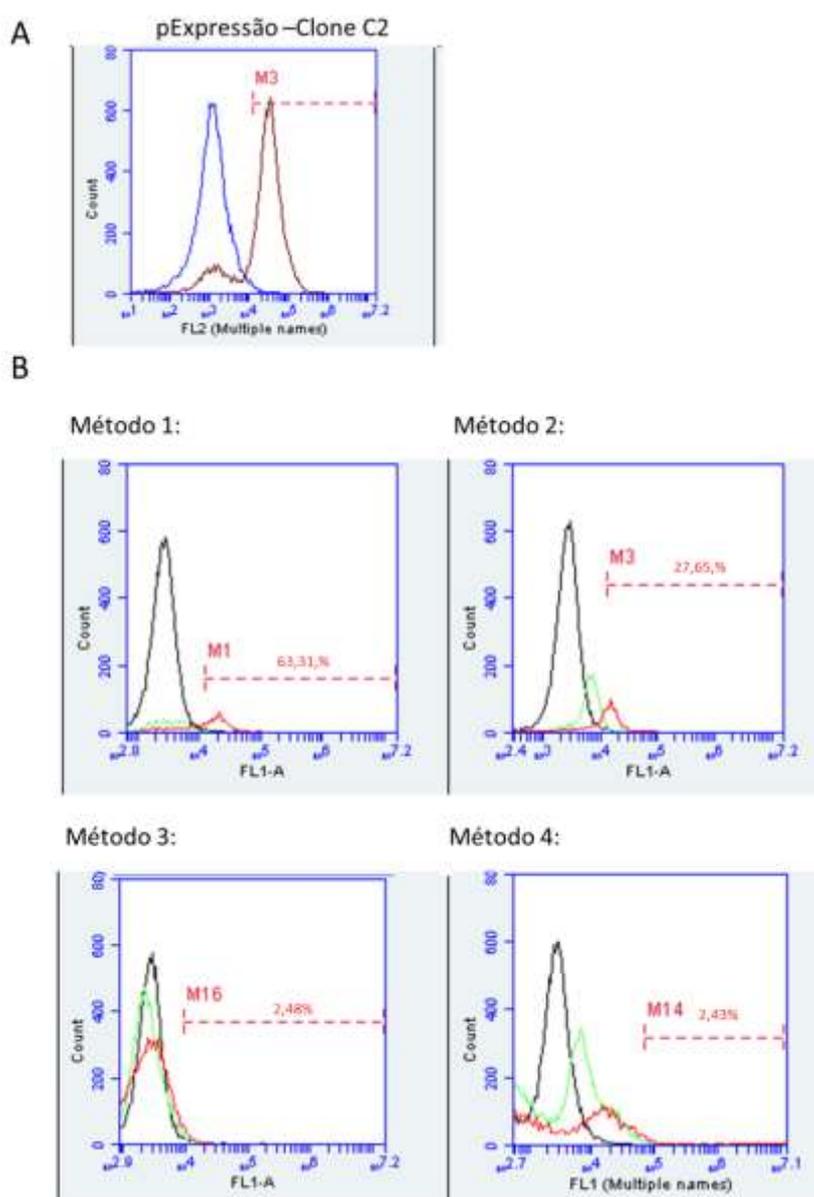


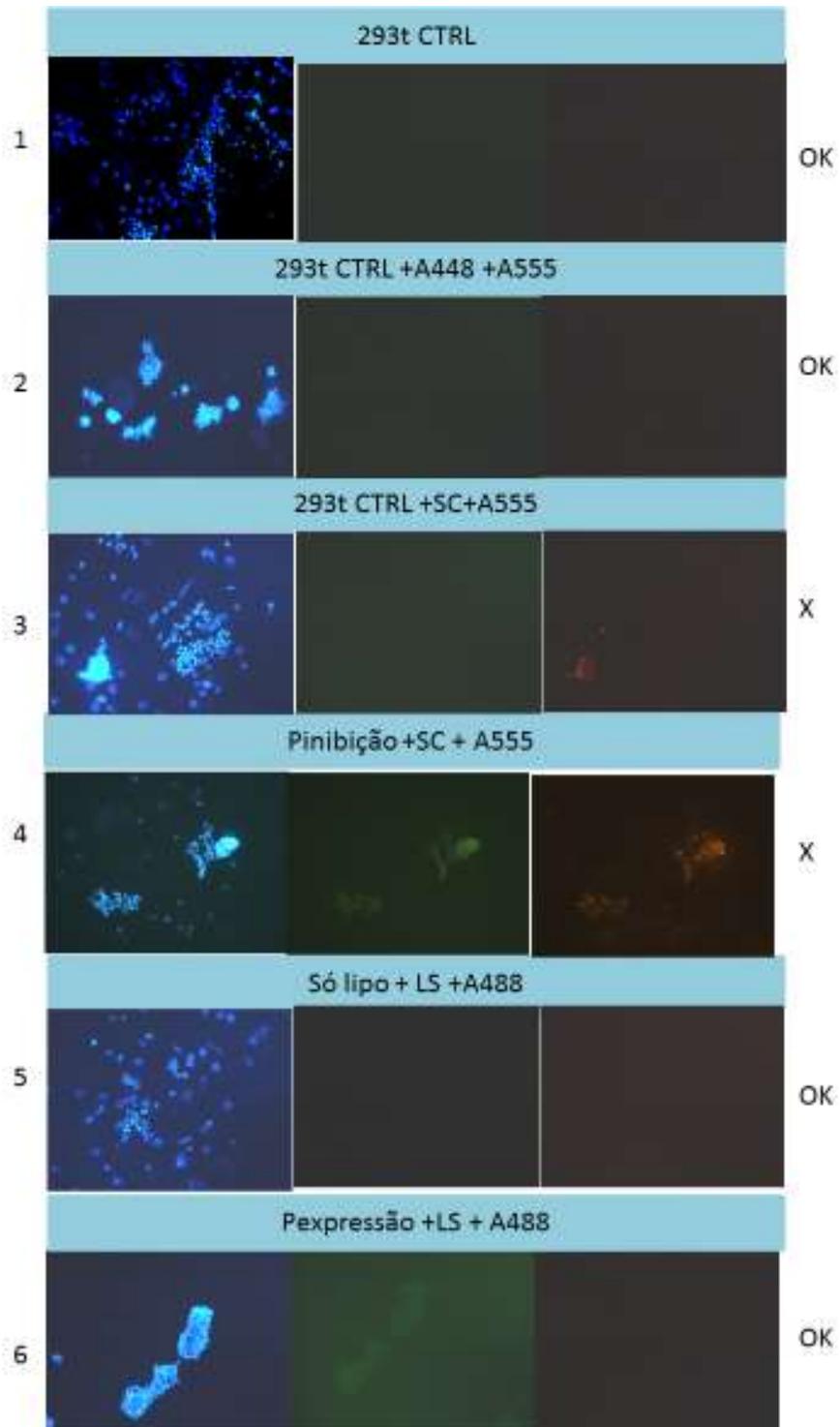
Figura 5: Histogramas gerados a partir da citometria de fluxo de células 293t marcadas com anti-POP3. (Lifespan). (A) Figura representativa do valor de células positivas para dTomato (preto) (em FL-2) em relação ao controle só lipo (azul). (B) Análise comparativa da porcentagem de células positivas para dTomato marcadas

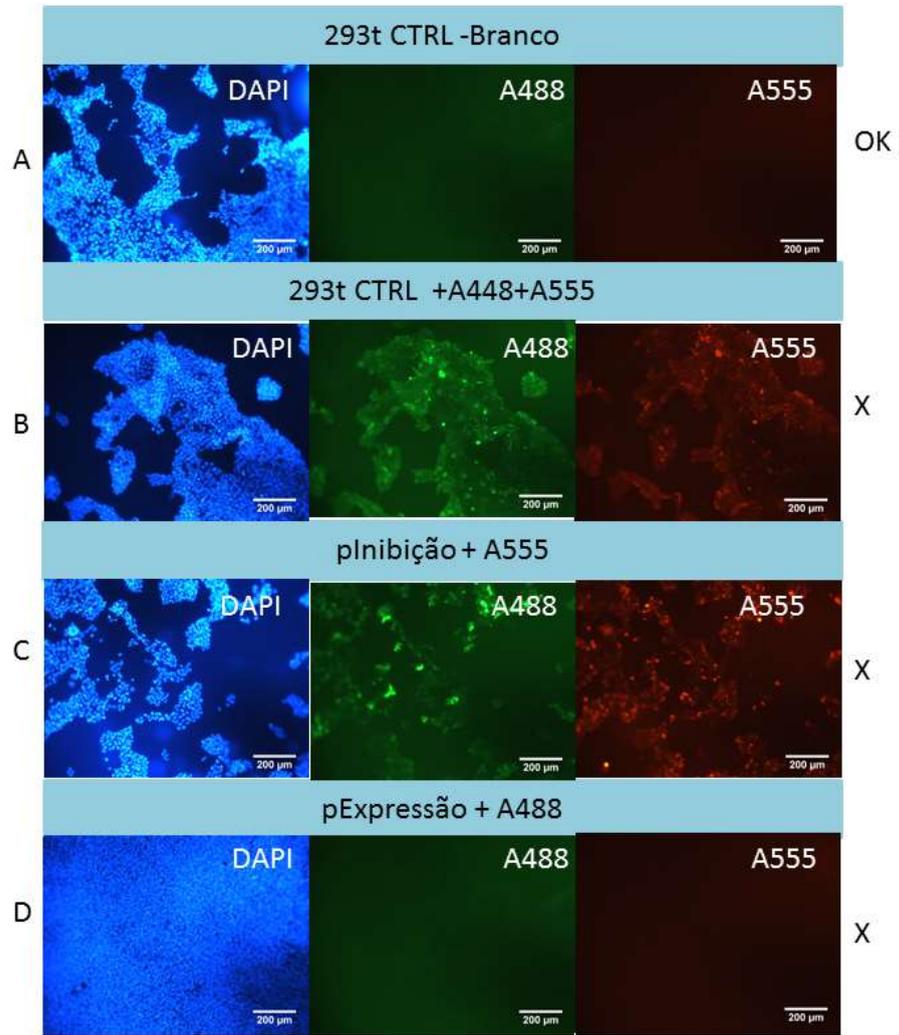
com anti-POP3 nos quatro protocolos testados. As linhas em preto correspondem às células do clone C2-pExpressão, as em verde correspondem à marcação destas células com anticorpo secundário (Alexa 488) e as em vermelho correspondem à marcação obtida na presença do anticorpo primário.

Os métodos um e dois apresentam-se como os mais específicos (Figura 7), pois a marcação com o anticorpo secundário (linha verde) não se sobrepõe em relação à marcação com primário e secundário (linha vermelha), no eixo FL-1. No método 1, quando consideramos a marcação com primário (removendo o efeito da marcação inespecífica), temos que 63% dos eventos são positivos para FL-1. Da mesma forma, para o método 2, temos 27,65% de eventos positivos. Já nos métodos 3 e 4 há grande sobreposição das curvas verdes e vermelhas, indicando que o secundário marca de forma inespecífica, e portanto, a marcação com o primário é baixa (2,43- 2,48%).

Padronização da Imunofluorescência

De modo a averiguar se o anticorpo da anti-POP3 (Lifespan) era capaz de marcar adequadamente as células para imunofluorescência, utilizou-se nesse momento as células 293t transfectadas (Figura 6). A marcação de lâminas foi realizada por duas vezes com sucesso e indica que o anticorpo da empresa Lifespan é capaz de marcar as células com superexpressão de POPDC3 e não detectar as células na qual sua expressão foi diminuída.





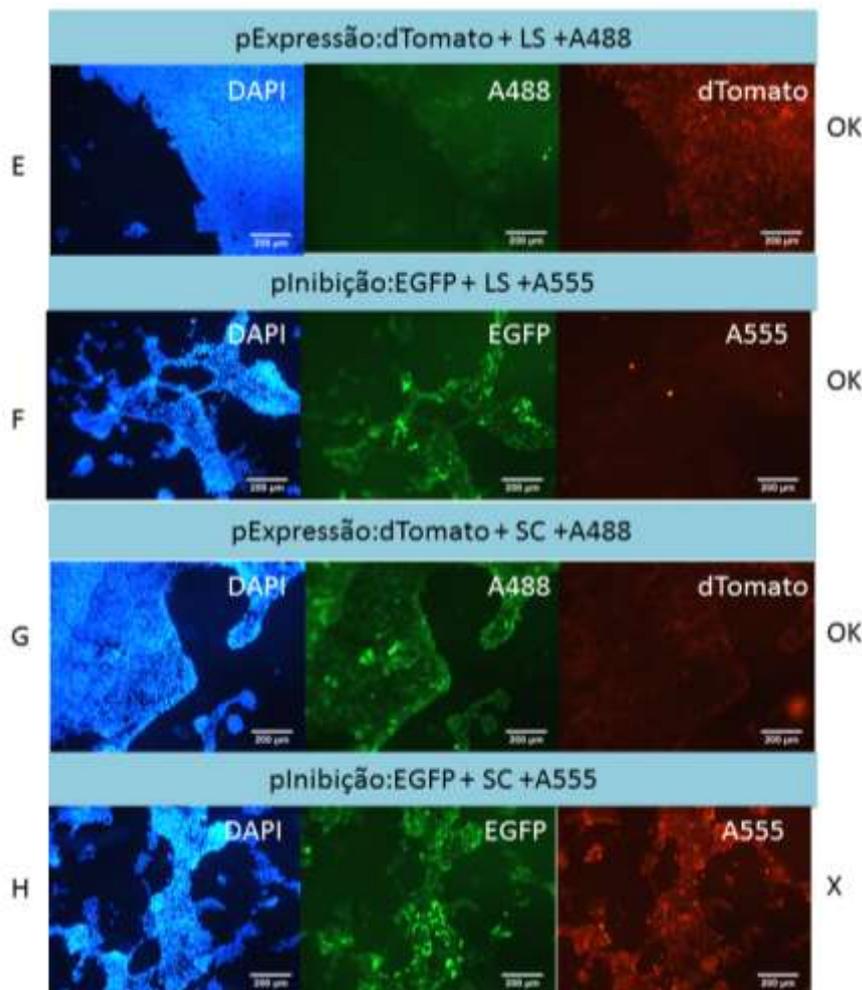


Figura 6: Imunofluorescência de células 293t transfetadas com os plasmídeos de superexpressão de POP3 (pExpressão: dTomato) ou os plasmídeos de inibição de POP3 (plnibição: EGFP). A marcação foi comparada em relação às células que não foram transfetadas. 1-6- são imagens referentes ao experimento 1, em aumento de 40X. A-H são imagens referentes ao experimento 2 em aumento de 100X. Os anticorpos comparados foram os da empresa Santa Cruz (SC) e da Lifespan (LS), ambos anti-POPDC3.

No primeiro experimento (aqui representado pelos números 1 a 6), não houve marcação dos anticorpos secundários nas células 293t não transfetadas (linhas 1 e 2). Houve marcação das células não transfetadas na presença do secundário Alexa 555 e do anticorpo anti-POP3 (Santa Cruz) (Linha 3). O anticorpo da Santa Cruz também se mostrou inespecífico uma vez que marcou células em o POP3 está inibido- (linha 4). Já o anticorpo anti-POP3 parece não marcar células não transfetadas na presença do secundário (Alexa 488) (linha 5), conforme esperado. Além disso, o anticorpo da Lifespan é capaz de marcar células com superexpressão do POP3- (linha 6).

No segundo experimento (aqui representado pelas letras A a H), as células não transfectadas não apresentam fluorescência (linha A). Houve marcação com o anticorpo secundário Alexa 555 (linhas B e C), porém não se observa marcação inespecífica do secundário Alexa 488. (linha D). As 293t com superexpressão foram corretamente marcadas pelo anticorpo anti-POP3 (linha E), e este anticorpo não reconhece as células em que o POP3 foi inibido, conforme esperado (linha F). Embora o anticorpo anti-POP3 tenha marcado as células em que houve superexpressão (linha G), ele aparentemente marca as células em que o POP3 foi inibido- (linha H), corroborando com a inespecificidade observada no experimento anterior.

Padronização da indução de superexpressão e da inibição de POPDC3 em células 293t

De modo a se ter material para padronização prévia dos anticorpos, as células 293t foram transfectadas com plasmídeos para superexpressão e inibição de POPDC3 pelo reagente da lipofectamine 3000.

Os esquemas de co-transfecção foram: 1) pIndução (TET-on)+ pInibição ou 2)pIndução (TET-on) +pExpressão, para inibição e superexpressão, respectivamente.

A expressão de POPDC3 e de POPDC1 varia em células 293t transfectadas

Avaliamos a expressão de mRNA de POPDC3 e POPDC1 em clones das células 293t transfectados com os plasmídeos de superexpressão e inibição - Figura 7. Curiosamente descobrimos que as células 293t já possuem a expressão de base de POPDC3. Entretanto, sua expressão foi comparada ao controle “células 293t que não receberam o plasmídeo” pelo método da qPCR (PCR quantitativo), os resultados demonstram que a expressão é 56,4 vezes maior no clone transfectado com o plasmídeo de superexpressão em relação célula sem transfecção. Para o clone transfectado com o plasmídeo inibição, a expressão é 2,5 vezes menor que o controle sem transfecção.

Por outro lado, no caso do POPDC1, observa-se um padrão um pouco diferente. Quando as células estão superexpressando POPDC3 não há maior ativação de POPDC1. Porém, na condição em que POPDC3 está inibido, há diminuição da expressão de POPDC1.

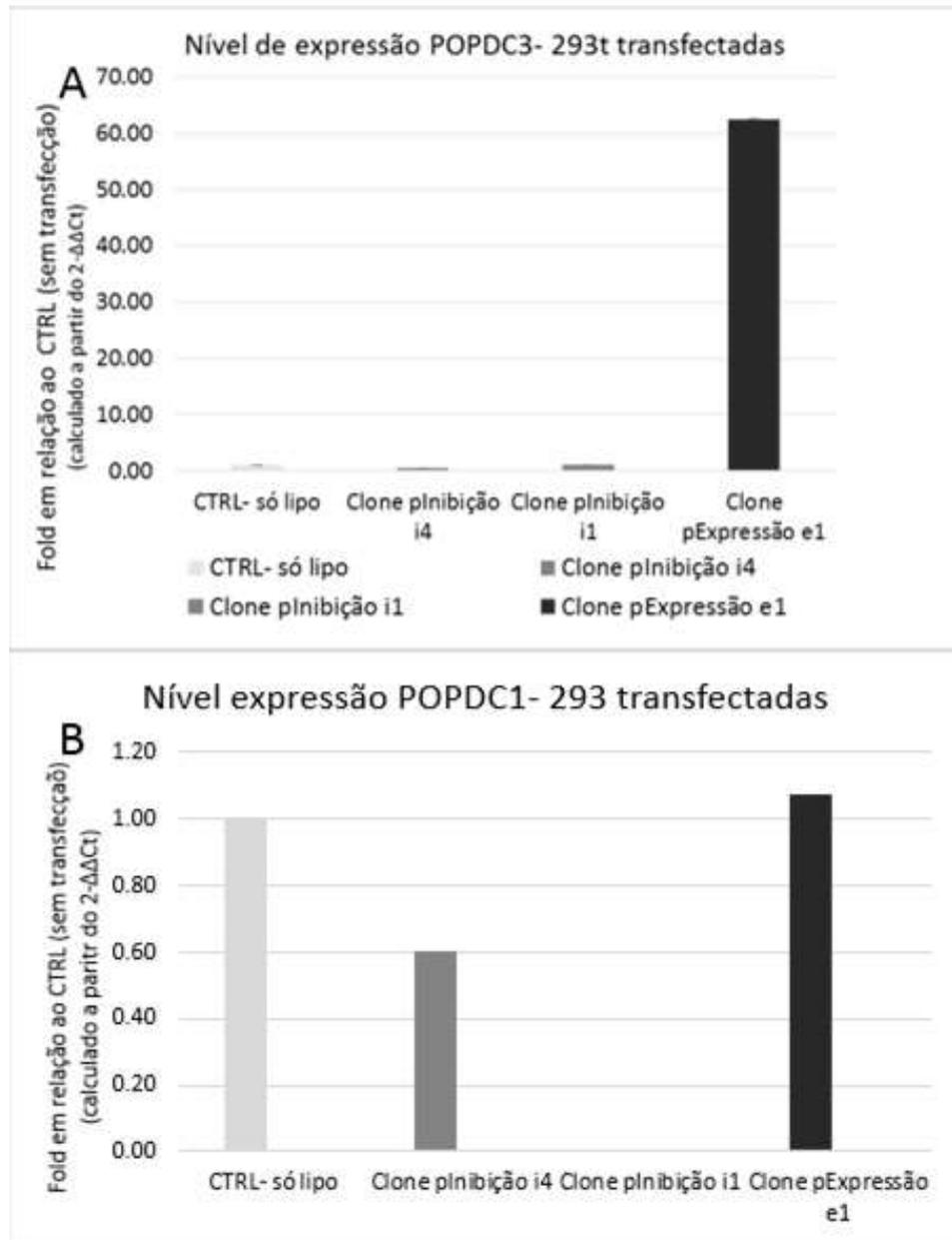


Figura 7: (A) Gráfico de expressão diferencial de POPDC3 pelo método do qPCR. As amostras comparadas são os clones i4 (transfectado com o plasmídeo inibição) e o clone e1 (transfectado com o plasmídeo expressão); (B) Gráfico de expressão diferencial de POPDC1 pelo método do qPCR. As amostras comparadas são os clones i4 (transfectado com o plasmídeo inibição) e o clone e1 (transfectado com o plasmídeo expressão)

Referências

1. Monteiro, S.R. and J.A. Lopes-da-Silva, *Effect of the molecular weight of a neutral polysaccharide on soy protein gelation*. Food Res Int, 2017. **102**: p. 14-24.
2. Miyara, M., et al., *Protein extracts from cultured cells contain nonspecific serum albumin*. Biosci Biotechnol Biochem, 2016. **80**(6): p. 1164-7.

