

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área Fisiopatologia e Toxicologia

**Construção de modelo *in vitro* baseados em
edição gênica por CRISPR/cas9 no *LDLR* visando
melhor compreensão da influência genética na
hipercolesterolemia familiar**

Augusto Akira Mori

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área Fisiopatologia e Toxicologia

**Construção de modelo *in vitro* baseados em
edição gênica por CRISPR/cas9 no *LDLR* visando
melhor compreensão da influência genética na
hipercolesterolemia familiar**

Augusto Akira Mori

Versão Corrigida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2023

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Mori, Augusto Akira
M854c Construção de modelo in vitro baseados em edição gênica por
CRISPR/cas9 no *LDLR* visando melhor compreensão da influência
genética na hipercolesterolemia familiar. / Augusto Akira Mori. -- São Paulo,
2023.
119p.
Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki
1. Hipercolesterolemia. 2. *LDLR*. 3. CRISPR/cas9. 4. Análise
Funcional. I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki, orientador.
616.3997 CDD

Augusto Akira Mori

Construção de modelo *in vitro* baseados em edição gênica por CRISPR/cas9
no *LDLR* visando melhor compreensão da influência genética na
hipercolesterolemia familiar

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, 10 de julho de 2023

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Mário e Kimiko, por todo o apoio e incentivo ao longo de todos estes anos na USP.

Aos meus irmãos, Mário e Leandro, pelas conversas aleatórias e pela descontração durante esse período.

À minha companheira, Rayssa, pelas palavras de suporte e carinho, sempre me incentivando e me fazendo acreditar.

A todos os meus amigos, principalmente à Adriana Amorim, Mariana Lima e Jorge Costa, que aguentaram minhas lamúrias e desabafos.

A todos os demais amigos e familiares que acompanharam esta jornada, vocês foram fundamentais para a conquista desse trabalho

“It’s like I’m frozen in one moment. And no one knows it because everyone else has moved on except me, but to me everything that’s happened is a dream, and I know it’s not real because I’m still behind the wall. And the worst part is that I don’t know who’s causing the scream.”

(The Poppy War – R. F. Kuang)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Mário Hiroyuki Hirata, pelos ensinamentos, conselhos e discussões durante esses anos, que me ajudaram a ser um pesquisador melhor.

À Prof.ª Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelas correções, sugestões e ajuda na publicação de resumos.

À Prof.ª Renata Gorjão, pela ajuda com a realização dos experimentos com citometria de fluxo.

Ao Prof. André Lucchesi, da UFRN, e ao Prof.º Augusto Lucchesi, da UNICAMP, pelos valorosos conselhos que contribuíram para a minha formação.

À técnica do LBMAD, Cristina Moreno Fajardo, pela paciência, amizade e companheirismo durante os anos.

A todos os integrantes e ex-integrantes do grupo HF, Bruna, Carol, Eli, Gláucio, Jéssica, Raul, Renata, Thaís e Vanessa, pelo companheirismo, pelas conversas, pelos bandejões e pela simples presença no dia a dia.

Aos alunos do LBMAD, Eduardo, Lívia, Priscila, Suellen e Tyanne, por toda a ajuda e descontração durante esses anos.

Ao aluno Kennedy Bonjour, da FMVZ, pela ajuda na microscopia e ao aluno Sun Yan, do ICB, pela ajuda com o plasmídeo.

Aos funcionários do LIMC-IDPC, Adriana, Ana e Lin, por todo o apoio técnico.

Aos funcionários do hospital Beneficência Portuguesa, Gisele e Helena, pelo apoio técnico.

Aos alunos e técnicos dos outros laboratórios do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Fabiana, Silvia, Edson, Walter, Renata, Maurício, Silene, Kátia, Isabella e Julia, pela disposição em ajudar, pelos conselhos técnicos e pelos ensinamentos transmitidos, que foram essenciais para a finalização do trabalho.

Às funcionárias da secretaria do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas, Edna, Samanta e Elaine, por ajudar na resolução de todas as dúvidas burocráticas da pós-graduação.

À minha antiga professora do cursinho pré-vestibular, Maria Fernanda Laurindo, que despertou em mim o interesse pela área de Biológicas.

A todos os pacientes que aceitaram ser voluntários e fazer parto do projeto.

À Divisão de Dislipidemia, representada pelos médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de cursar a graduação e a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de doutorado (processo 88882.327700/2019-0) e pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização do projeto (processo nº2016/12899-6)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

MORI, A. A. Construção de modelo *in vitro* baseados em edição gênica por CRISPR/cas9 no *LDLR* visando melhor compreensão da influência genética na hipercolesterolemia familiar. 2023.119f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2023.

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, sendo causado principalmente por variantes genéticas no gene do Receptor de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDLR). Apesar das tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS) serem capazes de identificar diversas variantes, poucas delas foram funcionalmente caracterizadas. A utilização da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 promove uma edição gênica precisa e permite a criação de modelos experimentais, de forma a contribuir para a melhor validação funcional dessas variantes. O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação funcional de variantes do LDLR identificadas em portadores de HF, através da utilização de CRISPR/Cas9.: Baseado em análises de predição *in silico*, do domínio afetado da proteína e na frequência da variante na população, selecionou-se três variantes do *LDLR* (rs5928 c.2441G>A p.Arg814Gln; rs750518671 c.2389 G>C p.Val797Leu e rs879254797 c.1118G>A p.Gly373Asp), e construiu-se três sgRNAs para cada um deles. Os sgRNAs foram inseridos no plasmídeo PX458 previamente digerido com a enzima de restrição BbsI, clonados e purificados em bactérias *E. coli DH5 α* , e co-transfectados com os seus respectivos moldes de reparo de DNA em células HepG2. As células co-transfectadas foram isoladas por FACS, e colocadas em cultura para crescimento e posterior avaliação funcional. A expressão de LDLR foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se anticorpo anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor-647, e por Western Blotting. A análise de atividade do LDLR foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se anticorpo anti-LDLR e Dil-LDL. Realizou-se também análises de microscopia confocal e por microscopia em campo claro utilizando-se marcação com Oil Red O para avaliação da atividade das células co-transfectadas. As variantes foram também analisadas por *docking* molecular para avaliar o efeito das variantes. Análises funcionais das células HepG2 editadas revelaram menores índices tanto de expressão quanto de ligação a partícula de LDL e internalização do complexo LDLR-LDL, para as três variantes estudadas. A análise de *docking* molecular para a variante rs879254797 revelou que a troca de um Asp por um Gly na posição 373 diminui a distância de interação entre o LDLR e a ApoB, aumentando a força de interação do complexo e diminuindo o processo de reciclagem do receptor de volta para a membrana. Além disso, verificou-se por microscopia, a ocorrência de processos celulares como comunicação célula-célula e formação de pseudópodes para captura de LDL nas células co-transfectadas com essa variante. Para a variantes rs750518671 c.2389 G>C p.Val797Leu, além da menor expressão, ligação e internalização do complexo LDLR-LDL, observou-se também a formação de vacuolização e deposição de lipídeos. Conclui-se com este estudo que, apesar das variantes rs5928 c.2441G>A p.Arg814Gln e rs750518671 c.2389G>C p.Val797Leu terem sido associadas a alterações no processo de ancoramento do receptor a membrana, os resultados

demonstraram que estas variantes também apresentam efeito patogênico devido aos baixos níveis de expressão, de ligação à LDL e de internalização do complexo LDLR-LDL, que foram refletidos nos fenótipos dos pacientes.

Palavras-chave: LDLR; CRISPR/Cas9; Hipercolesterolemia Familiar

Abstract

MORI, A. A. Construction of an in vitro models based on CRISPR/Cas9 gene editing aiming to enhance the understanding of genetic influence on Familial Hypercholesterolemia. 2023.119f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2023.

Background: Familial Hypercholesterolemia (FH) is one of the main causes of cardiovascular diseases, caused by genetic variants in *LDLR*, *ApoB* and *PSCK9* genes. Even the Next Generation Sequencing (NGS) technology being able to identify many genetic variants, only a few were functionally characterized. The use of CRISPR/Cas9 tool allows the construction of experimental models to better characterization of these variants.

Objectives: The objective of this work is to functional characterize *LDLR* variants recently identified in FH patients that lacks functional studies.

Methods: Three *LDLR* variants were selected (rs5928, rs750518671 and rs879254797) for functional studies based on in-silico prediction tools, the affected protein domain, and the minor allele frequency. Different sgRNAs were constructed for each, inserted in PX458 plasmids, cloned, and purified. The constructs were transfected in HepG2 cells and isolated by FACS. LDLR expression assay was evaluated by flow cytometry using Alexa647 conjugated mouse anti-LDLR antibody, and by Western Blotting. Dil-LDL was used to evaluate LDLR activity by flow cytometry. It was also used Oil Red O to evaluate LDLR activity in bright field.

Results: Functional analyses of HepG2-rs879254797 transfected cells showed reduced levels either in LDLR expression and in LDLR activity, which agrees with previous *docking* molecular analyses, that had shown that changing an Asp by a Gly at position 373 shortened the distance between LDLR and ApoB, therefore increasing the interaction bond. Besides, it was verified histologically that HepG2- rs879254797 and HepG2-rs750518671 showed unexpected cellular processes, like cell-cell communication (HepG2-rs879254797), vacuolization and pseudopods (rs750518671). Regarding HepG2-rs5928, there was observed reduced values either in LDLR expression and LDLR activity.

Conclusion: Although variants rs5928 and rs750518671 has been described in literature as being associated with fixation process at the cytoplasmatic membrane, we only find differences regarding their LDLR expression and activity, which both variants showed lower levels for both parameters. The HepG2-rs879254797 showed important histological result when incubated with LDL, that could suggest a pathological process.

Keywords: Familial Hypercholesterolemia; LDLR; Functional Analyses; CRISPR

Lista de Figuras

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VALORES DE COLESTEROL E SEU RESPECTIVO QUADRO DE HF, BEM COMO OS RISCOS DE DAC. ADAPTADO DE (SARRAJU; KNOWLES, 2019).....	26
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DO LDLR. A: VARIANTES DE CLASSE I, QUE AFETAM A SÍNTESE DO RECEPTOR; B: VARIANTES DE CLASSE II, QUE AFETAM O TRANSPORTE DO LDLR PARA O COMPLEXO DE GOLGI; C: VARIANTES DE CLASSE III, QUE AFETAM O PROCESSO DE INTERAÇÃO DO LDLR COM A LDL; D: VARIANTES DE CLASSE IV, QUE AFETAM O PROCESSO DE INTERNALIZAÇÃO DO COMPLEXO LDLR-LDL; E: VARIANTES DE CLASSE V, QUE AFETAM O PROCESSO DE RECICLAGEM DO RECEPTOR; F: VARIANTES DE CLASSE 6, QUE AFETAM O PROCESSO DE ANCORAMENTO DO LDLR À MEMBRANA. FONTE: PRÓPRIO AUTOR.....	33
FIGURA 3: ESQUEMA DO RECEPTOR DE LDL (LDLR), DEMONSTRANDO SEUS DOMÍNIOS E OS ÉXONS CORRESPONDENTES, BEM COMO O DOMÍNIO AFETADO POR CADA UMA DAS VARIANTES ESTUDADAS. ADAPTADO DE (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ ET AL., 2019).....	33
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE CRISPR/CAS9 DE S. PYOGENES. (FONTE: ADAPTADO DE BIOENDER).....	37
FIGURA 5: GRÁFICO DEMONSTRANDO A PORCENTAGEM DE VARIANTES ENCONTRADAS EM CADA UM DOS ÉXONS, CONSIDERANDO O TOTAL DE VARIANTES ENCONTRADOS NO NOSSO ESTUDO.....	43
FIGURA 6: MAPA DO PLASMÍDEO PX458.....	49
FIGURA 7: SEQUÊNCIA DA REGIÃO DO PLASMÍDEO PX458 DEMONSTRANDO A REGIÃO “STUFFER” A SER REMOVIDA DURANTE A DIGESTÃO COM A ENZIMA BbsI. OS SGRNAs SÃO INSERIDOS NO LUGAR NESSA REGIÃO REMOVIDA. NOTA: SETAS VERMELHAS: INDICAM A REGIÃO DE CLIVAGEM PELA ENZIMA BbsI; RETÂNGULOS VERMELHOS: SÍTIO DE RESTRIÇÃO PARA A ENZIMA BbsI. ADAPTADO DE ADDGENE (ADDGENE PLASMID #48138).....	50
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS HEPG2 (REFERÊNCIA E VARIANTES) COM DIL-LDL.....	65
FIGURA 9: FIGURA ESQUEMATIZANDO A SLIDE CHAMBER, E OS TEMPOS DE INCUBAÇÃO COM LDL COMERCIAL.....	66
FIGURA 10: GRÁFICO BOXPLOT COMPARANDO OS GRUPOS HF E NÃO-HF (CONTROLE), DEMONSTRANDO ELEVAÇÃO DOS VALORES DE CT (A), LDL (C) E TG (D), NO GRUPO HF, E MENORES VALORES DE LDL (B) NO GRUPO HF. ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA UTILIZANDO-SE O TESTE T.	69
FIGURA 11: GRÁFICO BOXPLOT DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS LIPÍDICOS (CT, LDL E TG), ENTRE OS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE (CTRL), E OS INDIVÍDUOS HF PORTADORES (FENÓTIPO GA OU AA) OU NÃO PORTADORES (FENÓTIPO GG) DAS VARIANTES RS121908039 (A-C); RS879254797 (D-F) E RS28941776 (G-H). * P<0.005; *** P <0.001; **** P<0.0001; NS: NÃO SIGNIFICATIVO.....	70
FIGURA 12: GRÁFICO BOXPLOT DEMONSTRANDO A VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS LIPÍDICOS (CT, LDL E TG), ENTRE OS INDIVÍDUOS DO GRUPO CONTROLE (CTRL), E OS INDIVÍDUOS HF PORTADORES (FENÓTIPO GA OU AA; OU FENÓTIPO GC OU CC) OU NÃO PORTADORES (FENÓTIPO GG) DAS VARIANTES RS750518671 (A-C); RS5928 (D-F) E RS137853694 (G-H). * P<0.005; *** P <0.001; **** P<0.0001; NS: NÃO SIGNIFICATIVO.....	71
FIGURA 13: ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTRAMOLECULARES DO LDLR. A: DIMINUIÇÃO DA DISTÂNCIA DE INTERAÇÃO (3,2 Å PARA 2,7 Å) QUANDO A CISTEÍNA É SUBSTITUÍDA POR UMA TIROSINA NA VARIANTE P.C184Y; B: AUMENTO DA DISTÂNCIA DE INTERAÇÃO (3,0 Å PARA 5,1 Å) QUANDO A GLICINA É SUBSTITUÍDA PELA ÁC. ASPÁRTICO NA VARIANTE P.G373D; C: AUMENTO DA DISTÂNCIA DE INTERAÇÃO (11,0 Å PARA 12,7 Å) QUANDO UMA GLICINA É SUBSTITUÍDA POR UM ÁC. ASPÁRTICO NA VARIANTE P.G549D; D: DIMINUIÇÃO DA DISTÂNCIA DE INTERAÇÃO (16,8 Å PARA 14,8 Å) QUANDO A VALINA É TROCADA POR UMA LEUCINA NA VARIANTE P.V797L; E: AUMENTO DA DISTÂNCIA DE INTERAÇÃO (5,1 Å PARA 8,4 Å) QUANDO A ARGININA É SUBSTITUÍDA POR UMA GLUTAMINA NA VARIANTE P.R814Q; F: A VARIANTE P.V827L NÃO INTERAGE COM NENHUM OUTRO RESÍDUO. LDLR: LOW-DENSITY LIPOPROTEIN.	73
FIGURA 14: FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE DEMONSTRANDO AS BANDAS FORMADAS PARA OS SGRNAs HIBRIDIZADOS.: ORDEM DO POÇOS: A): 1 A 3: SGRNA A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS121908039; 4 A 6: SGRNAs A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS879254797 E 7 A 9: SGRNAs A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS28941776; UTILIZAÇÃO DE REFERÊNCIA	

- DE PB DE 100PB; B): 1 A 3: SGRNAS A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS750518671; 4 A 6: SGRNAS A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS5928 E 7 A 9: SGRNAS A, B E C HIBRIDIZADOS DA VARIANTE RS137853964; REFERÊNCIA: ULTRA LOW RANGE DNA LADDER..... 76
- FIGURA 15: FOTOGRAFIA DO GEL DE AGAROSE DEMONSTRANDO A REFERÊNCIA DE DNA DE 1KB, COM FRAGMENTO SUPERIOR EM 10KB (A), PERFIL DO PLASMÍDEO PX 458 DIGERIDO (A) E ÍNTEGRO (C), USADO COMO CONTROLE. 76
- FIGURA 16: FOTOGRAFIA DA CULTURA EM PLACA DE PETRI NO MEIO LB-ÁGAR COM AMPICILINA (100NG/ML) DAS BACTÉRIAS E. COLI DH5A TRANSFORMADAS, UTILIZANDO-SE O PLASMÍDEO PX458. ESQ.: COLÔNIAS DE BACTÉRIAS E. COLI DH5A TRANSFORMADAS COM PLASMÍDEO PX458; DIR.: CONTROLE NEGATIVO DE E. COLI DH5A. SETAS E CÍRCULOS: APRESENTAM EXEMPLOS DE COLÔNIAS ISOLADAS DE E. COLI DH5A COM OS PLASMÍDEOS PX458. 77
- FIGURA 17: MICROFOTOGRAFIA DAS CÉLULAS HEPG2 PÓS TRANSFEÇÃO DOS CONSTRUTOS, OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO DE FLUORESCÊNCIA EVOS M5000 (SN: J1211-156C-031) (THERMOFISHER SCIENTIFIC, MASSACHUSETTS, EUA) DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA USP (ICB-USP) UTILIZANDO-SE FILTRO GFP (EX/EM: 470/525NM) PARA AVALIAR A EFICIÊNCIA DA TRANSFEÇÃO. AS IMAGENS FORAM OBTIDAS UTILIZANDO-SE OBJETIVAS DE 10X E 20X (400 E 200 µM, RESPECTIVAMENTE). CÉLULAS EM VERDE REPRESENTAM AS CÉLULAS CONTENDO O PLASMÍDEO PX458, EXPRESSANDO A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP). 1A: REPRESENTAÇÃO EM CAMPO CLARO DAS CÉLULAS HEPG2-WT(A) E REPRESENTAÇÃO EM FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DEVIDAMENTE TRANSFECTADAS, EM VERDE (1B); 2A: REPRESENTAÇÃO EM CAMPO CLARO DAS CÉLULAS HEPG2- RS879254797 (A) E REPRESENTAÇÃO EM FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DEVIDAMENTE TRANSFECTADAS, EM VERDE (2B); 3A: REPRESENTAÇÃO EM CAMPO CLARO DAS CÉLULAS HEPG2- RS5928 (A) E REPRESENTAÇÃO EM FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DEVIDAMENTE TRANSFECTADAS, EM VERDE (3B); 4A: REPRESENTAÇÃO EM CAMPO CLARO DAS CÉLULAS HEPG2- RS137853964 (A) E REPRESENTAÇÃO EM FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DEVIDAMENTE TRANSFECTADAS, EM VERDE (4B) 5A: REPRESENTAÇÃO EM CAMPO CLARO DAS CÉLULAS HEPG2- RS750518671 (A) E REPRESENTAÇÃO EM FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS DEVIDAMENTE TRANSFECTADAS, EM VERDE (5B) 79
- FIGURA 18: ANÁLISE DO PROCESSO DE SORTING (A) E CRESCIMENTO CELULAR (B). 1) A: DOTPLOT DO PROCESSO DE SORTING PARA AS CÉLULAS HEPG2, TRANSFECTADAS COM A VARIANTE RS879254797. B: RESULTADO DO CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS ISOLADAS; 2) A: DOTPLOT DO PROCESSO DE SORTING PARA AS CÉLULAS HEPG2 TRANSFECTADAS COM A VARIANTE RS5928, DESTACANDO AS ÁREAS COM AS CÉLULAS TRANSFECTADAS (P3); B. RESULTADO DO CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS ISOLADAS; 3). A: DOTPLOT DO PROCESSO DE SORTING PARA AS CÉLULAS HEPG2 TRANSFECTADAS COM A VARIANTE RS750518671, DESTACANDO AS ÁREAS COM AS CÉLULAS TRANSFECTADAS (P3); B. RESULTADO DO CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS ISOLADAS.. 80
- FIGURA 19: RESULTADO DA ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA REFERENTE À EXPRESSÃO DE LDLR, COMPARANDO-SE AS CÉLULAS NÃO MARCADAS (SUPERIOR) COM AS MARCADAS (INFERIOR). 1: REPRESENTAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS HEPG2-WT NÃO MARCADAS COM ANTICORPO (A) E MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-LDLR (B); 2: REPRESENTAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS HEPG2-RS5928 NÃO MARCADAS COM ANTICORPO (A) E MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-LDLR (B); 3: REPRESENTAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS HEPG2-RS879254797 NÃO MARCADAS COM ANTICORPO (A) E MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-LDLR (B); 4: REPRESENTAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS HEPG2-RS750518671 NÃO MARCADAS COM ANTICORPO (A) E MARCADAS COM ANTICORPO ANTI-LDLR (B)..... 82
- FIGURA 20: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA PORCENTAGEM DE EXPRESSÃO DE LDLR DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO AS VARIANTES, QUANDO COMPARADAS COM A CÉLULA HEPG2 REFERÊNCIA. 83
- FIGURA 21: FOTOGRAFIA DA MEMBRANA DE PVDF, DEMONSTRANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES À LDLR (140kDA) E À B-ACTINA (~40kDA). ORDEM DOS POÇOS (ESQ. PARA A DIR.): 1. PADRÃO DE PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS DE 10-260kDA; 2: SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HEPG2-WT, 3: SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS5928; 4: SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS879254797; 5: SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS750518671; 6. LISADO CELULAR DAS CÉLULAS HEPG2-WT; 7: LISADO CELULAR DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS5928; 8:

LISADO CELULAR DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS879254797 E 9: LISADO CELULAR DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO A VARIANTE RS750518671.	84
FIGURA 22: RESULTADO DA ANÁLISE DE ATIVIDADE DO LDLR EM CÉLULAS INCUBADAS À 37°C (SUPERIOR) E À 4°C (INFERIOR), UTILIZANDO-SE DIL-LDL. 1: RESULTADO DA ATIVIDADE DO LDLR UTILIZANDO-SE DIL-LDL EM CÉLULAS HEPG2-WILD-TYPE INCUBADAS À 37°C (A) E À 4°C (B); 2: RESULTADO DA ATIVIDADE DO LDLR UTILIZANDO-SE DIL-LDL EM CÉLULAS HEPG2-RS5928 INCUBADAS À 37°C (A) E À 4°C (B); 3 RESULTADO DA ATIVIDADE DO LDLR UTILIZANDO-SE DIL-LDL EM CÉLULAS HEPG2-RS879254797 INCUBADAS À 37°C (A) E À 4°C (B) E 4: RESULTADO DA ATIVIDADE DO LDLR UTILIZANDO-SE DIL-LDL EM CÉLULAS HEPG2-RS750518671 INCUBADAS À 37°C (A) E À 4°C (B).	85
FIGURA 23: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA ATIVIDADE DE LDLR À 4°C E A À 37°C DAS CÉLULAS HEPG2 CONTENDO AS VARIANTES, QUANDO COMPARADAS COM AS CÉLULAS HEPG2 REFERÊNCIA.	86
FIGURA 24: FOTOMICROGRAFIA DAS CÉLULAS HEPG2-WT, HEPG2-RS879254797 E HEPG2-RS750518671. COLORAÇÃO COM OIL RED O E CONTRACOLORAÇÃO COM HEMATOXILINA DE HARRIS. MICROSCÓPIO ZEISS BX800, AUMENTO DE 100X. AS SETAS INDICAM EXEMPLOS DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS CORADAS COM ORO.	88
FIGURA 25: RESULTADOS DE MICROSCOPIA DAS CÉLULAS HEPG2 MUTADAS, QUANDO INCUBADAS COM ORO. A E C: OBSERVA-SE A FORMAÇÃO DE VACUOLIZAÇÃO E DEPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS EM BALSAS LIPÍDICAS PARA AS CÉLULAS CONTENDO A VARIANTES RS750518671; B E D: OBSERVA-SE A FORMAÇÃO DE PSEUDÓPODES E INTERAÇÃO CÉLULAS-CÉLULA, PARA AS CÉLULAS TRANSFECTADAS COM A VARIANTE RS879254797. MICROSCÓPIO ZEISS BX800, AUMENTO DE 100X.	89
FIGURA 26: RESULTADO DA MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS HEPG2. A: CÉLULAS HEPG2 INCUBADAS COM LDL CONTROLE POR 8 HORAS. VERDE: LIPÍDIOS NEUTROS - LIPIDTOX™; VERMELHO: LDL DIL 546; AMARELO: ANTI-LDLR – ALEXA 647; AZUL: NÚCLEO (DAPI, ESCALA DE 50µM; B: CÉLULAS HEPG2, INCUBADAS COM LDL CONTROLE POR 4 HORAS. VERDE: ANTI-APO B - ALEXA 488; VERMELHO: ANTI-LDLR - ALEXA 647; AZUL: NÚCLEO (DAPI), ESCALA DE 10µM. SETAS E CÍRCULOS: INDICAÇÃO DE COLOCALIZAÇÃO LDL-LDLR.	90

Lista de Tabelas

TABELA 1: PRINCIPAIS CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HF	28
TABELA 2: VARIANTES MISSENSE E STOP GAIN DO GENE LDLR IDENTIFICADAS EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL.	42
TABELA 3: TABELA DEMONSTRANDO A LOCALIZAÇÃO EXÔNICA DA VARIANTE, O MAF E O RESULTADO DAS PREDIÇÕES IN SILICO.	44
TABELA 4: ESQUEMA DO PLASMÍDEO PX458 DEMONSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE ALGUNS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENZIMAS PARA POSSÍVEIS LOCAIS DE INSERÇÃO DE FRAGMENTOS E CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE.	49
TABELA 5: PROTOCOLO DA REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO DOS SGRNAS.	53
TABELA 6: CONDIÇÕES PARA HIBRIDAÇÃO DOS SGRNAS.	54
TABELA 7: MOLDES DE REPARO DE DNA PARA CADA UM DOS SGRNAS.	55
TABELA 8: PROTOCOLO DE CONSTRUÇÃO DO MIX DE REAÇÃO PARA A DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PX458 UTILIZANDO-SE A ENZIMA BBSI.	57
TABELA 9: CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO UTILIZADAS PARA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PX458.	57
TABELA 10: PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE DESFOSFORILAÇÃO DO PLASMÍDEO PX458 LINEARIZADO, UTILIZANDO-SE FASTAP.	57
TABELA 11: CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A ETAPA DE DESFOSFORILAÇÃO.	58
TABELA 12: PROTOCOLO DE PREPARO DA REAÇÃO PARA A LIGAÇÃO DO SGRNA AO PLASMÍDEO LINEARIZADO.	59
TABELA 13: PROTOCOLO DE PREPARO DA TRANSFEÇÃO.	61
TABELA 14: TABELA DEMONSTRANDO OS SGRNAS CONSTRUÍDOS PARA CADA UMA DAS VARIANTES SELECIONADAS DO GENE LDLR.	75
TABELA 15: CONCENTRAÇÃO DE DNA DOS PLASMÍDEOS PX458 PURIFICADOS DE E. COLI DH5A.	77

Lista de Abreviaturas

µm	micrômetro
Å	Ângstron
ABCA1	Transportador A1 do cassete de ligação de ATP
ABCG1	Transportador do cassete de ligação de ATP, subfamília G membro 1
ABCG5	Transportador do cassete de ligação de ATP, subfamília G membro 5
ABCG8	Transportador do cassete de ligação de ATP, subfamília G membro 8
ABraOm	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACAT	Acil-CoA Aciltransferase
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACGS	<i>Association for Clinical Genomic Science</i>
ANNOVAR	Anotação de variante
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoA2	Apolipoproteína A2
ApoA4	Apolipoproteína A4
ApoA5	Apolipoproteína A5
ApoB100	Apolipoproteína B100
ApoC1	Apolipoproteína C1
ApoC2	Apolipoproteína C2
ApoC3	Apolipoproteína C3
ApoE	Apolipoproteína E
Arg	Arginina
ATP	Adenosina trifosfato
BP	Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo
BSA	Albumina de Soro Bovino
BSEP	Bomba de exportação de sais biliares
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
Cas9	<i>CRISPR Associated Protein 9</i>
CEFAP	Centro de Facilidades Para a Pesquisa
CHD	Doença Cardíaca Coronariana
CjCas9	<i>Campylobacter jejuni Cas9</i>
CNV	Variação do número de cópias
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPRi	CRISPR interferente
crRNA	<i>CRISPR-RNA</i>
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
dCas9	<i>dead Cas9</i>
DCev	Doença Cerebrovascular
DCV	Doença Cardiovascular
Dil	Percloratotetrametilindocarbocianina
DLCM	<i>Dutch Lipid Clinic Network</i>
DM	Dinâmica Molecular
DMEM	Meio Dulbecco's Eagle modificado
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

DO	Densidade Óptica
DSB	Quebra da dupla-fita
DVP	Doença Vascular Periférica
EAS	Sociedade Europeia de Aterosclerose
EDTA	Ácido Etilenodiamotetraacético
EG	Edição gênica
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDB	Doença Familiar da ApoB
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GFP	Proteína Verde Fluorescente
Gln	Glutamina
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDR	Reparo de Homologia Direta
HeHF	Hipercolesterolemia Familiar Heterozigota
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HL	Lipase Hepática
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-CoA
HMGCR	Hidroximetilglutaril-CoA Redutase
HNH	<i>His-Asn-His</i>
HoHF	Hipercolesterolemia Familiar Homozigota
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IM	Infarto do Miocárdio
indel	Inserções e deleções
KAc	Acetato de Potássio
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KRAB	<i>KrüB-associated box</i>
LB	Luria-Bertani
LCAT	Lecitina colesterol Acil-transferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLR	Receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLRAP1	Proteína Adaptadora 1 do Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
LPL	Lipase lipoproteica
LR1-7	Receptor de LDL
mA	miliampere
MAF	Frequência do Menor Alelo
MEDPED	Realização de Diagnóstico Precoce para Prevenção de Morte Prematura
miRNA	microRNAs
ml	mililitro
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>

MnCl	Cloreto de Manganês
MVA	Mevalonato
MYBPC3	Proteína C ligadora da Miosina
NA	Não Aplicável
NaCl	Cloreto de Sódio
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração
NHEJ	Junção Não Homóloga das Terminações
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NLS	Sinais de Localização Celular
ORO	<i>Oil-Red O</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
pb	pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCKS9	Pró-Proteína Convertase Subtilisina Kexina 9
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNK	Polinucleotídeo Quinase
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping 2</i>
pre-βHDL	Partículas de Lipídeos Livres de ApoA1
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
q.s.p.	quantidade suficiente para
RIPA	Ensaio de Radio-Imunoprecipitação
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteico
r.p.m.	rotações por minuto
SBRG	Grupo de Registro Simon-Broome
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	Pequeno Guia de RNA
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SR-B1	Receptor Scavenger Tipo B Classe I
SREBP	Elemento de Ligação de Proteína Reguladora de Esterol
TALENS	Nucleases Semelhantes a Ativadores Transcricionais
TBE	Tris-Borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFB I	Solução de transformação I
TFB II	Solução de transformação II
TG	Triglicerídeos
tracrRNA	Transativador crRNA
TRC	Transporte Reverso de Colesterol
UniProt	The Universal Protein Resource
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Regiões Não Traduzidas
V	Volts
VLDL	Lipoproteína de Muita Baixa Densidade
VSMC	Células Vasculares Musculares Lisas

VUS	Variantes de Significado Incerto
WT	Genótipo Selvagem
ZFN	<i>Zinc Finger Nucleases</i>
ZFP	<i>Zinc Finger Proteins</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. O Colesterol e as Dislipidemias	22
1.2. Hipercolesterolemia Familiar (HF).....	24
1.2.1. O gene do <i>LDLR</i>	31
1.3. Sequenciamento genético e edição gênica.....	34
1.3.1. A Ferramenta CRISPR/Cas9.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivos Específicos.....	40
4. CASUÍSTICA.....	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1. Aspectos éticos da pesquisa	41
5.2. Análise do perfil lipídico.....	41
5.3. Seleção das variantes do gene <i>LDLR</i> e Análise de Modelagem Molecular	41
5.3.1. Estudos de Modelagem Molecular	47
5.3.1.1. Predição dos efeitos da variante na estabilidade da proteína.....	47
5.3.1.2. Modelagem da Homologia e Preparação da Estrutura	47
5.3.1.3. Análise de <i>Docking</i> Molecular Proteína-Proteína.....	47
5.4. Edição Gênica Por CRISPR/Cas9.....	48
5.4.1. Expansão dos Vetores Plasmidiais	51
5.4.1.1. Preparo de Células Quimiocompetentes	51
5.4.1.2. Expansão do Plasmídeo PX458.....	52
5.4.2. Preparação e hibridação dos sgRNAs	53
5.4.3. Construção do molde de reparo para recombinação homóloga.....	54
5.4.4. Digestão e Inserção dos sgRNAs no vetor plasmidial.....	57
5.5. Cultivo de Células HepG2 e Experimentos de Co-transfecção	59
5.5.1. Cultivo Celular.....	59
5.5.2. Co-transfecção dos construtos e moldes de reparo em células HepG2	60
5.5.3. Isolamento das células transfectadas por Cell Sorting.....	61
5.6. Análise do LDLR das células recombinantes.....	62
5.6.1. Análise da Expressão do LDLR por Citometria de Fluxo.....	62
5.6.2. Análise da Expressão do LDLR por <i>Western Blotting</i>	63
5.6.3. Análise da Ligação e Internalização do LDLR por Citometria de Fluxo	65

5.6.4.	Análise de ligação e internalização do LDLR por microscopia	66
5.6.4.1.	Análise de lipídeos neutros	66
5.6.4.2.	Análise por microscopia confocal.....	67
5.7.	Análise Estatística dos Resultados.....	68
6.	RESULTADOS.....	69
6.1.	Análise do Perfil Lipídico	69
6.2.	Análise de Modelagem Molecular do LDLR.....	72
6.2.1.	Predizendo os efeitos das variantes na estrutura da proteína.....	72
6.2.2.	Efeitos no <i>Docking</i> Molecular	72
6.3.	Edição Gênica Por CRISPR/Cas9.....	74
6.3.1.	Preparação dos sgRNAs e inserção no vetor plasmidial	74
6.3.2.	Expansão e purificação dos construtos contendo os sgRNAs.....	77
6.4.	Cultivo de Células HepG2 e Experimentos de Co-transfecção	78
6.4.1.	Co-transfecção dos construtos e moldes de reparo em células HepG2	78
6.4.2.	Isolamento das células transfectadas por <i>Cell Sorting</i>	80
6.5.	Análise do LDLR das células recombinantes.....	81
6.5.1.	Análise da Expressão do LDLR	81
6.5.2.	Análise da Ligação e Internalização do LDLR por citometria de fluxo.....	84
6.5.3.	Análise de ligação e internalização do complexo LDLR-LDL por Microscopia	86
6.5.3.1.	Análise com lipídeos neutros.....	86
6.5.3.2.	Análise por Microscopia Confocal.....	90
7.	DISCUSSÃO	90
7.1.	Perfil Lipídico e modelagem molecular	90
7.2.	Análise da Expressão, Ligação e Internalização do LDLR.....	92
7.3.	A Variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D).....	94
7.4.	As variantes Transmembrana	97
8.	CONCLUSÃO	100
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
10.	ANEXO.....	108
10.1.	Anexo 1 – Tabelas e figuras suplementares.....	108
10.2.	Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.....	111
10.3.	Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.....	112
10.4.	Anexo 4 - Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP)	113

10.5.	Anexo 5 - Parecer do Comitê de Ética da Real e Benemerita Associação Portuguesa de Beneficência de São Paulo (BP).....	114
10.6.	Anexo 6 - Parecer da Comissão Interna de Biossegurança.....	115
10.7.	Curriculum Lattes.....	116
10.8.	Ficha do Aluno	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Colesterol e as Dislipidemias

O Colesterol é um componente essencial não apenas para a formação da barreira celular, mas também na regulação da fluidez e permeabilidade da membrana plasmática. Além disso, o colesterol atua como precursor de diversos esteroides, como a Vitamina D, os sais biliares e os hormônios das classes dos progestágenos, glicocorticoides, mineralocorticoides, androgênios e estrogênios (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012; BENITO-VICENTE et al., 2018b).

O colesterol utilizado pelas células pode ser adquirido pela dieta, ou endogenamente via de novo, pela síntese intracelular. Na via absorvida pela alimentação, os principais lipídeos são: o colesterol, o éster de colesterol, os ácidos graxos livres e os triglicérides, além das vitaminas lipossolúveis. Na origem endógena de colesterol, ou síntese de novo, o colesterol provém principalmente das células hepáticas, via acetil-coenzima A (Acetil-CoA) (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012) no retículo endoplasmático, e no citoplasma através da via do mevalonato (MVA). A enzima limitante desse processo é a hidroximetilglutaril-CoA Redutase (HMGCR), que catalisa a conversão do HMG-CoA para ácido mevalônico e é um alvo comum para medicamentos hipocolesteremiante, representado principalmente pelas estatinas (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012).

O colesterol liberado para os tecidos periféricos é inicialmente secretado pelo fígado sob a forma de lipoproteínas ricas em triglicerídeos ou lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), cuja proteína estrutural e metabolicamente importante é a apolipoproteína B100. No tecido periférico, as partículas de VLDL trocam componentes da superfície com a lipoproteína de alta densidade (HDL), principalmente a apo-CII, apo-CIV e Apo-E, e sofrem ação da lipase lipoproteica (LPLs) transformando-as em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que nas membranas dos hepatócitos sofrem ação da lipase hepática (HL), resultando na formação das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDLs) (BENITO-VICENTE et al., 2018b), que podem ser captadas pelos hepatócitos, ou retornar para a circulação periférica, agora carregando principalmente o colesterol.

As LDLs são compostas principalmente por ésteres de colesterol, fosfolipídios e ApoB100, e também pode apresentar síntese hepática. As LDLs na circulação periférica são captadas pelas células nas regiões revestidas de clatrina, através da interação com os Receptores de LDL (LDLRs), proteínas de membrana, que irão interagir com as Proteínas Adaptadoras 1 de LDLR (LDLRAP1), para serem endocitadas (CHEMELLO et al., 2021). A seguir, forma-se uma vesícula, o endossomo, que se acidifica devido a alterações estruturais no LDLR formando-se o lisossomo. Dependendo da concentração intracelular em colesterol, o LDLR pode ser reciclado retornando para a membrana celular, enquanto a LDL sofre ação da lipase lisossomal para liberar ácido graxo e colesterol livre (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012; BENITO-VICENTE et al., 2018b). A pró-proteína convertase subtilisina kexina 9 (PCSK9) tem papel importante na regulação do processo de reciclagem do LDLR. A acidificação do endossomo aumenta a afinidade entre o LDLR e a PCSK9, ativando a função proteolítica, de forma que o receptor pode ser degradado no endossomo, dependendo da necessidade intracelular de colesterol (HORTON; COHEN; HOBBS, 2007; LAMBERT et al., 2009). Os lipídeos e as proteínas liberados do endossomo, principalmente o colesterol livre e os aminoácidos provenientes da degradação da ApoB100, são então reutilizados pela células para formação de membranas, como as da mitocôndria e do retículo endoplasmático, principalmente pela ação das proteínas de Niemann-Pick C1 e C2 (BENITO-VICENTE et al., 2018b). Para evitar o acúmulo exagerado de colesterol livre no plasma ou nas membranas intracelulares, o colesterol é convertido em ésteres de colesterol pela ação da Acil-CoA-Acilttransferase (ACAT) e é armazenado na forma de gotículas lipídicas, que podem ser liberadas, quando necessário, pela ação da enzima colesterol éster hidrolase (CEH) (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012)

Alterações nas vias regulatórias do colesterol podem resultar em diversas outras dislipidemias, como a sitosterolemia Tipo C e a Doença de Niemann-Pick tipo C1 (BENITO-VICENTE et al., 2018b). O excesso de secreção de VLDL no plasma, por exemplo, pode levar a um conseqüente acúmulo de LDL plasmático e doenças cardíacas. Por outro lado, uma secreção deficiente de VLDL pode resultar em acúmulo no fígado, resultando em doenças hepáticas (BENITO-VICENTE et al., 2018b).

As dislipidemias podem ser caracterizadas como o conjunto de alterações que ocorrem durante uma ou mais etapas da metabolização dos lipídeos, cujos efeitos manifestam-se através do aumento da LDL colesterol (LDL-c), do colesterol sérico total (CT) e dos triglicérides (TG) ou da diminuição da HDL colesterol (HDL-c) (MUTHUSAMY, 2016).

As dislipidemias são classificadas em primárias e secundárias; sendo as primárias aquelas relacionadas às variações genéticas mono ou poligênicas, resultando em alterações na síntese e no metabolismo de lipoproteínas com superprodução ou defeito na remoção plasmática de LDL, baixa produção de HDL ou diminuição do metabolismo de triglicérides (TG) (XAVIER et al., 2013; HEGELE et al., 2015; GARCÍA-GIUSTINIANI; STEIN, 2016); enquanto as dislipidemias secundárias ocorrem como consequências de outras doenças, como a diabetes melito, hipotireoidismo, doenças renais ou hepáticas, podendo sofrer influência de fatores como obesidade, estado de pós-menopausa, dieta rica em carboidratos e lipídeos, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo (FREITAS, 2010).

1.2. Hipercolesterolemia Familiar (HF)

Dentre as diversas dislipidemias, destaca-se a hipercolesterolemia familiar (HF). A HF é a doença genética metabólica mais comum, de herança autossômica codominante, caracterizada principalmente por elevadas concentrações de colesterol plasmático desde o nascimento (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021) que, se não tratadas, aumentam a probabilidade de formação de placas ateroscleróticas e, conseqüentemente, apresentam maior risco (3 a 4x) de desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCVs) (CHEN; CHEN; ZHANG, 2019; CHEMELLO et al., 2021).

Considerando a complexidade regulatória do metabolismo do colesterol, diversos fatores genéticos e não genéticos podem levar ao desenvolvimento da HF. Os genes diretamente envolvidos são o *LDLR*, o *APOB*, a *PCSK9* e a *APOA1*, que codificam, respectivamente, as proteínas para o Receptor de LDL, Apolipoproteína B 100, Pró-proteína convertase subtilisina-kexina 9 e Apolipoproteína A1. Outros genes, com menor frequência, também contribuem para a HF, como *ABCG5*, *ABCG8*, *APOE*, dentre outros (MABUCHI, 2017; BENITO-VICENTE et al., 2018b;

CHEN; CHEN; ZHANG, 2019; SARRAJU; KNOWLES, 2019; CHEMELLO et al., 2021).

De acordo com a literatura, a frequência da HF na forma heterozigota (HeHF), está entre 1:200 e 1:300 dependendo dos critérios adotados (VRABLIK et al., 2020). A forma homozigota (HoHF), por sua vez, apresenta uma frequência de 1: 300.000 a 1:1.000.000 (BENITO-VICENTE et al., 2018b; CHEN; CHEN; ZHANG, 2019; CHEMELLO et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). Estudos recentes realizados com populações da China e da Austrália, revelaram uma frequência de HeHF de 1:211~359 e 1:229~353, respectivamente (WATTS et al., 2016). Em 2017, Chen e colaboradores estimaram que havia aproximadamente 30 milhões de casos de HF ao redor do mundo, sendo 2.580.000 casos apenas na América Latina (CHEN; CHEN; ZHANG, 2019).

De maneira geral, valores maiores ou iguais à 200 mg/dL de colesterol total (CT) e maiores ou iguais a 100 mg/dL do colesterol da LDL são considerados valores limitantes, acima dos quais o risco de doenças cardiovasculares aumenta drasticamente. Valores de CT e do colesterol da LDL em pacientes HeHF não tratados são de aproximadamente 300 mg/dL (7,8 mmol/L) e 194 mg/dL (~>5 mmol/L), respectivamente, que pode resultar em eventos cardiovasculares entre os 30~50 anos para homens e 40~60 anos para mulheres. Em HoHF, pacientes apresentam valores do colesterol da LDL colesterol acima de 500 mg/dL (>13 mmol/L) quando não tratados, ou acima de 300 mg/dL (aproximadamente >8mmol/L) quando estão sob tratamento com hipolipemiantes (VRABLIK et al., 2020). Em paciente HoHF, eventos ateroscleróticos severos começam já na infância e, se não tratados, geralmente vão a óbito antes dos 30 anos (SARRAJU; KNOWLES, 2019; CHEMELLO et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). A figura 1 esquematiza a representação das características da HF.

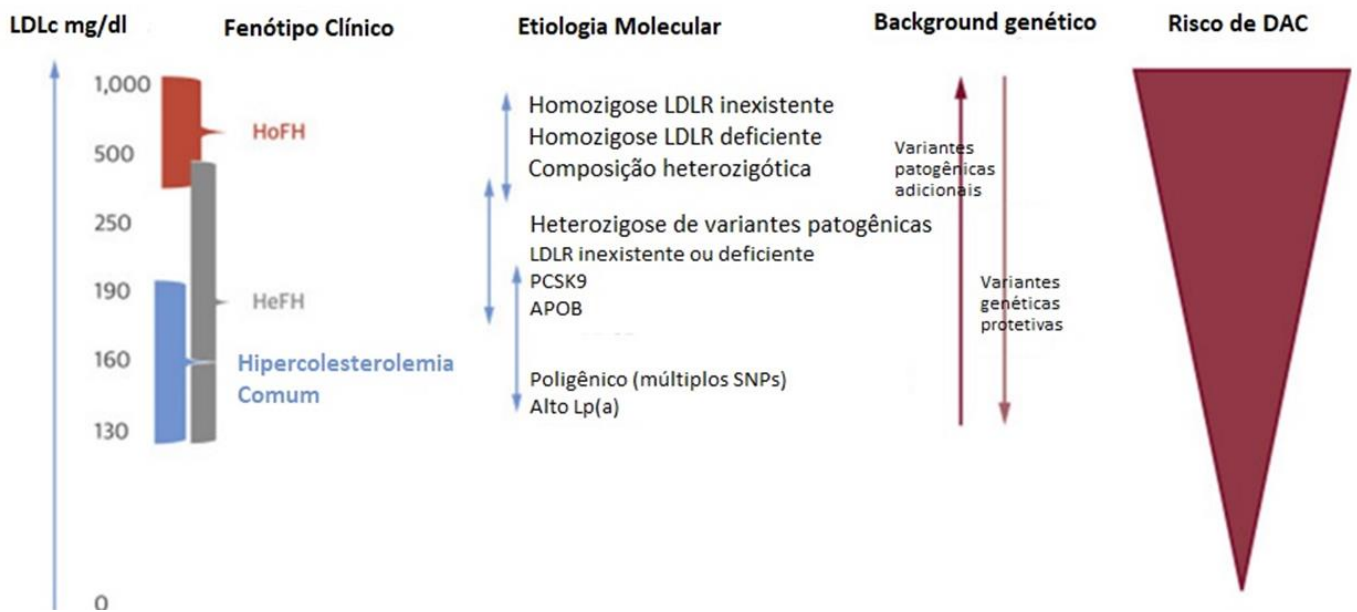


Figura 1: Representação esquemática dos valores de colesterol e seu respectivo quadro de HF, bem como os riscos de DAC. Adaptado de (SARRAJU; KNOWLES, 2019)

Quadros mais graves de HF podem apresentar sintomas físicos comuns, apesar de não estarem presentes em todos os casos. O acúmulo de colesterol nos tecidos pode levar ao desenvolvimento de manifestações cutâneas, principalmente na derme, como o aparecimento de xantomas cutâneos e tendinosos, xantelasmas nas pálpebras e arco córneo. Em pacientes HoHF, esses sinais costumam ser a primeira manifestação da doença, muitas vezes ainda na infância (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). Contudo, apesar de pacientes HF possuírem um elevado risco de aterosclerose prematura, eles podem ter uma expectativa de vida normal se forem alcançados e mantidos valores de colesterol da LDL dentro dos parâmetros recomendados. Pacientes HF devem ser orientados e encorajados a seguirem uma dieta saudável e terem uma rotina de prática de atividade física regular e monitorada. Além disso, outros fatores de risco tradicionais como tabagismo, hipertensão, diabetes e obesidade devem ser cuidadosamente controlados, considerando a alta associação com doença cardiovascular aterosclerótica em pacientes HF (CHEMELLO et al., 2021; FUTEMA et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

De acordo com a Sociedade Europeia de Aterosclerose (EAS), o diagnóstico genético da HF deve ser recomendado e considerado para pacientes com Doença

Cardíaca Coronariana (CHD) com idade inferior a 55 para homens e inferior a 60 para mulheres; em pessoas com parentes que possuem DCV prematura fatal ou não-fatal; em pessoas com parentes que possuem xantomas tendinosos; em pessoas com valores bem elevados colesterol da LDL (adultos: >190 mg/dL (5 mmol/L) e crianças >150 mg/dL (4 mmol/L)); e em parentes de primeiro grau de portadores de HF (MACH et al., 2020). Diversos guias para o diagnóstico genético de HF já foram desenvolvidos, como o *Simon Broome Register Group* (SBRG), o *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) e o *Make Early Diagnoses to Prevent Early Deaths* (MEDPED), que apesar de possuírem pequenas diferenças, apresentam diversos critérios em comum, considerando os sintomas físicos, valores de colesterol plasmático, histórico familiar de HF e análise genética (BENITO-VICENTE et al., 2018b). A tabela 1 demonstra uma síntese dos principais critérios utilizados por esses guias.