APÊNDICE A

1. Introdução

Algumas alternativas de terapia celular com células-tronco foram testadas para auxiliar no tratamento do infarto do miocárdio (MI). As terapias com células-tronco pluripotentes (ESCs), oriundas da massa interna do blastocisto, pareciam proeminentes uma vez que essas células são capazes de gerar vários tipos celulares (cardiomiócitos, hepatócitos, neurônios, etc). Porém, sua aplicação terapêutica é limitada devido sua origem embrionária, e seu uso é eticamente controverso, além de mostrar-se potencialmente tumorigênico.

Já as terapias com células-tronco multipotentes (mesenquimais -MSCs) da medula/ tecido adiposo foram capazes de melhorar a função cardíaca através da produção de fatores parácrinos que auxiliaram os cardiomiócitos residentes, com efeito cardioprotetor [1].

Sendo assim, o implante de MSCs não repõe os cardiomiócitos perdidos durante o infarto do miocárdio. Alternativamente, foi desenvolvido em 2006 por dois pesquisadores distintos, ganhadores do Nobel (Yamanaka e Takahashi), a possibilidade de obtenção de células-tronco pluripotentes a partir de fibroblastos de camundongo [2], e posteriormente a tecnologia evoluiu até a obtenção de células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSC) originárias de fibroblastos da pele [3]. As células foram obtidas através da reprogramação, por 4 fatores, comumente designados de *OCT4*, *SOX-2*, *C-MYC* e *KLF4*. Tais células foram então estudadas com relação ao seu potencial de transformação em diversos tipos celulares.

Atualmente, pesquisas indicam que os cardiomiócitos derivados de hiPSC (hiPSC-CMs), se obtidos em um até um estágio tal que sejam capazes de integrar-se ao sincício e sejam capazes de proliferar, para repor a área perdida, sem gerar tumorigênese, são os mais adequados para repovoar a região perdida pelo IM e melhoram a função cardíaca [4].

Apesar dos avanços nesse sentido, a diferenciação das células hiPSC em cardiomiócitos é um processo com variabilidade de reprodução, por isso, muitos grupos fazem uso de marcadores para selecionar as populações durante a diferenciação e aumentar o grau de pureza final [4], [5].

APÊNDICE A

Neste trabalho objetivamos compreender a função do gene *POPDC3* durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, através do *knockdown*, pois foi visto que esse gene possui padrão de expressão crescente durante o processo. O objetivo foi testar a hipótese de que na condição de expressão de *POPDC3* haja menor comprometimento cardiogênico durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. Na medida que os fenótipos forem bem classificados, então, poder-se-á compreender a função desse gene para no futuro, eventualmente selecionar hiPSC durante a diferenciação com maior eficiência de produção de cardiomiócitos.

O modelo da diferenciação *in vitro* foi escolhido, pois haviam ferramentas para edição gênica das células hiPSC, que se poderiam ter fenótipo acessível mediante diferenciação em cardiomiócitos. Além disso, até o momento nenhum gene dessa família foi investigado durante tal diferenciação, sendo inédito.

2. Objetivo

Testar a hipótese de que o gene POPDC3 afete o processo de diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos.

Objetivos específicos

- 1) Gerar hiPSCs modificadas geneticamente para expressarem sequencias curtas de RNA de interferência (por meio de *Short-hairpin system*) para inibir a expressão de POPDC3.
- 2) Gerar hiPSCs modificadas geneticamente para superexpressarem POPDC3 através de sistema de transdução do lentiviral.

APÊNDICE A

3. Materiais e métodos

Microscopia confocal – HCS

Os cardiomiócitos derivados de hiPSC foram cultivados até o dia 15 da diferenciação em placas contendo Geltrex™, formando uma malha e em batimento. Após esse dia, foram singularizados com solução de colagenase a 1mg/mL por 60 minutos e replaquados em placas de 96 wells (TPP). A leitura dessas placas de 96 wells foi feita juntamente ao CEFAP-USP através do equipamento InCell (GE) para aquisição de imagens em larga escala (*High Content Screening- HCS*).

Western Blotting

As amostras proteicas foram extraídas utilizando-se de um tampão que contém HEPES ou RIPA. Utilizou-se Triton XD-100 1% como detergente fraco.

A amostras sofreram corrida eletroforética (30mA por cerca de 2,5 horas) em gel de acrilamida 12% em tampão de amostra contendo DTT (dithiothreitol- Life Technologies R0861) e posteriormente utilizando beta-mercaptoetanol. O marcador utilizado para verificação do peso molecular foi o Kaleidoscope (#161-0375 BioRad©). O gel foi transferido para uma membrana PVDF (Trans-Blot Turbo BioRad©) a 12V 2,5A por 1 hora. A membrana foi bloqueada com BSA 5% (bovine serum albumin- A7906 Sigma- Aldrich©) por uma hora a temperatura ambiente. Foi feita a marcação para Pop3 (anti- Pop3 sc-168993- SantaCruz Biotechnology®) 1:500 ou 0,01µg/µl e Rabbit anti-goat (AP106P- Merck©) a 0,5.10⁻³ µg/µl. Também foram utilizados os anticorpos anti-Pop3- LS- Lifespan LS-C145698, ProteinTech 11800-1-AP e abcam (ab76388 e ab156426).As membranas também foram incubadas com anticorpos anti-cTNT (troponina cardíaca- Abcam Ab-8295), HCN4 (Abcam Ab-32675), Nkx2.5 (Cell Signaling 8792S) e Cx43 (Abcam Ab-11370), SCN5a (Santa Cruz Sc-271255) e Gapdh (abcam ab-22555). Todos esses anticorpos foram incubados overnight a 4°C. Os respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP (do inglês, “horse seradish peroxidase” foram empregados na concentração de 1:2000. A revelação das imagens foi feita pelo emprego de ECL (método quimioluminescente). As imagens foram obtidas no equipamento ImageQuanti

APÊNDICE A

LAS 4000 mini (GE©). A quantificação das bandas foi feita por meio do programa ImageJ (FijilImage®).

Citometria de fluxo

Foram utilizados quatro métodos de marcação para citometria em um clone (nomeado de C2) transfectado com o plasmídeo para superexpressão de POPDC3. Os métodos diferem em relação aos reagentes das etapas de fixação e permeabilização. Três dos quatro protocolos já são estabelecidos: 1) Método 1 (protocolo de marcação de proteínas intracelulares- R & D); 2) Método 2 (protocolo de marcação de proteínas intracelulares- abcam – formol); 4) Método 4 (protocolo de marcação de utilizado na técnica de Imunofluorescência- vide item 2.6.2). O método 3 é empregado em nosso laboratório para marcação de proteínas intracelulares. Nesse protocolo a fixação é feita com PFA1% a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir as amostras foram permeabilizadas com metanol 90% a 4° C por 10 minutos. Após 2 lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário em BSA 1% a 4° C por 35 minutos. Após duas lavagens com uma solução de triton 0,1% em BSA 1%, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário em triton 0,1% em BSA 1% a 4° C por 30 minutos. O anticorpo secundário foi lavado por três vezes com uma solução de triton 0,1% em BSA 1% e o sobrenadante foi ressuspensionado em BSA 1% até a leitura (que foi feita imediatamente o processo de marcação). Para o procedimento, as células foram dissociadas utilizando tripsina e foram separadas 2. 10⁵ células para cada condição, exceto para o método 3 em que foram utilizadas 3.10⁵ células. Para todos os métodos o secundário utilizado foi Goat Anti-Rabbit Alexa 488, cuja fluorescência é emitida no comprimento do verde (que corresponde a leitura do FL-1) no citômetro.

Células empregadas

Foram utilizadas células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) derivadas de fibroblastos da pele. Tais células foram utilizadas após consentimento da doadora e seguem o mesmo protocolo aprovado pela CAPPesq (055/11) - Anexo A. Além disso, foram utilizadas células HEK-293T

APÊNDICE A

apenas para treinamento das técnicas, validação dos anticorpos utilizados e para verificação da eficácia de transfecção dos plasmídeos.

3.1.1. Cultivo celular hiPSCs

As células utilizadas nesse trabalho foram originárias de fibroblastos da pele que sofreram reprogramação nuclear com os genes OCT4, SOX2, KLF4 e CMYC utilizando-se o um vetor viral encapsidando um plasmídeo Stemcca [6], desenvolvido e doado gentilmente por Dr. Gustavo Mostoslavsky ao nosso laboratório.

No cultivo de hiPSCs foi empregado meio E8 suplementado com trocas diárias. A dissociação das células é feita através do uso de Versene®, e o plaqueamento é feito após preparo da placa com Geltrex (12,5M), como coating não celular. No caso das células modificadas geneticamente, houve tentativa de transfecção utilizando dois processos distintos: reagente lipofectamina 3000 ou eletroporação (kit Keon 24). Adicionalmente tais células sofreram infecção com lentivírus contendo as sequências dos plasmídeos para superexpressão de POPDC3 e para inibição de POPDC3 (shRNA).

3.1.2. Cultivo celular 293t

O cultivo de células de origem humana, como a 293t se deu devido a necessidade de testar a eficácia da superexpressão e inibição pelos plasmídeos adquiridos. (Vide item Plasmídeos utilizados- item 2.8). As células 293t foram transfectadas pelo emprego do reagente Lipofectamine 3000, seguindo as indicações do fabricante.

Estas células foram cultivadas na sua forma aderida, bem como em suspensão. Para o cultivo das 293t aderidas foi utilizado meio DMEM High com 10% BCS (Hyclone). Já em suspensão, estas células sofrerão adaptação (retirada gradativa do soro- de 10% BCS para 0% BCS) e introdução de meio para cultivo CDM4 sem soro (Invitrogen). Originalmente, esse meio sem soro é utilizado para cultivo em suspensão de células CHO (células de ovário de hamster chinês). O processo de adaptação seguiu da seguinte forma:

APÊNDICE A

Tabela 1: Diminuição gradativa do soro no cultivo das células 293t em suspensão

	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 6</i>	<i>Dia 7</i>
Soro	10%	5%	2,5%	1,25%	1%	0%

No dia 9 do processo de adaptação, foi realizada citometria para avaliar o nível de expressão dos marcadores dTomato (referente ao plasmídeo de superexpressão) e EGFP (referente ao plasmídeo de inibição).

Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos adquiridos são bicistrônicos, ou seja, tem co-expressão de proteínas fluorescentes. Além disso, fazem parte do sistema TET3G, ou seja, sua expressão é induzida por tetracilinas, utilizando-se o mecanismo Tet-on. Tais plasmídeos foram adquiridos da Empresa Cyagen Company- Vector Builder © ou foram modificados a partir de um plasmídeo utilizado em estudo anterior no Mont Sinai (Figura 10).

O sistema de indução Tet-on foi empregado como alternativa para estudo da superexpressão/ inibição de Popdc3 na diferenciação, pois é indutível e reversível. Nesse sistema, da proteína transativadora da tetraciclina (tTA), que é criada pela fusão de uma proteína, TetR (repressora de tetraciclina), encontrada na bactéria *Escherichia coli*, com o domínio de ativação de outra proteína, VP16, encontrada no Herpes Vírus Simplex é usada para controlar a expressão de um transgene (nesse caso o gene POPDC3, para superexpressão, ou o shRNA-POPDC3 para inibição). Quando da adição de doxiciclina (uma tetraciclina), há um efeito de ativação da transcrição dos transgene.

APÊNDICE A

Além do plasmídeo de superexpressão (de aqui em diante denominado como pExpressão), dispomos de um plasmídeo de inibição (de aqui em diante denominado como plnibição), também com promotor induzível. Ele funciona por meio de sequências flanqueadoras ao shRNA (5'-miR 30 e 3'-miR30) [7]. Os shRNA (do inglês *short hairpin*, são sequências que promovem o silenciamento do gene-alvo por meio da ativação do complexo de destruição das sequências de mRNA (RISC). O shRNA integrado ao genoma da célula do hospedeiro é transcrito gerando um miRNA que será processado pela Drosha em pré-miRNA. No citoplasma ele é processado pela Dicer, em que a fita *sense* (passageira) normalmente é degradada e a *antisense* serve como guia para o complexo RISC encontrar a sequência de mRNA alvo complementar ao guia e destruí-la [8]. No caso do plasmídeo construído neste trabalho, as sequências flanqueadoras (5'-miR 30 e 3'-miR30) serão removidas durante o splicing, restando apenas o shRNA funcional na célula. No caso do plasmídeo para superexpressão de POPDC3 o sistema tet-on foi empregado na forma de dois plasmídeos (um para produzir o rtTA) e outro com o elemento responsivo ao rtTA (TRE3G), que possui o marcador de fluorescência, dTomato.

APÊNDICE A

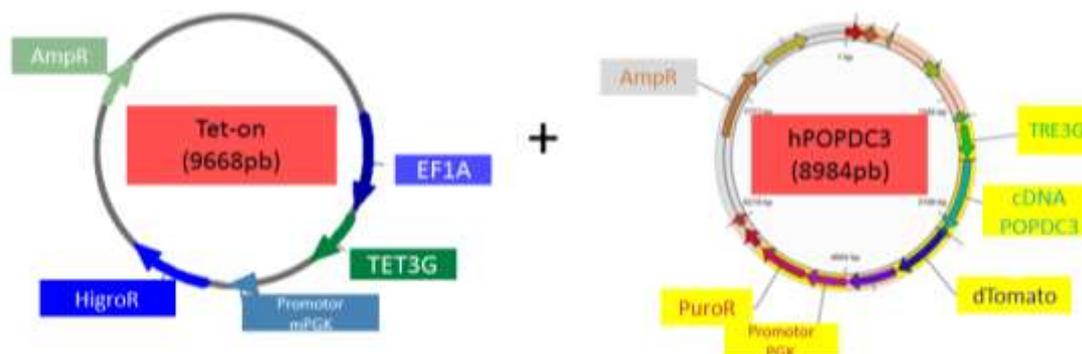


Figura 1: Esquema dos plasmídeos indutíveis (tet-on) empregados nas células hiPS antes do dia 0 da diferenciação para superexpressão de hPOPDC3.¹

As células hiPS também foram infectadas por vírus contendo plasmídeo para inibição de POPDC3, EGFP expresso constitutivamente, e shRNA expresso de forma condicional (somente na presença de DOX). Esse plasmídeo, trazido do Mount-Sinai University foi trazido pelo post-Doc Rafael Dariolli e permite o emprego do sistema tet-on com somente um plasmídeo. Nesse caso, só foi necessária uma droga para seleção, a puromicina. Foram criadas quatro linhagens de hiPSC, cada uma contendo uma sequência de shRNA para depleção do mRNA de POPDC3 humano (Tabela 2). A quarta sequência (sh4) corresponde a mesma adquirida no caso dos plasmídeos comerciais (sistema de dois plasmídeos- Vector Builder). Os shorthairpins contêm uma sequência sense –S e anti-sense AS que formam a estrutura de grampo de cabelo, após processamento pela Drosha e Dicer.

Em todos os casos de inibição do POPDC3, os plasmídeos desenhados contêm EGFP como marcador de fluorescência. O que difere, é que no sistema de dois

¹. Os dois plasmídeos foram desenhados e adquiridos da empresa Vector Builder. O primeiro tet-on confere resistência a higromicina. O segundo, aqui representado como hPOPDC3 contém o elemento TRE3G e é ativado somente após a ação do plasmídeo Tet-on (por ação da DOX- tetraciclina). O plasmídeo hPOPDC3 confere resistência a puromicina. Na presença de DOX ocorre expressão do POPDC3 e expressão de dTomato.

APÊNDICE A

plasmídeos, as células precisam ser resistentes a higromicina e blasticidina ao mesmo tempo, e no sistema de plasmídeo único, apenas a puromicina. As seqüências utilizadas para KD de POPDC3 estão listadas na Tabela 2.

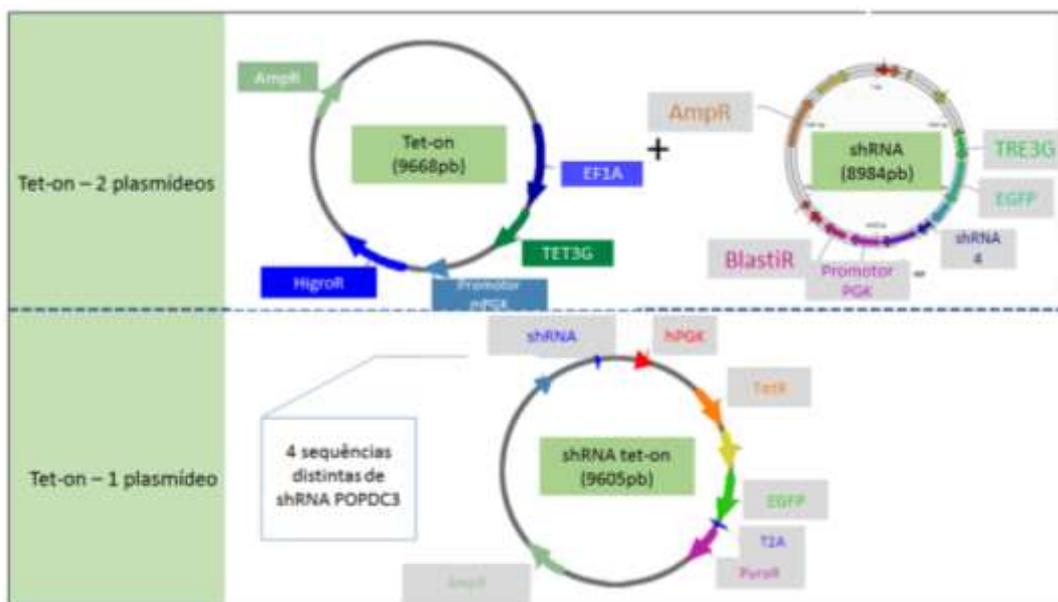


Figura 2: Esquema dos plasmídeos indutíveis (tet-on) empregados nas células hiPS antes do dia 0 da diferenciação.² Detalhes dos elementos que compõem os plasmídeos estão na nota de rodapé 3.

² No painel superior estão os dois plasmídeos desenhados e que foram adquiridos da empresa Vector Builder. O primeiro tet-on confere resistência a higromicina. O segundo, aqui representado como shRNA contém o elemento TRE3G e é ativado somente após a ação do plasmídeo Tet-on (por ação da DOX- tetraciclina). O plasmídeo shRNA confere resistência a blasticidina. Na presença de DOX ocorre expressão do shRNA e expressão de EGFP. No painel inferior, um único plasmídeo, que confere resistência a puromicina, é capaz de ser indutível carregar a seqüência de shRNA para POPDC3. Nesse caso apenas shRNA POPDC3 é indutível, sendo o EGFP expresso de forma contínua. Foram gerados 4 plasmídeos com essa abordagem, contendo 4 seqüências distintas de shRNA.

³ pUC ori=origem de replicação do plasmídeo (permite a replicação em numerosas cópias e manutenção na *E. coli*); promotor RSV= promotor do vírus causador de Rous(permite replicação do mRNA viral independente de TAT); Δ5' LTR= repetições terminais longas 5' (permite a transcrição e empacotamento do mRNA viral); Ψ= elemento empacotador (permite empacotamento viral); RRE=elemento da resposta rev (permite a exportação nuclear do mRNA viral dependente de Rev); cPPT= trato polipurina central (facilita a importação nuclear do mRNA o HIV-1 por meio de uma alça de DNA). EF1A= promotor humano (fator de alongamento 1 alfa); TRE3G= promotor responsivo à tetraciclina; Kozak= seqüência de Kozak (atua na iniciação da tradução); EGFP= marcador proteico verde de fluorescência aumentada (do inglês "enhanced green fluorescent protein") (λemissão=507nm); cDNA hPOP3= ácido desoxirribonucleico complementar ao gene Popeye 3 humano; BamHI-a-small-oligo-XhoI= seqüência com sítios para as enzimas de restrição BamHI e XhoI; P2A: molécula de ligação (do inglês "linker", permitindo que a expressão da molécula fluorescente só ocorra na presença do inserto); dTomato: marcador fluorescente com emissão vermelha (λemissão= 581nm); hPOP3 shRNA antisense = sonda de RNA antisense (complementar ao gene POP3 humano, que inibe sua transcrição); 5' miR30 e 3' miR30= seqüências flanqueadoras dos RNAs de inibição (shRNA) que serão removidas por splicing. WPRE= Elemento regulatório pós-transcricional do vírus da hepatite Woodchuck (aumenta a expressão dos plasmídeos); Promotor PGK= promotor de camundongo da fosfoglicero quinase 1; Ampicilina, blasticidina, higromicina e puromicina= antibióticos (marcadores de seleção dos plasmídeos); ΔU3/3' LTR = repetições terminais longas 3' (permite a transcrição e empacotamento do mRNA viral); SV40 pA precoce= sinal de poliadenilação do vírus simio 40.

APÊNDICE A

Tabela 2: Sequências senso (S) e antisenso (AS) dos quatro *short-hairpins* para POPDC3 humano- 58pb

Nome	Sequência	Alvo-NCBI
POPDC3_S_1	ccggGCTCCTTTATGTCTTCAGTTTctcgag AAACTGAAGACATAAAGGAGCtttttg	NM_022361.3
POPDC3_AS_1	aattcaaaaaGCTCCTTTATGTCTTCAGTTTctcgag AAACTGAAGACATAAAGGAGC	NM_022361.3
POPDC3_S_2	ccggGGATTCTCCTGAGTGGGATTCctcgag GAATCCCACCTCAGGAGAATCCtttttg	NM_022361.3
POPDC3_AS_2	aattcaaaaaGGATTCTCCTGAGTGGGATTCctcgag GAATCCCACCTCAGGAGAATCC	NM_022361.3
POPDC3_S_3	ccggGACATCAAAGTCTGAAATTTActcgag TAAATTTTCAGACTTTTGATGTCtttttg	NM_022361.4
POPDC3_AS_3	aattcaaaaaGACATCAAAGTCTGAAATTTActcgag TAAATTTTCAGACTTTTGATGTC	NM_022361.4
POPDC3_S_4	ccggCCAGACGATACTGTGATAAATctcgag ATTATCACAGTATCGTCTGGtttttg	NM_022361.3
POPDC3_AS_4	aattcaaaaaCCAGACGATACTGTGATAAATctcgag ATTATCACAGTATCGTCTGG	NM_022361.3

APÊNDICE A

Após a transfecção das hiPSCs com os plasmídeos propostos, procurou-se realizar seleção por antibióticos, sendo eles a higromicina, puromicina e blastomicina. Após a seleção, as células são diferenciadas em cardiomiócitos (CMs), para aquisição de parâmetros de comprometimento cardiogênico.

Transfecções

Transfecções por reagente Lipofectamine 3000

As células hiPSCs foram co-transfectadas com os plasmídeos dos sistema tet-on (sistema de 2 plasmídeos) em placas de 24 poços quando atingiram a confluência de 80%: **1) Indução (Tet-on) + Superexpressão (pExpressão POPDC3: *dTomato3*) Indução (Tet-on) + Inibição (pInibição-POPDC3-shRNA:*EGFP*);**

A inserção dos plasmídeos foi feita por meio do método de transfecção pela Lipofectamine 3000 (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. As células também foram transfectadas por meio da eletroporação, em que as condições de choque foram determinadas após padronização com plasmídeo GFP (pGFF max-num. Cat 632370).

Transfecções por eletroporação

De maneira a tentar aumentar a eficiência de transfecção, procedeu-se com a eletroporação das hiPSCs. Foi utilizado o eletroporador (**Neon® Transfection System**-Thermo Fisher) e kit Neon 24 (10uL- Thermo Fisher), e as condições de

APÊNDICE A

choque foram padronizadas pela internalização do plasmídeo comercial pGFP Max⁴ e um plasmídeo sem inserto (CAG) para simular o nosso plasmídeo TET3G.

Durante a padronização utilizou-se choques de 1400V a 1200V, com massas de pGFP+CAG entre 2 a 4ug, com duração de 20ms e 2 pulsos. Em experiência previa por um colega de nosso laboratório, havia a evidência de que a condição de 2µg (2ug total- 1,5ug de pGFP + 0,5ug de CAG) -1200V, 20ms e 2 pulsos funcionava bem na eletroporação de iPSCs suínas, por isso testamos algumas variações desta condição nas células humanas (1000V-1100V-1200V-1400V; 20ms;1 ou 2 pulsos).

Infecções

Obtenção das partículas virais

Foram feitas duas produções virais distintas, na primeira, utilizou-se plasmídeos de terceira geração para gerar as partículas virais. Nesse caso, as partículas virais são obtidas através da transfecção dos plasmídeos GAG, REV e POL em células 293t. É necessária uma massa de 10µg de cada plasmídeo para a execução da produção de vírus em larga escala. Plaqueiam-se 10 placas de 60 mm com 2×10^6 células HEK 293T por placa. No dia seguinte, coleta-se o sobrenadante de cada placa em um tubo cônico de 50 mL, e centrifuga-se a 1000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Recoloca-se 3 mL de meio na placa e deixar na estufa a 37°C por mais 24 horas. O sobrenadante coletado é filtrado (filtro 0,45 µm) e posto em tubo para ultracentrifugação (caçapa do rotor

⁴ Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V. Conforme disponível em: <http://bio.lonza.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_56.pdf>.

APÊNDICE A

SW32Ti) a 23.00rpm por 4°C, *break on* por 90 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante das caçapas foi descartado e inativado em hipoclorito 0,1%. O precipitado foi ressuspenso em 100µL de HBSS e mantido a 4°C até o dia seguinte. No próximo dia as alíquotas são preparadas contendo 10µL e armazenadas a 80°C. Nesse mesmo dia, o mesmo procedimento de ultracentrifugação é repetido para obter-se uma segunda coleta das partículas virais.

Também foi feita uma segunda produção de partículas virais, em que plasmídeos de segunda geração foram empregados na geração dos lentivírus. Nesse caso, foram utilizados os plasmídeos PM2G, pAX2 na produção dos vírus em 293t-HEK. Foram plaqueadas 4 milhões de células e foi feita transdução dos plasmídeos. Após 48h o meio foi coletado e congelado a -80°C para ser utilizado em hiPSCs.

Infeções com lentivírus do sistema tet-on (2 plasmídeos)- Vector Builder

As hiPSCs foram infectadas com lentivírus contendo as sequências dos plasmídeos para superexpressão e inibição indutível do gene POPDC3 humano. As partículas virais foram obtidas a partir de diferentes formas (Vide item abaixo). Inicialmente, o protocolo de infecção viral ocorreu de forma que o plasmídeo Tet-on transduzisse as células juntamente com o plasmídeo para inibição ou superexpressão. Nesse caso, foi feito o plaqueamento de 5.103 células/1,9 cm² (poços de 24 wells). No dia seguinte obtiveram-se aproximadamente 1.104 células /1,9 cm², e foi feita a infecção com MOI=0,5. A indução da fluorescência foi feita entre 3-6 dias após a infecção, através da adição de 1µg/mL de doxiciclina. Após o aparecimento de níveis de fluorescência visíveis ao

APÊNDICE A

microscópio de fluorescência, realizou-se um repique das células (para backup) e com o restante foi feita a seleção por antibióticos. Após 27 dias de seleção com puromicina e higromicina em pulsos, as hiPSCs infectadas com o plasmídeo de expressão exibiram 32% de células dTomato+ (Figura 3), enquanto as hiPSCs selecionadas com blastidina e higromicina (infectadas com o plasmídeo para inibição) exibiram 58% de células EGFP+ (Figura 4).

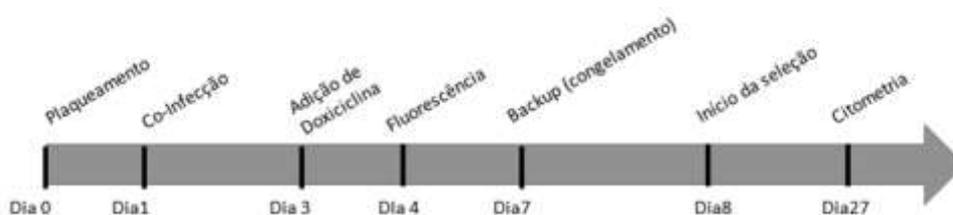


Figura 3: Metodologia de cultivo, seleção e expansão das hiPSCs co-infectadas pelos plasmídeos TET3G (MOI=0,5) e pExpressão POPDC3 (MOI=0,5)

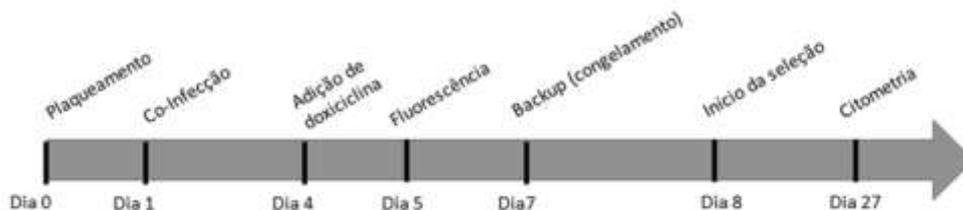


Figura 4: Metodologia de cultivo, seleção e expansão das hiPSCs co-infectadas pelos plasmídeos TET3G (MOI=0,5) e pInibição do POPDC3 (MOI=0,5)

Além do método de co-infecção, também foi realizado o método de infecção sequencial (no caso do plasmídeo para superexpressão) e de infecção única (no caso do plasmídeo para inibição- Mount Sinai).

Infecções com lentivírus do sistema Tet-on (1 plasmídeo) - Mount Sinai

Somente foram infectadas células hiPS com o propósito de *knockdown* de POPDC3. Para isso, foram obtidos 4 tipos de vírus contendo shRNAs anti-POPDC3, e seus plasmídeos foram transduzidos nas hiPSCs. Nesse caso, na produção viral, foi feita somente uma coleta do meio das 293t-HEK (6mL a partir de uma placa de 100mm de diâmetro). Foram aliqüotados 300uL a -80°C para

APÊNDICE A

uso na infecção. Desses 300uL, somente 120uL foram adicionados às células hiPSC -plaqueadas previamente 24h num poço de placa de 24 poços ($6 \cdot 10^4$ células/poço) - em meio mínimo (300uL) por 6h, com adição de polibreno (1ug/mL). Na sequência, o volume de meio foi ajustado para 500uL por mais 18h. Após 72h foi visualizada a introdução dos plasmídeos por microscopia de fluorescência (EGFP). Essas células foram submetidas a seleção por um único antibiótico: puromicina.

Dosagem de antibióticos em hiPSCs

A seleção das células por antibióticos é possível devido à presença do gene de resistência a antibióticos. As doses utilizadas para seleção foram testadas pelo teste de viabilidade celular (MTT). O ensaio do MTT (Ensaio de microcultura *tetrazolium*) baseia-se na conversão do MTT (do inglês, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Amarelo) em seu produto (violeta), em presença de NADH. Somente células com viabilidade possuem capacidade de produzir o produto violáceo. De maneira a encontrar uma dose ideal para seleção de hiPSC, não apenas baseada na literatura, realizou-se ensaios de MTT com as células hiPS. O objetivo foi encontrar doses para a seleção (no caso da puromicina e da higromicina) e indução do plasmídeo Sistema TET3G (no caso da doxiciclina) pelo ensaio de viabilidade MTT [9].

Foram plaqueadas $10,6 \cdot 10^4$ células /cm² em placas de 96 poços e foram tratadas por 2h, 24h, 48h e 96h com os antibióticos. Ao final do tratamento foi adicionado ao meio de cultura das células a 20µL da solução de MTT (0,5mg/mL). As células foram incubadas com o MTT por 2,5 horas na incubadora. O sobrenadante foi desprezado e o conteúdo restante foi

APÊNDICE A

ressuspendido em 200µL de DMSO. A leitura da absorbância foi procedida a 540nm no equipamento Victor Wallac.

As doses testadas dos antibióticos seguem na tabela abaixo:

Tabela 3: Doses dos antibióticos testadas em hiPSCs para seleção/ativação do sistema das células transfectadas

PUROMICINA (µg/mL)	DOXICICLINA (µg/mL)	HIGROMICINA (µg/mL)
1	0,2	50
2	0,3	100
3	0,5	150
4	0,7	200
5	0,8	250
6	1	300

As doses máximas de teste foram consideradas de acordo com a literatura presente até o momento [10], [11]. O antibiótico blasticidina não teve suas doses de seleção testadas pelo método do MTT, foi assumida que a dose de 300ug/mL teria efeito sobre as células não transfectadas, dose já testada previamente por outros autores[12]. Para a puromicina, foram testadas doses menores do que 6µg/mL, pois há evidência de nosso laboratório de que essa dose é capaz de selecionar hiPSCs transfectadas.

As hiPSCs que foram transduzidas com 2 plasmídeos ao mesmo tempo, foram tratadas em pulsos (um dia com antibióticos e outro dia sem antibióticos) para selecionar as células efetivamente carreadores dos genes para superexpressão de POPDC3 ou que expressassem o shRNA para inibição do POPDC3. As doses utilizadas para seleção de células com superexpressão

APÊNDICE A

foram administradas a partir do 4^o dia da visualização da fluorescência (correspondente ao dia 8 do protocolo da figura 9) e seguiram até o dia 14 (4^o pulso). A partir dessa data, as células foram mantidas sem as drogas (puromicina= 0,5µg/mL e higromicina= 25µg/mL) para expansão até o dia da citometria (dia 27). As doses utilizadas para seleção de células com POPDC3 inibido foram administradas a partir do 3^o dia da visualização da fluorescência (correspondente ao dia 8 do protocolo da figura 10) e seguiram até o dia 18 (6^o pulso). A partir dessa data, as células foram mantidas sem as drogas (blastidina= 6,25µg/mL e higromicina= 25µg/mL) para expansão até o dia da citometria (dia 27).

Já para as células transduzidas com apenas um plasmídeo, apenas a puromicina foi utilizada como droga de seleção. A expressão de EGFP é constitutiva, não sendo necessária a adição de doxiciclina para verificar a expressão do plasmídeo. As células iniciaram o tratamento com puromicina (1µg/mL) a partir de 72 horas após a infecção. Conforme obteve-se estabilidade durante as passagens, foi possível obter células selecionadas com até 5µg/mL de puromicina.

Citometria de fluxo com separação celular por fluorescência

Além da seleção por antibióticos, foi empregada a seleção celular por marcadores de fluorescência, no caso do sh4 (sistema de dois plasmídeos), selecionando assim somente eventos EGFP⁺. Cerca de 6 milhões de células foram levadas ao citômetro da UNIFESP (FACS Calibur), submetidas a DOX. Lá foram estabelecidos padrões de granulosidade (SSC) e tamanho celular (FSC) para as hiPSC sem modificação genética (branco). A amostra contendo células

APÊNDICE A

EGFP⁺ foi selecionada e recolhida em tubo estéril, contabilizando cerca de 60.000- 400.000 células com 90% de pureza para o marcador EGFP⁺. A expansão para experimentos de diferenciação ocorreu com emprego de penicilina e estreptavidina 1% até que atingissem cerca de 4 milhões de células para que ocorresse a diferenciação, sem DOX. Na diferenciação, uma parte das células seria submetida a DOX e outra não, após a seleção por FACS.

Diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos

A análise da expressão do gene selecionado a partir do experimento de RNASeq foi observada também durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos, através de metadados e *in vitro*.

O protocolo de diferenciação de hiPSCs em cardiomiócitos *in vitro* foi esquematizado segundo a Figura 5. O protocolo utilizado utiliza diversas drogas para diferenciação e gera cardiomiócitos batendo em placa no 9º dia após o início da diferenciação. A figura abaixo demonstra uma linha do tempo didática do protocolo que foi empregado, bem como os reagentes utilizados:

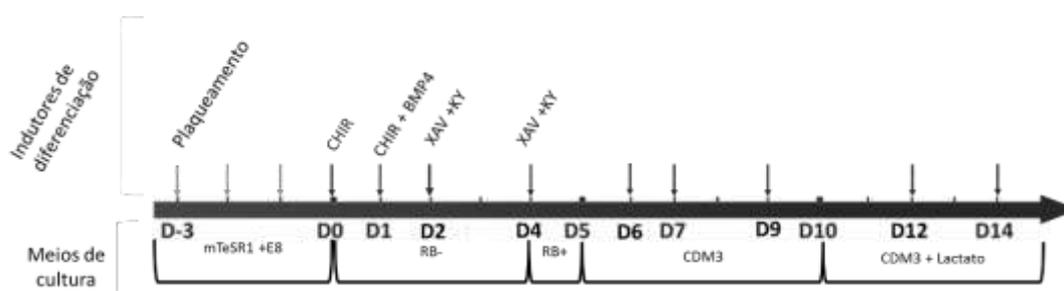


Figura 5: Representação temporal do curso da diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos. O processo é dividido em dias negativos (aqui representados em azul, como sendo ainda hiPSC até o dia 0). Após o dia 0 já há direcionamento cardíaco das células. As trocas de meio estão representadas pelas setas e os reagentes necessários para cada etapa estão listados acima da linha do tempo.

O protocolo é uma variação do protocolo utilizado pelo grupo do pesquisador Sean Palecek, e leva em consideração ativação e inibição da via da *Wnt*, gerando cardiomiócitos que iniciam a contrair espontaneamente em placa por volta do dia 9 (D9) do protocolo de diferenciação.

APÊNDICE A

As hiPSC foram cultivadas utilizando meio mTeSR em placas revestidas utilizando 150µg/mL de Geltrex. O início da diferenciação se dá quando ~90% de confluência for atingida (cerca de 3 dois dias após o dia de plaqueamento). No dia 0, as células foram lavadas suavemente com RPMI duas vezes e foi adicionado RPMI suplementado com B27 (B27 Minus Insulin (50x), Gibco /Life Technologies) sem insulina (RB-) contendo 9µM CHIR (InSolution™ GSK-3 Inhibitor XVI, CHIR99021 - CAS 252917-06-9 - Calbiochem). No dia 1, 20-22 horas após o início da diferenciação, metade do meio de cultura foi removido e o volume total foi completado usando RB - com 20ng/mL de BMP4 (BMP-4, CF, R & D Systems) e 9µM CHIR. No dia 2, as células foram lavadas utilizando RPMI e foi adicionado RB- com 2,5µM de KY (KY 02111, Cayman Chemical Company) e 2,5µM de XAV (XAV 939, Cayman Chemical Company). No dia 4, o meio foi substituído por RB + Insulina (RB +) (usando Suplemento B27 (50x), (Gibco) contendo 2,5µM de KY e 2,5µM de XAV. Nos dias 5 e 6 as células são mantidas em RB+ (com trocas de meio diárias). A partir do dia 7 até ao dia 10 utilizou-se meio RPMI contendo 213µg/mL de Vitamina C (ácido L-Ascórbico, Sigma-Aldrich) e 500µg /mL de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) (CDM3). Do dia 10 ao dia 20 utilizou-se CDM5- CDM3 + (suplemento antioxidante (1000x) Sigma-Aldrich) + aminoácidos não essenciais (Gibco) foi usado+ 1% P/S (penicilina estreptavidina)- no meio de cultura. A partir do dia 21, o meio foi trocado a cada dois dias.

No caso das células contendo o plasmídeo para inibição de POPDC3 (Mont-Sinai), a diferenciação foi feita na presença da doxíciclina. Em todos os experimentos a DOX foi adicionada aos controles, a fim de averiguar os efeitos exclusivos do knockdown, e não da DOX. O RNA foi coletado nos dias 0, 8, 10, 12 e dia 15 para quantificar os marcadores, indicadores de comprometimento cardiogênico. As proteínas foram coletadas no 10º dia da diferenciação e a marcação de imunofluorescência foi feita no 20º dia de diferenciação das células. Alguns vídeos foram gravados a fim de verificar a taxa de contratilidade celular durante a diferenciação.

APÊNDICE A

Processamento de vídeos de cardiomiócitos derivados de hiPSC

Os vídeos foram gravados em microscópio óptico em aumento de 100X, utilizando-se de uma câmera Nikon, e salvos em formato .avi. O software utilizado para calcular a frequência de batimento foi desenvolvido por William Scaff (aluno de doutorado da USP-POLI). A frequência de batimento é calculada como o número de vezes por minuto em que um conjunto de pixels (blocos realiza um trajeto cíclico. Para cada vídeo, cerca de 20 blocos são selecionados na imagem e a frequência de batimento deles foi plotada de forma individual. O valor médio dos blocos foi considerado como frequência de batimento do vídeo correspondente.