Tabela 1: Principais critérios utilizados para o diagnóstico da HF

Critério	DLCN	MEDPED	Simon-Broome	AHA	
Histórico Familiar	DAC	- DAC Precoce [1] - DVP ou DCeV [1]	NA	IM - <50 anos em parentes do 2° grau ou <60 anos em parentes do 1° grau [4]	DAC precoce em parentes 1° grau [b]
	LDLc (mg/dL)	Parente com LDLc >95% percentil - Adulto [2] - Criança [1]	NA	>290 em parentes de 1° ou 2° grau [5]	Parentes afetados de 1° grau [c]
	Estigmas	Xantomas tendíneos e/ou arco córneo [2]	NA	Xantomas tendíneos em parentes de 1° grau [2]	NA
Histórico Clínico	NA	- DAC Precoce [2] - DVP ou DCeV [1]	NA	NA	NA
Estigmas Físicos	-	Xantomas tendíneos [6] e arco córneo <45 anos [4]	NA	Xantomas tendíneos [2]	NA
Valores lipídicos	Colesterol Total (mg/dL)	NA	NA	>290 (adultos) [1] >260 (crianças) [1]	NA
	LDLc (mg/dL)	>325 [8] 251~325 [5] 191~250 [3] 155~190 [1]	>220~360	>190 (adultos) [1] > 160 (crianças) [1]	>190 (adultos) [a] > 160 (crianças) [a]
	Análise	Mutações nos <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> e <i>PCSK9</i>	Sem caso de FH	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> e <i>PCSK9</i> [3]	<i>LDLR</i> , <i>APOB</i> e

genética	genes	[8]	em parentes		<i>PCSK9</i> [d]
Diagnóstico de HF		Definitivo: >8			
		Provável: 6~8	Ajuste dos níveis de corte de LDLc	Definitivo: 3	a + (b ou c) ou d
		Possível: 3~5		Provável: 5	

Legenda 1: DAC: Doenças arterial coronariana; DCeV: Doença cérebro vascular; DVP: Doenças vascular periférica; HF: Hipercolesterolemia Familiar; IM: Infarto do Miocárdio NA: Não aplicável; LDLc: colesterol da lipoproteína de baixa densidade. Números entre colchetes representam a pontuação de cada critério. Adaptado de: (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

O diagnóstico da HF baseado apenas na avaliação clínica, como os valores de colesterol total, colesterol da LDL, e presença de xantomas e xantelasma é eficiente no diagnóstico de quadros clássicos e severos, cujos sintomas são mais evidentes, porém é incapaz de detectar quadros mais simples. O desenvolvimento e utilização das técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS) propiciaram a descoberta de diversas variantes genéticas relacionados à HF, que podem estar associados não apenas aos quadros severos, mas também aos casos da HF moderada. (BENITO-VICENTE et al., 2018b)

Apesar da elevada concentração do colesterol da LDL ser o fator determinante para a gravidade do caso, o fenótipo clínico de pacientes com HF pode variar consideravelmente, porque o aumento não está associado apenas à quantidade de variantes que o paciente possui, mas também com o impacto funcional de cada uma dessas variantes. O fenótipo da HF também pode ser influenciado por outros fatores genéticos e ambientais, de forma que pacientes com variantes idênticas podem demonstrar fenótipos diferentes (VRABLIK et al., 2020; CHEMELLO et al., 2021).

Nesse sentido, a *European Atherosclerosis Society* (EAS) já incluiu exames genéticos como parte do diagnóstico da HF, segundo os quais, o diagnóstico deve considerar: a confirmação genética de dois alelos mutantes no *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ou *LDLRAP1*, ou concentrações do colesterol da LDL em pacientes não tratados >500 mg/dL (13 mmol/L); ou concentrações do colesterol da LDL em pacientes tratados >300 mg/dL (≥ 8 mmol/L) juntamente com xantomas cutâneos ou tendinosos antes dos 10 anos de idade; ou elevadas concentrações do colesterol da LDL em pacientes não tratados, condizentes com o quadro de HeHF em ambos os pais (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

O principal foco do tratamento da HF consiste basicamente na diminuição e manutenção dos valores do colesterol da LDL plasmática dentro dos parâmetros recomendados, de maneira a evitar a formação de placas ateroscleróticas e suas consequências. As estatinas, a principal classe de medicamentos utilizados para tratamento da HF, atuam, portanto, estimulando a síntese do LDLR para aumentar a captura de LDL colesterol e diminuir sua concentração plasmática. A dose de estatina administrada deve ser individualizada, levando-se em consideração a idade,

a situação cardiovascular, os valores esperados de colesterol, bem como interações medicamentosas e a intolerabilidade. Contudo, apesar das diferentes dosagens e dos diferentes tipos de estatinas existentes hoje no mercado, como a sinvastatina, rosuvastatina, atorvastatinas, pravastatinas, entre outras, seus efeitos dependem da funcionalidade do receptor da LDL, apresentando resultados não tão satisfatórios em pacientes HoHF, ou em pacientes com variantes nulas do *LDLR* (CHEMELLO et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

Contudo além das vias que possuem o LDLR como alvo terapêutico, outros medicamentos foram desenvolvidos para o controle da HF. O Ezetimibe, por exemplo, inibe a absorção de colesterol e fitosteróis pelos enterócitos da região do jejuno, através do bloqueio da ação da proteína de Niemann-Pick C1 tipo 1 (VRABLIK et al., 2020). O mipomersen e lomitapide, por suas vezes, inibem a produção de lipoproteínas contendo ApoB e são, portanto, efetivas mesmo em pacientes sem nenhum tipo de resíduo funcional de LDLR (WALDMANN et al., 2017; CHEMELLO et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). Já o Alirocumab e o Evolocumab são dois medicamentos desenvolvidos a base de anticorpos monoclonais anti-PCSK9 que atuam inativando essa proteína e impedindo que esta degrade o LDLR (VRABLIK et al., 2020). O Inclisiram, por sua vez, é um ácido ribonucleico (RNA) pequeno interferente, que atua inibindo a síntese intracelular de PCSK9 nos hepatócitos (CHEMELLO et al., 2021; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

1.2.1. O gene do *LDLR*

O gene do *LDLR* está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.1-13-3), e possui 45 kb de extensão com 18 éxons que codificam 839 aminoácidos na sua forma madura. Esse gene é majoritariamente expresso no fígado, embora também seja expresso em células do tecido periférico. A proteína recém-sintetizada possui peso molecular de cerca de 120 kDa, que posteriormente será submetida a um processo de glicosilação extensa no complexo de Golgi, atingindo a forma madura com 160 kDa (YAMAMOTO et al., 1984; LINDGREN et al., 1985; MOLLAKI; PROGIAS; DROGARI, 2013; STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2017)

O gene *LDLR* foi o primeiro a ser estudado e o primeiro a ser associado à HF (GOLDSTEIN; BROWN, 1974). Atualmente, responde por cerca de 80 a 90% dos casos associados a doença, com mais de 3.000 variantes já registrados no banco de dados ClinVar (BENITO-VICENTE et al., 2018b; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). Diversos tipos de variantes genéticas do *LDLR* já foram descritos como patogênicas, incluindo variantes de sentido errado (*missense*), variante sem sentido (*nonsense*), alteração do padrão de leitura do RNA mensageiro (*frameshift*), inserções e deleções (*indel*) e alterações no número de cópias (CNV). As variantes genéticas já descritas do *LDLR* podem ser classificadas em seis diferentes grupos de acordo com o resultado funcional provocado por essas variantes (figura 2) (CHOUMERIANOU; DEDOISSIS, 2005; SCHAEFER et al., 2012; DEFESCHE et al., 2017):

- Classe I: são as mais comuns, tais como grandes deleções, alterações na região promotora, alterações na região 5' não traduzida (5'UTR) ou mesmo na região codificadora do gene, que resultam na ausência total da proteína, na síntese de uma quantidade não detectável, ou ainda na síntese de proteínas com uma taxa de atividade inferior à 2%. Representam os casos mais graves de HF (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021)
- Classe II: representam as variantes que promovem uma liberação deficiente do LDLR do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, devido a um bloqueio parcial ou completo desse transporte;
- Classe III: representam as variantes que promovem uma ligação anormal da Apo B100 ao LDLR, afetando o domínio de ligação do receptor às partículas de LDL. Os receptores atingem a membrana citoplasmática, mas não se ligam ou ligam-se parcialmente às partículas de LDL;
- Classe IV: representam as variantes que causam uma deficiência na internalização da LDL;
- Classe V: são as variantes que impedem a dissociação do complexo LDL-LDLR, sendo este último degradado junto com o LDL no endossomo, impedindo, portanto, a reciclagem do receptor.
- Classe VI: são as variantes que promovem uma falha do transporte inicial do LDLR para a membrana basolateral.

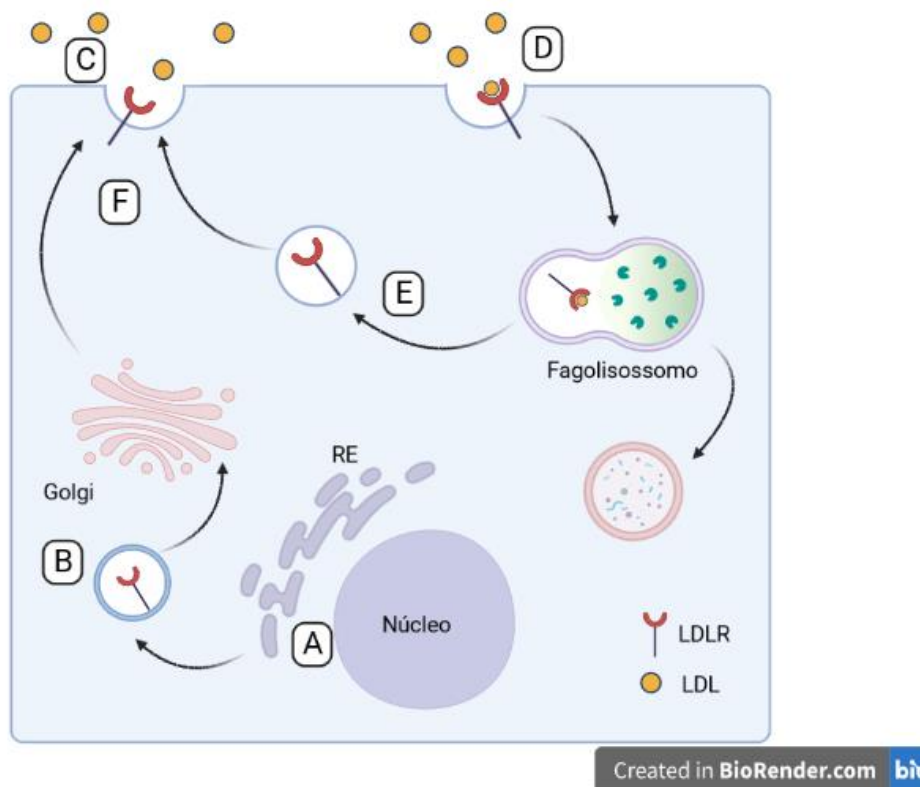


Figura 2: Representação esquemática da ação do LDLR. A: Variantes de classe I, que afetam a síntese do receptor; B: Variantes de classe II, que afetam o transporte do LDLR para o complexo de Golgi; C: variantes de classe III, que afetam o processo de interação do LDLR com a LDL; D: variantes de classe IV, que afetam o processo de internalização do complexo LDLR-LDL; E: variantes de classe V, que afetam o processo de reciclagem do receptor; F: variantes de classe VI, que afetam o processo de ancoramento do LDLR à membrana. Fonte: Próprio autor.

A figura 3 demonstra um esquema do LDLR, seus éxon e seus domínios

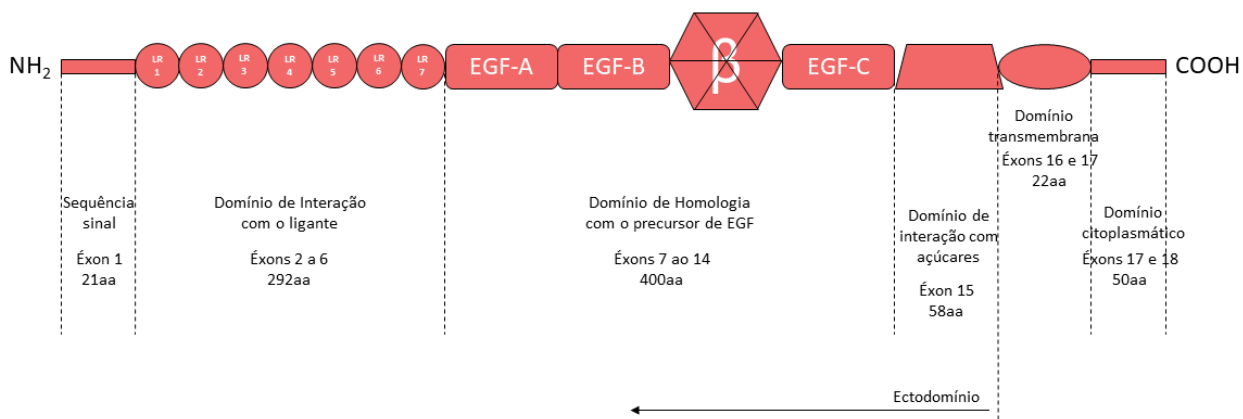


Figura 3: Esquema do receptor de LDL (LDLR), demonstrando seus domínios e os éxons correspondentes, bem como o domínio afetado por cada uma das variantes estudadas. Adaptado de (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

1.3. Sequenciamento genético e edição gênica

O constante aperfeiçoamento das técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos a partir de 2005, promoveu uma redução de custos e uma maior acessibilidade a essa ferramenta, possibilitando sua utilização em massa (BAMSHAD et al., 2011). O desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS) contribuiu não apenas para a redução dos custos de testes genéticos, mas também permitiu o sequenciamento do genoma ou exoma humano em um tempo relativamente curto (VRABLIK et al., 2020). Conseqüentemente, o grande aumento na quantidade de dados gerados e na quantidade de variantes identificadas, resultou na ampliação dos questionamentos funcionais, pois isoladamente os dados gerados pelo sequenciamento não são capazes de prever a influência dessas variantes no metabolismo e conseqüentemente na manifestação de doenças, mesmo utilizando análises avançadas de bioinformática (THORMAEHLEN et al., 2015; LI; WANG, 2017) e quimioinformática.

Para avaliação das variantes encontradas pós-análise preliminar e sua devida interpretação e associação com a fisiopatologia de doenças, necessita-se realizar alinhamentos cuidadosos utilizando-se vários genomas de referência, de forma que o processo de anotação dessas variantes possibilite uma melhor avaliação das suas conseqüências. O ANNOVAR (*Annotate Variation*) é uma ferramenta disponível online (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) para anotação das variantes, capaz não apenas de prever seus efeitos funcionais, mas também de compará-las com diversas bases de dados já existentes, permitindo inclusive a análise de outras regiões além dos genes, como seqüências alvo de microRNAs (miRNAs) e predição de estruturas secundárias de RNA. Diversas ferramentas de predição *in silico*, inclusas no ANNOVAR, podem ajudar a prever o efeito funcional das variantes encontradas, tentando prever o efeito que as variantes podem causar na estrutura e função da proteína, tais como SIFT, PolyPhen, Provean e *Mutation Taster*, cujos algoritmos já estão bem estabelecidos (NG; HENIKOFF, 2001; ADZHUBEI et al., 2010; WANG; LI; HAKONARSON, 2010; CHOI et al., 2012; SIM et al., 2012; SCHWARZ et al., 2014).

Pode-se também utilizar o *software* ANNOVAR em conjunto com a ferramenta de *docking* molecular, que consiste em uma análise virtual baseada em estrutura e

interação molecular. As estruturas tridimensionais de pequenas moléculas, simuladas em computador, são posicionadas sobre a estrutura alvo em diversas posições, conformações e orientações, sugerindo possíveis graus de interação a nível molecular. A utilização de *docking* em estudos genéticos possibilita a melhor compreensão da influência da variante encontrada sobre a interação com respectivo ligante (CHAUDHARY; MISHRA, 2016).

Apesar das ferramentas de predição *in silico* predizerem o efeito funcional das variantes sobre a ação da proteína, tal processo ainda precisa ser validado *in vitro*. Em pesquisas biológicas, técnicas capazes de remover, introduzir e alterar a sequência de DNA de células ou organismos facilitam a melhor compreensão da influência e dos efeitos de diversos genes em determinadas doenças (KHAN et al., 2018).

1.3.1. A Ferramenta CRISPR/Cas9

Ferramentas de edição gênica (EG) têm chamado a atenção de pesquisadores devido ao seu alto potencial de manipular, editar e modificar o genoma de diferentes espécies, com o objetivo de aumentar a compreensão de diversas mutações e variantes genéticas, e também devido à possibilidade de correção de mutações causadoras de doenças (ZHANG; QUAN; WANG, 2018; SHARMA et al., 2021). A grande velocidade na identificação de variantes propiciado pelo desenvolvimento do NGS, e a carência de estudos funcionais dessas variantes identificadas, tornam os mecanismos de edição gênica ferramentas essenciais para o estudo dessas variantes (BENITO-VICENTE et al., 2018b). Nos últimos anos, as ferramentas de EG e tecnologias relacionadas, têm sido utilizadas com sucesso por muitos pesquisadores em um grande número de aplicações, incluindo edição de genomas de plantas, edição de genomas de mamíferos *in vivo*, mutagênese sítio-dirigida e estudos de knock-out (ZHANG; QUAN; WANG, 2018).

EGs são técnicas que introduzem alterações de interesse no DNA na forma de substituições de bases ou inserções/deleções na região alvo. Diversas ferramentas de EG já foram desenvolvidas e estudadas com essa finalidade, como as baseadas em nucleases "Zinc Fingers" (ZFN) e as baseadas em nucleases efetoras do tipo ativadores transcricionais (TALENs). A primeira consiste na combinação não

específica do domínio de clivagem FokI e das Proteínas Zinc Fingers (ZFP), em que são utilizados ZFNs pareados, um "*upstream*" e outro "*downstream*" em relação ao sítio alvo, para promover a quebra da dupla-fita (DSB) de DNA. Contudo, ZFNs conseguem reconhecer apenas tripletes de DNA, restringindo, portanto, o número de sítios alvo. De maneira semelhante, as TALENs incluem a endonuclease FokI e um complexo de efetores tipo ativadores transcricionais (TALEs), que são sequências de aminoácidos que flanqueiam o sítio alvo do DNA. TALENs apresentam vantagens em relação às ZFNs, uma vez que reconhecem nucleotídeos individuais e são mais específicas que as ZFNs. Contudo, o empacotamento e a "entrega" das TALENs pode ser um desafio devido ao seu tamanho maior que as ZFNs (SHARMA et al., 2021).

Apesar dos ZFNs e TALENs terem sido amplamente utilizados para EG humana, animal e de plantas; o sistema CRISPR tem chamado atenção desde 2013, devido a sua maior eficiência, precisão, facilidade de uso e custo-benefício (MANGHWAR et al., 2019; UNİYAL et al., 2019; SHARMA et al., 2021).

As Repetições Palindrômicas Curtas Interespaçadas e Agrupadas Regularmente (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR*), associadas com a nuclease denominada CRISPR associada 9 (*Crispr associated 9 – Cas9*) foi originalmente descoberto em 1987 (SHARMA et al., 2021) como parte do sistema imune adaptado de bactérias, especialmente *S. Pyogenes*. Tal mecanismo propiciava resistência a elementos genéticos oriundos de um segundo organismo, identificando-os e clivando-os (ZHANG; QUAN; WANG, 2018; UNİYAL et al., 2019; SHARMA et al., 2021). O sistema CRISPR/Cas9 incorpora sequências do DNA invasor entre as sequências repetidas do CRISPR, sendo denominadas sequências protoespaçadoras, e sendo agrupadas em conjunto dentro da célula bacteriana. Essas regiões são transcritas e processadas em CRISPR RNAs (crRNAs) quando a bactéria sofre nova infecção do mesmo organismo invasor, onde cada crRNA hibridiza com um segundo RNA, conhecido como CRISPR RNA transativador (tracrRNA), e o conjunto resultante se complexa com a Cas9. Apesar da região protoespaçadora do crRNA direcionar a Cas9 para clivar o DNA invasor, a clivagem apenas ocorre caso a região do DNA invasor identificada pelo crRNA esteja próxima a pequenas sequências conhecidas como Motivo Adjacente ao Protoespaçador (*Protospacer Adjacent Motif – PAM*) (Figura

4) (KHAN et al., 2018; MANGHWAR et al., 2019; UNIYAL et al., 2019). Dessa forma, a geração de quebra de dupla-fita (*Double Strand Breaks – DSBs*) de DNA pelo sistema CRISPR/Cas9 pode ser direcionada para regiões específicas, desde que se possuam sequências nucleotídicas que guiem a Cas9 (RNA guia – sgRNA) para o sítio de clivagem, e a sequência alvo esteja próximo à sequência PAM (PELLAGATTI et al., 2015).

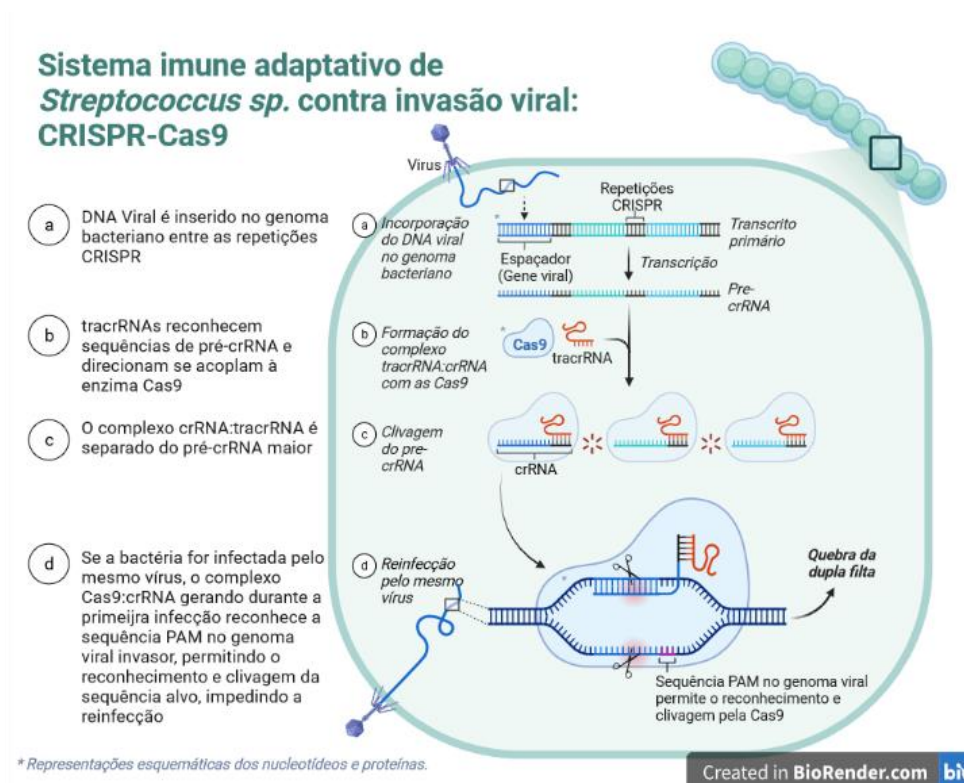


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes*. (Fonte: Adaptado de Biorender)

A indução de DSBs por Cas9 pode ser reparada por vias de reparos de DNA endógenos presentes em todos os tipos celulares: Reparação Homóloga (*Homology Directed Repair – HDR*) e Recombinação não-homóloga (*Non-Homologous End Joining – NHEJ*). Ambas as vias de reparos são utilizadas pelas células para manter a integridade genômica e a viabilidade celular. Na presença de um molde de reparação homóloga, o sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado para gerar modificações de sequências precisas (por exemplo, inserção de variantes) através do reparo por HDR (PELLAGATTI et al., 2015).

Apesar da edição gênica baseada em HDR ser limitada pela baixa eficiência devido à competição com o mecanismo NHEJ (ZHANG; QUAN; WANG, 2018), a

modificação genética via HDR já foi realizada com sucesso em plantas (SCHAEFFER; NAKATA, 2015) e mesmo em embriões humanos, nos quais foi realizado a correção por HDR de uma variante patogênica do gene *MYBPC3*, relacionado principalmente com cardiomiopatia hipertrófica (MA et al., 2017).. Além disso, o uso desse sistema em estudos clínicos para tratamento do câncer também já foi aprovado pelo Comitê de Aconselhamento do DNA Recombinante, do Instituto Nacional de Saúde (NIH) nos Estados Unidos da América (EUA) (SHARMA et al., 2021).

Com relação às DCVs pesquisas utilizando CRISPR/Cas9 já foram realizadas em camundongos para estudo dos genes relacionados com HF, como a *LDLR* e a *PCSK9* (JARRETT et al., 2018). Além disso, Tessadori e colaboradores (TESSADORI et al., 2018) também já aplicaram essa técnica para corrigir alterações genéticas cardiovasculares em modelos de zebrafish. Esses estudos sugerem o uso de tal tecnologia como uma potencial ferramenta de edição gênica para tratamento de DCVs, especialmente condições associadas com doenças hereditárias associadas ao metabolismo lipídico (SHARMA et al., 2021).

As aplicações futuras para o CRISPR/Cas9 são promissoras para provável aplicação clínica. Com a progressão das técnicas de edição gênica, as pesquisas que se utilizam de edição gênicas para tratamento de doenças humanas irá se desenvolver rapidamente (SHARMA et al., 2021). Contudo, apesar das conquistas no estudo da genética e na manipulação com sucesso de embriões humanos para a correção de doenças, incluindo a síndrome da imunodeficiência humana (HIV) (MA et al., 2017; ROSE; BROWN, 2019), há implicações éticas sobre manipulação genéticas em humanos. Apesar de algumas instituições como a Academia Nacional de Ciência, Engenharia e Medicina dos EUA ter demonstrado um suporte para as edições genéticas embrionárias para correção de mutações de doenças sérias quando não há outra alternativa, ainda são necessários mais estudos antes que o CRISPR/Cas9 possa se tornar uma opção viável e segura para aplicações clínicas (ZHANG; QUAN; WANG, 2018)

2. JUSTIFICATIVA

A HF, caracterizada principalmente pela elevada concentração do colesterol da LDL desde a infância, representa um sério fator de risco para DCVs. Dentre os diversos genes envolvidos no metabolismo do colesterol, destaca-se o *LDLR*, e os diferentes efeitos de suas variantes genéticas. Devido à grande variabilidade fenotípica dos portadores de HF, as pequenas diferenças entre os critérios diagnósticos adotados, bem como o alto custo dos testes genéticos em relação aos exames clínicos comuns, a realização do diagnóstico genético em massa continua sendo um desafio para o diagnóstico da HF, com a maioria dos países realizando menos de 1% dos casos (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). A República Tcheca, por exemplo, um dos países líderes no diagnóstico de HF, permanece ainda com aproximadamente 80% dos pacientes HF não diagnosticados (VRABLIK et al., 2020).