Processamento de imagens de cardiomiócitos derivados de hiPSC

As imagens de microscopia confocal obtidas a partir das diferenciações de hiPSC em cardiomiócitos no 20º dia, foram fotografadas pelo equipamento de HCS localizado no ICBIII-CEFAP em aumento de 200X. As fotos contêm 3 canais correspondentes aos comprimentos de onda de 488nm, 358nm (DAPI) e 555nm. A análise das imagens foi feita através de software desenvolvido por William Scaff (POLI-USP), seguindo os mesmos princípios do artigo já publicado anteriormente[13]. As máscaras foram criadas para marcações nucleares e citoplasmáticas. As intensidades mínimas de marcação foram definidas (*threshold*) e assim, somente os pixels com marcação mais intensa foram considerados, a imagem foi então binarizada. Atráves das coordenadas dos pixels, foi possível determinar células duplamente positivas para os marcadores considerados. A marcação dos marcadores foi considerada somente em cardiomiócitos (cTNT⁺).

4. Resultados

Modificação genética em hiPSC para inibição e superexpressão de POPDC3 humano

Otimização de doses de seleção de hiPSC por antibióticos

Os resultados abaixo mostram que as drogas (puromicina e higromicina) têm efeito de reduzir a viabilidade logo após sua adição na dose de 1 a 6ug/mL para a puromicina e de 50 a 300ug/mL para a higromicina (com duas horas já há redução da viabilidade). As doses máximas foram estabelecidas pela literatura. Entretanto, para a doxiciclina não foi observado tal fenômeno, ela se assemelha ao controle, conforme o desejado (Figura 6).

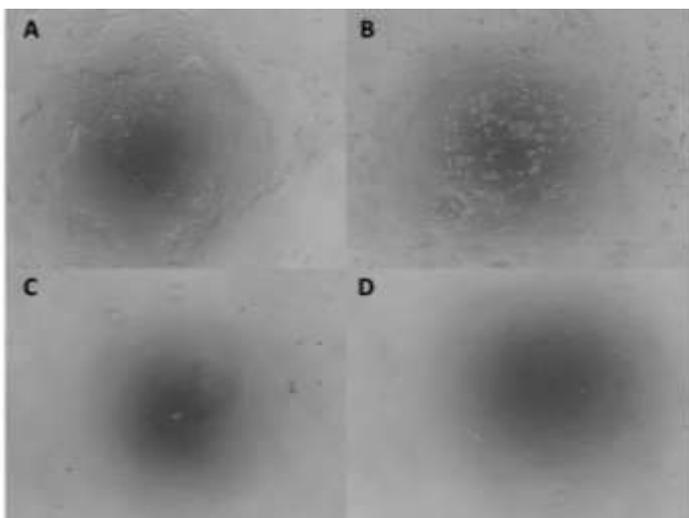


Figura 6: Microscopia de contraste de fase de células hiPSCs tratadas com antibióticos por 48h. (A) hiPSCs controle. (B) hiPSCs tratadas com 0,2ug/mL de doxiciclina. (C) hiPSCs tratadas com 1ug/mL de puromicina. (D) hiPSCs tratadas com 50ug/mL de higromicina. Aumento de 40X.

As doses de doxiciclina testadas demonstram que o crescimento das células não foi afetado pelo emprego da droga (em todas as doses testadas). Dessa forma, utilizamos a dose máxima (1ug/mL) para induzir a expressão dos genes contidos nos plasmídeos- Figura 7.

A dose de tratamento com higromicina escolhida foi de 50ug/mL para a seleção das células transfectadas com o plasmídeo de indução do sistema (pTET3G)- Figura 8. Já, dose de tratamento com puromicina escolhida foi de

APÊNDICE A

2ug/mL para a seleção das células transfectadas com o plasmídeo de expressão (pExpressão POPDC3: dTomato)- Figura 9.

APÊNDICE A

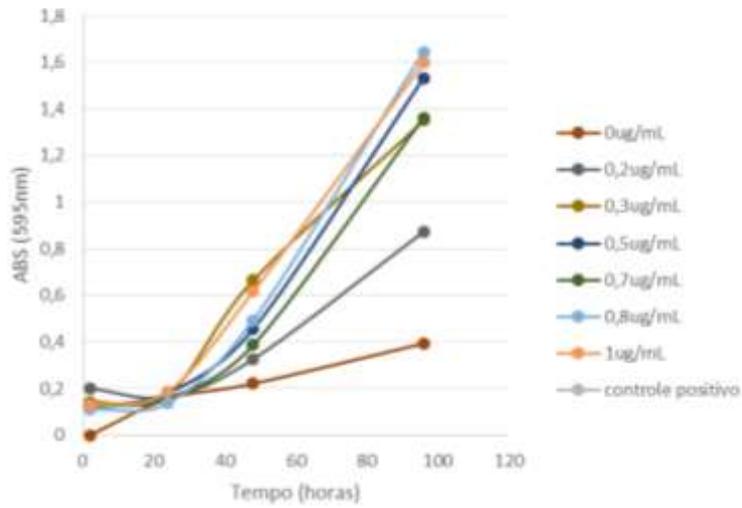


Figura 7: Ensaio de viabilidade celular em hiPSCs tratadas com doxiciclina.

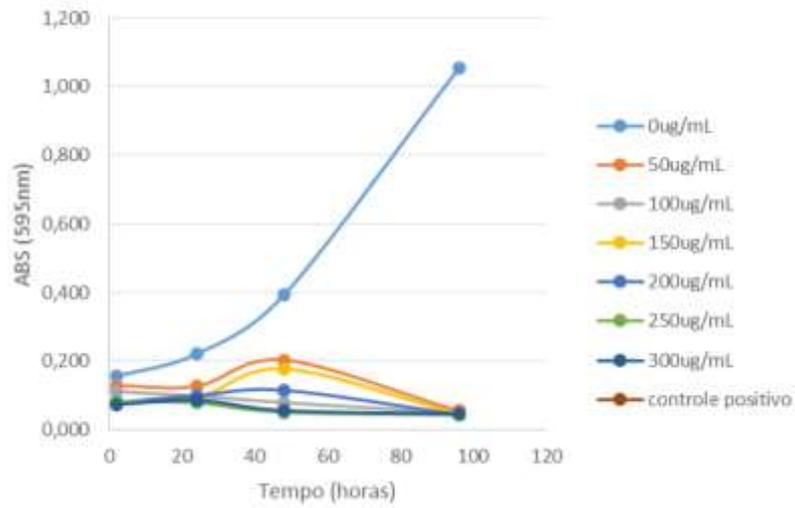


Figura 8: Ensaio de viabilidade celular em hiPSCs tratadas com higromicina B

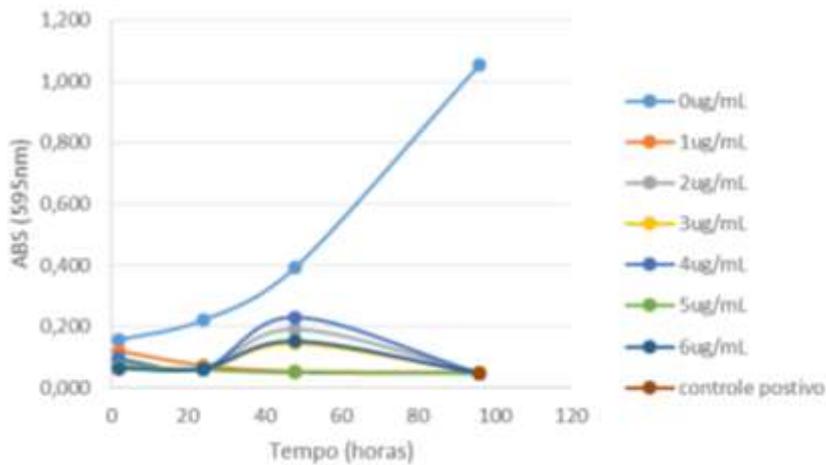


Figura 9: Ensaio de viabilidade celular em hiPSCs tratadas com puomicina.

APÊNDICE A

Transdução de hiPSC por Lipofectamine 3000

Baixas taxas de transfecção foram obtidas 48h após a transfecção com o reagente Lipofectamine 3000, sendo que apenas 3,41% das células internalizaram o plasmídeo TET3G e o plasmídeo Expressão e apenas 1,97% internalizaram o plasmídeo TET3G e o plasmídeo Inibição- (Figura 10 e Figura 11). Após 72h foram adicionados antibióticos de seleção e todas as células morreram. O procedimento foi repetido por duas vezes, obtendo-se resultados semelhantes. Portanto, partiu-se para outra abordagem de transfecção.

APÊNDICE A

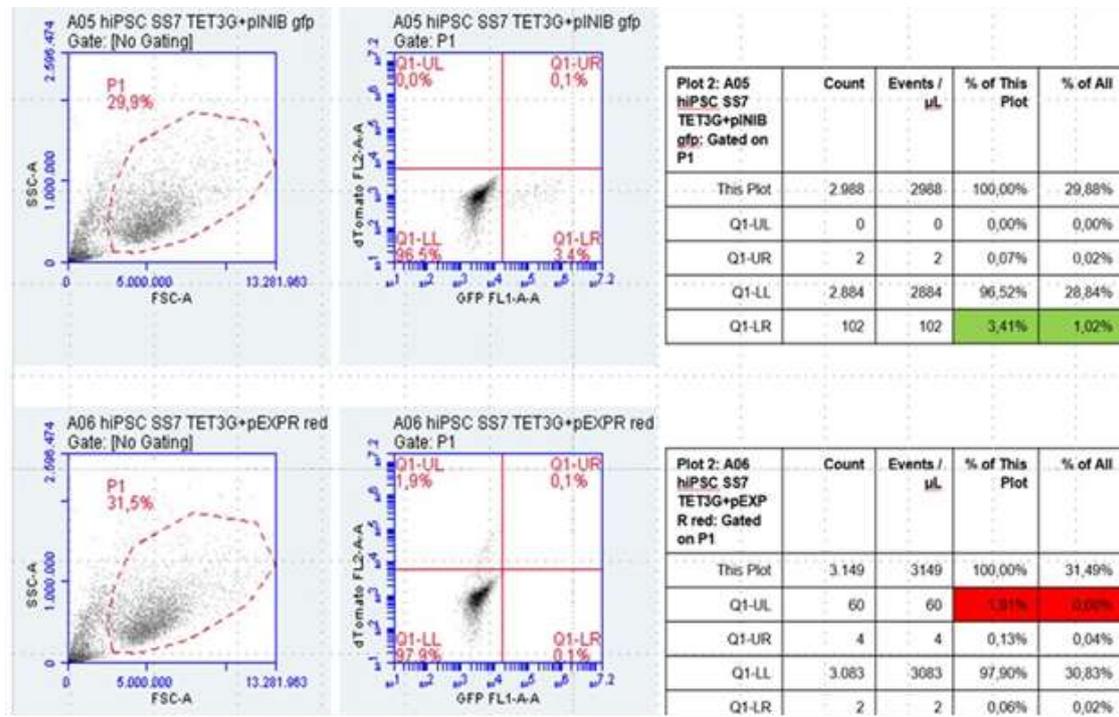


Figura 10: Avaliação das porcentagens de hiPSCs transfectadas com os plasmídeos de superexpressão e inibição do POPDC3.

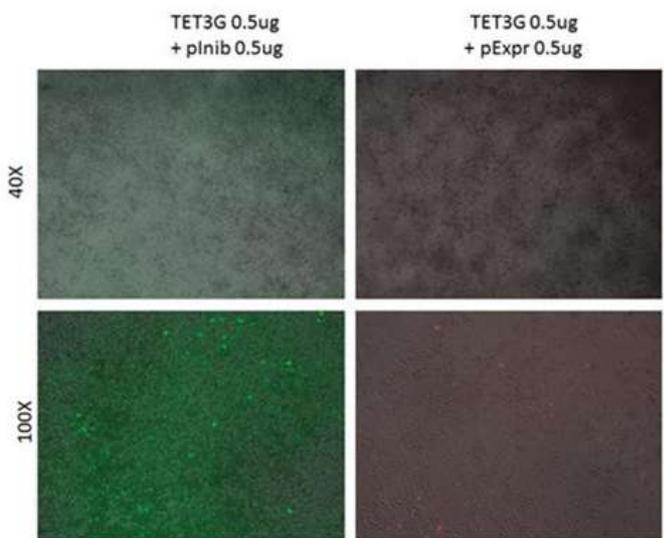


Figura 11: Avaliação da eficiência da transfecção de hiPSCs por fluorescência. Imagens obtidas em dois aumentos (40X e 100X).

APÊNDICE A

Transfecção de hiPSC por eletroporação

A padronização da intensidade de choques, número de pulsos indica que as melhores condições são de (1200V, 20ms e 1 pulso) e (1100V, 20ms, 2 pulsos), pois são as mais viáveis (mais fluorescente e com mais células aderidas) - (Figura 12).

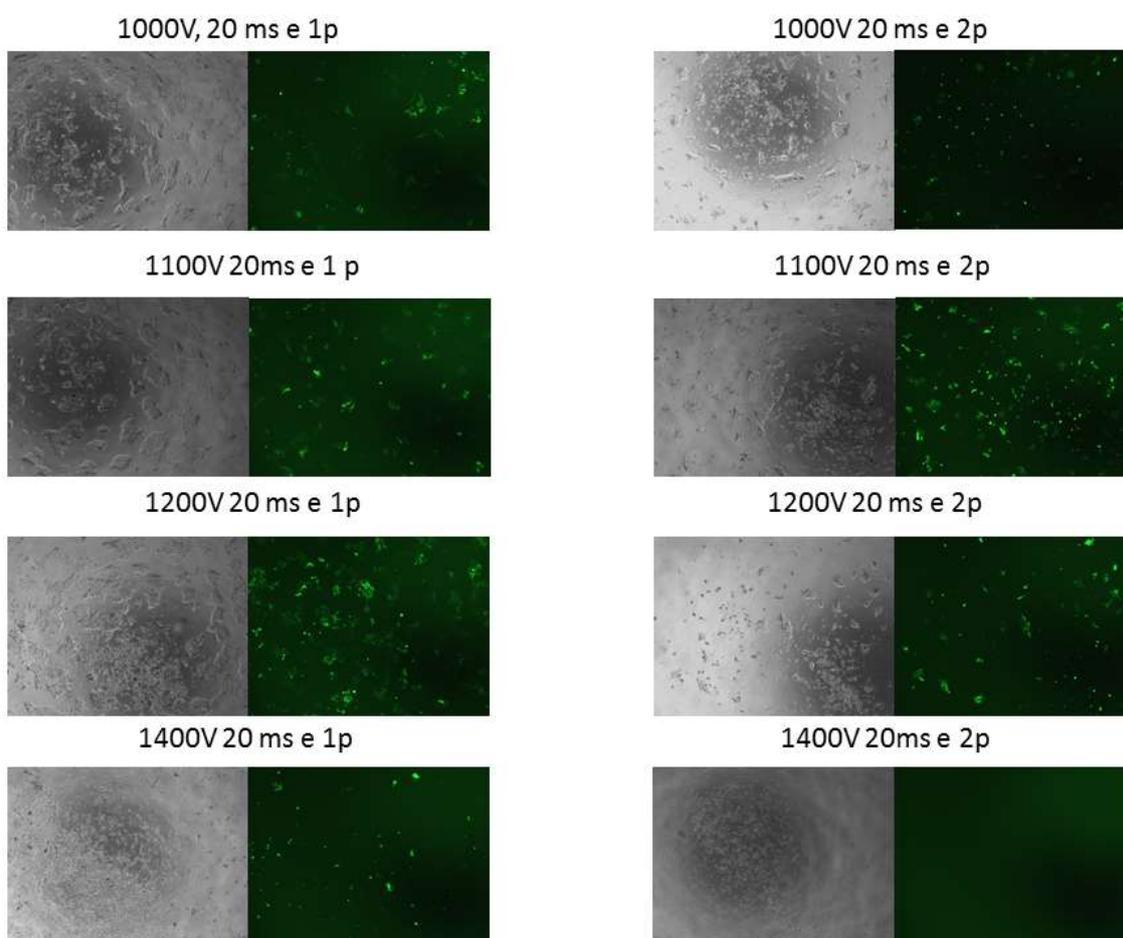


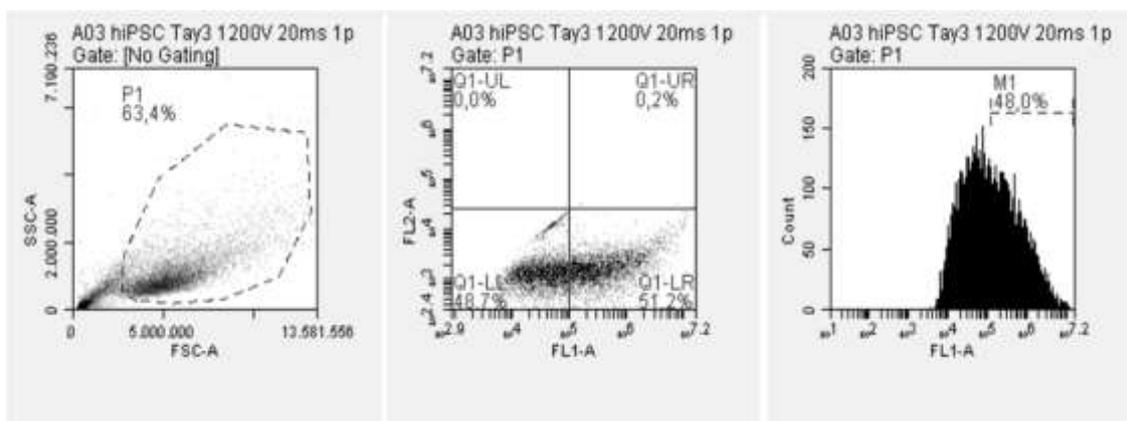
Figura 12: Microscopia de fluorescência de células hiPSCs eletroporadas com plasmídeo GFP e CAG (2 μ g total). Aumento de 40X.

Verificamos que os eventos que possuem perfil de células viáveis (alto FSC e médio-alto SSC) e que se encaixam no Gate P1 correspondem a 63,4% na condição 1200V, 20ms e 2 pulsos e apenas 22,8% na condição 1100V, 20ms e 2 pulsos. Apesar de a porcentagem de células positivas para GFP (FL-1), ter

APÊNDICE A

vido maior 1100V, 20ms e 2 pulsos (56,7%) do que em 1200V, 20ms e 2 pulsos (51,2%), escolhemos a última por se mostrar mais verde no geral (ou seja, $56,7\% \times 22,8\% < 63,4\% \times 51,2\%$). Portanto, escolhemos a condição de 1200V, 20ms e 2 pulsos com 2 μ g de material para os experimentos com os plasmídeos para os experimentos subsequentes (Figura 13).

1200V 20ms e 1 pulso



1100V 20ms e 2 pulsos

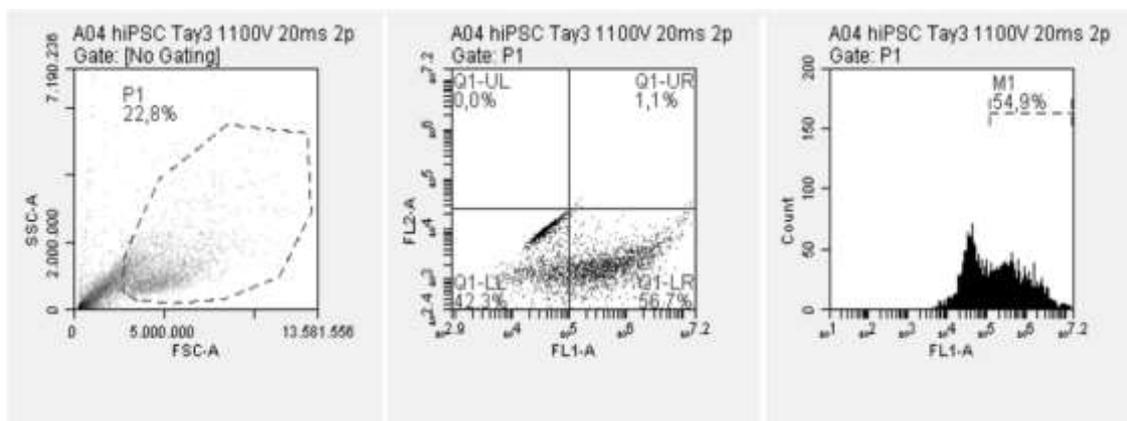


Figura 13: Citometria de fluxo das células hiPSCs. Comparação entre as porcentagens de eventos positivos para GFP (FL-1) na condição de eletroporação de 1200V, 20ms e 2 pulsos versus 1100V, 20ms e 2 pulsos.

Os resultados obtidos com os plasmídeos de interesse (vector builder), demonstram que grande parte das células não suporta o choque com 2 μ g de plasmídeos maiores que o GFP (3kb). Os plasmídeos adquiridos (pExpressão e pInibição) têm por volta de 9kb, portanto, e são 3 vezes maiores que o pmaxGFP.

APÊNDICE A

Foi feita uma repadronização para a co-transfecção dos plasmídeos de indução do sistema Tet-on e para superexpressão (considerando viáveis os choques com 1200V, 20ms, 1 pulso e 1µg de DNA total). O tratamento com antibióticos foi feito nas doses abaixo (que correspondem a um quarto da dose testada pelo método do MTT)-Tabela 4 ,porém houveram poucas células sobreviventes.

Tabela 4: Doses utilizadas de antibióticos de seleção em hiPSCs eletroporadas.

PUROMICINA (µg/mL)	Blasticidina (µg/mL)	HIGROMICINA (µg/mL)
0,5	2,5	12,5

Apesar de todos esforços, as células demoraram 48 horas para se recuperar da eletroporação e mediante a adição de antibióticos não tivemos nenhuma população resistente, após 96 horas de tratamento com antibióticos- Figura 14.

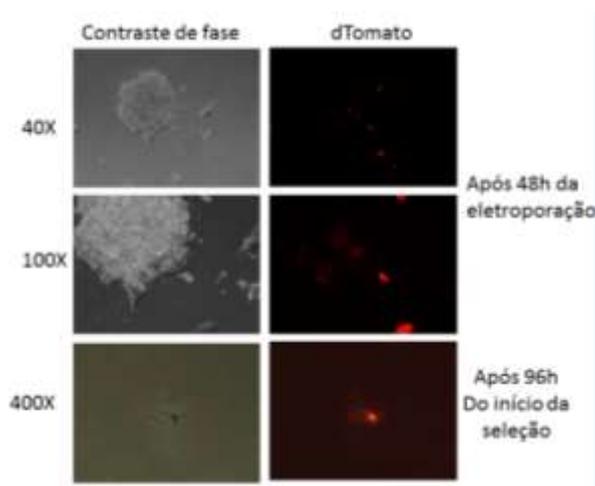


Figura 14: Células-tronco humanas de pluripotência induzida que foram eletroporadas (1200V, 20ms e 1 pulso) com 1,5ug de massa de plasmídeos total. A seleção com puromicina foi prejudicial às células (imagens inferiores).

APÊNDICE A

Devido à baixa taxa de sobrevivência células após a eletroporação e seleção por antibióticos, foram empregadas partículas virais contendo os plasmídeos para infectar as hiPSCs.

Infecção de hiPSCs por partículas virais

A infecção por lentivírus se mostrou a alternativa mais adequada para realizar knock-in e knockout do gene POPDC3, pois nesse caso foi possível estabelecer a seleção das células com fluorescência, e conseqüentemente contenham expressão do inserto de interesse (shRNA no caso da inibição e o mRNA do POPDC3 humano no caso da superexpressão). No caso de co-infecção dos dois plasmídeos comerciais, as doses de antibióticos utilizadas para selecionar as células - Tabela 5) que continham os dois plasmídeos foram estabelecidas segundo experimento de viabilidade células.

As células foram infectadas, um dia após o plaqueamento, com partículas virais. Para visualização da fluorescência, foi adicionada a doxiciclina 3-4 dias após a infecção. O aparecimento da fluorescência se deu dois dias após o uso da doxiciclina, e esperou-se quatro dias para início a seleção por antibióticos. Tanto para as hiPSCs com superexpressão de POPDC3, quanto para as que têm o POPDC3 inibido, o processo de seleção ocorreu cronologicamente de forma semelhante.

Tabela 5: Doses utilizadas na seleção de hiPSCs infectadas pelo sistema tet-on de dois plasmídeos

PUROMICINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Blasticidina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HIGROMICINA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0,5	6,25	25

No caso das células com superexpressão, as células foram co-selecionadas utilizando-se higromicina e puromicina e no caso das células com inibição de POPDC3, as células foram co-selecionadas utilizando-se higromicina e blasticidina. A morfologia celular e as intensidades de fluorescências foram registradas ao longo do tempo e constam nas Figura 15 e Figura 16.

APÊNDICE A

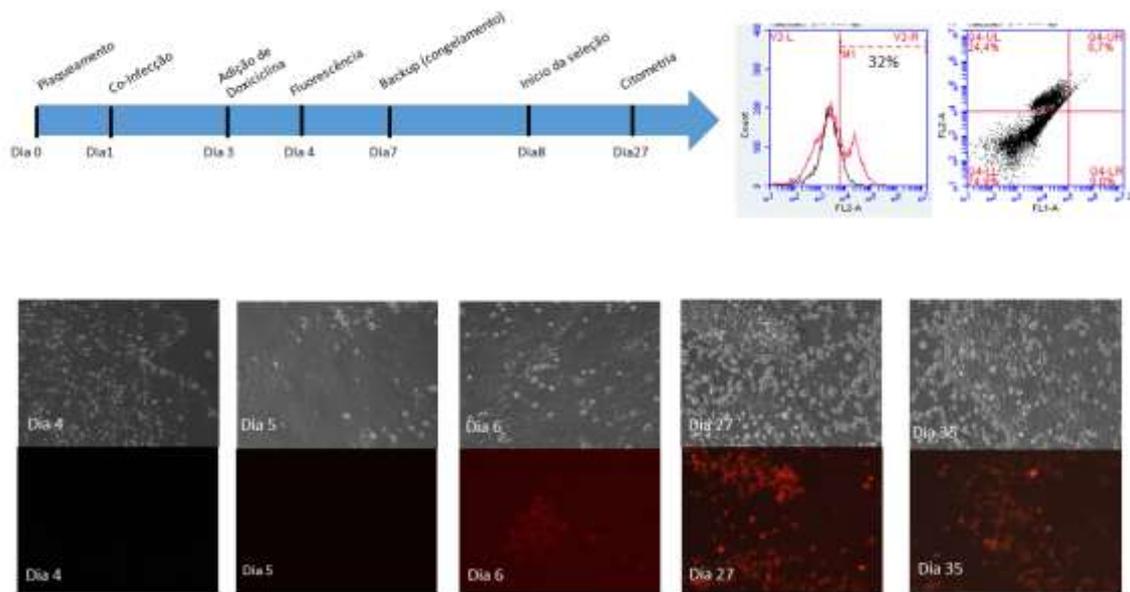


Figura 15: Acompanhamento da fluorescência das hiPSCs infectadas com o lentivírus para superexpressão de POPDC3 (dTomato⁺). A esquerda é possível verificar a porcentagem de células fluorescentes após 27 dias de seleção em pulsos (a citometria tem correspondência com a foto do Dia 35).

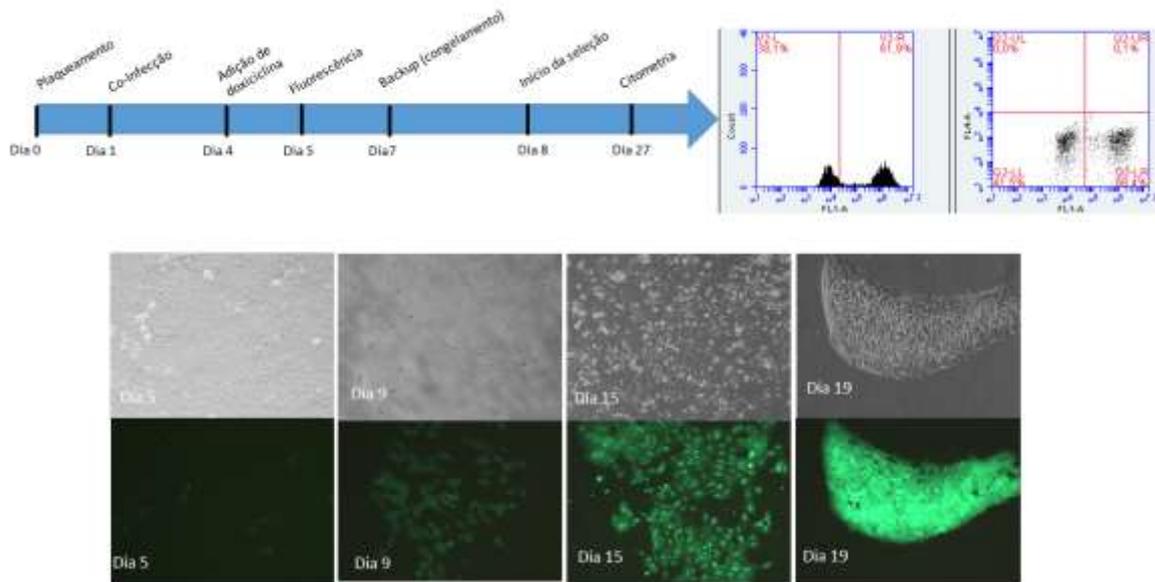
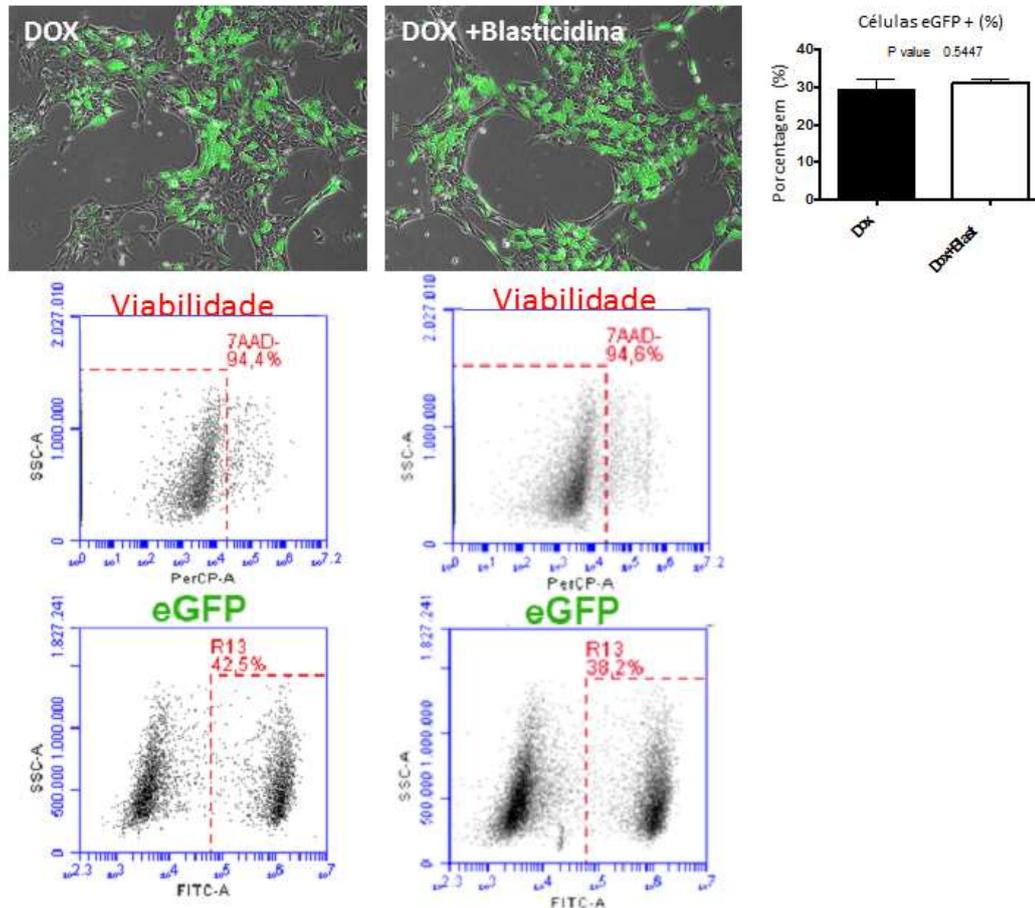


Figura 16: Acompanhamento da fluorescência das hiPSCs infectadas com o lentivírus para inibição de POPDC3 (EGFP⁺), sistema tet-on de dois vírus. A esquerda é possível verificar a porcentagem de células fluorescentes após 19 dias de seleção.

Os experimentos de transdução de hiPSCs com plasmídeos tet-on (dois plasmídeos distintos, um para o sistema, e outro com marcador fluorescente e com o transgene) proporcionaram obtenção de populações (“pools”) com 32% de células dTomato⁺ e com 58% de células EGFP⁺. Esse resultado foi possível através da co-seleção por antibióticos higromicina e blasticidina no caso do

APÊNDICE A

knockdown, e higromicina e puromicina no caso do da superexpressão de POPDC3. Devido aos baixos níveis de pureza obtidos com as co-seleções (Figura 17), alguns experimentos de clonagem foram delineados (por diluição



limitante e por pick colony- Figura 18), porém foi erificado pouca viabilidade celular e diferenciação espontânea.

Figura 17: Experimentos de viabilidade celular de hiPSC selecionadas por blasticidina e higromicina, que contém shRNA para inibição de POPDC3 (sh4)- sistema tet-on de dois plasmídeos com EGFP expresso mediante adição de DOX (não constitutivo).

As células EGFP⁺ parecem estar excluindo ou suprimindo a expressão de EGFP (com característica de população mista, sem colônias definidas).

Os experimentos de seleção de clones por *pick colony* geraram subclones eGFP positivos (11.1%)- (n=1 em 9), partindo-se de célula única. A eficiência de clonagem foi baixa (apenas 9 poços dentre 384 demonstraram crescimento para expansão celular. A presença de *naive-cells* (células pequenas com crescimento

APÊNDICE A

em colônias com bordas definidas e relação núcleo citoplasmática elevada) ocorreu somente em um terço dos clones que foram expandidos, indicando que o estado *primed-cells* (células com maior grau de comprometimento/especificação em alguma linhagem, que crescem de forma mais esparsa em cultivo *in vitro*) foi mais proeminente, sugerindo que houve diferenciação espontânea.

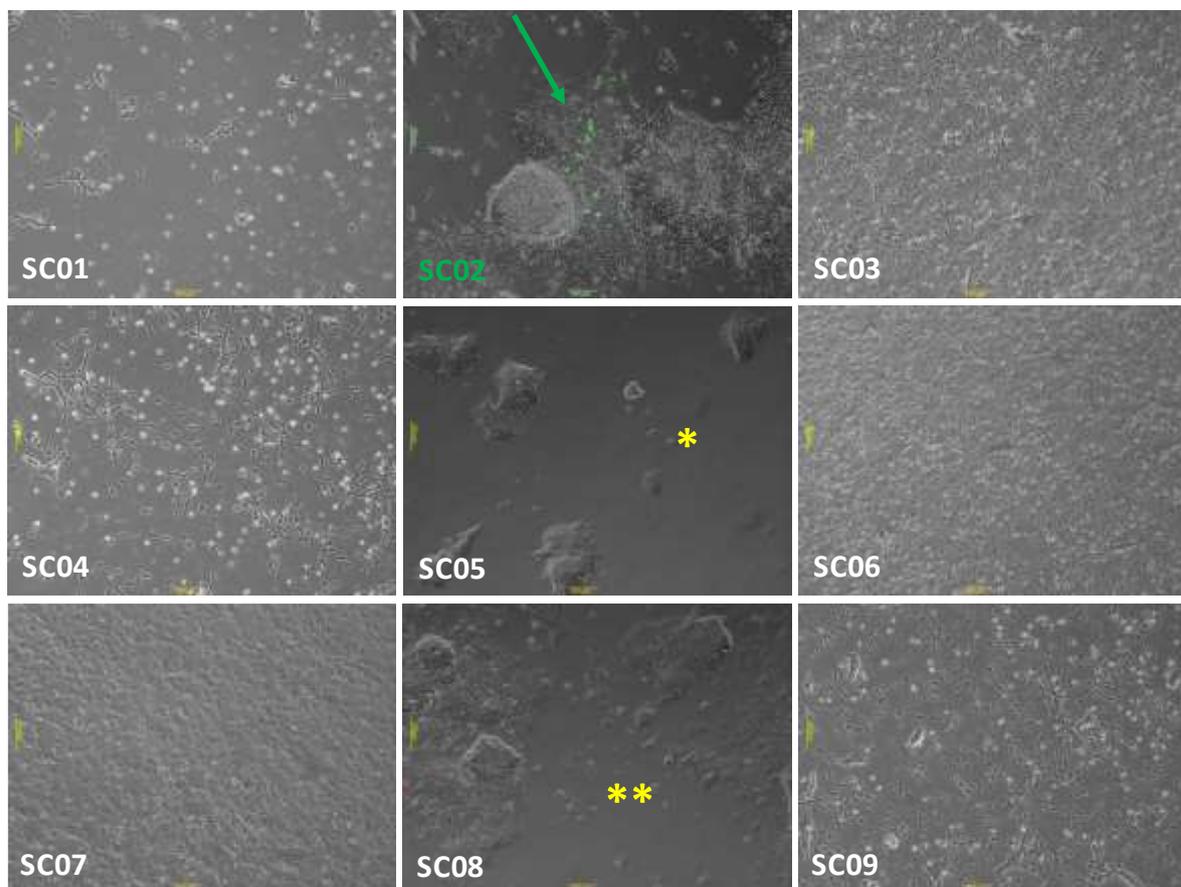


Figura 18: Clones obtidos em experimentos de pick colony de hiPSC contendo o plasmídeo para inibição de POPDC3 humano.⁵

Além disso, devido a presença de marcadores fluorescentes, houve tentativa de separação das células por FACS, porém houve perda das porcentagens de células fluorescentes após plaqueamento para a diferenciação.

APÊNDICE A

Cerca de 6 a 8 milhões de células hiPSC geneticamente modificadas⁵ para conter as sequências de sh4-POPDC3, foram levadas até o FACS (citômetro de separação de células por fluorescência), após tratamento com DOX por pelo menos dois dias. As células haviam sido previamente selecionadas através de dois antibióticos (higromicina e blasticidina). O nível de pureza exigido foi maior que 90% após o experimento de seleção. Cerca de 10-40% das células retornaram à cultura celular, mediante tratamento com antibióticos (penicilina e estreptomicina-1%) por 2 dias. A expansão celular ocorreu de forma a manter um poço com DOX, que foi mensurado no momento do plaqueamento das diferenciações. Em todos os casos, os níveis de expressão de EGFP decaíram após a expansão celular (52%, 80% e 30%), porém, mesmo assim foram feitos os plaqueamento das diferenciações.

⁵ As células hiPSC foram infectadas com vírus contendo plasmídeo Tet-on (responsivo a DOX e que confere resistência a higromicina) e outro para inibição do POPDC3 (que contém TRE3G, sendo ativado pelo primeiro plasmídeo na presença de DOX) e conferindo expressão de shRNA-4 POPDC3 e EGFP às hiPSCs.

APÊNDICE A

Apesar disso, algumas células provenientes do *sorting* celular (EGFP⁺ e que continham o shRNA) foram postas a diferenciar. Os dados referentes a morfologia dos cardiomiócitos obtidos nesses experimentos estão resumidos na Tabela 6 do Item Diferenciação das hiPSC modificadas geneticamente.

As células hiPS também foram infectadas por vírus contendo plasmídeo para inibição de POPDC3, EGFP expresso constitutivamente, e shRNA expresso de forma condicional (somente na presença de DOX). Esse plasmídeo, trazido do Mout-Sinai University foi trazido pelo post-Doc Rafael Dariolli e permite o emprego do sistema tet-on com somente um plasmídeo. Nesse caso, só foi necessária uma droga para seleção, a puromicina. Foram criadas quatro linhagens de hiPSC, cada uma contendo uma sequência de shRNA para depleção do mRNA de POPDC3 humano. A produção de partículas virais por células HEK-293t foi observada em microscópio de fluorescência- Figura 19.

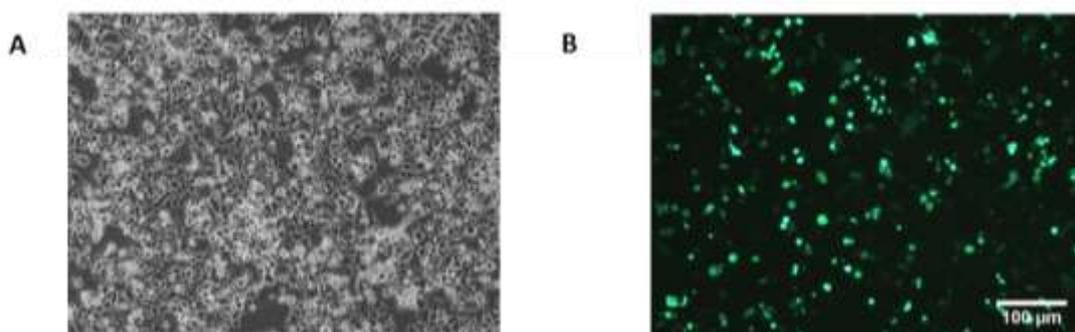


Figura 19: Produção de lentivírus para inibição de POPDC3 humano por células HEK-293t.⁶

A seleção das células hiPS transduzidas por lentivírus contendo plasmídeo para inibição de POPDC3 humano, correspondentes ao sistema de 1 plasmídeo único, ocorreu através do antibiótico puromicina (1 µg/mL) e observamos células hiPSC eGFP durante a seleção- Figura 20.

⁶ Figura 19: Produção de lentivírus para inibição de POPDC3 humano por células HEK-293t.

A- Microscopia de contraste de fase de células HEK-293t transfectadas com plasmídeos para geração das partículas virais. B- Microscopia de fluorescência para observação do EGFP, foto obtida sem adição de DOX.