Além da detecção de variantes genéticas do *LDLR*, uma melhor compreensão da significância clínica dessas variantes pode ser alcançada através de uma validação funcional, para que possam ser utilizadas para tornar o diagnóstico de HF mais preciso (BENITO-VICENTE et al., 2018c). Apesar de diversos estudos já terem sido realizados para melhor caracterizar o efeito de cada uma dessas variantes, muitas ainda apresentam resultados contraditórios ou são consideradas de significado incerto (VUS).

Nesse sentido, a ferramenta CRISPR/Cas9, torna-se importante para a construção de modelos contendo variantes genéticas específicas em células de linhagens permanentes, contribuindo para uma melhor compreensão de seus efeitos.

Assim, devido à importância do papel do LDLR no perfil fisiopatológico da HF, e considerando os resultados prévios obtidos em estudos do nosso grupo, caracterizar funcionalmente as diferentes variantes encontradas no *LDLR* construindo modelos em células de linhagens através da edição gênica por CRISPR/cas9, pode fornecer evidências que possam caracterizar alguma possível alteração de função, melhorar a avaliação da influência dessas variantes, e estabelecer uma possível relação genótipo-fenótipo (SILVA et al., 2012). A caracterização precisa dessas variantes

pode contribuir para um melhor direcionamento terapêutico, melhor definição para as variantes que ainda não apresentam significância conclusiva, e poderiam contribuir para o avanço da terapia farmacológica personalizada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilização da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 para realização da avaliação funcional de variantes genéticas do gene *LDLR* identificados em pacientes diagnosticados com Hipercolesterolemia Familiar.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar as variantes patogênicas do *LDLR* baseado nos domínios afetados pelas variantes, pelas análises funcionais *in silico* e pela frequência do alelo raro na população global e brasileira
- Utilizar o sistema CRISPR/Cas9 para introdução de variantes patogênicas/deletérias do gene *LDLR* em células HepG2
- Avaliar a funcionalidade do *LDLR* nas células HepG2 transfectadas com as variantes, por citometria de fluxo e microscopia confocal
- Estabelecer uma possível relação genótipo/fenótipo comparando-se os dados obtidos *in vitro* com os dados clínicos

4. CASUÍSTICA

O presente faz parte de um projeto (Projeto Fapesp processo nº2016/12899-6) (BORGES, 2019), no qual foram sequenciados 287 pacientes fenotipicamente caracterizados como HF e 45 pacientes controle, baseados em perfil clínico e análise do perfil lipídico, como valores de colesterol total (CT), LDL, HDL, VLDL e TG. O diagnóstico fenotípico de HF foi realizado utilizando-se o critério DLCN modificado (FALUDI et al., 2017; IZAR et al., 2021). Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que eram acompanhados pelos médicos da Divisão de Dislipidemia no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e pelos médicos do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo (BP). Todos os

pacientes foram devidamente informados sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, instituição principal, sob o CAAE nº 24618713.0.1001.5462 (Anexo 2) e pelo CEP de outros centro participantes: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), sob o CAAE nº 24618713.0.3001.0067 (Anexo 3), Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) sob o CAEE nº24618713.0.2004.5415 (Anexo 4) e Real e Benemérita Associação Portuguesa de Beneficência de São Paulo (BP), sob parecer no 4.341.106 (Anexo 5).

5.2. Análise do perfil lipídico

A análise da correlação genótipo-fenótipo foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* 9.3.1, comparando-se os valores de CT, HDL, LDL, VLDL e TG entre os grupos dos portadores de cada uma das variantes selecionadas, o grupo HF dos não portadores das variantes, e o grupo normolipidêmico.

5.3. Seleção das variantes do gene *LDLR* e Análise de Modelagem Molecular

Utilizando-se os resultados obtidos do trabalho em andamento do nosso grupo (BORGES, 2019) identificaram-se e selecionaram-se as variantes do gene *LDLR* que poderiam estar relacionadas com a HF através de resultados de anotação das variantes realizadas pelo software ANNOVAR, que inclui os programas de predição *in silico* Polyphen2, SIFT, Provean e *Mutation Taster*. As variantes foram selecionadas considerando também aquelas que, apesar de já terem sido identificadas, ainda carecem de resultados alteração funcional *in vitro* associadas ao fenótipo HF, ou que apresentam resultados controversos segundo o ClinVar. A tabela 2 demonstra as variantes do *LDLR* encontradas em estudo prévio do nosso grupo (BORGES, 2019), enquanto a figura 5 demonstra a porcentagem de variantes encontradas no *LDLR*, para cada um de seus éxons.

Tabela 2: Variantes missense e stop gain do gene LDLR identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar.

Identificação	Tipo	Troca Nucleotídica	Troca Aminoácido
rs121908039	Não sinônima	c.551G>A	p.Cys184Tyr
rs879254797	Não sinônima	c.1118G>A	p.Gly373Asp
rs28941776	Não sinônima	c.1646G>A	p.Gly549Asp
rs376207800	Não sinônima	c.185C>T	p.Thr62Met
rs1135402768	<i>stop gain</i>	c.487C>T	p.Gln163Ter
rs752596535	<i>stop gain</i>	c.501C>A	p.Cys167Ter
rs121908026	Não sinônima	c.530C>T	p.Ser177Leu
rs875989902	Não sinônima	c.533A>T	p.Asp178Val
rs373822756	Não sinônima	c.662A>G	p.Asp221Gly
rs148698650	Não sinônima	c.829G>A	p.Glu277Lys
rs879254747	Não sinônima	c.977C>G	p.Ser326Cys
rs879254754	Não sinônima	c.1013G>A	p.Cys338Tyr
rs139361635	Não sinônima	c.1024G>A	p.Asp342Asn
rs11669576	Não sinônima	c.1171G>A	p.Ala391Thr
rs28942078	Não sinônima	c.1285G>A	p.Val429Met
rs28942079	Não sinônima	c.1291G>A	p.Ala431Thr
rs879254913	Não sinônima	c.1463T>C	p.Ile488Thr
rs137929307	Não sinônima	c.1775G>A	p.Gly592Glu
rs753707206	Não sinônima	c.1801G>C	p.Asp601His
rs1057519677	Não sinônima	c.1853T>G	p.Val618Gly
rs121908031	<i>stop gain</i>	c.2043C>A	p.Cys681Ter
rs45508991	Não sinônima	c.2177C>T	p.Thr726Ile
rs750518671	Não sinônima	c.2389G>C	p.Val797Leu
rs5928	Não sinônima	c.2441G>A	p.Arg814Gln
rs137853964	Não sinônima	c.2479G>A	p.Val827Ile
rs72658860	Não sinônima	c.970G>A	p.Gly324Ser
rs113972139	Não sinônima	c.2312C>T	p.Ala771Val
rs750649426	<i>stop gain</i>	c.1176C>A	p.Cys392Ter

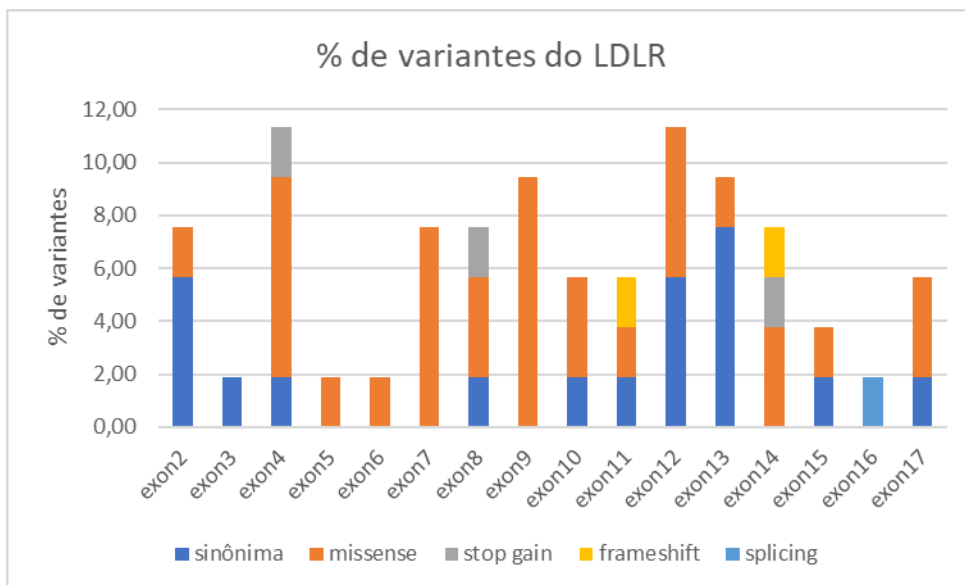


Figura 5: Gráfico demonstrando a porcentagem de variantes encontradas em cada um dos éxons, considerando o total de variantes encontrados no nosso estudo.

A seleção das variantes do *LDLR* (transcrito NM_000527) foi baseada na anotação das variantes gerados pelo ANNOVAR, cujos resultados foram considerados patogênicos/provavelmente patogênicos pelas quatro principais ferramentas de predição *in silico* citados anteriormente. Os critérios de patogenicidade utilizados por cada ferramenta estão descritos na tabela suplementar 1. Além dessa análise preliminar, foi considerado também a frequência do alelo raro (*MAF*), cujas baixas frequências podem diminuir a possibilidade de serem polimorfismos.

Baseado no trabalho desenvolvido por Rodríguez-Jimenez e colaboradores (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019), que estabelece uma relação entre os éxons e os domínios codificado do *LDLR*; considerou-se também quais domínios seriam afetados pelas variantes selecionadas, de forma a realizar posterior análise funcional. Foram identificadas as variantes exônicas *missense* ou de *stop gain*, que foram classificadas como patogênicas/deletérias nos principais programas de predição *in silico* (Tabela 3), e selecionaram-se seis variantes para edição gênica em células HepG2 utilizando-se CRISPR/Cas9 e posterior análise funcional: rs121908039 (c.551G>A p.C184Y), rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), rs28941776 (c.1646G>A p.G549D), rs750518671 (c.2389G>C p.V797L), rs5928 (c.2441G>A p.R814Q) e rs137853964 (c.2479G>A p.V827I).

Tabela 3: Tabela demonstrando a localização exônica da variante, o MAF e o resultado das predições *in silico*.

rs	Éxon	MAF	Clinvar	InMeRF_hg38	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Provean
rs121908039	4	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs879254797	8	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs28941776	11	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs376207800	2	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Deletéria	Polimorfismo	Causador de Doença	Deletéria
rs1135402768	4	-	Patogênico	#N/D	-	-	Causador de Doença	-
rs752596535	4	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	#N/D	-	-	Causador de Doença	-
rs121908026	4	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs875989902	4	<0.001	Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs373822756	4	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs148698650	6	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Tolerado	Benéfico	Causador de	Neutro

rs879254747	7	-	Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs879254754	7	-	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs139361635	7	0.0015	Significado Incerto	Patogênico	Tolerado	Benéfico	Neutro	Neutro
rs11669576	8	0.6769	Significado Incerto	Normal	Tolerado	Benéfico	Polimorfismo	Neutro
rs28942078	9	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Neutro
rs28942079	9	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs879254913	10	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs137929307	12	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs753707206	12	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Deletéria	Benéfico	Neutro	Deletéria
rs1057519677	13	-	Patogênico/Provavelmente Patogênico	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Doença Causador de Doença	Deletéria
rs121908031	14	<0.001	Patogênico/Provavelmente Patogênico	#N/D	-	-	Doença Causador de Doença	-
rs45508991	15	0.0017	Significado Incerto	Patogênico	Tolerado	Benéfico	Neutro	Deletéria

rs750518671	16	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Tolerado	Benéfico	Causador de Doença	Neutro
rs5928	17	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Tolerado	Deletéria	Causador de Doença	Neutro
rs137853964	17	<0.001	Significado Incerto	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Tolerado
rs72658860	7	0.0024	Significado Incerto	Patogênico	Deletéria	Deletéria	Causador de Doença	Deletéria
rs113972139	16	<0.001	Significado Incerto	Normal	Tolerado	Tolerado	Polimorfismo	Tolerado
rs750649426	8	<0.001	Significado Incerto	#N/D	-	-	-	-

5.3.1. Estudos de Modelagem Molecular

5.3.1.1. Predição dos efeitos da variante na estabilidade da proteína

A compreensão precisa do impacto das variantes na estabilidade das proteínas é essencial para prever seus efeitos tanto na conformação quanto na estrutura da proteína. Nesse sentido, as abordagens atuais têm enfrentado desafios na avaliação precisa desses impactos, geralmente possuindo uma propensão relacionada à desestabilização das variantes e capacidade limitada de predição. Para superar esses desafios, utilizou-se a ferramenta DDMut (ZHOU et al., 2023), uma rede rápida e precisa desenhada para prever alterações na energia livre de Gibbs resultante de mutações pontuais. A ferramenta DDMut considera tanto a mutação direta quanto uma hipotética mutação reversa, contribuindo efetivamente para a construção de um modelo antissimétrico (Tabela Suplementar 2).

5.3.1.2. Modelagem da Homologia e Preparação da Estrutura

As sequências referências do LDLR e da APOB foram obtidas do banco de dados *The Universal Protein Resource* (Uniprot) (LDLR código: P35951 e ApoB código: Q0VD83), os modelos tridimensionais foram gerados utilizando-se o processo AlphaFold2 (<https://github.com/deepmind/alphafold>). Para avaliar a validade das estruturas geradas, empregou-se a análise de estrutura da proteína (PROSA - <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), o índice de qualidade geral Z-score e qualidade de modelos locais. Para finalizar as estruturas do LDLR e APOB, realizou-se a adição de átomos de hidrogênio, e as cadeias laterais faltantes foram corrigidas utilizando-se a ferramenta Biopolymer no Sybyl X 2.0 (<https://certara.com/>) (TRIPONS Inc) e o código PROPKA(LI; ROBERTSON; JENSEN, 2005; MADHAVI SASTRY et al., 2013) (Github code: <https://github.com/jensengroup/propka>).

5.3.1.3. Análise de *Docking* Molecular Proteína-Proteína

Para a análise de *docking* molecular, utilizou-se a ferramenta ZDOCK, cujo algoritmo foca nas interações de corpo rígido realizadas através de pesquisas em espaços rotacionais enquanto emprega um algoritmo de FFT para aumentar a eficiência da busca nos espaços translacionais. Para estudar o *docking* proteína-

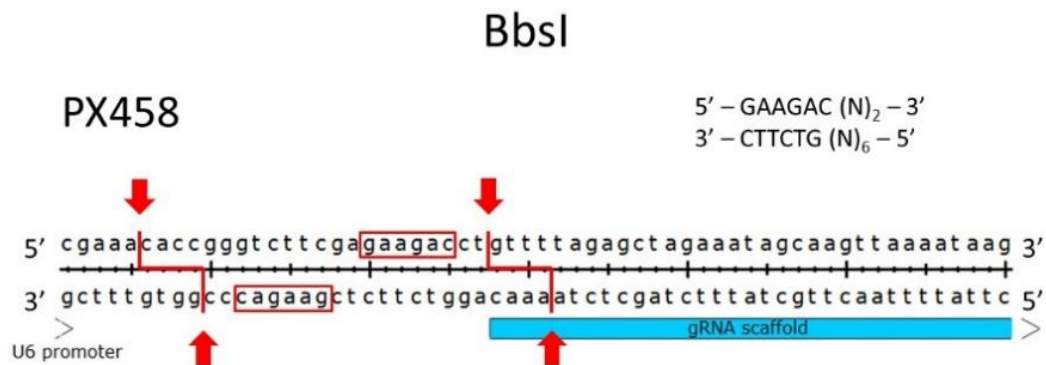
proteína, empregaram-se duas versões do ZDOCK, que diferiam apenas nos parâmetros utilizados para definir as pontuações dos algoritmos. Especificamente, utilizou-se tanto ZDOCK2.1 que incorpora apenas a complementaridade em forma de par, e o ZDOCK2.3 que, além da complementaridade em forma de par, contempla também os efeitos eletrostáticos e energia de dissolução (PIERCE; HOURAI; WENG, 2011; PIERCE et al., 2014). O intervalo rotacional das amostras foi definido para 6° e todos os parâmetros padrões foram utilizados.

5.4. Edição Gênica Por CRISPR/Cas9

O processo de edição gênica por CRISPR/Cas9 ocorre pela transcrição de um sgRNA e pela expressão da endonuclease Cas9. Os sgRNAs são responsáveis por guiar a endonuclease Cas9 para o sítio alvo de clivagem da dupla fita de DNA, através do pareamento de bases. Diferentemente dos métodos de clonagem tradicionais, onde se utilizam enzimas de restrição para selecionar um segmento de DNA de um organismo doador para então inseri-lo em vetor plasmidial, o método de CRISPR/Cas9 utiliza enzimas de restrições apenas no processo de digestão do plasmídeo para inserção do segmento de DNA no vetor, e não durante a etapa de seleção desse inserto. Por CRISPR/Cas9, a seleção do inserto consiste na própria síntese de oligos de DNA fita-simples, que serão posteriormente hibridizados e inseridos no plasmídeo de interesse (HSU et al., 2013; DOENCH et al., 2016)

O plasmídeo pSpCas9-2A(BB)-GFP (PX458) (*AddGene plasmid #48138*, *AddGene*, Massachusetts, EUA) foi utilizado para a realização da edição gênica por CRISPR/Cas9 por possuir a região promotora U6 responsável pela transcrição do sgRNA utilizado. Na extremidade dessa região, há o sítio de restrição para a inserção do sgRNA, utilizando-se a enzima de restrição *BbsI*. A figura 6 mostra o mapa do plasmídeo PX458 e seus sítios de restrições. Apesar de na figura não estar demonstrado o sítio de restrição para a enzima *BbsI*, encontra-se nas documentações e na análise da sequência do plasmídeo o sítio para atuação da enzima de restrição utilizada (Tabela 4) (*AddGene*). Além disso, o plasmídeo também possui cassete de expressão da endonuclease Cas9, responsável pela clivagem da dupla fita de DNA no sítio alvo, fusionado a sinais de localização celular (NLS) nas regiões C e T-terminal da endonuclease (ZHENG et al., 2018), e ainda possui cassete de expressão da proteína verde fluorescente (GFP), possibilitando análise de transfecção em microscópio de fluorescência.

dos sgRNAs no plasmídeo PX458 linearizado, prosseguiu-se com a clonagem dos mesmos em bactérias *E. coli* DH5 α , e posterior purificação dos mesmos.



Figura

7: Sequência da região do plasmídeo PX458 demonstrando a região “stuffer” a ser removida durante a digestão com a enzima BbsI. Os sgRNAs são inseridos no lugar nessa região removida. Nota: Setas vermelhas: indicam a região de clivagem pela enzima BbsI; Retângulos vermelhos: Sítio de restrição para a enzima BbsI. Adaptado de AddGene (Addgene plasmid #48138).

A edição gênica por CRISPR/Cas9 possibilita clivagens da dupla fita de DNA em regiões alvo pela ação da Cas9, guiada pelos sgRNAs. Após o processo de clivagem da região alvo do DNA, contudo, as células acionam mecanismos para reparar a região clivada do DNA. O processo de reparo por NEHJ consiste no reparo da região clivada por inserção/deleção aleatória de bases, tendendo, portanto, a levar a uma perda da função do gene (CUI et al., 2018). A reparação por HDR, por sua vez, se utiliza de um molde de DNA para realizar o reparo da região clivada, de forma a diminuir possíveis erros durante o reparo (CUI et al., 2018; YANG; HUANG, 2019). Considerando o processo de HDR, optou-se nesse projeto por fornecer juntamente com o sgRNA, um molde de DNA contendo o sítio polimórfico selecionado para favorecer a reparação homóloga.

Para o mecanismo de HDR, os moldes fornecidos devem possuir, além da sequência que deseja ser inserida ou modificada, sequências acopladas em suas extremidades (braços homólogos) para que seja possível o correto pareamento e consequente reparo (CUI et al., 2018; YANG; HUANG, 2019). Apesar de variar um pouco de acordo com a literatura, os moldes de reparo possuem entre 100 e 200 pb, com aproximadamente 40pb em cada extremidade dos braços homólogos. Considerando a atuação da DNA polimerase, responsável pela replicação da fita de

DNA no sentido 5'→3', a posição da variante inserida no molde de reparo e a posição da DSB provocada pela Cas9 precisam ser levadas em consideração no momento da construção do molde. Quando a alteração da base desejada se encontra posterior à região clivada pela endonuclease, o molde fornecido deve estar orientado no sentido 3'→5', ao passo que caso a DSB ocorra após a região de alteração desejada, o molde fornecido deve estar na orientação 5'→3' (O'CONNOR-GILES LAB. WILDONGER LAB. HARRISON LAB, [s.d.]).

5.4.1. Expansão dos Vetores Plasmidiais

5.4.1.1. Preparo de Células Quimiocompetentes

Bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes foram preparadas conforme descrição resumida a seguir: no primeiro dia, as bactérias *E. coli* DH5α foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em banho de gelo. Após descongelamento, utilizou-se uma alça plástica estéril para estriar as bactérias no meio de cultura Luria Bertani (LB) em placa de Petri (sem antibiótico) para poder isolar as colônias, que foram posteriormente incubadas em estufa a 37°C por cerca de 16 h. Nesse mesmo dia, foi preparada a solução de transformação I pH 5,8 (TFB I) (MnCl₂·4H₂O 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂·2H₂O, glicerol 15%, água destilada q.s.p.) e II pH 6,8 (TFB II) (KAc 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, glicerol 15%, água destilada q.s.p.). As soluções foram posteriormente filtradas utilizando-se seringas e filtros 0,22 µm, em cabine de segurança biológica previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta por 15 minutos, e armazenadas à 4°C, protegidas da luz.

As placas semeadas por estrias incubadas foi analisada e selecionou-se colônias bem isoladas, que foram colhidas com uma alça e transferidas para um tubo Falcon de 50 ml contendo 20 ml de meio LB líquido, que foi incubada a 37°C sob agitação de 300 r.p.m. por cerca de 16 h. O conteúdo do tubo Falcon foi transferido para um Erlenmeyer de 1000 ml contendo 200 ml de meio LB para crescimento em incubadora com agitação de 300 r.p.m. até uma densidade ótica em 595nm (OD₅₉₅) de 0,4 a 0,6. A seguir, incubou-se em banho de gelo por cerca de 15 minutos, com posterior centrifugação a 6.000 r.p.m. por 3 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante. As bactérias foram cuidadosamente ressuspensas em 6 ml de solução TFB I, e incubou-se em banho de gelo por mais 15 minutos, seguido de

centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o descarte do sobrenadante, as bactérias foram ressuspensas em 0,6 ml de solução TFB II e, utilizando-se um suporte para mistura de gelo seco e álcool para manter a baixa temperatura, alíquotas de 100 µl de *E. coli* foram transferidas para criotubos e armazenadas em freezer -80°C até utilização.

5.4.1.2. Expansão do Plasmídeo PX458

A expansão do plasmídeo PX458 foi realizada utilizando-se *E. coli* DH5α quimiocompetentes mantidas no freezer -80°C, que foram descongeladas em banho de gelo. Após descongelamento total, 25 µl foram pipetados em um tubo Eppendorf de 1,5 ml e adicionaram-se 2 µl do PX458, com leves movimentos rotacionais com a ponteira. O mesmo processo foi realizado utilizando-se 2 µl de água como controle negativo, em outro tubo Eppendorf de 1,5 ml, também contendo as bactérias. Os tubos foram então incubados em banho de gelo por 30 minutos, seguido de incubação a 42°C por 60 segundos (choque-térmico) em banho de água, e nova incubação em gelo por 5 minutos. A seguir, adicionaram-se 800 µl de meio LB, com incubação a 37°C por 1 hora a 300 r.p.m. Centrifugou-se a 4.000 r.p.m. por 3 minutos, removeu-se o excesso de sobrenadante até restar aproximadamente 50 µl. As células foram então diluídas em 150 µl de meio LB, e semeadas em LB-Agar-Ampicilina (100 µg/ml) em volumes de 50 µl e 100 µl. Para manutenção do meio estéril, essa etapa foi realizada utilizando-se uma alça de Drigalski flambada e resfriada próxima à chama do Bico de Bunsen. As placas foram então incubadas invertidas a 37°C, durante o período mínimo de 12 horas. Posteriormente, 2 a 3 colônias foram selecionadas e repicadas em frascos Erlenmeyers contendo 200 ml de meio LB-Ampicilina (100 µg/ml), e foram novamente incubadas à 37°C e agitação aproximada de 300 r.p.m.. Após a incubação por cerca de 16 h, foi realizada a purificação dos plasmídeos utilizando o *Maxiprep Plasmid Hipure Purelink™* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (BAUER; CANVER; ORKIN, 2014) segundo as orientações do fabricante, e posterior quantificação por espectrofotometria utilizando Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA).

5.4.2. Preparação e hibridação dos sgRNAs

A seleção dos sgRNAs foi realizada utilizando-se o software online Benchling (<https://benchling.com>) para seleção e avaliação dos melhores guias, considerando a região alvo e os valores *On* e *Off-Targets* de cada sgRNA. Utilizando-se o software “Reverse and Complement DNA Sequence” (<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>), foi verificado a sequência complementar de cada sgRNA escolhido. A cada sequência senso e antisenso dos sgRNAs, foram adicionadas bases adaptadoras nas extremidades, de maneira a formar pontas coesivas durante a futura etapa de inserção nos plasmídeos (Figura 7). Para cada variante selecionada do *LDLR*, foram selecionados três sgRNAs (A, B e C), para aumentar a chance de acerto nos sgRNAs selecionados. Os oligos foram adquiridos da Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e ressuspensos em água milliQ autoclavada para concentração final de 100 µM.

O processo de hibridação das fitas senso e antisenso foi efetuado preparando-se uma mistura de reagentes (Tabela 5) em um tubo Eppendorf de 0,2 ml que foi posteriormente colocado no termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (Modelo:9902 SN:299020202), segundo os parâmetros descritos na Tabela 6 (CONG et al., 2013). Após o processo de hibridação, os sgRNAs foram analisados em gel de agarose 2% em tampão Tris Borato em ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (TBE) 0.5x, a partir de uma solução estoque de TBE 5x (5,4 g de TRIS, 2,75 g de ácido bórico, agitação com 90 mL de água destilada; 2 mL de EDTA 0,5 M, água q.s.p. 100ml). A eletroforese foi realizada com os parâmetros: 100 V, 60 mA por 30 minutos e utilizando-se marcador de 1 kb (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tabela 5: Protocolo da reação de hibridação dos sgRNAs.

Componente	Quantidade (µl)
sgRNA 5' (senso) (100 µM)	1
sgRNA 3' (antisenso) (100 µM)	1
Tampão de ligação T4, 10x	1
T4 PNK	0,5
Água	6,5

Total	10
-------	----

Tabela 6: Condições para hibridação dos sgRNAs.

Ciclos	Condições
1	37°C por 30 minutos
15	95°C por 5 minutos, com diminuição de 5°C/min até 25°C

5.4.3. Construção do molde de reparo para recombinação homóloga

Baseado na sequência do gene *LDLR* obtida através do Ensembl (<https://m.ensembl.org/>), transcrito *LDLR-208* ENST00000558518.5 acessado em março de 2019, foram construídos os moldes para reparação homóloga da região clivada pelos sgRNAs, considerando um tamanho total 100 pb, e 40 pb de braços homólogos de cada lado (tabela 7). Baseado na posição genômica das variantes selecionadas e dos sítios de reconhecimento dos sgRNAs, identificou-se a região que seria clivada, e construiu-se o molde de reparo de DNA.

No molde de reparo, foram inseridas as alterações nucleotídicas definidas pelas variantes, bem como alterou-se também a sequência PAM, reconhecida pela Cas9 para realizar a DSB. Os moldes de reparo foram construídos em DNA fita simples, no sentido 5'→3' caso a posição da alteração nucleotídica estivesse antes do sítio de clivagem, ou no sentido 3'→5' caso a alteração nucleotídica estivesse depois (O'CONNOR-GILES LAB. WILDONGER LAB. HARRISON LAB, [s.d.]).

Tabela 7: Moldes de reparo de DNA para cada um dos sgRNAs.

sgRNA	sgRNA	Molde de reparo
rs121908039	A	5'CAACGACCCCGACTGCGAAGATGGCTCGGatgagtggccgcagcgct[G>A]T/AGGGGTCTTTAC GTGTTCCAAGGGGACAGTAGCCCCTGCTCGGCCTTCGAG3'
	B	5'GACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGCAGCGCT[G>A]Taggggtctttacgtgtcca/AGGG GACAGTAGCCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCCACTGCC3'
	C	5'CGACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGCAGCGCT[G>A]Taggggtctttacgtgtccaa/GG GGACAGTAGCCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCCACTGC3'
rs28941776	A	3'TGGGCCACTGAATGTTTTTCAGTCACCAGCGAGTAGATGTCCACA[C>T]CATT CAGGCCCC CTTTCTTGATCTTGGCGGGAGTTCCCCAGTCAGTCCAGTACAT5'
	B	3'TGCCATTGGGCCACTGAATGTTTTTCAGTCACCAGCGAGTAGATGTCCACA[C>T]CATT CAG GCCCCCTTTCTTGATCTTGGCGGGAGTTCCCCAGTCAGTCCA5'
	C	5'AAGATCAAGAAAGGGGGCCTGAATG[G>A]TGTGGACATCTACTCGCTGGTGACTgaaaacatt cagtggcccaa/TGGCATCACCCCTAGGTATGTTTCGCAGGAC3'
rs879254797	A	3'TCGTGTGGGGTCCAGCTGGAAGCCTTCCTCACACTGGCACTTGTAGCCA[C>T]C[C>T]T CCAGGTTACGCAGAGCTGGCTGCAGGTGTCGGGATCCTGACACTC5'
	B	3'TGTGGGGTCCAGCTGGAAGCCTTCCTCACACTGGCACTTGTAGCCA[C>T]CCTC[C>T]A GGTTCACGCAGAGCTGGCTGCAGGTGTCGGGATCCTGACACTCATC5'
	C	5'TCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGG[G>A]TGGCtacaagtgccagtgtgagg a/A[G>A]GCTTCCAGCTGGACCCCCACACGAAGGCCTGCAAG3'
rs750518671	A	3'TAGCGGGAGGCTGTGACCTGGGGGACGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTA[C>G]CGATG

		GGGAGGACAATGGACAGAGCCCTCACGCTACTGGGCTTCTTCTCA5'
	B	3' TAGCGGGAGGCTGTGACCTGGGGGACGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTA[C>G]CGATGG GGAGGACAATGGACAGAGCCCTCACGCTACTGGGCTTCTTCTCA5'
	C	3'TAGCGGGAGGCTGTGACCTGGGGGACGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTAC[C>G]CGAT GGGGAGGACAATGGACAGAGCCCTCACGCTACTGGGCTTCTTCTC5'
	A	3'CTTCTGATAGACGGGGTTGTCAAAGTTGATGCTGTTGATGTTCTTAAGC[C>T]GCCAGTTC TTCCATAGAAGGAAGACCCCCAGGCAAAGGAAGACGAGGAGC5'
rs5928	B	5'GAAGACTATCTGCCCCAACAGTTTCAACTACGACA ACTACAAGAATTTCG[G>A]CGGTCAAG AAGGTATCTTCCTTCTGGGGGTCCGTTTCCTTCTGCTCCTCG3'
	C	5'GAAGACTATCTGCCCCAACAGTTTCAACTACGACA ACTACAAGAATTTCG[G>A]CGGTCAAG AAGGTATCTTCCTTCTGGGGGTCCGTTTCCTTCTGCTCCTCG3'
	A	3'TCCTGGTTGTGGCAAATGTGGACCTCATCCTCTGTGGTCTTCTGATAGA[C>T]GGGGTTGT CAAAGTTGATGCTGTTGATGTTCTTAAGCCGCCAGTTCTTCC5'
rs137853964	B	3'CCTTCTTGACCGCCGAATTCTTG TAGTTGTCGTAGTTGAAACTGTTGGGG[C>T]AGATAGT CTTCTGGT/gtctcctactccaggtgtaaACGGTGTTGGTCCT5'
	C	5'GAAGAACTGGCGGCTTAAGAACATCAACAGCATCAACTTTGACAACCCC[G>A]TCTATCAG AAGACCACAGAGGATGAGGTCcacatttgccacaaccagga/C3'

Legenda: Maiúsculo: braços homólogos; Minúsculos: reconhecimento do sgRNA; [Sublinhado]: representação da troca nucleotídica.

5.4.4. Digestão e Inserção dos sgRNAs no vetor plasmidial

O processo de digestão do vetor plasmidial com a enzima de restrição BbsI remove a sequência *stuffer* (22 pb), para inserção dos sgRNAs nessa região, conforme Figura 7, e os sgRNAs previamente hibridizados foram inseridos no fragmento digerido do plasmídeo.

Para o processo de restrição enzimática, utilizou-se um tubo Eppendorf 0,2 ml, no qual preparou-se o mix da reação conforme tabela 8:

Tabela 8: Protocolo de construção do mix de reação para a digestão do plasmídeo PX458 utilizando-se a enzima BbsI.

Reagente	Volume
PX458 (500ng/μl)	10μl
10x Buffer	10μl
<i>BbsI</i>	5μl
FastAP	5μl
Água	70μl
Total	100μl

O tubo Eppendorf foi então brevemente homogeneizado e centrifugado, e colocado no termociclador conforme os parâmetros descritos na tabela 9:

Tabela 9: Condições de incubação utilizadas para digestão do plasmídeo PX458.

Fase	Temperatura	Ciclos	Tempo
Digestão	37°C	1	10 minutos
Inativação	65°C	1	15 minutos

Após a restrição enzimática, realizou-se a desfosforilação utilizando-se o kit *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Invitrogen, Califórnia, EUA), impedindo posterior recircularização, seguindo as orientações do fabricante. Para tal, a reação de desfosforilação foi preparada conforme descrito na tabela 10

Tabela 10: Protocolo para realização de desfosforilação do plasmídeo PX458 linearizado, utilizando-se FastAP.

Componente	Volume
Plasmídeo Linearizado (1ug

10x Tampão de reação	2ul
FastAP	1ul
Água	7ul
Total	20ul

Os tubos foram brevemente agitados em vórtex e centrifugados (spin), e então colocados no termociclador com os parâmetros descritos na tabela 11, e posteriormente, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%, utilizando-se agarose com baixo ponto de fusão (LMP), em tampão TBE 0,5x com tempo de corrida de 1h, 100V e 60mA.

Tabela 11: Condições utilizadas para a etapa de desfosforilação.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desfosforilação	1	37	10
Inativação	1	65	5

Após o processo de digestão, realizou-se a purificação do fragmento de interesse do plasmídeo digerido. Isolou-se o fragmento de interesse do gel de agarose utilizando-se uma lâmina de barbear limpa com álcool 70% e luz UV portátil. A banda separada foi colocada em um tubo eppendorf 1,5ml para realização da purificação.

O processo de purificação foi realizado utilizando-se o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen, Califórnia, EUA) conforme orientações do fabricante. Resumidamente, realizou-se a pesagem do fragmento de gel, e adição de *Solubilization Buffer* (L3) de acordo com a massa pesada (1,2ml de L3 para cada 400mg de gel). O tubo foi então colocado no termobloco à 50°C por 10 minutos, invertendo-se o tubo a cada 3 minutos. Posteriormente, o tubo foi deixado em incubação por mais 5 minutos. Após total solubilização do gel, 850 µl da solução foi transferida para a coluna de extração (capacidade máxima de 850 µl). A coluna foi centrifugada à 13.000g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Adicionou-se 500 µl de solução de lavagem (W1) à coluna, centrifugou-se à 13.000g por 1 minuto e o filtrado foi novamente descartado. Uma nova centrifugação foi realizada, a 17.000g por dois minutos para eliminação total de etanol. A coluna foi então colocada sobre um tubo de coleta, e adicionou-se 50 µl de *Elution Buffer* à coluna. Este conjunto,

com a coluna dentro do tubo, foi então centrifugada à 13.000g por 1 minuto e o DNA eluído foi identificado como “PX458Pur”.

Posteriormente, a reação de ligação dos sgRNAs ao plasmídeo digerido foi então realizada utilizando-se o kit T4 DNA Ligase (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo as orientações do fabricante. A mistura da reação de ligação foi realizada conforme tabela 12:

Tabela 12: Protocolo de preparo da reação para a ligação do sgRNA ao plasmídeo linearizado.

Reagente	Volume
10x Tampão de reação da Ligase	4µl
Inserto:Vetor	4µl:2µl
T4 DNA Ligase	1µl
Água	9µl
Volume Total	20µl

Após o preparo, a solução foi rapidamente e cuidadosamente homogeneizada em vórtex, e centrifugada por alguns segundos a 12.000 r.p.m.. A solução foi então incubada utilizando-se o termociclador Veriti (Applied Biosystem, Califórnia, EUA) a 24°C por 1 h.

Após a digestão e inserção dos sgRNAs no plasmídeo PX458, realizou-se a análise da integridade das construções de plasmídeo PX458-sgRNA por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5x, a 100 V, 60 mA por 30 minutos e corado com gel red. Posteriormente a análise em gel, realizou-se a expansão e purificação desses constructos, transformando-se bactérias *E. coli* DH5α, conforme descrito no item 5.4.4

5.5. Cultivo de Células HepG2 e Experimentos de Co-transfecção

5.5.1. Cultivo Celular

As células da linhagem HepG2 (células hepáticas - ATCC® HB-8065™) (ATCC, Virgínia, EUA) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² a 37°C em estufa umidificada com atmosfera de 5% CO₂ (Series 8000WJ – Thermo Fisher Scientific Inc., Wilming), em meio de cultura DMEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (pH 7,4),

contendo 100 µg/ml de Normocin (Veritas, Califórnia, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Thermo Scientific, Machassussetts, EUA).

Para o processo de expansão das células HepG2, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS 1x, e foi adicionado 1 ml de *Trypsin-EDTA* (Thermo Scientific, Machassussetts, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37°C por 4 minutos para atividade da Tripsina e, após conferência na análise microscópica observando as células se adesão, adicionou-se 2 ml de meio DMEM para neutralização da Tripsina. O volume total (3 ml) foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml, e as células foram centrifugadas por 7 minutos a 1000 r.p.m. e temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspendidas em 1 ml de meio DMEM completo. Retiraram-se 10 µl dessa solução ressuspendida, que foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml contendo 490 µl de Azul de Trypan. Após homogeneização, pipetou-se 10 µl na câmara de Neubauer e efetuou-se a contagem das células. Após a contagem, pipetou-se cerca de 10⁵ células para cada 5 ml de meio de cultura, em novas garrafas de 25 cm². Os experimentos foram realizados utilizando-se células HepG2 que estavam na sexta passagem.

5.5.2. Co-transfecção dos construtos e moldes de reparo em células HepG2

O processo de co-transfecção foi realizado com constructo da PX458-sgRNAs e os moldes de reparo. Para o preparo da mistura contendo o sgRNA e o molde de reparo correspondente, preparou-se um tubo Eppendorf contendo 500ng do constructo de plasmídeo contendo o sgRNA, e 500ng do molde de reparo de DNA correspondente (RAN et al., 2013). Posteriormente, o processo de transfecção foi realizado utilizando-se Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo orientações do fabricante. No dia anterior à transfecção, realizou-se o processo de tripsinização e contagem das células HepG2, conforme descrito no item 5.5.1, plaqueando 10⁵ células em cada poço da placa de 24 poços que seria utilizado na transfecção. No dia posterior ao plaqueamento, procedeu-se à realização do processo de transfecção. Segundo as orientações do fabricante, para cada reação de transfecção, devem-se ser preparados dois tubos (Tubos 1 e 2), o primeiro contendo o meio Opti-MEM I e o reagente Lipofectamine 3000, enquanto no

segundo deve conter o meio Opti-MEM I, o reagente P3000 e o DNA a ser transfectado, conforme demonstrado na tabela 13

Tabela 13: Protocolo de preparo da transfecção.

Componente	Tubo 1	Tubo 2
Meio Opti-MEM I	25µl	25µl
Lipofectamine 3000 reagente	0.75µl	-
P3000 reagente	-	1µl
Mix construção plasmídeo+molde reparo	-	500ng:500ng

Após os tubos estarem preparados, transferiu-se o conteúdo do Tubo 2 para o tubo 1, com posterior incubação deste último tubo por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, o volume (50 µl) foi transferido para o poço da placa de 24 poços contendo as células HepG2. Após o processo de transfecção, as células foram incubadas em estufa umidificada, por 48h à 37° e 5%CO₂ (Series 8000WJ – Thermo Fisher Scientific Inc., Wilming).

Após 48h da transfecção, o resultado foi analisado em microscópio invertido de fluorescência EVOS M5000 (SN: J1211-156C-031) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) utilizando-se filtro GFP (Ex/Em: 470/525nm) para avaliar a eficiência da transfecção. As imagens foram obtidas utilizando-se objetivas de 10x e 20x, com escalas de 400 µm e 200 µm, respectivamente.

5.5.3. Isolamento das células transfectadas por Cell Sorting

As células HepG2, em passagem sete, co-transfectadas com os devidos construtos foram incubadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e contendo 100 µg/ml de *Normocin*, à 37°C em estufa umidificada a 5% CO₂ por 48h (Series 8000WJ – Thermo Fisher Scientific Inc., Wilming). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS-1x, tripsinizadas com TrypLE (Gibco®Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e reincubadas na estufa por 5 minutos para ação da tripsina. Após a incubação, inativou-se a tripsina por adição do meio de cultura, e centrifugou-se a solução à 1000 r.p.m. por 7 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* formado em 1000ul de meio DMEM sem SFB. Após a

contagem na câmara de Neubauer, a suspensão celular foi diluída para aproximadamente 15×10^6 células. O isolamento das células co-transfectadas foi realizada utilizando-se o citômetro BD FACS Aria II (*BD Bioscience*, San Diego, CA., EUA) do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). As células isoladas foram coletadas em tubos Falcon de 15 ml contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, e posteriormente centrifugados à 1000 r.p.m. por 7 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura DMEM e transferido para poços individuais da placa de 96 poços. As células foram então incubadas em 100µl de meio de cultura DMEM suplementados com 10% SFB e antibiótico *Normocin* em incubadora de CO₂ a 37°C e 5% CO₂. Ao atingirem confluência, as células foram tripsinizadas e transferidas para garrafas de 25cm² (Series 8000WJ – Thermo Fisher Scientific Inc., Wilming), para serem posteriormente analisadas, uma vez que a expressão de GFP é transitória.

5.6. Análise do LDLR das células recombinantes

5.6.1. Análise da Expressão do LDLR por Citometria de Fluxo

A marcação da partícula de LDL ou do LDLR com partículas fluorescentes permite a determinação da expressão do LDLR na superfície celular, bem como da ligação e internalização do LDL (CHEMELLO et al., 2021). Dessa forma, para avaliar se haveria diferença na quantidade de LDLR expressa pelas células HepG2 referência e pelas células isoladas por FACS, utilizou-se um anticorpo monoclonal de camundongo anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 (sc-18823, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA). Para tal, a análise da expressão do LDLR foi realizada por citometria de fluxo e por *Western blotting*. Resumidamente, a análise no citômetro de fluxo, foi realizada conforme descrito a seguir: as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x, e tripsinizadas com TrypLE (Gibco®Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). Efetuou-se a contagem celular na câmara de Neubauer e distribuíram-se 10^6 células em cada tubo, separando-as entre os dois grupos: as células marcadas com anticorpos e as sem marcação. As células sem marcação com anticorpo foram utilizadas para se avaliar a presença ou ausência de alguma fluorescência intrínseca a cada uma das células analisadas.

As células foram bloqueadas incubando-as em uma solução de PBS com albumina de Soro Bovino (BSA) 0,1% (PBS-BSA) por 10 minutos em temperatura ambiente, seguida por centrifugação à 1000r.p.m. por 5 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* celular em PBS 1x. Prosseguiu-se com uma nova centrifugação nas mesmas condições, ressuspendendo-se o *pellet* formado em 1ml de PFA 4% (1ml para cada 10⁶ células) com incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse processo, realizou-se duas etapas de centrifugação à 1500~2000r.p.m. por 5 minutos, ressuspendendo-se o *pellet* celular em 1ml de PBS 1x.

Para o grupo de células que seria incubado com anticorpo, realizou-se a permeabilização utilizando-se PBS-Triton 0,1% com incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, com duas etapas de centrifugação à 2.000~2.500 r.p.m. por 5 minutos, ressuspendendo-se o *pellet* em PBS 1x após cada centrifugação. Após a permeabilização, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 (sc-18823, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) em diluição de 1:50, e mantidas em repouso por 15 minutos em banho de gelo. Após adição de 1 ml de PBS 1x e centrifugação à 3.000 r.p.m. por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se as células em 500 µl de PBS 1x. Os dois grupos de células (marcadas e não marcadas) foram analisadas em citômetro BD FACS CANTO II (BD Bioscience, San Diego, CA., EUA), com aproximadamente 10.000 eventos medidos pelo próprio citômetro, para comparação da fluorescência obtidas entre as células transfectadas e não transfectadas, ou seja, para verificar se as variantes que foram inseridas provocariam alguma alteração na expressão do receptor, em relação às células HepG2 referência (ETXEBARRIA et al., 2012, 2014; BENITO-VICENTE et al., 2018a; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019)

5.6.2. Análise da Expressão do LDLR por *Western Blotting*

A análise de expressão do LDLR também foi realizada por *Western blotting*. A suspensão celular foi centrifugada à 1.000 r.p.m. por 7 minutos, lavadas duas vezes em PBS 1x e novamente centrifugada à 1.000 r.p.m. por 7 minutos. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o *pellet* celular em tampão de ensaio de imunoprecipitação (RIPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA), contendo inibidor de

protease 1x (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail – Roche, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA), com posterior incubação em gelo por 5 minutos. Após a incubação, a suspensão celular foi novamente centrifugada à 14.000g por 15 minutos, e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. Após esse processo, a quantificação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976)

A separação de proteínas foi realizada utilizando-se o Mini-Protean® Pre-Cast TGX Gel 4-20% (Bio-Rad Lab., Hercules, California, EUA), no qual foram pipetados 15 µg das alíquotas das proteínas em cada poço do gel, diluídas em tampão de amostra (Tris-HCL 100 mM pH 6,8; mercaptoetanol 10%; SDS 2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%), e utilizando-se o padrão de peso molecular 10-260 kDa *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, EUA). A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes utilizando-se tampão de corrida (SDS 10 g; Tris 30,3 g; Glicina 144,1 g; água 1 L, e diluição 1:10) inicialmente à 70 V por aproximadamente 5 minutos para compactação das bandas, e depois por 1h40 à 140 V. Após a eletroforese, as proteínas fracionadas em gel foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente ativada em metanol. Para o processo de transferência, utilizou-se a solução de transferência (Glicina 2,9 g; Tris 5,8 g em Metanol 100 ml; água 1 L), configurando-se a corrida para 100 V por 1h40. A corrida foi realizada em banho de gelo, e dentro da geladeira. Para diminuir as chances de ligações inespecíficas, a membrana foi então bloqueada com 5% *Blotting-Grade Blocker* (Bio-Rad Lab., Hercules, California, EUA) em TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 0,9% com 0,1% Tween 20) por 1h em temperatura ambiente. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi lavada por 10 minutos em TBST, três vezes, e então incubada com o anticorpo anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, EUA) (diluído 1:3.000 em TBST) durante toda a noite à 4°C, sob agitação. Após a incubação com anticorpo, realizou-se novamente três lavagens de 10 minutos com TBST. Utilizou-se o sistema de detecção *ECL Advanced Western Blotting Kit* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), e a intensidade da quimioluminescência das bandas formadas pela reação foram captadas pelo fotodocumentador Amersham Imager 680 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Após a detecção, a membrana foi novamente lavada três vezes por 10 minutos em TBST, e incubada com anticorpo anti β-Actina

(Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA) (diluído 1:10.000 em TBST) por 1h em temperatura ambiente. O processo para detecção das bandas foi realizado da mesma maneira.

5.6.3. Análise da Ligação e Internalização do LDLR por Citometria de Fluxo

A análise de ligação da LDL ao receptor (LDLR) e do processo de internalização do complexo LDLR-LDL por endocitose foram realizadas utilizando-se células HepG2. Essas foram lavadas duas vezes em PBS 1x e tripsinizadas com TrypLE (Gibco®Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). Após a contagem na câmara de Neubauer, cerca de 10^6 células foram distribuídas em placa de 24 poços. As células foram então incubadas por 24h em meio DMEM contendo Soro Deficiente em Lipoproteínas de Plasma Humano (Sigma-Aldrich, [S5519](#)) para normalização da expressão do receptor. A seguir, as células foram incubadas com partículas de LDL coradas com perclorato de tetrametilindocarbocianina (DiI-LDL) por 4h à 37°C e à 4°C (Figura 8), separadamente, para análise de internalização e de ligação, respectivamente. As células foram novamente lavadas duas vezes em PBS-BSA 1%, fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas novamente em PBS-BSA 1% por duas vezes, e analisadas por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD FACS Canto II (*BD Bioscience*, San Diego, CA., EUA) do ICB-USP (ETXEBARRIA et al., 2012, 2014; BENITO-VICENTE et al., 2018a; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

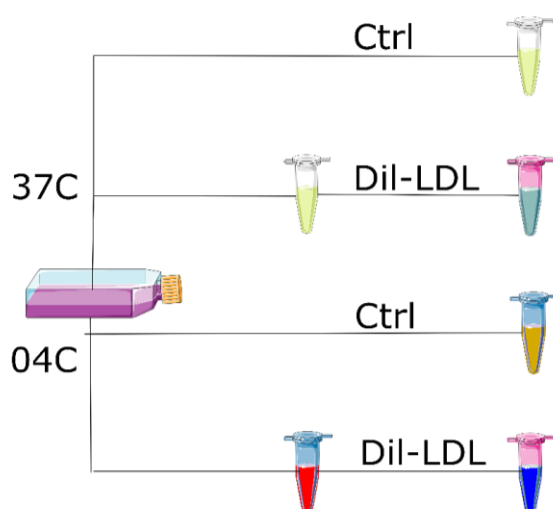


Figura 8: Representação esquemática do ensaio de incubação das células HepG2 (referência e variantes) com DiI-LDL.