APÊNDICE A

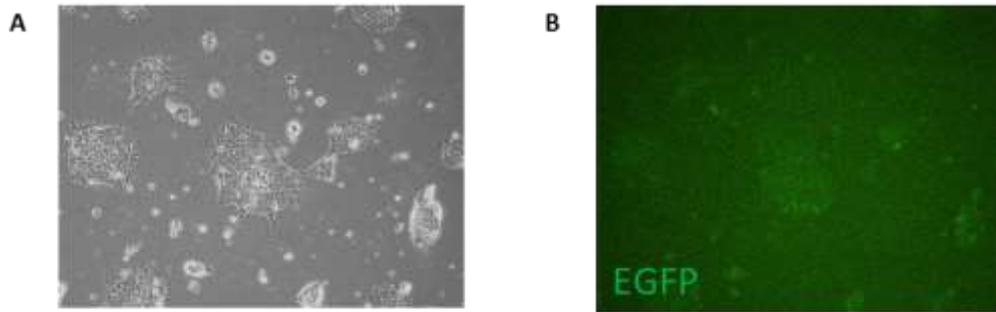


Figura 20: Transdução de lentivirus contendo plasmídeo para inibição de POPDC3 (sh2).⁷

Também foi possível passar as células no citômetro para determinar o grau de pureza de células EGFP+ (. A porcentagem de células EGFP+ foi de aproximadamente 60% (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) para todos os quatro shorthairpin selecionados com puromicina a 1ug/mL. Apesar de não ser 100% puras, não se observou morte celular após adição da droga, enquanto que no controle não havia mais viabilidade. A intensidade de fluorescência no filtro FL-1 (correspondente ao EGFP) demonstra que houve um aumento de cerca de 10X de EGFP após a seleção com puromicina.

⁷ A- Microscopia de contraste de fase de células hiPSC transduzidas com partículas virais. B- Microscopia de fluorescência para observação do EGFP, foto obtida sem adição de DOX.

APÊNDICE A

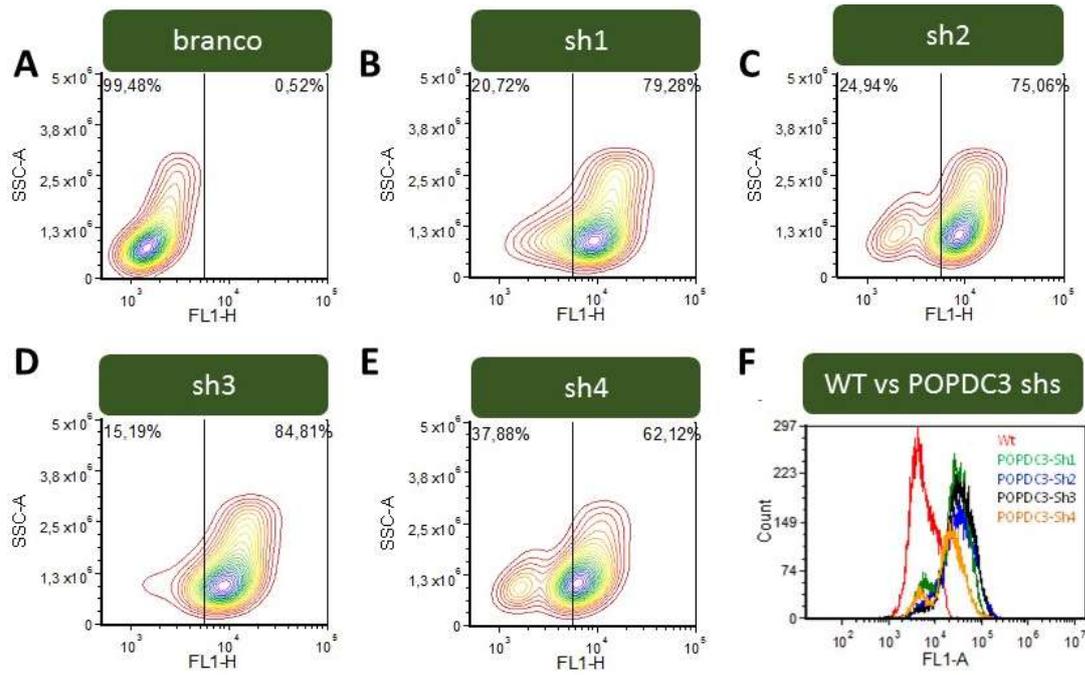


Figura 21: Citometria de fluxo de células hiPSC, visualizadas segundo sua granulosidade (SSC-A) e fluorescência no comprimento de onda do EGFP (correspondente ao filtro FL-1).⁸

Acreditamos que a população estava pura, porém algumas células removeram a proteína EGFP por ser tóxica para a célula, como já foi observado por outros autores [14]. Algumas diferenciações foram executadas com essas 4 linhagens, cada uma contendo um shorthairpin, a fim de estabelecer o mais eficiente para diminuir a expressão de POPDC3, ou seja, tais células seguiram sem ou com DOX desde o início da diferenciação (dia -2) até o 10^o dia da diferenciação.

⁸ A- Células hiPSCs sem shRNA; (B-E) - Células hiPSCs com shRNA para inibição de POPDC3- sendo 4 sequencias distintas; F- Histograma do número de células de todos os grupos e suas intensidades de fluorescência em FL-1

APÊNDICE A

Diferenciação das hiPSC modificadas geneticamente

Diferenciação das células transduzidas com plasmídeos tet-on para knockdown de POPDC3- 2 plasmídeos

As células hiPSCs que sofreram *sorting* (pertencentes ao sistema de dois plasmídeos tet-on, foram selecionadas com combinação de higromicina e blastomicina e por FACS- restando pureza maior que 90% de EGFP+). Estas, foram diferenciadas em cardiomiócitos seguindo o protocolo de diferenciação, utilizando 6µM de CHIR em todas as diferenciações (n=3). O processo foi executado com um pool de células⁹ EGFP⁺ e não EGFP⁺ no mesmo cultivo.

As células EGFP⁺ (contendo o shRNA ativado por DOX) foram capazes de permanecer aderidas até o final do protocolo de diferenciação (dia 8), e aparentemente mostram-se menos maduras durante o processo em relação às células não EGFP⁺ (n=1 e n=2). Tabela a seguir resume os achados de cada uma dessas diferenciações:

⁹ Aproximadamente 50% das células contém shRNA ativado por DOX, e portanto, se mostram EGFP⁺ (quando visualizadas por microscópio de fluorescência ou por citometria) e aproximadamente 50% das células que não contém o shRNA, e que portanto quando cultivadas na presença de DOX não são EGFP⁺.

APÊNDICE A

Tabela 6: Resumo dos achados morfológicos dos hiPSC-CMs provenientes do *sorting* de células EGFP+ (tet-on com dois plasmídeos)

<i>Diferenciação</i>	<i>Porcentagem de células EGFP+</i>	<i>Resultado</i>
1	52%	Células com shRNA ativo apresentam contratilidade inicial no mesmo dia das células sem shRNA ativo (dia 6). Após o dia 10, as células com shRNA ativo apresentam frequência de batimento superior à daquela observada pelas células com shRNA inativo
2	80%	Células com shRNA ativo apresentam contratilidade atrasada (dia 9) em relação às células com shRNA inativo (dia 8). Apenas houveram beating foci na condição com shRNA ativo, enquanto a placa toda apresentava contratilidade na condição do shRNA inativo.
3	30%	Células com shRNA ativo apresentam contratilidade no dia 8 em comparação com a condição com shRNA inativo (sem contratilidade aparente no mesmo dia da diferenciação).

Observamos uma tendência (n=1 e n=2) de imaturidade na contratilidade celular na condição em que o shRNA está ativo, pois a frequência de batimento das células com DOX era superior às células controle, e também iniciaram a contração antes dos controles. Essas observações podem indicar que a inibição do POPDC3 pode afetar a contratilidade celular. A conclusão da terceira diferenciação (n=3) pode ter sido oposta em relação ao n=1 e n=2, devido à baixa porcentagem de células EGFP+ (assim o efeito do shRNA está diluído e as células contraem normalmente).

APÊNDICE A

Diferenciação das células transduzidas com plasmídeos tet-on para knockdown de POPDC3- 1 plasmídeo único

Ao final da seleção com puromicina, na dose de 1 µg/mL por 15 dias, foi possível iniciar diferenciações com cada um dos quatro shRNAs a fim de estabelecer qual deles melhor depletava a expressão de POPDC3. A diferenciação foi conduzida de forma que cada shRNA foi comparado na condição sem DOX e com DOX até o 10º dia da diferenciação. O PCR demonstra que o sh1 é capaz de diminuir a expressão de POPDC3 em cerca de 13% no dia 10 da diferenciação, enquanto que o sh2 é capaz de reduzir em 42% a expressão de POPDC3 no dia 10. Os sh3 e sh4 não foram capazes de diminuir a expressão de POPDC3 de forma significativa. (Figura 22)

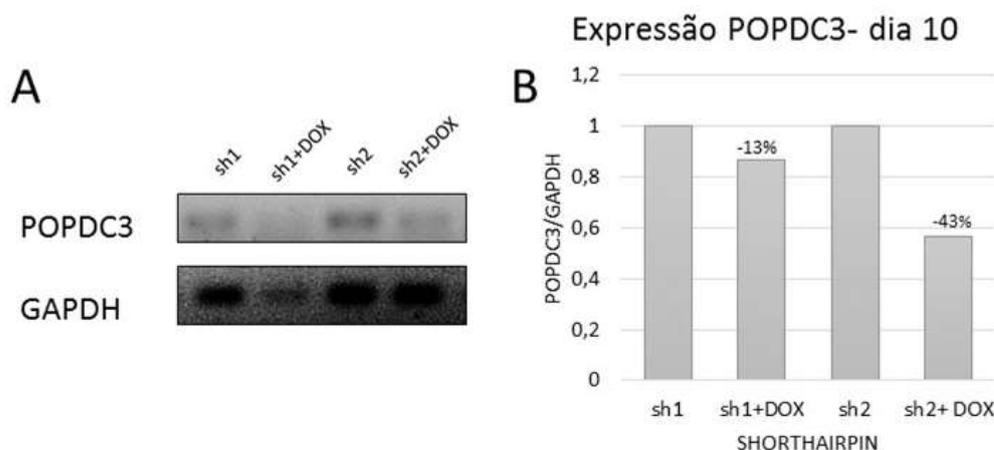


Figura 22: Expressão de hPOPDC3 (RT-PCR) no 10º da diferenciação de CM-hiPSCs oriundos de linhagens modificadas por sh1 e sh2. (n=2)

Além desses parâmetros de frequência, foi possível sugerir a presença de alguns marcadores da cardiogênese (n=2) por Western Blotting nas células com *shorthairpin* 1 e 2, ativados (DOX) ou sem DOX (CTRL) no 10º dia de diferenciação (Figura 23). A expressão de cTNT foi diminuída em sh1 DOX,

APÊNDICE A

indicando que as células com diminuição de POPDC3 podem estar menos diferenciadas em relação a mesma linhagem CTRL. A expressão de NKx2.5 está em média 2,84 vezes menor no grupo sh1 DOX em relação ao seu controle (sh1 CTRL). Já, no caso do sh2, a expressão de Nkx2.5, está aumentada em sh2 DOX em relação ao seu controle (sh2 CTRL), em 1,57 vezes, em média. A expressão de Cx43, está menor em sh1 DOX em relação ao seu controle (sh1 CTRL), em 35%, em média. Já no caso de sh2, a expressão de Cx43 está levemente aumentada em 24% aproximadamente em sh2 DOX, quando comparado ao seu controle (sh2 CTRL). A expressão de HCN4 está maior no grupo sh2 DOX, em média, cerca de 1,78 vezes em relação ao grupo controle (sh2 CTRL).

APÊNDICE A

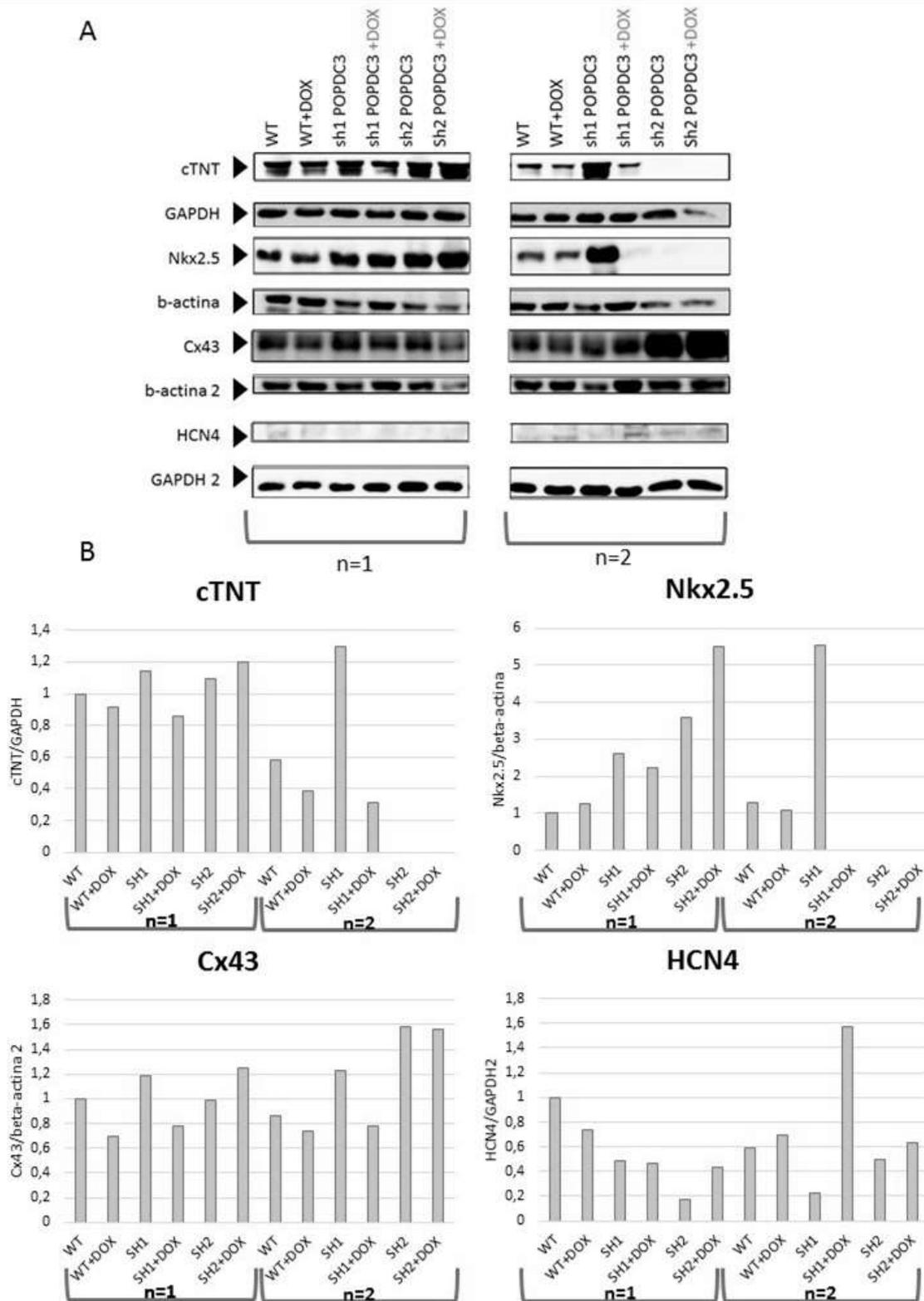


Figura 23: Expressão de marcadores cardiogênicos em hiPSC-CMS em 10º dia de diferenciação, oriundos das linhagens WT, sh1 e sh2 por Western Blotting.(n=2)

APÊNDICE A

Tabela 7: Expressão relativa de proteínas cardíacas em hiPSC-CMs no 10º dia da diferenciação. (Fold change em relação ao WT)

	WT	WT+DOX	SH1	SH1+DOX	SH2	SH2+DOX
CTNT	1	0,78	1,62	0,68	1,1	1,2
NKX2.5	1	1,07	3,37	1,14	3,5	5,5
CX43	1	0,78	1,34	0,88	1,48	1,59
HCN4	1	0,91	0,39	1,57	0,52	0,74

Com base em todos os dados apresentados até o momento, os shortpins 1 e 2, que foram os mais eficazes em diminuir a expressão de POPDC3, podem sugerir que afetem o comprometimento cardiogênico (Tabela 7). Então, as células com sh1 e sh2 foram superselecionadas com puromicina de 5µg/mL, a fim de evidenciar ainda mais as diferenças observadas entre células tratadas com DOX e sem DOX (CTRL), pois a quantidade de cópias do plasmídeo presente em cada célula influencia diretamente na capacidade de knockdown.

Assim sendo, as hiPSCs sh1 e sh2 superselecionadas (puromicina 5µg/mL) foram postas a diferenciar até o 12º e 15º dia da diferenciação para aquisição de fenótipos. A fim de averiguar qual momento a adição de DOX proporciona o knockdown mais proeminente, adicionamos a DOX em diversos momentos das diferenciação -dia -2(correspondente ao plaqueamento), dia 5 (5º dia após o início das drogas e meios diferenciais) e dia 8 (8º dia após o início das drogas e meios diferenciais) e mensuramos a expressão de POPDC3 por qPCR- Figura 24. Foi observado que sh1 foi capaz de diminuir a expressão de POPDC3 em apenas 4% no 12º dia da diferenciação, quando na presença de DOX desde o dia 8 da diferenciação. Já para o sh2 a redução observada quando da adição da DOX desde o dia 8 foi de 46% em relação aos seus respectivos

APÊNDICE A

controles sem DOX. Assim sendo, o sh2 se mostrou a sequência mais eficiente em promover o knockdown de POPDC3, durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos.

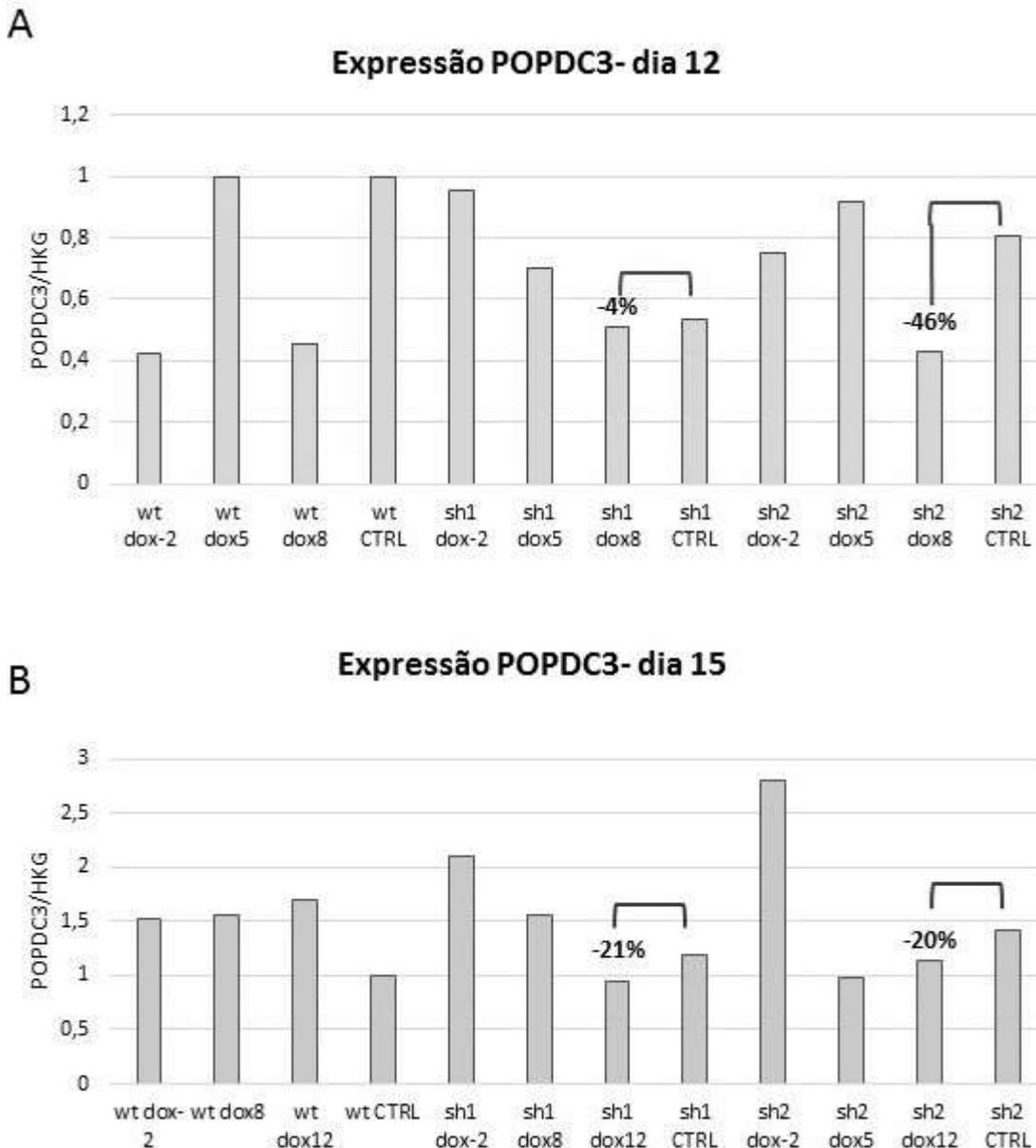


Figura 24: Nível de expressão de POPDC3 no 12º da diferenciação (A) e no 15º dia da diferenciação (B), mensurado por qPCR. (n=3). Sem diferença estatística considerando testes T de Student e intervalos de confiança de 90%.