5.6.4. Análise de ligação e internalização do LDLR por microscopia

5.6.4.1. Análise de lipídeos neutros

Para avaliar a capacidade de ligação do LDLR às partículas lipídicas tanto nas células HepG2 referência como nas células HepG2 contendo as variantes, utilizou-se LDL controles comerciais (Invitrogen™, Thermo Scientific, [L3486](#)) e coloração imersa com *Oil Red O* (ORO) [1-(2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenil) fenildiazenil azonaphthalen-2-ol)] (Sigma-Aldrich, [O0625](#)). Para tal, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x e tripsinizadas com TrypLE (Gibco®Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). Após a contagem na câmara de Neubauer, as células foram distribuídas em poços individuais das Lâminas Nunc™ Lab-Tek™ II 4-well Chamber Slide™ System (Thermo Scientific, [154534](#)) (“slide chambers”), contendo aproximadamente 10^5 células por poço, e cultivadas em meio DMEM em estufa umidificada à 5% CO₂ e 37°C, por 48h. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e incubadas por 24h em meio DMEM contendo Soro Deficiente em Lipoproteínas de Plasma Humano (Sigma-Aldrich, [S5519](#)). Após a segunda incubação, as células foram incubadas com LDL comercial ((Invitrogen™, Thermo Scientific, [L3486](#))) diluídas em tampão DPBS com CaCl₂ / MgCl₂ (Gibco™, Thermo Scientific, [14080089](#)) por 0h, 4h e 8h, à 37°C mantendo-se um poço incubado em meio deficiente como controle (Figura 9), para avaliar o processo de ligação e internalização do complexo LDLR-LDL.

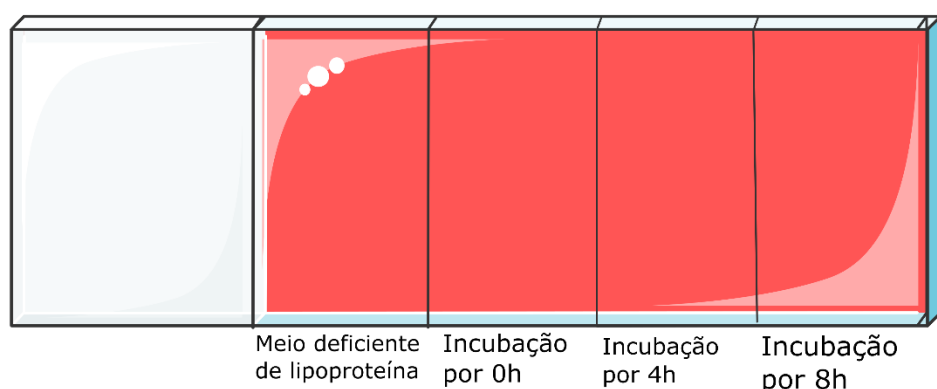


Figura 9: Figura esquematizando a slide chamber, e os tempos de incubação com LDL comercial

Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x, fixadas em paraformaldeído 4%. O processo de coração foi realizado através de imersão por 2 minutos em propilenoglicol 100% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); 6 minutos em 5% ORO; 1 minutos em 85% propilenoglicol; seguida de duas lavagens com água destilada. O processo de contra coloração foi efetuado por 3 minutos com hematoxilina de Harris modificada (sem álcool) para destacar os núcleos dos hepatócitos e montados com glicerol 70%. As células foram então analisadas em microscópio Zeiss BX800, aumento de 100x, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

5.6.4.2. Análise por microscopia confocal

Para a análise da ligação e internalização do complexo LDLR-LDL por microscopia confocal, tanto as células HepG2 referência quanto as células HepG2 contendo as variantes foram preparadas, distribuídas e fixadas conforme descrito anteriormente (item 5.6.1). O processo de ligação e internalização foi avaliado tanto para lipídeos neutros, quanto para o complexo LDLR-LDL. Para a marcação com anticorpos, as células foram incubadas com 50µL de anticorpos primários Anti-Apolipoproteína B (Abcam, [ab20737](#)) em solução de bloqueio (1:500) e Anti-LDLr (Abcam, [ab52818](#)) em solução de bloqueio (1:100) por 90 minutos em temperatura ambiente (ou por uma noite à 4°C). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes em PBS 1x, e incubadas com 50 µL de anticorpos secundários Cabra Anti-Coelho IgG H&L, conjugado com fluoróforo Alexa Fluor®488 (Abcam, [ab150077](#)) em solução de bloqueio (1:200) por 1 hora, em temperatura ambiente e protegido da luz. Após a incubação, efetuou-se três lavagens com PBS 1x e, para a análise de ligação e internalização com lipídeos neutros, adicionou-se marcações para lipídios neutros - LipidTOX™ (verde); LDL Dil 546 (Vermelho) e Anti-LDLr – Alexa 647 (Amarelo), já para a análise do complexo LDLR-LDL, utilizou-se as marcações Anti-Apo B - Alexa 488 (verde) e Anti-LDLr - Alexa 647 (vermelho), além da marcação com 50µL de DAPI (Sigma-Aldrich, [D9542](#)) em solução de diluição (1:1.000) e lavagens posteriores com PBS1x por três vezes, para ambos os casos. Após esse processo, adicionou-se 10µL meio de montagem *Prolong™ Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen™, Thermo Scientific, [P36970](#)), a lamínula, selou-se as “slide chamber” e as armazenou à 4°C até microscopia. As imagens foram obtidas utilizando-se

microscópio de Super-Resolução LEICA STED 3X, TCS SP8 (Leica Microsystems, Alemanha)

5.7. Análise Estatística dos Resultados

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando-se o software Prisma v9.3.1. As variáveis quantitativas foram analisadas utilizando-se o teste T para comparar valores entre dois grupos, enquanto utilizou-se a análise de variância com correção de Bonferroni para comparação entre dois ou mais grupos. Valores de significância foram adotados para $p < 0.005$.

(c.2441G>A p.R814Q) e rs137853964 (c.2479G>A p.V827I)., conforme demonstrando pelas figuras 11 e 12, utilizando-se a análise de variância com correção de Bonferroni. Os gráficos de Índice de confiança para cada uma das análises estão demonstrados nas figuras suplementares 1 e 2.

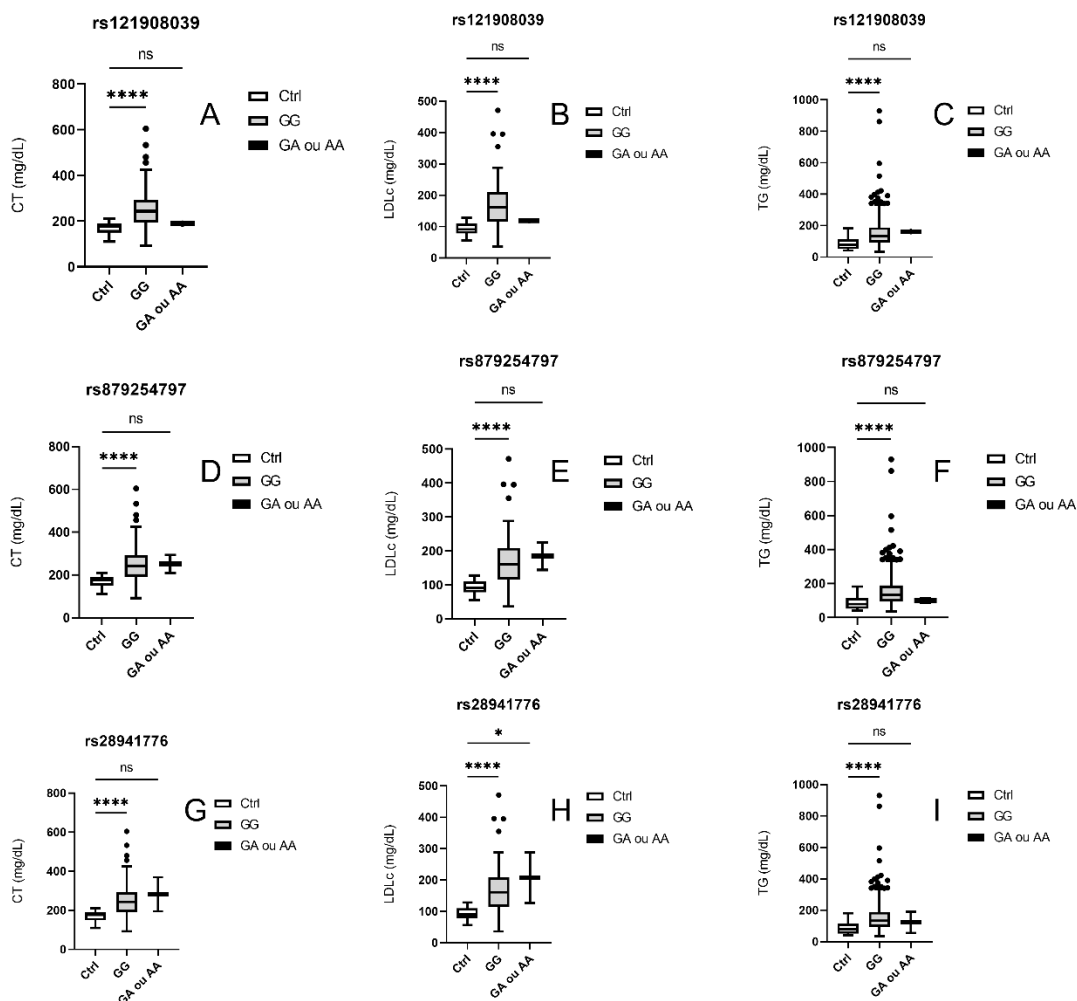


Figura 11: Gráfico Boxplot demonstrando a variação dos parâmetros lipídicos (CT, LDL e TG), entre os indivíduos do grupo controle (Ctrl), e os indivíduos HF portadores (genótipo GA ou AA) ou não portadores (genótipo GG) das variantes rs121908039 (A-C); rs879254797 (D-F) e rs28941776 (G-H). * $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; ns: não significativo.

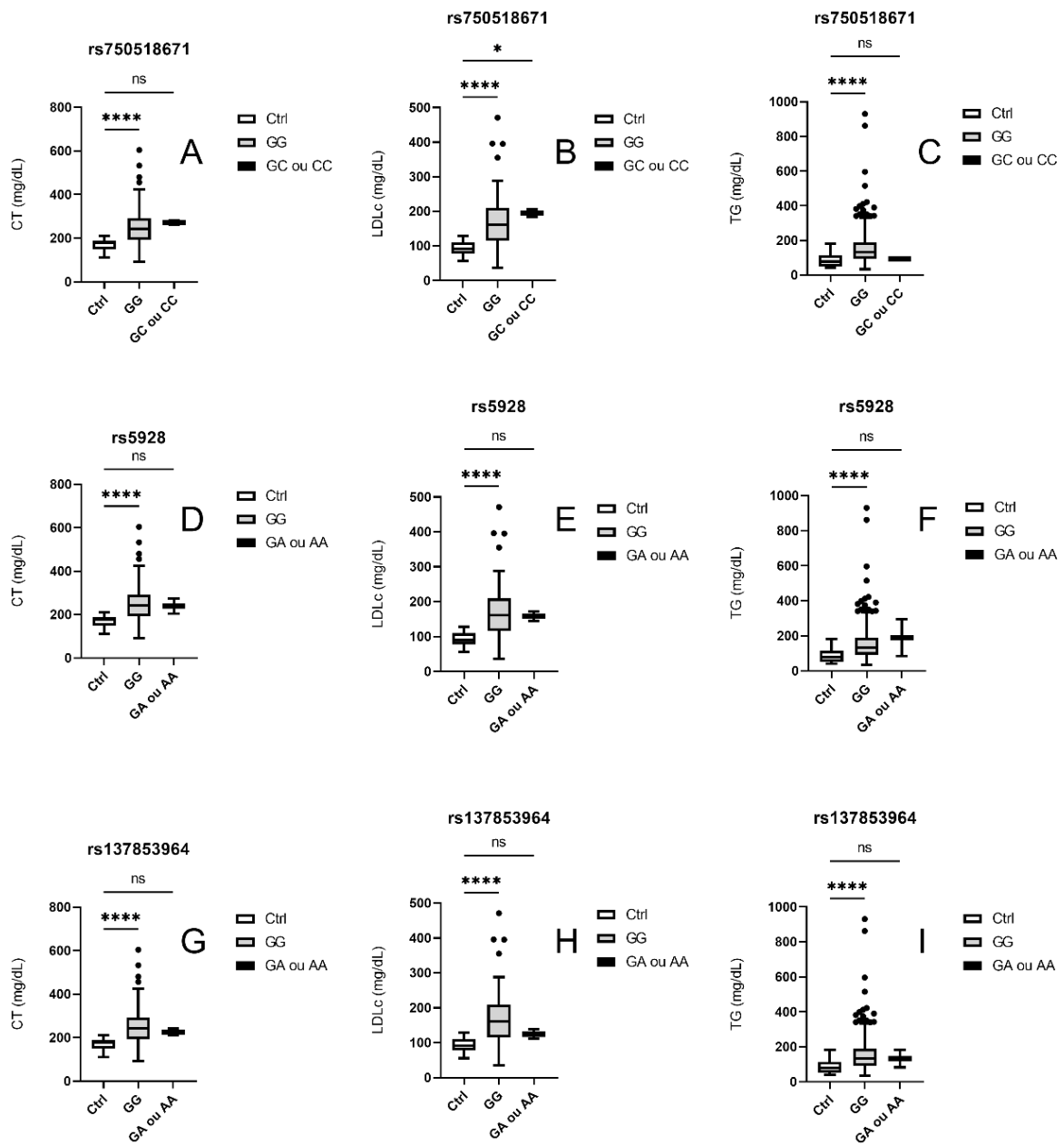


Figura 12: Gráfico Boxplot demonstrando a variação dos parâmetros lipídicos (CT, LDL e TG), entre os indivíduos do grupo controle (Ctrl), e os indivíduos HF portadores (genótipo GA ou AA; ou genótipo GC ou CC) ou não portadores (genótipo GG) das variantes rs750518671 (A-C); rs5928 (D-F) e rs137853964 (G-H). * $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$; ns: não significativo.

Os gráficos 11 e 12 demonstram alterações significativas nos parâmetros lipídicos (CT, HDL, LDL e VLDL) entre os indivíduos do grupo HF não portadores da variante, quando comparados ao grupo controle.

6.2. Análise de Modelagem Molecular do LDLR

6.2.1. Predizendo os efeitos das variantes na estrutura da proteína

Estudos de predição utilizando-se o DDMut foram realizados para se avaliar o perfil energético das trocas de aminoácidos, resultantes de cada uma das variantes selecionadas: rs121908039 (c.551G>A p.C184Y), rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), rs28941776 (c.1646G>A p.G549D), rs750518671 (c.2389G>C p.V797L), rs5928 (c.2441G>A p.R814Q) e rs137853964 (c.2479G>A p.V827I). Observou-se que a variante p.C184, localizada no éxon 4 e que codifica para o domínio de interação com o ligante, exibiu uma troca de energia favorável para a estabilidade da proteína (-4,07kcal/mol para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$ da proteína referência para a troca na posição aminoacídica; 2,99 kcal/mol para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$ reversa da proteína referência para o mutado). Por outro lado, a variante p.G373D localizada no éxon 8 que codifica para o domínio de homologia com a região EGF (1,87 kcal/mol para predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$; 1,77 kcal/mol para a predição reversa $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$) e a variante p.G549D (-1,51 kcal/mol para predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$; 1,77 kcal/mol para a predição reversa $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$) que também codifica para o domínio de homologia com a região EG, mostraram alterações intermediários de energia na estabilidade da proteína. Em comparação, a variante p.V797L localizada no éxon 16 e que codifica para a região transmembrana (-0,02 kcal/mol para predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$; 0,20 kcal/mol para a predição reversa $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$), e as variantes p.R814Q e p.V827L, ambas localizadas no éxon 17 e também codificando para a região transmembrana (0,15 kcal/mol para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$; -0,52 kcal/mol para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$ reversa e 0,08kcal/mol para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$; -0,11 para a predição $\Delta\Delta G^{\text{Estabilidade}}$ reversa, respectivamente) exibiram baixas alterações de energia na estrutura da proteína. Além disso, geraram-se modelos homólogos tanto da sequência referência quanto das variantes do LDLR. Esses modelos exibiram energias locais dentro da janela amostral e valores de Z-score de aproximadamente -7,39.

6.2.2. Efeitos no *Docking* Molecular

A estrutura tridimensional do LDLR pode ser dividida em regiões distintas: regiões L1 a L7, representando os domínios de repetição de interação com ligante

(L); a região EGF-A/EGF-B, representando o precursor do fator de crescimento epidermal; e a região TMD, representando a região transmembrana. Interessantemente, observou-se que as interações encontradas na estrutura do LDLR são mais internas do que com ApoB. (Figura 13). Isso se deve porque essas variantes estão localizadas em regiões distantes das regiões de interação com a ApoB. Portanto, é mais provável que essas variantes afetem mais as interações com a própria estrutura do LDLR do que afetem diretamente a interação com ApoB

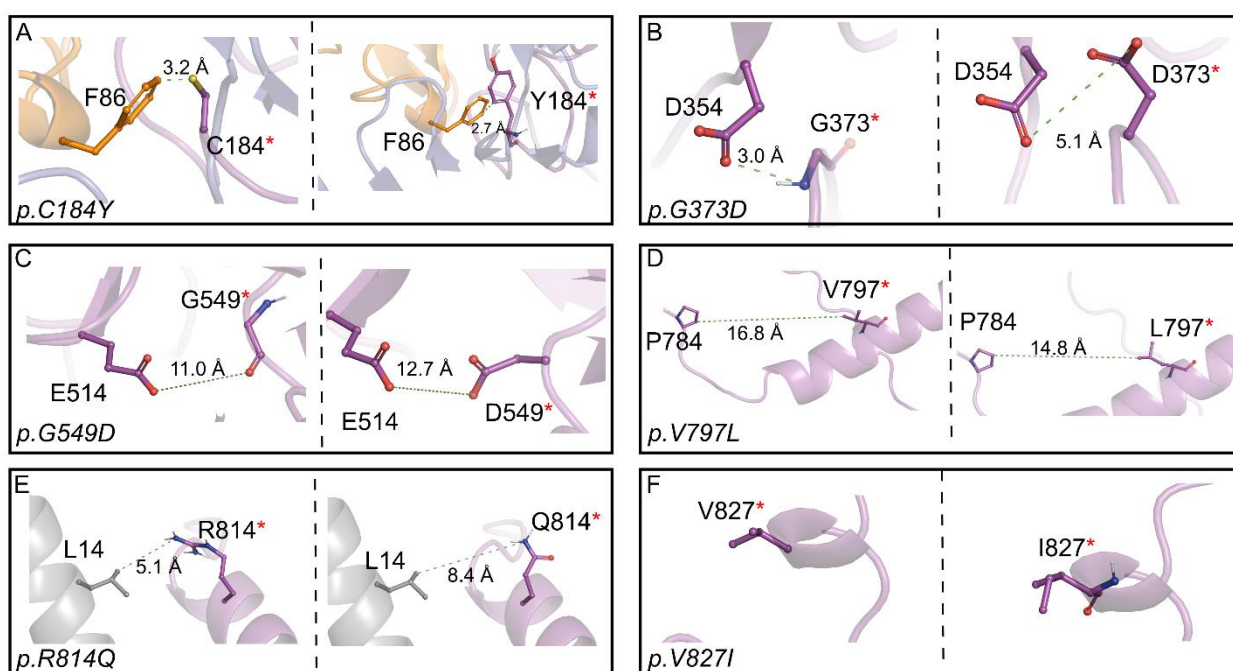


Figura 13: Análise das interações intramoleculares do LDLR. A: Diminuição da distância de interação (3,2 Å para 2,7 Å) quando a Cisteína é substituída por uma Tirosina na variante p.C184Y; B: Aumento da distância de interação (3,0 Å para 5,1 Å) quando a Glicina é substituída pela Ác. Aspártico na variante p.G373D; C: Aumento da distância de interação (11,0 Å para 12,7 Å) quando uma Glicina é substituída por um Ác. Aspártico na variante p.G549D; D: Diminuição da distância de interação (16,8 Å para 14,8 Å) quando a Valina é trocada por uma Leucina na variante p.V797L; E: Aumento da distância de interação (5,1 Å para 8,4 Å) quando a Arginina é substituída por uma Glutamina na variante p.R814Q; F: a variante p.V827L não interage com nenhum outro resíduo. LDLR: Low-density lipoprotein.

Observou-se que as interações intramoleculares na estrutura do LDLR se alinham com os perfis energéticos das mutações (Figura 13). A variante p.C184Y mantém sua interação com D354 em distâncias de 3,2 Å e 2,7 Å, respectivamente (Figura 13A). A variante p.G373D resulta em um aumento da distância entre os resíduos (3,0 Å e 5,1 Å, respectivamente, Figura 13B), assim como para as variantes p.G549D (11,0 Å e 12,7 Å, respectivamente, Figura 13C). As variantes p.V797L (16,8 Å e 14,8 Å, respectivamente; Figura 13D) e p.R814 (5,1 Å e 8,4 Å,

respectivamente, Figura 13E) estão distantes dos sítios de interação com outros domínios do LDLR. Notavelmente, a variante p.V827I não exibe interação com nenhum outro resíduo (Figura 13F).

6.3. Edição Gênica Por CRISPR/Cas9

6.3.1. Preparação dos sgRNAs e inserção no vetor plasmidial

De acordo com os resultados da análise de predição in silico, selecionaram-se as variantes rs121908039 (c.551G>A p.Cys184Tyr), rs879254797 (c.1118G>A p.Gly373Asp), rs28941776 (c.1646G>A p.Gly549Asp), rs750518671 (c.2389G>C p.Val797Leu), rs5928 (c.2441G>A p.Arg814Gln) e rs137853964 (c.2479G>A p.Val827Ile). Para cada uma das variantes, foram desenhados três pares de sgRNAs (três senso e três antisense), conforme demonstrado na tabela 14

As fitas senso e anti senso de cada um dos sgRNAs foram hibridizadas conforme descrito no item 5.4.2, e analisadas em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X. A figura 14 demonstra o resultado da eletroforese para a construção dos sgRNAs.

Após a digestão do plasmídeo pSpCas9-2A(BB)-GFP (PX458) com a enzima de restrição BbsI, realizou-se o processo de purificação do plasmídeo digerido, conforme descrito no item 5.4.4 (Figura 15). A inserção dos sgRNAs hibridizados nos plasmídeos linearizados foi realizado conforme descrito nos itens 5.4.4.

Tabela 14: Tabela demonstrando os sgRNAs construídos para cada uma das variantes selecionadas do gene LDLR.