Durante a diferenciação, observamos que a morfologia das células diferenciadas se compara com células controle (sem modificação genética), e o

APÊNDICE A

início dos batimentos também foi semelhante ao controle (WT). Pode-se sugerir que com a presença de POPDC3 a frequência de contração celular observada nas células sh2 DOX8 é menor que no controle (WT) durante todos os momentos avaliados da diferenciação-Figura 25. Dentre as células com DOX desde o dia 5 da diferenciação, aquelas que possuem o sh2, tem menor frequência de contração observada no dia 11 da diferenciação (seta preta). A menor frequência observada foi a de sh2 com DOX desde o dia 8 (compatível com a melhor eficiência de Knockdown por qPCR- seta verde) - Figura 26.

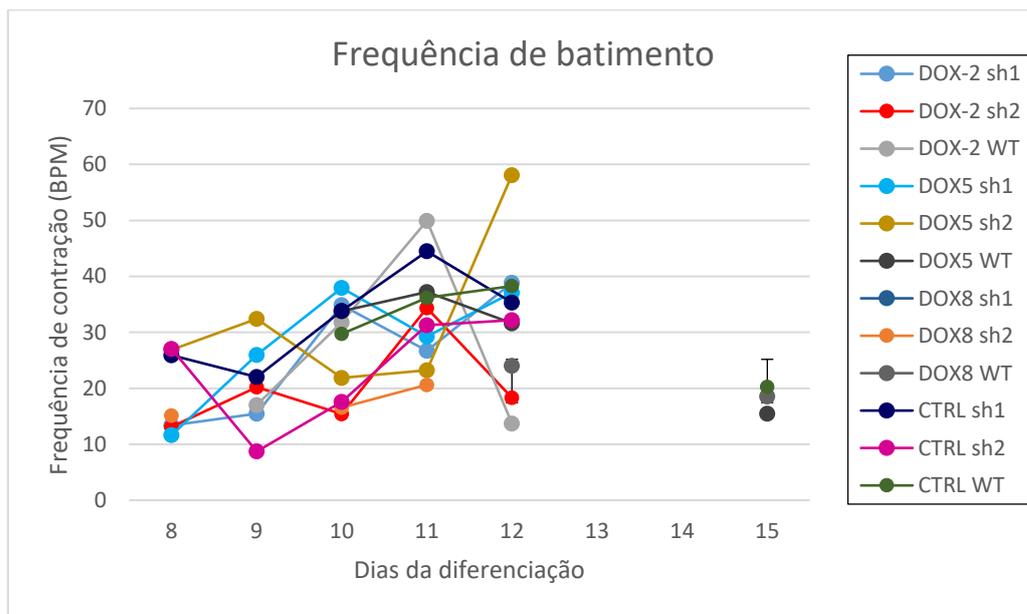


Figura 25: Frequência de contração celular de hiPSC-CMs oriundos das linhagens WT, sh1 e sh2.

APÊNDICE A

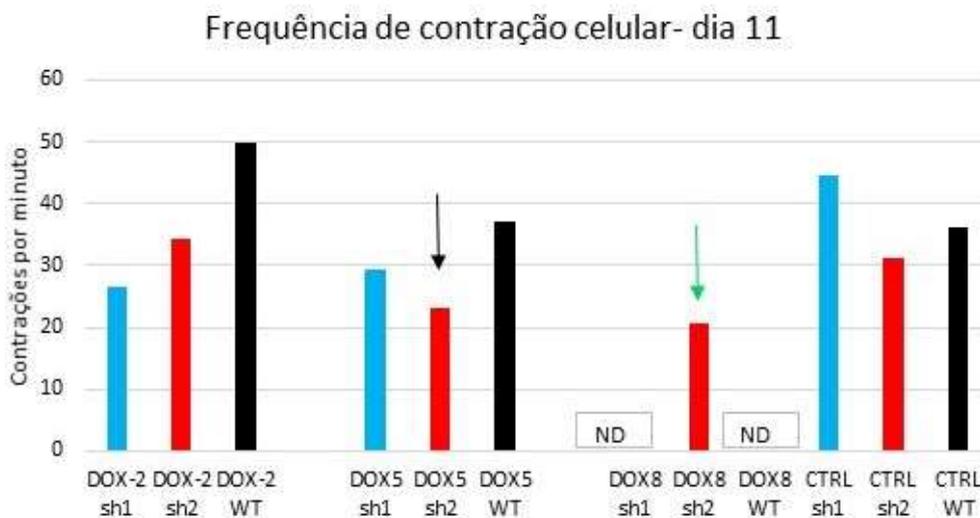


Figura 26: Frequência de batimento da monocamada celular gerada no 11º dia da diferenciação

A análise da arritmia das células com sh2 POPDC3, quando comparada a células sh2 DOX (shRNA ativado contra POPDC3) sugere que

A expressão de BVES, POPDC2, troponinas, miosinas e conexinas (Cx43 e Cx45) foi mensurada por qPCR.

A expressão dos genes da família Popeye está representada na Figura 27. No grupo sh2, a expressão de POPDC1 não ficou diminuída nos casos em que houve adição de DOX. Para as células controle (WT), a expressão de POPDC1 também não afetada pela adição de DOX. No grupo sh2, a expressão de POPDC2 diminuiu levemente quando houve adição de DOX no dia 8, sendo maior a diferença observada no 12º dia da diferenciação (FC= -1,77, p-valor não significativo com intervalo de confiança de 90% (n=3). Para as células controle, a expressão de POPDC2 praticamente não foi afetada pela adição de DOX. No grupo sh2, a expressão de POPDC3 diminuiu quando houve adição de DOX no dia 8 (observada no 12º dia da diferenciação), conforme verificado na Figura 24

APÊNDICE A

(FC= -18,7; , p-valor não significativo com intervalo de confiança de 90% (n=3).

Para as células controle (WT), a expressão de POPDC3 parece ser afetada pela adição de DOX. No entanto, as barras de desvio padrão para o grupo WT estão maiores do que em relação ao sh2, assim, as diferenças existentes no grupo sh2 são mais confiáveis do que as existentes nas amostras WT.

APÊNDICE A

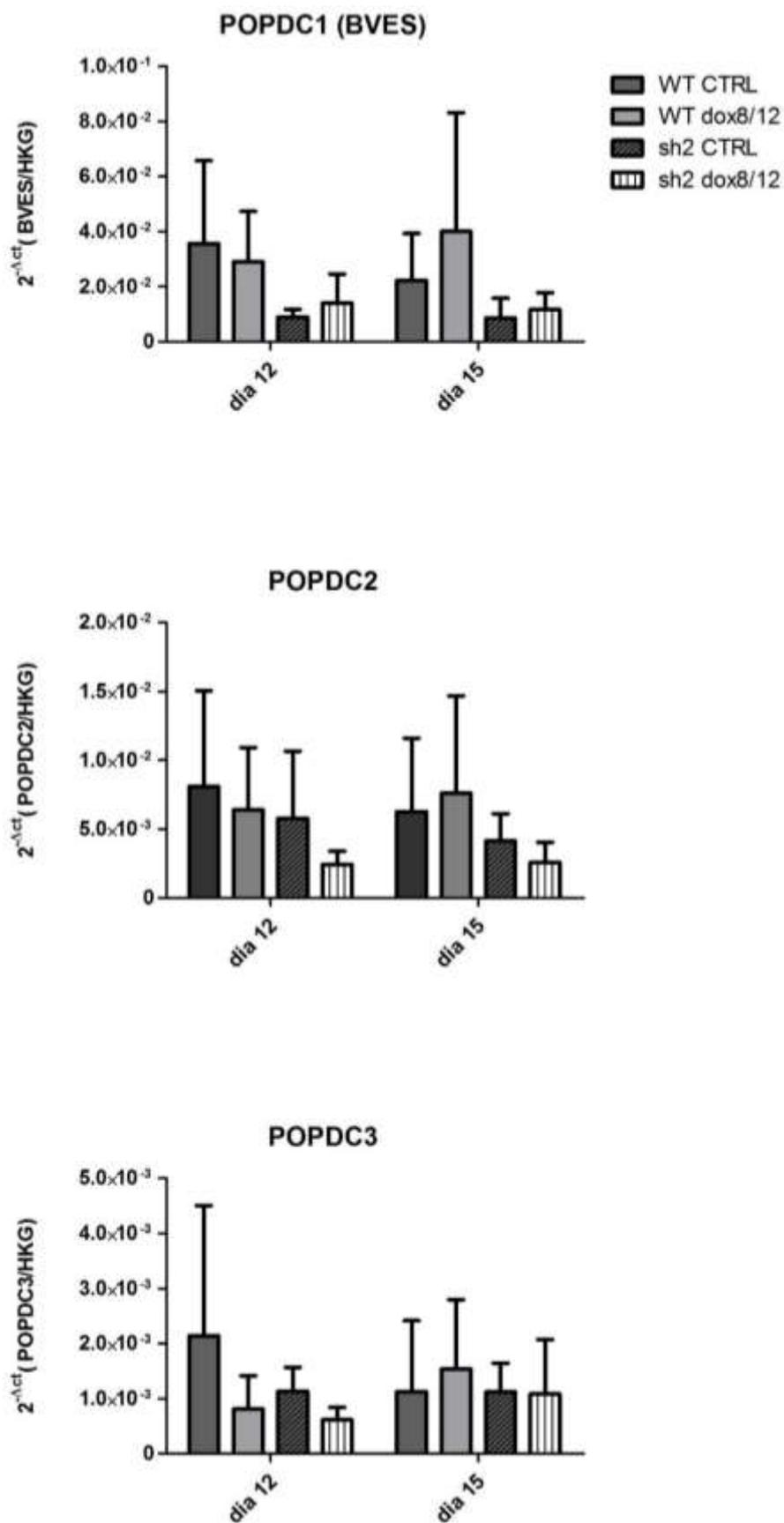


Figura 27: Expressão de genes da família Popeye nas melhores condições de inibição de POPDC3 e nos controles (n=3).

APÊNDICE A

Os genes TNNI1 e TNNI3 que codificam as troponinas foram quantificados e os resultados constam na (Figura 28). A expressão de TNNI1 decaiu entre os dias 12 e 15, para os grupos WT CTRL, e sh2 CTRL, sendo menor em 2,67 e 1,16 vezes, respectivamente. No entanto, para os grupos WT DOX e sh2 DOX, a expressão parece ter permanecido constante no período avaliado. A expressão de TNNI3 aumentou nos grupos WT DOX e sh2 CTRL, em 2,08 e 1,23 vezes, respectivamente. Para o grupo, WT CTRL e sh2 DOX houve uma diminuição da expressão de TNNI3 em 1,45 e 1,2 vezes, respectivamente, no período analisado.

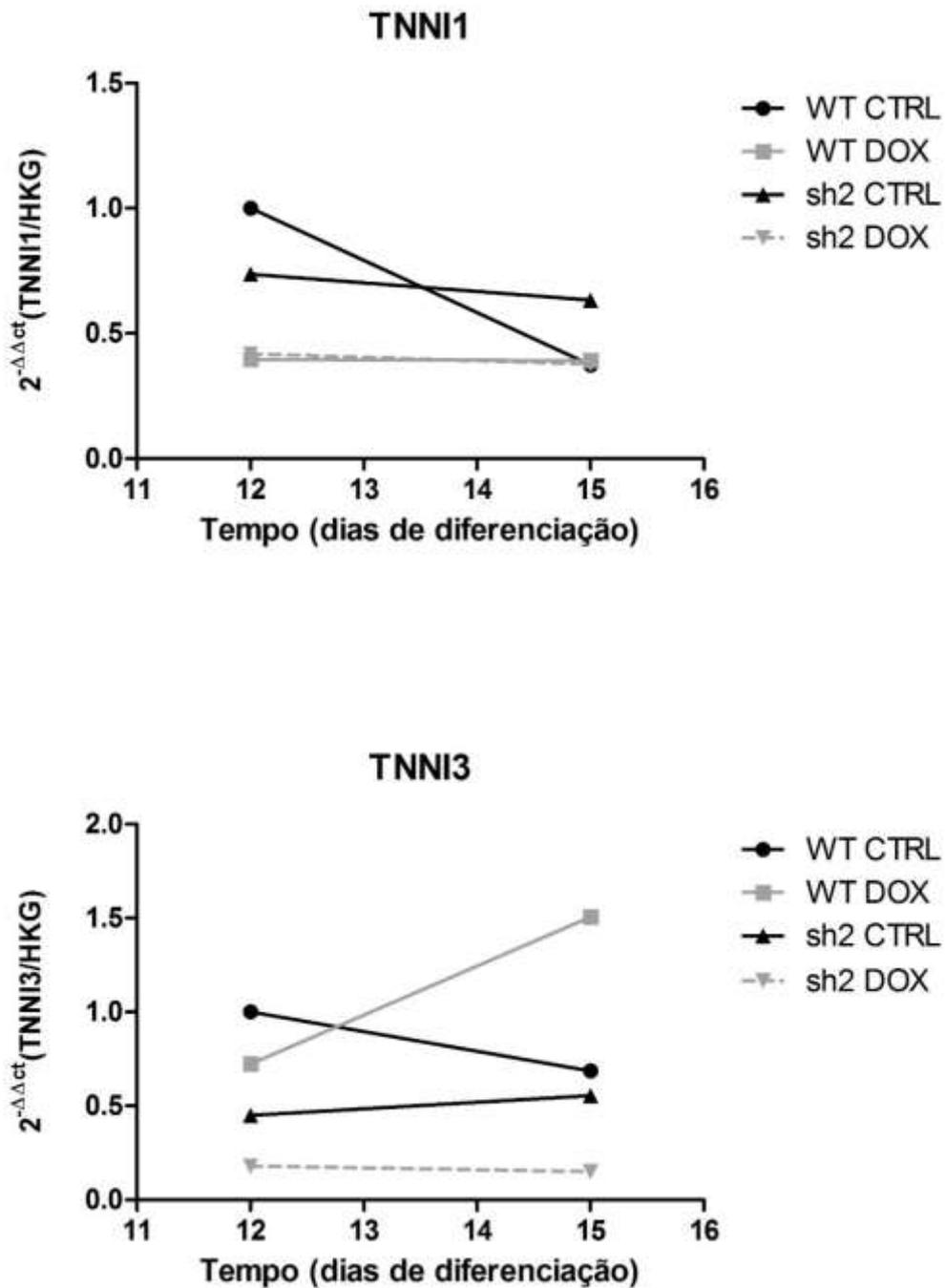


Figura 28: Expressão de troponinas cardíacas TNNI1 e TNNI3 por qPCR. O knockdown de POPDC3 parece não afetar a expressão de TNNI1 ao longo do tempo (ANOVA 2 vias, p-valor>0,05, sh2 DOX vs sh2 CTRL- dia 12 e dia 15) e o knockdown de POPDC3 também não parece afetar a expressão de TNNI3 ao longo do tempo significativamente (ANOVA de 2 vias, p-valor>0,05 sh2 DOX vs sh2 CTRL- dia 12 e dia 15).

A expressão de miosinas também foi mensurada por qPCR e os resultados encontram-se listados na Figura 29. A presença da subunidade 2 da

APÊNDICE A

miosina de cadeia leve (MYL2) foi maior no grupo sh2 DOX no 15º dia da diferenciação, em relação aos demais grupos. Esse dado precisa ser confirmado com n amostral maior do que o empregado neste experimento, pois os erros amostrais (desvio padrão apresentado no gráfico), podem sugerir que tal observação seja uma singularidade de cada diferenciação. No caso da expressão da subunidade 7 da cadeia pesada MYL7, não houve diferenças entre os grupos, tanto no 12º dia, como no 15º dia da diferenciação.

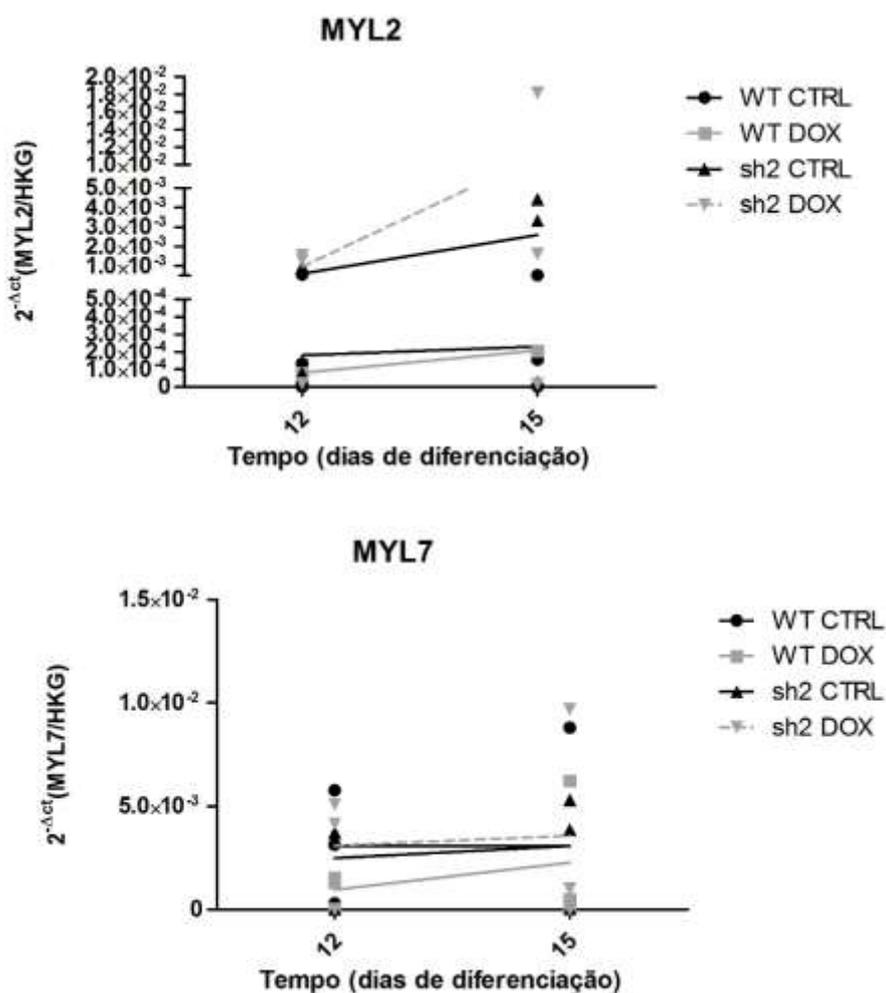


Figura 29: Expressão de miosinas 2 e 7 em hiPSC-CMs. O knockdown de POPDC3 não afeta significativamente a expressão de MYL2 ao longo do tempo ((ANOVA de 2 vias comparando sh2 CTRL vs sh2 DOX, com testes pos-hoc Bonferroni, p-valor>0,05). O knockdown de POPDC3 não afeta significativamente a expressão de MYL7 significativamente ao longo do tempo (ANOVA de 2 vias comparando sh2 CTRL vs sh2 DOX, com testes pos-hoc Bonferroni, p-valor>0,05).

APÊNDICE A

A quantificação de conexinas (Cx40 e Cx43) também foram mensuradas e os resultados obtidos constam na Figura 30. A expressão das conexinas é maior nas amostras sh2 em relação às WT, independente da adição de DOX. A expressão de CX40 é aproximadamente 3,92 vezes maior no grupo sh2 em relação ao grupo WT. Comparando-se a expressão de CX40 no grupo sh2 DOX com sh2 CTRL, verifica-se que nos dois momentos da diferenciação avaliados, a expressão de CX40 está em média 3,6 vezes maior no grupo DOX em relação ao grupo sh2 CTRL.

A expressão de CX43 é aproximadamente 2,7 vezes maior no grupo sh2 em relação ao grupo WT. Comparando-se a expressão de CX43 no grupo sh2 DOX com sh2 CTRL, verifica-se que nos dois momentos da diferenciação avaliados, a expressão de CX43 está em média 1,2 vezes maior no grupo CTRL em relação ao grupo sh2 DOX.