Variante	sgRNA-A	sgRNA-B	sgRNA-C
rs121908039	5'(CACC)GATGAGTGGCCGCAGCGCTGT3' 3' CTA CT CACCGGCGTCGCGACA(CAAA) 5'	5'(CACC)GAGGGGTCTTTACGTGTTCCA3' 3' CTCCCAGAAATGCACAAGGT(CAAA) 5'	5' (CACC)GGGGGTCTTTACGTGTTCCAA 3' 3' CCCCAGAAATGCACAAGGTT(CAAA) 5'
rs28941776	5'(CACC)GCCCGCCAAGATCAAGAAAGG3' 3' CGGGCGGTTCTAGTTCTTTCC(CAAA) 5'	5'(CACC)GTCCCGCCAAGATCAAGAAAG3' 3' CAGGGCGGTTCTAGTTCTTTCC(CAAA) 5'	5' (CACC)GGAAAACATTCAAGTGGCCCAA 3' 3' CCTTTTGTAAGTCACCGGGTT(CAAA) 5'
rs879254797	5'(CACC)GCCAGCTCTGCGTGAACCTGG3' 3' CGGTCGAGACGCACTTGGACC(CAAA) 5'	5'(CACC)GCAGCCAGCTCTGCGTGAACC3' 3' CGTCGGTCGAGACGCACTTGG(CAAA) 5'	5' (CACC)GTACAAGTGCCAGTGTGAGGA 3' 3' CATGTTACGGTCACACTCCT(CAAA) 5'
rs750518671	5'(CACC)GGAAGAAGCCCAGTAGCGTGA3' 3' CCTTCTTCGGGTCATCGCACT(CAAA) 5'	5'(CACC)GAGAAGAAGCCCAGTAGCGTG3' 3' CTCTTCTTCGGGTCATCGCAC(CAAA) 5'	5'(CACC)GCTGTCCATTGTCCTCCCAT3' 3' CGACAGGTAACAGGAGGGGTA(CAAA) 5'
rs5928	5'(CACC)GCCTCGTCTTCCTTTGCCTGG3' 3' CGGAGCAGAAGGAAACGGACC(CAAA) 5'	5'(CACC)GGGGGTCTTCCTTCTATGGA3' 3' CCCCCAGAAAGGAAGATACCT(CAAA) 5'	5'(CACC)GCGTCTATCAGAAGACCACAG3' 3' CGCAGATAGTCTTCTGGTGTC(CAAA) 5'
rs137853964	5'(CACC)GTCCTTCTATGGAAGAACTGG3' 3' CAGGAAGATACCTTCTTGACC(CAAA) 5'	5'(CACC)GCAGAGGATGAGGTCCACATT3' 3' CGTCTCCTACTCCAGGTGTAA(CAAA) 5'	5'(CACC)GCACATTTGCCACAACCAGGA3' 3' CGTGTAACGGTGTGGTCCT(CAAA) 5'

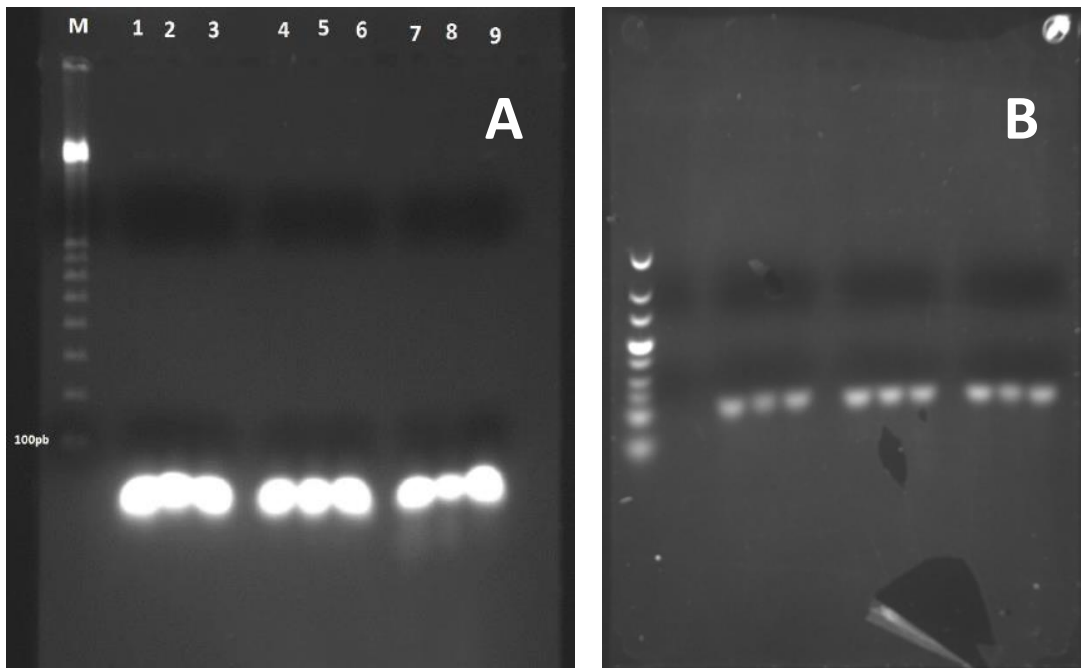


Figura 14: Fotografia do gel de agarose demonstrando as bandas formadas para os sgRNAs hibridizados.: Ordem do poços: A): 1 a 3: sgRNA A, B e C hibridizados da variante rs121908039; 4 a 6: sgRNAs A, B e C hibridizados da variante rs879254797 e 7 a 9: sgRNAs A, B e C hibridizados da varianters28941776; utilização de referência de pb de 100pb; B): 1 a 3: sgRNAs A, B e C hibridizados da variante rs750518671; 4 a 6: sgRNAs A, B e C hibridizados da variante rs5928 e 7 a 9: sgRNAs A, B e C hibridizados da variante rs137853964; Referência: Ultra Low Range DNA Ladder.



Figura 15: Fotografia do gel de agarose demonstrando a referência de DNA de 1kb, com fragmento superior em 10kb (A), perfil do plasmídeo PX 458 digerido (A) e íntegro (C), usado como controle.

6.3.2. Expansão e purificação dos construtos contendo os sgRNAs.

A figura 16 demonstra o resultado da etapa de expansão para o plasmídeo PX458 em bactéria *E. coli DH5α* isoladas, crescimento de colônias brancas isoladas, que contêm cassete de resistência para antibiótico ampicilina. Utilizaram-se também bactérias *E. coli DH5α* sem transformação com plasmídeos que serviram de controle, e verificou-se que não houve formação de colônias em meio com ampicilina.

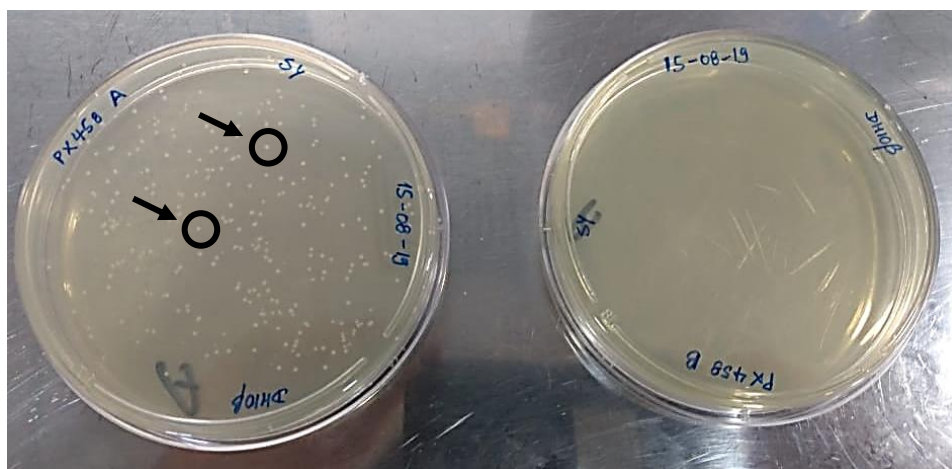


Figura 16: Fotografia da cultura em placa de petri no meio LB-Ágar com ampicilina (100ng/ml) das bactérias *E. coli DH5α* transformadas, utilizando-se o plasmídeo PX458. Esq.: Colônias de bactérias *E. coli DH5α* transformadas com plasmídeo PX458; Dir.: Controle negativo de *E. coli DH5α*. Setas e círculos: apresentam exemplos de colônias isoladas de *E. coli DH5α* com os plasmídeos PX458.

Durante o processo de purificação, não foi possível recuperar os sgRNAs A e B do construto PX458-rs879254797, nem o sgRNA C do construto PX458-rs750518671. Para os construtos PX458-rs121908039 e PX458-rs28941776, não foi possível recuperar nenhum dos sgRNAs. A tabela 15 demonstra o resultado da quantificação dos construtos extraídos e purificados, utilizando-se o *Elution Buffer* como branco da reação.

Tabela 15: Concentração de DNA dos plasmídeos PX458 purificados de *E. coli DH5α*.

Plasmídeo	sgRNA	[DNA](ng/μL)	A260/A280	A260/A230
PX458 - rs879254797	C	2636,20	1,87	2,30
PX458 – rs5928	A	178,58	1,82	-4,22
	B	986,38	1,90	3,24

	C	836,55	1,92	3,41
	A	1139,29	1,89	3,00
PX458 – rs137853964	B	1435,19	1,89	2,81
	C	1549,27	1,93	2,99
PX458 – rs750518671	A	867,61	1,90	3,40
	B	1219,32	1,91	2,99

6.4. Cultivo de Células HepG2 e Experimentos de Co-transfecção

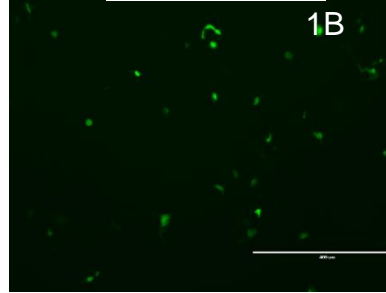
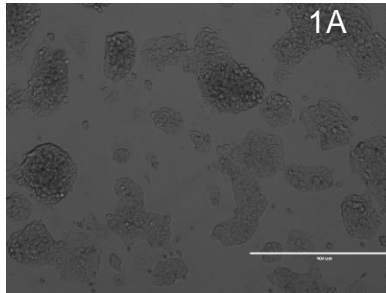
6.4.1. Co-transfecção dos construtos e moldes de reparo em células HepG2

A figura 17 demonstra o resultado da co-transfecção utilizando-se os construtos de plasmídeos contendo os sgRNAs para as variantes rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), rs5928 (c.2441G>A p.R814Q), rs137853964 (c.2479G>A p.Val827Ile) e rs750518671 (c.2389G>C p.V797L), bem como a co-transfecção realizada com um plasmídeo PX458 controle, que não contém nenhum sgRNA hibridizado, possuía apenas a sequência “*stuffer*”. Como o plasmídeo contém um cassete de expressão de EGFP, as células co-transfectadas expressam a proteína verde fluorescente.

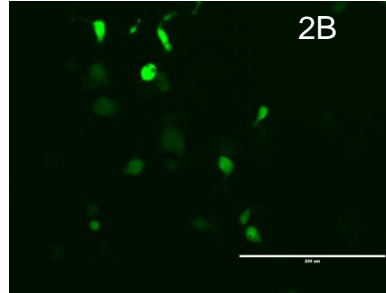
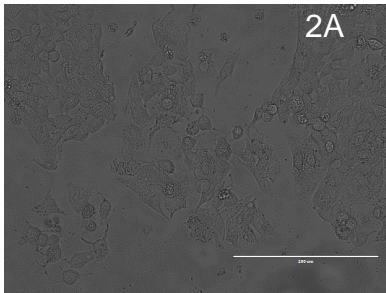
Campo Claro

GFP

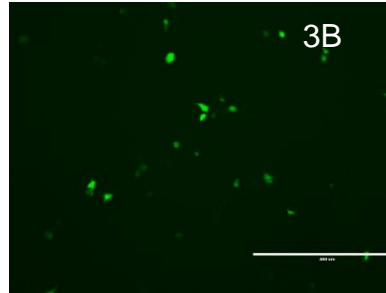
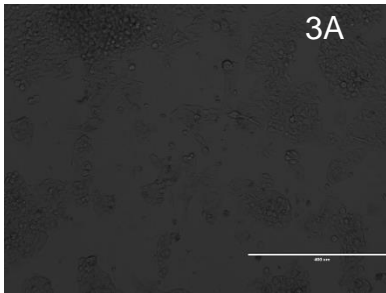
PX458-Ctrl



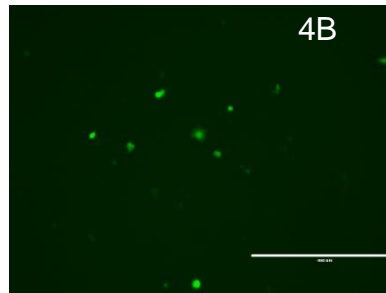
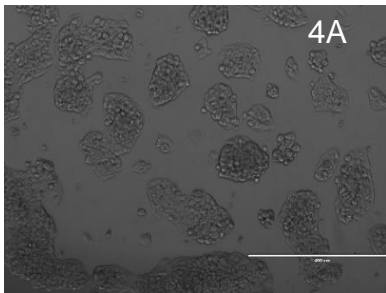
PX458-
rs879254797



PX458-rs5928



PX458-
rs137853964



PX458-
rs750518671

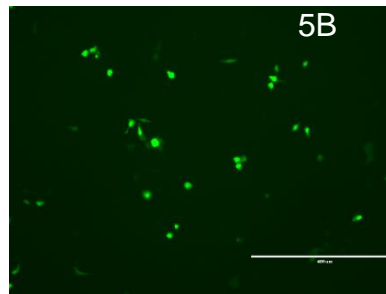
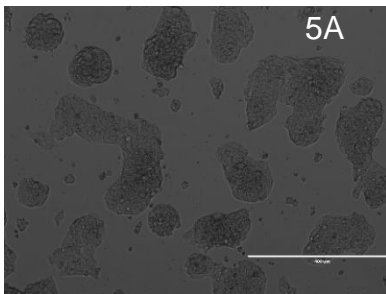


Figura 17: Microfotografia das células HepG2 pós transfeção dos construtos, observadas em microscópio invertido de fluorescência EVOS M5000 (SN: J1211-156C-031) (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) utilizando-se filtro GFP (Ex/Em: 470/525nm) para avaliar a eficiência da transfeção. As imagens foram obtidas utilizando-se objetivas de 10x e 20x (400 e 200 μ m, respectivamente). Células em verde representam as células contendo o plasmídeo PX458, expressando a proteína verde fluorescente (GFP). 1A: Representação em campo claro das células HepG2-WT(A) e representação em fluorescência das células devidamente transfectadas, em verde (1B); 2A: Representação em campo claro das células HepG2- rs879254797 (A) e representação em fluorescência das células devidamente transfectadas, em verde (2B); 3A: Representação em campo claro das células HepG2- rs5928 (A) e representação em fluorescência das células devidamente transfectadas, em verde (3B); 4A: Representação em campo claro das células HepG2- rs137853964 (A) e representação em fluorescência das células devidamente transfectadas, em verde (4B) 5A: Representação em campo claro das células HepG2- rs750518671 (A) e representação em fluorescência das células devidamente transfectadas, em verde (5B)

6.4.2. Isolamento das células transfectadas por *Cell Sorting*

As células HepG2 devidamente transfectadas foram isoladas das demais células por citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro BD FACS Aria II (BD Bioscience, San Diego, CA., EUA) do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do ICB-USP, conforme descrito no item 5.5.3. Durante o isolamento das células transfectadas, contudo, não foi possível recuperar as células HepG2 transfectadas com a variante rs137853964. A figura 18 demonstra o resultado do FACS para as células HepG2 transfectadas com as variantes rs879254797, rs5928 e rs7505178671. As células isoladas foram coletadas em tubos Falcon de 15ml, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB e incubadas novamente em estufa à 37° C e 5% CO₂, para crescimento das células isoladas

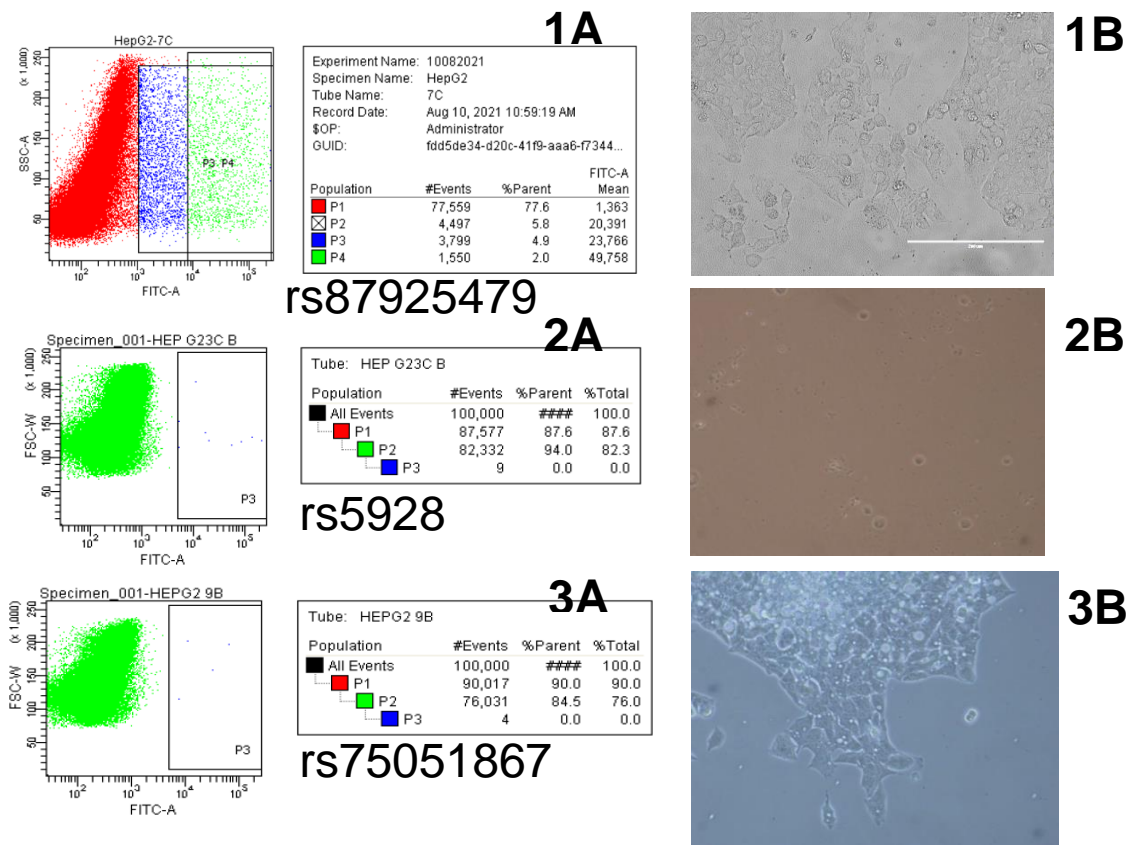


Figura 18: Análise do processo de sorting (A) e crescimento celular (B). 1) A: Dotplot do processo de sorting para as células HepG2, transfectadas com a variante rs879254797. B: Resultado do cultivo celular das células isoladas; 2) A: Dotplot do processo de sorting para as células HepG2 transfectadas com a variante rs5928, destacando as áreas com as células transfectadas (P3); B: Resultado do cultivo celular das células isoladas; 3) A: Dotplot do processo de sorting para as células HepG2 transfectadas com a variante rs750518671, destacando as áreas com as células transfectadas (P3); B: Resultado do cultivo celular das células isoladas.

6.5. Análise do LDLR das células recombinantes

6.5.1. Análise da Expressão do LDLR

Após o crescimento celular das células co-transfectadas que foram isoladas por FACS, a análise de expressão de LDLR foi realizada em citometria de fluxo e por *Western blotting*, utilizando-se células HepG2 referências (WT) e as células HepG2 contendo as variantes rs879254797 (c.1118G>A p.Gly373Asp), rs750518671 (c.2389G>C p.Val797Leu) e rs5928 (c.2441G>A p.Arg814Gln).

A análise da expressão do LDLR por citometria de fluxo foi realizada conforme descrito no item 5.6.1. A figura 19 demonstra a quantidade de células fluorescente ou não, para cada um dos grupos de células marcadas e não marcadas com anticorpo anti-LDLR Alexa-Fluor 647, ou seja, tanto para a células HepG2 controle, quanto para as células transfectadas com as variantes. Na figura 20, observa-se o gráfico comparativo da intensidade de fluorescência entre os mesmos grupos. As células não marcadas com anticorpo foram utilizadas como controle negativo. A expressão de LDLR das células HepG2 contendo as variantes rs5928 (c.2441G>A p.R814Q), rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) ou rs750518671 (c.2389G>C p.V797L) revela uma expressão de 40,92%, 31,20% e 0,45% em relação à célula controle (100%).

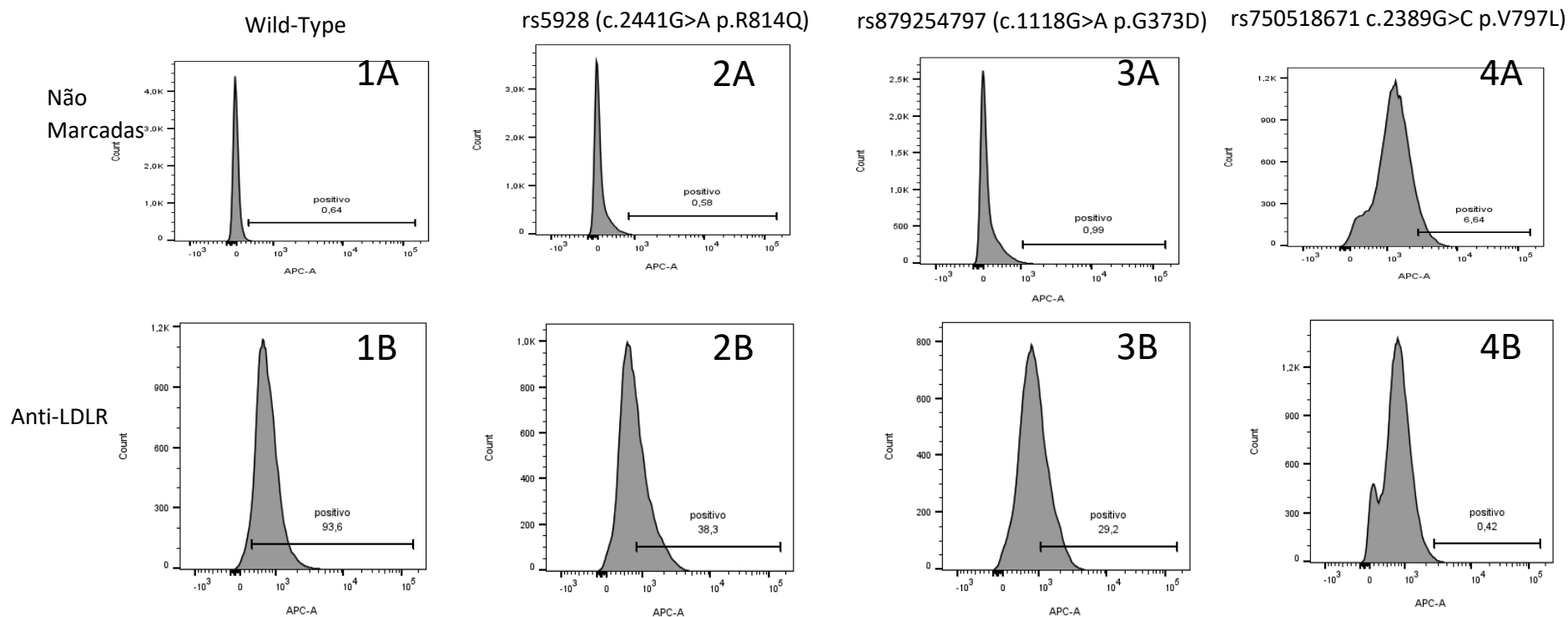


Figura 19: Resultado da análise de fluorescência referente à expressão de LDLR, comparando-se as células não marcadas (superior) com as marcadas (inferior). 1: Representação da fluorescência das células HepG2-WT não marcadas com anticorpo (A) e marcadas com anticorpo anti-LDLR (B); 2: Representação da fluorescência das células HepG2-rs5928 não marcadas com anticorpo (A) e marcadas com anticorpo anti-LDLR (B); 3: Representação da fluorescência das células HepG2-rs879254797 não marcadas com anticorpo (A) e marcadas com anticorpo anti-LDLR (B); 4: Representação da fluorescência das células HepG2-rs750518671 não marcadas com anticorpo (A) e marcadas com anticorpo anti-LDLR (B).

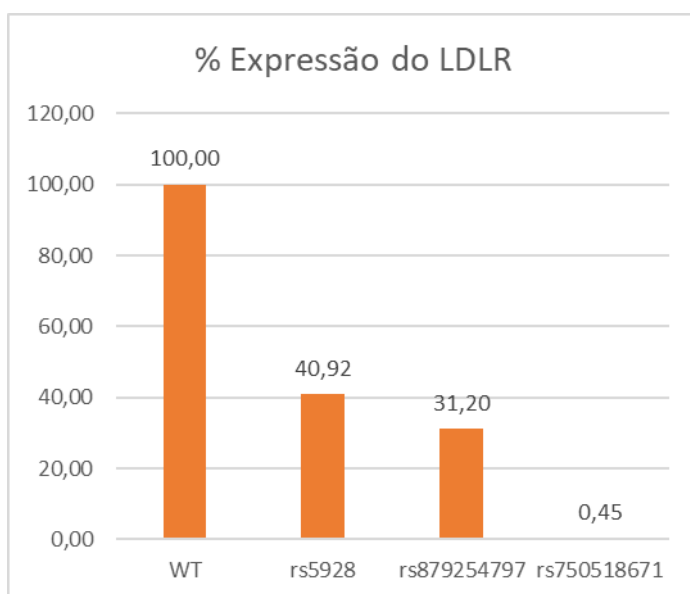


Figura 20: Gráfico representativo da porcentagem de expressão de LDLR, em intensidade média de fluorescência (MFI) das células HepG2 contendo as variantes, quando comparadas com a célula HepG2 referência.

Para verificar se expressão do LDLR estava associado apenas à superfície celular, realizou-se também a análise por *Western blotting*, conforme descrito no item 5.6.2, utilizando-se tanto as amostras do lisado celular, quanto do sobrenadante. A figura 21 demonstra as bandas formadas com tamanho correspondentes ao LDLR (140kDa) para as amostras do lisado celular tanto das células transfectadas quanto da célula HepG2 referência, demonstrando que estas estavam sendo normalmente expressas no lisado, apesar de não estarem amplamente presentes na superfície celular. Para as amostras utilizando-se o sobrenadante, não foi observada a reação (ausência da banda), sinalizando que estas não estavam sendo secretadas para o meio extracelular.

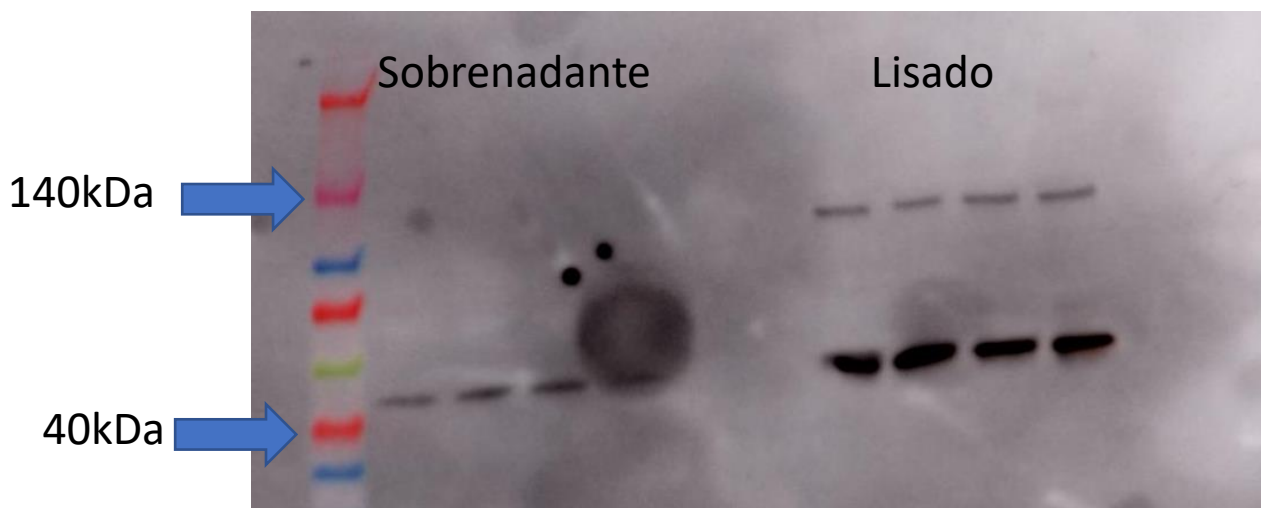


Figura 21: Fotografia da membrana de PVDF, demonstrando as bandas correspondentes à LDLR (140kDa) e à β -Actina (~40kDa). Ordem dos poços (Esq. Para a Dir.): 1. Padrão de peso molecular de proteínas de 10-260kDa; 2: Sobrenadante das células HepG2-WT, 3: Sobrenadante das células HepG2 contendo a variante rs5928; 4: Sobrenadante das células HepG2 contendo a variante rs879254797; 5: Sobrenadante das células HepG2 contendo a variante rs750518671; 6. Lisado celular das células HepG2-WT; 7: Lisado celular das células HepG2 contendo a variante rs5928; 8: Lisado celular das células HepG2 contendo a variante rs879254797 e 9: Lisado celular das células HepG2 contendo a variante rs750518671.

6.5.2. Análise da Ligação e Internalização do LDLR por citometria de fluxo

Para verificar se o receptor de LDL apresentava capacidade de ligação   partícula de LDL, e capacidade de internalização do complexo LDLR-LDL, analisou-se a capacidade de ligação com a partícula de LDL (4 C), e o processo de internalização por endocitose (37 C), conforme descrito no item 5.6.3. A figura 22 mostra o resultado da citometria de fluxo, demonstrando a intensidade de fluorescência emitida pela partícula de LDL corada com Dil (Dil-LDL), quando incubadas   37 C ou   4 C, tanto para as células HepG2 controle, quanto para as transfectadas com as variantes rs5928 (c.2441G>A p.R814Q), rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) e rs750518671 (c.2389G>C p.V797L). A figura 23 demonstra uma análise comparativa da intensidade de fluorescência das células transfectadas, em relação às células HepG2-WT. As células HepG2 transfectadas com as variantes rs5928 (c.2441G>A p.R814Q), rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) ou rs750518671 (c.2389G>C p.V797L) apresentaram índices de ligação com LDL de 6,19%, 5,67% e 8,01%, respectivamente, quando comparados com as células HepG2-WT. Com relação ao processo de internalização, as células apresentaram índices de 7,34%, 14,73% e 12,13%, respectivamente.

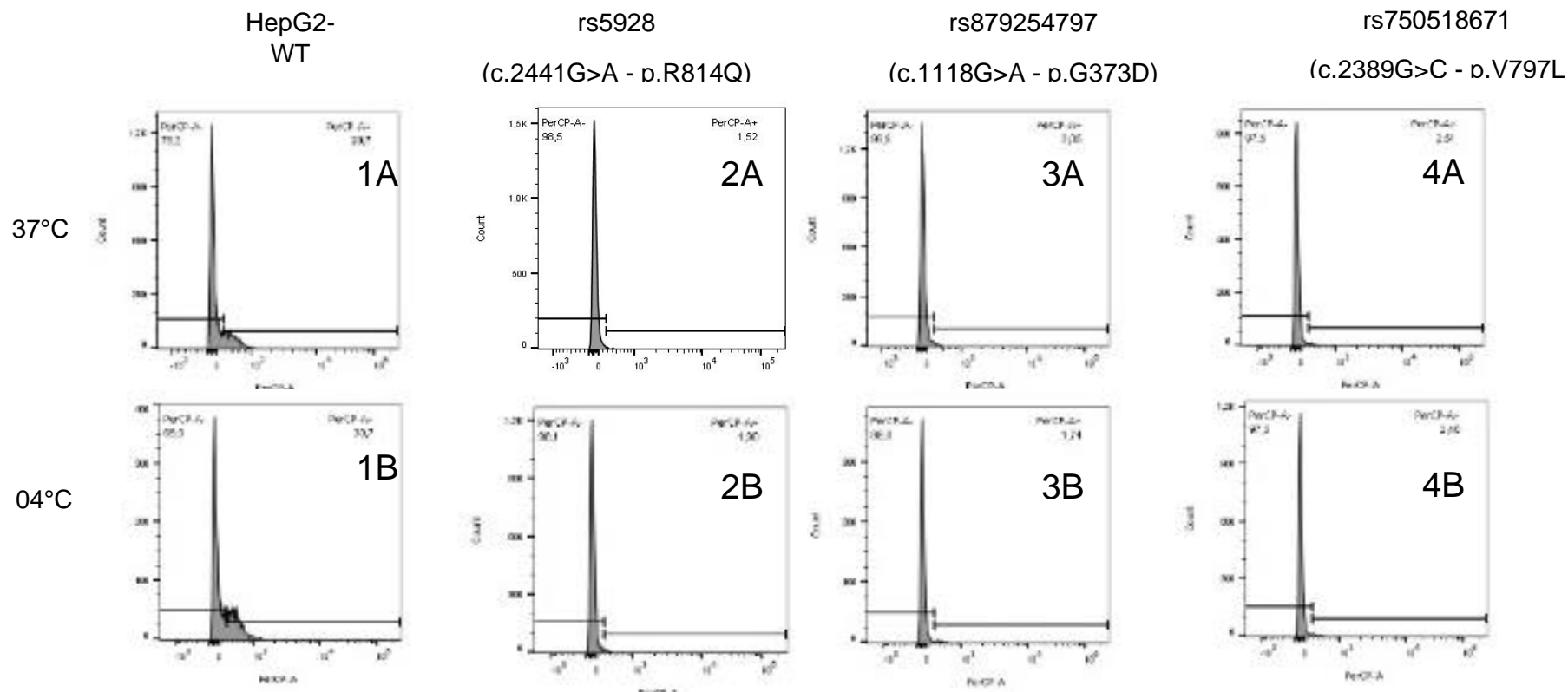


Figura 22: Resultado da análise de atividade do LDLR em células incubadas à 37°C (superior) e à 4°C (inferior), utilizando-se Dil-LDL. 1: Resultado da atividade do LDLR utilizando-se Dil-LDL em células HepG2-Wild-Type incubadas à 37°C (A) e à 4°C (B); 2: Resultado da atividade do LDLR utilizando-se Dil-LDL em células HepG2-rs5928 incubadas à 37°C (A) e à 4°C (B); 3: Resultado da atividade do LDLR utilizando-se Dil-LDL em células HepG2-rs879254797 incubadas à 37°C (A) e à 4°C (B) e 4: Resultado da atividade do LDLR utilizando-se Dil-LDL em células HepG2-rs750518671 incubadas à 37°C (A) e à 4°C (B).

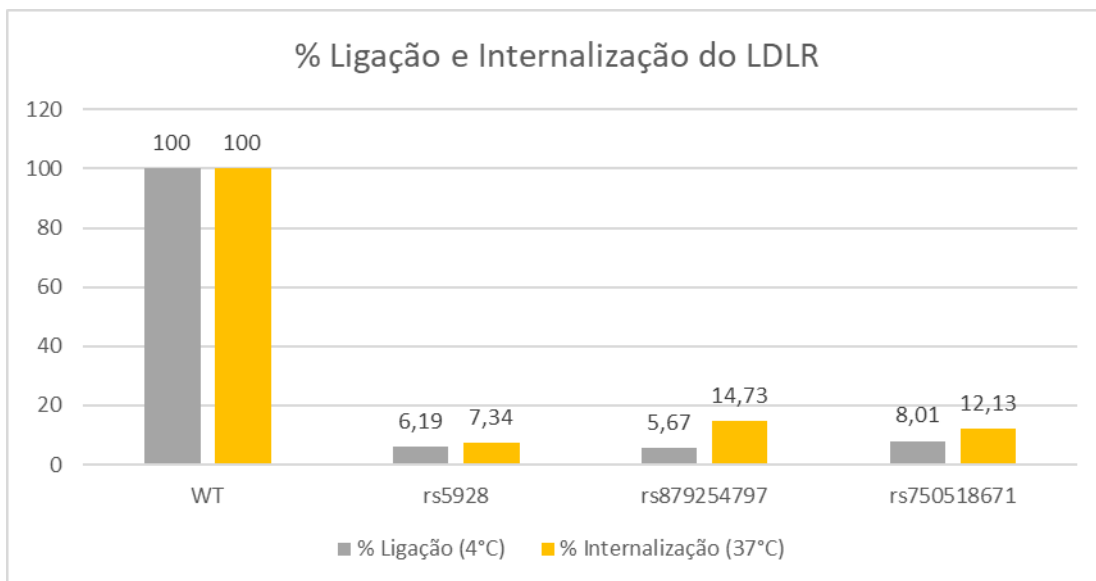


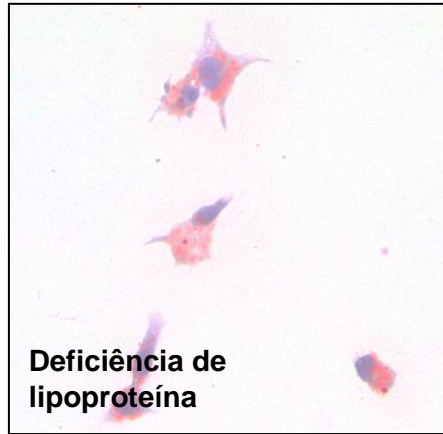
Figura 23: Gráfico representativo da atividade de LDLR à 4°C e a à 37°C das células HepG2 contendo as variantes, quando comparadas com as células HepG2 referência.

6.5.3. Análise de ligação e internalização do complexo LDLR-LDL por Microscopia

6.5.3.1. Análise com lipídeos neutros

Esse experimento foi realizado com o objetivo de se avaliar a morfologia celular das células hepáticas quando submetidas a um meio deficiente de lipoproteínas, e como seria o comportamento dessas células ao receberem LDL. As células HepG2-referência e as células HepG2 contendo as variantes rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) e rs750518671 (c.2389G>C - p.V797L) foram cultivadas em meio DMEM, submetidas a uma etapa de incubação com soro deficiente de lipoproteínas, adição de LDL comercial após 0h, 4h e 8h, e posteriormente coradas com ORO, conforme descrito no item 5.6.4. As células foram analisadas por microscopia (Zeiss BX800, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), conforme descrito no item 5.6.4. A figura 24 demonstra o resultado da microscopia, para avaliação da morfologia celular dessas células. As setas indicam exemplos de partículas lipídicas coradas com ORO.

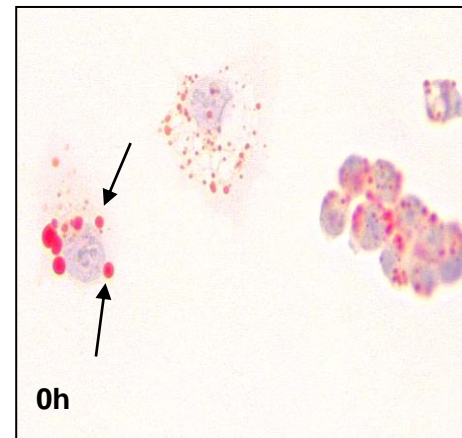
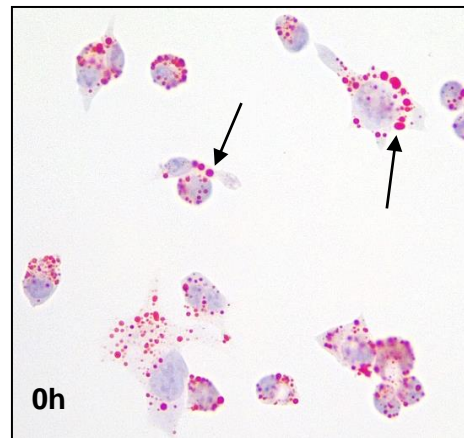
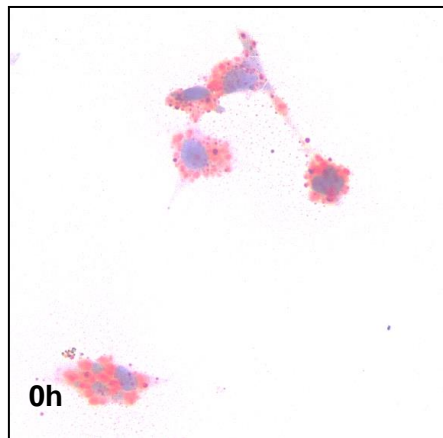
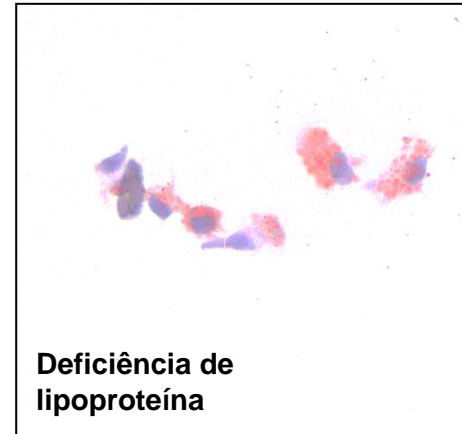
HepG2-WT



HepG2- rs879254797
(c.1118G>A p.Gly373Asp)



HepG2- rs750518671
(c.2389G>C - p.V797)



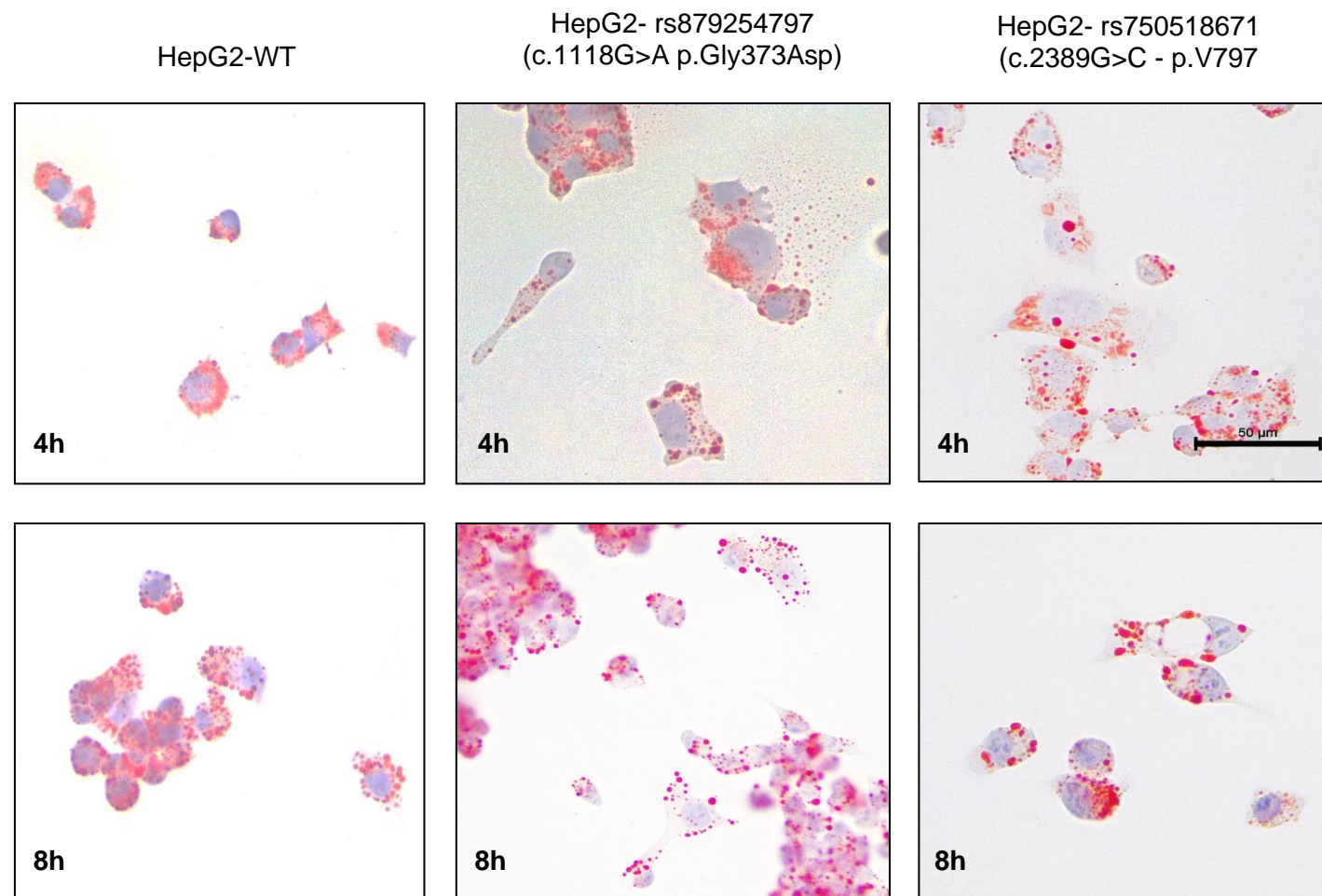


Figura 24: Fotomicrografia das células HepG2-WT, HepG2-rs879254797 e HepG2-rs750518671. Coloração com Oil Red O e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Microscópio Zeiss BX800, aumento de 100x. As setas indicam exemplos de partículas lipídicas coradas com ORO.

Nas células HepG2-que haviam sido transfectadas com as variantes rs750518671 (c.2389G>C - p.V797L) e rs879254797 (c.1118G>A p.Gly373Asp), observou-se a formação de estruturas celulares como a deposição de lipídeos e a presença de vacuolização para as células contendo a variante rs750518671 (c.2389G>C - p.V797L) (Figura 25 A e C), e a formação de pseudópodes e interação célula-célula para a cultura celular transfectada com a variante rs879254797 (c.1118G>A p.Gly373Asp) (Figura 25 B e D).

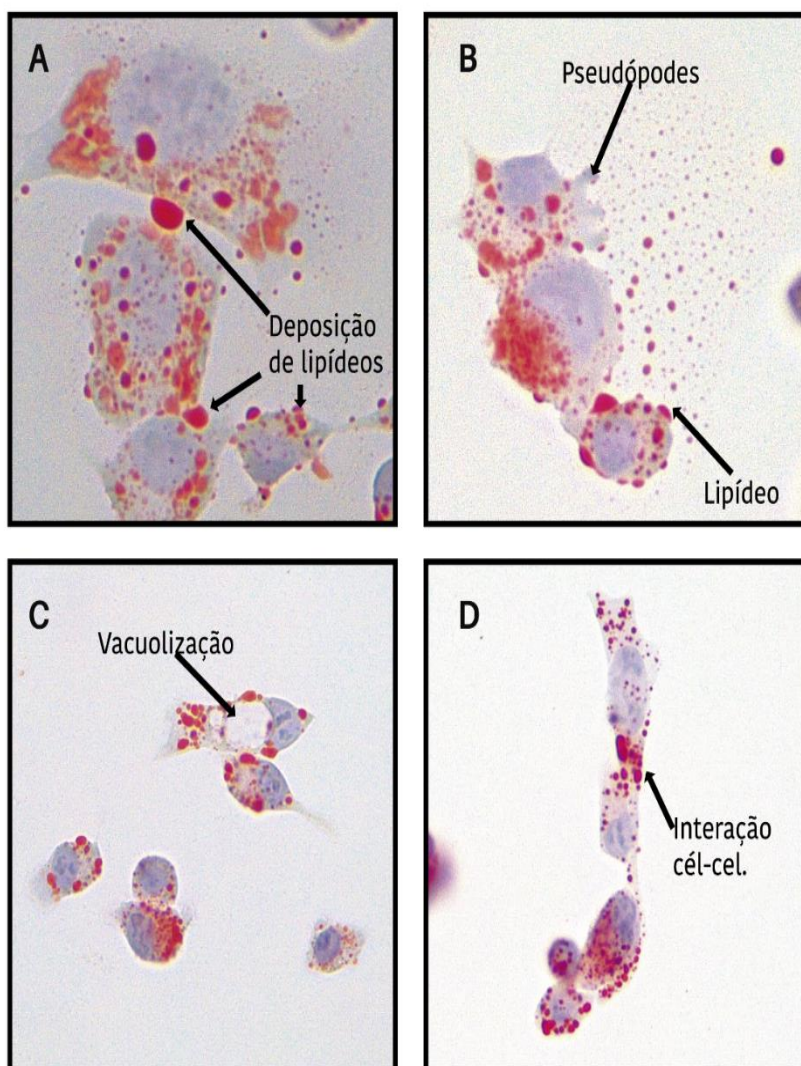


Figura 25: Resultados de microscopia das células HepG2 mutadas, quando incubadas com ORO. A e C: Observa-se a formação de vacuolização e deposição de lipídeos em balsas lipídicas para as células contendo a variantes rs750518671; B e D: Observa-se a formação de pseudópodes e interação célula-célula, para as células transfectadas com a variante rs879254797. Microscópio Zeiss BX800, aumento de 100x.

6.5.3.2. Análise por Microscopia Confocal

Para a análise da ligação e internalização do complexo LDLR-LDL por microscopia confocal, tanto as células HepG2 referência quanto as células HepG2 contendo as variantes foram preparadas e incubadas com anticorpos, conforme descrito no item 5.6.4.2 e demonstrado na figura 26. A captura de cada marcador fluorescente foi capturada individualmente, e ao realizar o “merge” das imagens capturadas, verificase na figura 26A a colocalização (em destaque) do LDLR-lipídeos neutros. Já na figura 26B, pode-se perceber a colocalização da ApoB-LDLR, indicados (em destaque).

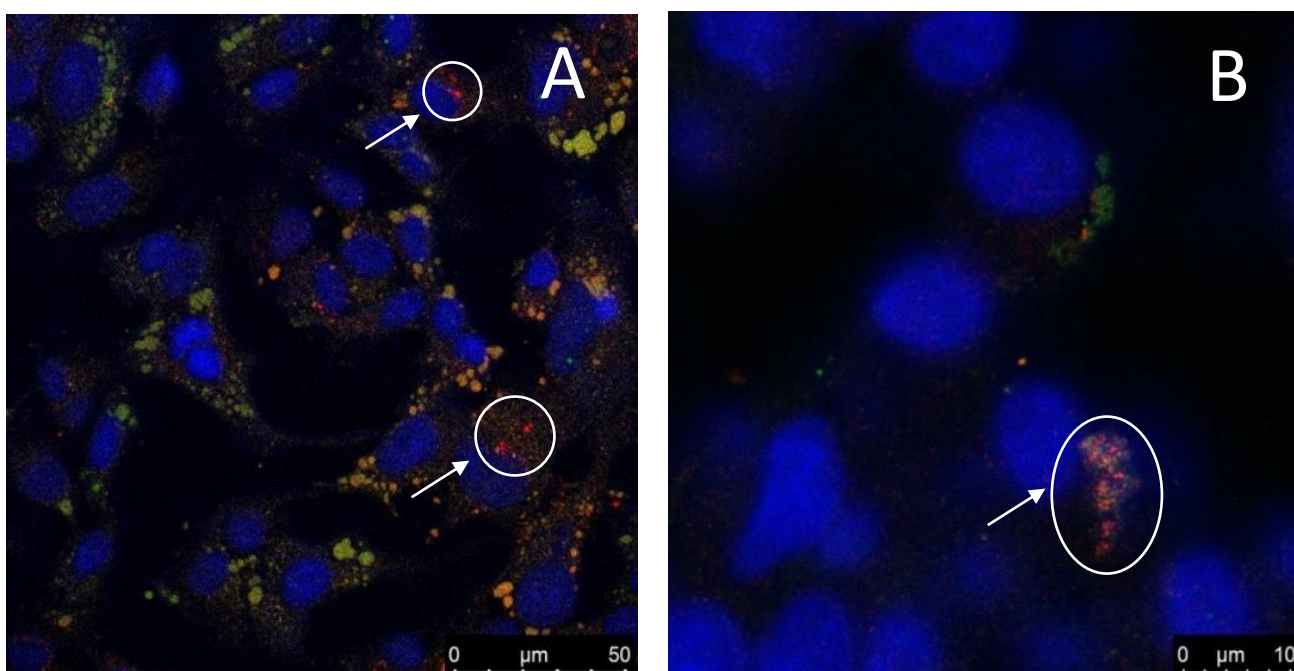


Figura 26: Resultado da microscopia confocal das células HepG2. A: Células HepG2 incubadas com LDL Controle por 8 horas. Verde: Lipídios neutros - LipidTOX™; Vermelho: LDL Dil 546; Amarelo: Anti-LDLr – Alexa 647; Azul: núcleo (DAPI, escala de 50µm; B: Células HepG2, incubadas com LDL Controle