APÊNDICE A

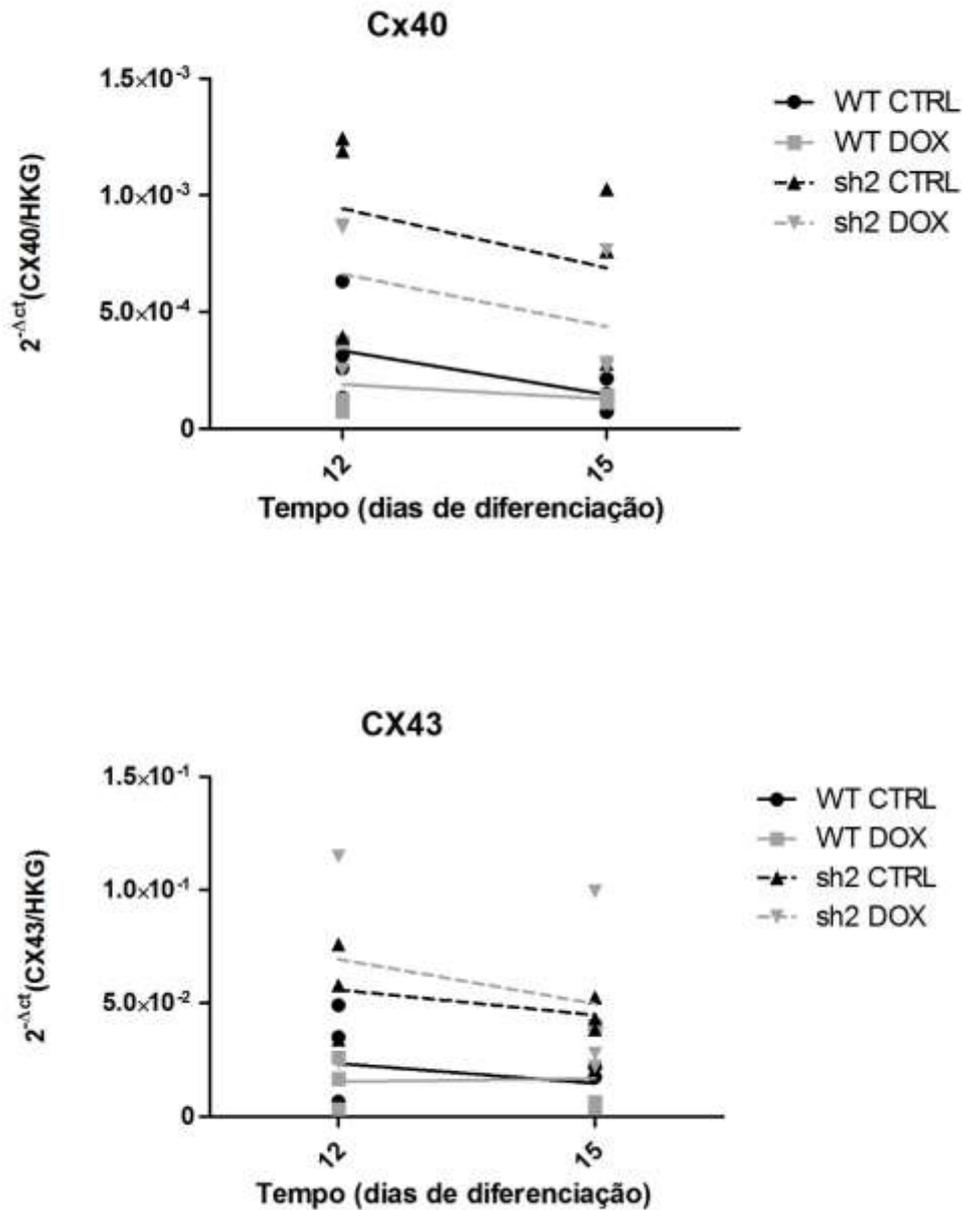


Figura 30: Expressão de conexas 40 e 43 em hiPSC-CMs. O knockdown de POPDC3 não afeta significativamente a expressão de CX40 ao longo do tempo (ANOVA de 2 vias comparando sh2 CTRL vs sh2 DOX, com testes pos-hoc Bonferroni, p-valor>0,05, n=3). O knockdown de POPDC3 não pode ser avaliado ao longo do tempo (n=2-3). Nos dia 12 e 15 da diferenciação, o KD de PPODC3 não afeta a significativamente a expressão de Cx43 (Mann-Whitney, sh2 CTRL vs sh2 DOX, p-valor>0,05).

APÊNDICE A

A quantificação de HCN4 (canal de potássio/sódio ativado por hiperpolarização e nucleotídeo cíclico) foi obtida nas amostras KD versus controle e os resultados constam na Figura 31). A expressão de HCN4 parece ser menor nas amostras sh2 em relação às WT, independente da adição de DOX (p-valor não significativo, número amostral pequeno). Comparando-se a expressão de HCN4 no grupo sh2 DOX com sh2 CTRL, verifica-se que no 12º e 15º dias da diferenciação, a expressão de HCN4 está em média 2,21 e 2,76 vezes maior no grupo sh2 CTRL em relação ao grupo sh2 DOX, respectivamente (p-valor não significativo, número amostral pequeno). Apesar do número amostral ter sido baixo, vale destacar uma tendência de expressão aumento de HCN4 no grupo sh2+DOX8.

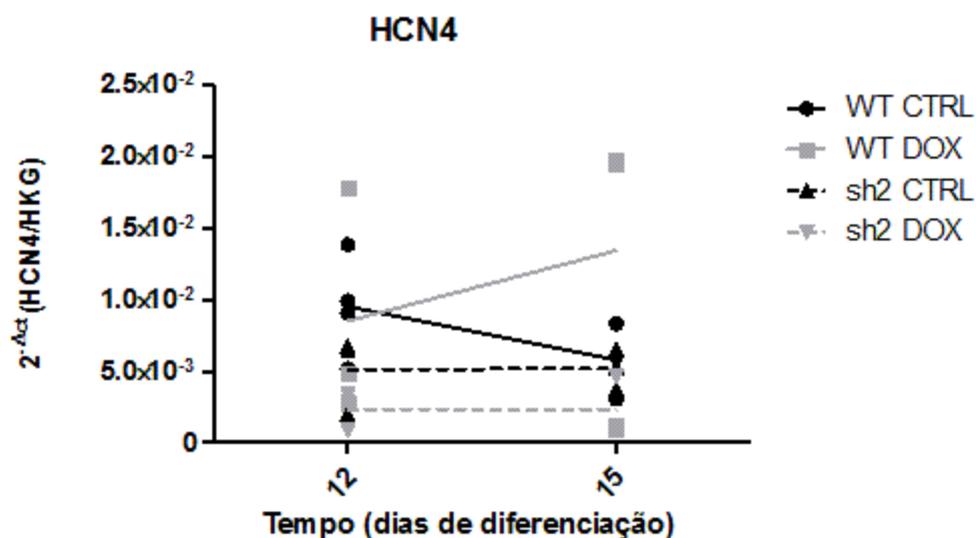


Figura 31: Quantificação de HCN4 por qPCR no 12º e 15º dia da diferenciação controle e de hiPSCs oriundas da linhagem sh2-POPDC3. Quantificação de HCN4 por qPCR no 12º e 15º dia da diferenciação controle e de hiPSCs oriundas da linhagem sh2-POPDC3. O knockdown de POPDC3 não afeta significativamente a expressão de HCN4 ao longo do tempo (ANOVA de 2 vias comparando sh2 CTRL vs sh2 DOX, com testes pos-hoc Bonferroni, p-valor>0,05, n=3).

APÊNDICE A

A expressão proteica de KI67, NKX2.5 e NAV1.5 foi observada por microscopia de fluorescência e o sistema de captura e análise das imagens foi automatizado (do inglês *High Content Screening-HCS*)- Figura 32. A expressão de Ki67, um marcador do estágio de síntese de DNA, e portanto, de ciclo celular está 1,5 vezes menor em nas células com sh1 e sh2 comparativamente ao controle (WT)- (Diferença sem significado estatístico $p > 0,05$). Já o marcador NKX2.5 está maior em 10% nos CMs com sh1 e sh2 em relação aos CMs controle (Diferença sem significado estatístico $p > 0,05$). O marcador de células de condução, NAV1.5 está mais expresso nos CMs com sh1 cerca de 2,36 vezes mais do que nos CMs controle (ANOVA 1 via $p\text{-valor} > 0,05$ - não significativo). Para os CMs sh2, a expressão de NAV1.5 supera em 5,93 vezes a expressão observada nos CMs controle (ANOVA de 1 via- $p\text{-valor} < 0,0001$).

APÊNDICE A

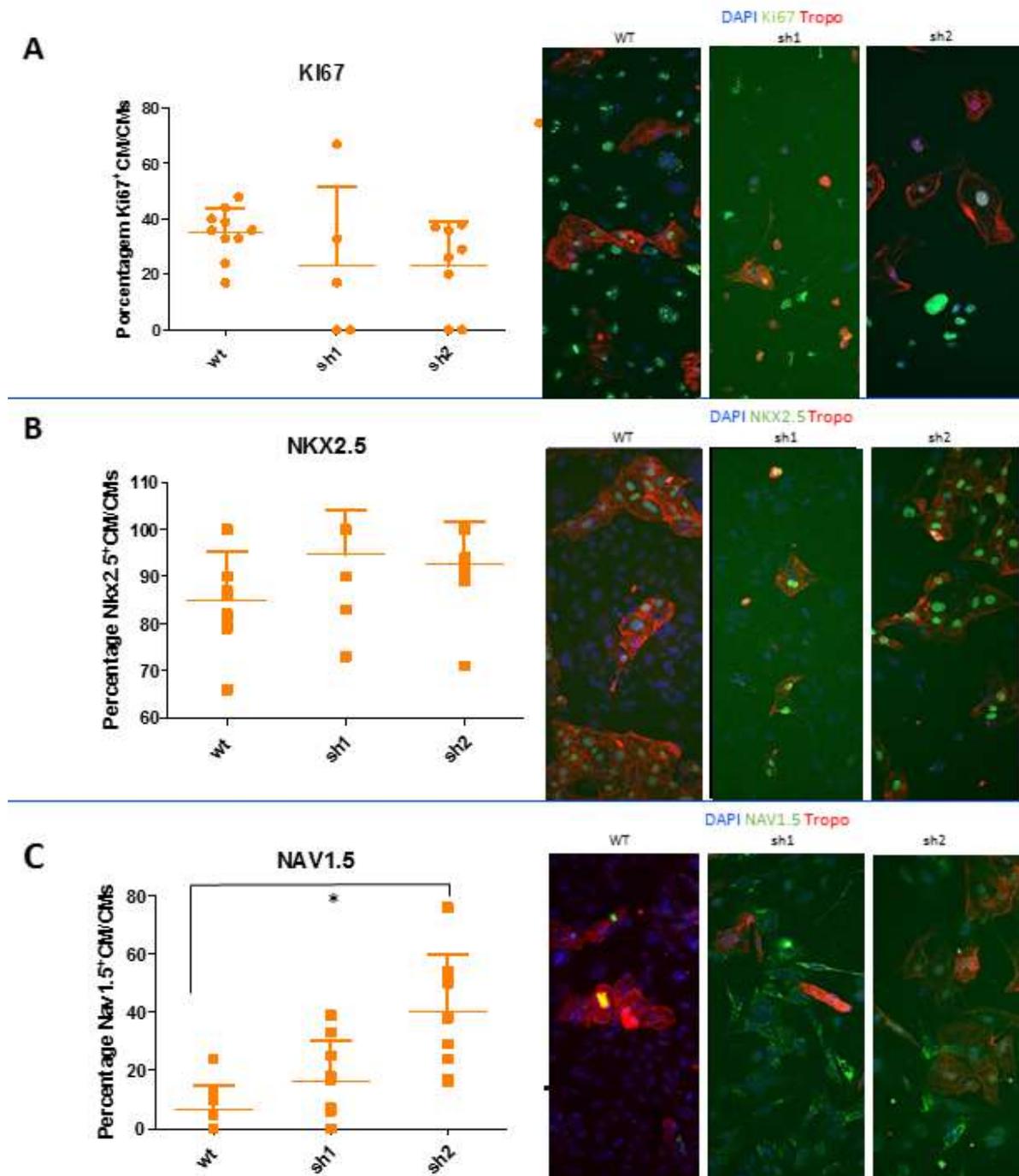


Figura 32: Análise de Imagens de High Content Screening de hiPSC-CMs no 20º dia de diferenciação oriundas das linhagens WT, sh1 e sh2 sugerem que cardiomiócitos que possuem o sh2 ativo para inibição de POPDC3 apresentam maior expressão de NAV1.5. (n=9; ANOVA de 1 via; *p-valor<0,0001).

APÊNDICE A

5. Discussão e conclusão

A estratégia desenvolvida nesse trabalho consiste na geração de clones de hiPSCs que possuam o POPDC3 inibido (shRNA). A infecção e seleção das hiPSC permitiu a obtenção de pools celulares contendo células com e sem a modificação genética, que foram capazes de se diferenciar em cardiomiócitos. Esses experimentos de diferenciação permitiram observar que o comportamento das células com shRNA ativado apresentam uma tendência de células (“cardiomiócito-*like*”) mais imaturas. Esse fato pode ser um indício de que a inibição de POPDC3 não afeta a indução mesoderme/mesendoderme (dias 1-4 da diferenciação), mas sim afeta as condições de contratilidade celular e marcadores cardiogênicos a partir do dia 8.

Apesar de não termos demonstrado estatisticamente que POPDC3 foi diminuído na condição de adição de DOX a partir do dia 8 (na linhagem sh2), observa-se que em média 46% da sua expressão foi reduzida. Experimentos modificando POPDC3 durante a diferenciação de hiPSC em cardiomiócitos nunca foram realizados, sendo um dado inédito. Na literatura, demonstrou-se que essas proteínas possuem papel redundante no coração, ou seja, em determinado momento da árvore filogenética, especula-se que POPDC3 tenha sido uma duplicação de POPDC1 (por estarem no mesmo cromossomo) [15]. Apesar disso, não observamos knockdown (KD) de POPDC1 mediante KD de POPDC3. Entretanto, observamos uma diminuição (sem significado estatístico) na expressão de POPDC2, quando houve KD de POPDC3, podendo sugerir que o sh2 possui atividade no mRNA de POPDC2. Não acreditamos que essa hipótese seja verdadeira, uma vez que os *shRNAs* desenhados não tinham

APÊNDICE A

sobreposição entre os membros da família Popeye. Assim, conforme houver maior número amostral espera-se que tal tendência deixe de existir.

Na condição de diferenciação de sh2 com DOX a partir do dia 8, obtivemos dados que sugerem que o shift de troponinas I1 para I3 está prejudicado nas células com KD. O shift de troponinas é um marcador de maturidade de cardiomiócitos, pois normalmente a isoforma I1 diminui dando lugar a isoforma I3.

Os dados de miosinas, sugerem que uma tendência de que o gene MYL2 está aumentada em sh2 DOX. Esse dado não é esperado, uma vez que durante a diferenciação, a expressão de MYL2 deve diminuir, e a de MYL7 aumentar, tornando a célula com fenótipo mais ventricular [16] e menos atrial. Sendo que MYH7 é mais observado em ventrículos, e MYL2 está mais expresso nos átrios [17].

A expressão de conexinas possui uma tendência a ser maior nos grupos sh2 em relação ao WT, independente da ação de DOX, sendo mais evidente esse fenômeno para CX40. Isso pode indicar que as células estão com fenótipo de cardiomiócito de condução mais proeminente [18], e as diferenciações oriundas do sh2 podem estar gerando menos cardiomiócitos de trabalho (Cx43) [19]. Além disso, por haver pouca diferença entre sh2 CTRL e sh2 DOX, pode-se especular sobre a presença de tetraciclinas no meio de cultivo, assim o grupo sh2 CTRL também teria o sistema Tet-on ativado, por isso observamos pequenas diferenças entre os grupos.

APÊNDICE A

A expressão de HCN4 possui uma tendência a ser menor em amostras de sh2 em relação ao WT, independente da adição de DOX. Esse dado não era esperado uma vez que, ambos se ligam ao AMPc para regular a frequência cardíaca, assim deveria estar mais expresso para compensar a ausência de POP [20]. Um trabalho relata que mutantes nulos para POP1 não apresentou alterações na corrente de sódio (íon transportado pelo canal HCN4) [21].

Neste trabalho, demonstramos que NAV1.5 encontra-se aumentado na condição com POPDC3 diminuído, sugerindo que nessa condição, ocorre um aumento da expressão compensatório a ausência de POPDC3. O marcador NAV1.5 têm papel sobre a regulação da frequência cardíaca por ser um canal de sódio presente na membrana de cardiomiócitos de trabalho e de condução, sendo responsável pela geração e propagação dos potenciais de ação [22]. Pouco se sabe a respeito da interação entre NAV1.5 e POPDC3 [23], porém sabe-se que TREK-1 (um canal de potássio com íntima ligação a família *Popeye*) interage com proteínas da família *popeye* na membrana, atuando na regulação da frequência mediante estresse (estimulação adrenérgica). Este trabalho, pode sugerir que NAV1.5 seja outra proteína com a qual proteínas *Popeye* interage.

APÊNDICE A

Referências

1. Suzuki, E., et al., *Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Cardiovascular Disease*. Adv Exp Med Biol, 2017. **998**: p. 179-185.
2. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
3. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
4. Foo, K.S., et al., *Human ISL1(+) Ventricular Progenitors Self-Assemble into an In Vivo Functional Heart Patch and Preserve Cardiac Function Post Infarction*. Mol Ther, 2018. **26**(7): p. 1644-1659.
5. Takeda, M., et al., *Identification of Cardiomyocyte-Fated Progenitors from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Marked with CD82*. Cell Rep, 2018. **22**(2): p. 546-556.
6. Sommer, A.G., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector*. J Vis Exp, 2012(68).
7. Du, G., et al., *Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing*. FEBS J, 2006. **273**(23): p. 5421-7.
8. Moore, C.B., et al., *Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown*. Methods Mol Biol, 2010. **629**: p. 141-58.
9. Levitz, S.M. and R.D. Diamond, *A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT*. J Infect Dis, 1985. **152**(5): p. 938-45.
10. Tomizawa, M., et al., *Dual Gene Expression in Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Episomal Vectors*. Tissue Engineering Part A, 2014. **20**(23-24): p. 3154-3162.
11. Tanaka, A., et al., *Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61540.
12. Maruyama, M., et al., *Lineage-specific purification of neural stem/progenitor cells from differentiated mouse induced pluripotent stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(6): p. 420-33.
13. de Carvalho, A., et al., *Early Postnatal Cardiomyocyte Proliferation Requires High Oxidative Energy Metabolism*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15434.
14. Liu, H.S., et al., *Is green fluorescent protein toxic to the living cells?* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 712-7.

APÊNDICE A

15. Brand, T., et al., *The cAMP-binding Popdc proteins have a redundant function in the heart*. *Biochem Soc Trans*, 2014. **42**(2): p. 295-301.
16. Marian, A.J. and E. Braunwald, *Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy*. *Circ Res*, 2017. **121**(7): p. 749-770.
17. Wakili, R., et al., *Multiple potential molecular contributors to atrial hypocontractility caused by atrial tachycardia remodeling in dogs*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010. **3**(5): p. 530-41.
18. Kanthan, A., et al., *Human Connexin40 Mutations Slow Conduction and Increase Propensity for Atrial Fibrillation*. *Heart Lung Circ*, 2018. **27**(1): p. 114-121.
19. Okamoto, K., et al., *'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(12): p. 2550-62.
20. Brand, T. and R. Schindler, *New kids on the block: The Popeye domain containing (POPDC) protein family acting as a novel class of cAMP effector proteins in striated muscle*. *Cell Signal*, 2017. **40**: p. 156-165.
21. Froese, A., et al., *Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 1119-30.
22. Rook, M.B., et al., *Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression*. *Cardiovasc Res*, 2012. **93**(1): p. 12-23.
23. Boukens, B.J. and V.M. Christoffels, *Popeye proteins: muscle for the aging sinus node*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(3): p. 810-3.

ANEXO A



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19/03/18, **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **142/15** intitulado **“O papel dos genes da família Popeye na regeneração cardíaca”** apresentado pela Comissão Científica do InCor

- Prorrogação de prazo do projeto para **dezembro de 2019**

Pesquisador Responsável: **José Eduardo Krieger**

CEUA-FMUSP, 19 de Março de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO B

3567/10/156



APROVAÇÃO

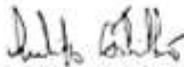
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/03/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0055/11**, intitulado: **"USO DE CÉLULAS IPS (INDUCED PLURIPOTENT STEM) PARA COMPREENSÃO DE ALTERAÇÕES EM CARDIOMIÓCITOS DE PACIENTES COM CARDIOMIOPATIAS DE BASE GENÉTICA."** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa [Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c"].

Pesquisador (a) Responsável: **José Eduardo Krieger**

Pesquisador (a) Executante: **Diogo Gonçalves Biagi dos Santos**

CAPPesq, 16 de Março de 2011


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
22/03/11
Carine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnnet.usp.br

ANEXO C



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30/04/2019, APROVOU o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 142/15 intitulado "O papel dos genes da família Popeye na regeneração cardíaca" apresentado pela Comissão Científica do InCor.

- Alteração do título do projeto para: "Identificação de Genes com Potencial de serem alvos Terapêuticos para Reparar ou Regenerar o Tecido Cardíaco Adulto"

Pesquisador Responsável: José Eduardo Krieger

CEUA-FMUSP, 30 de Abril de 2019



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais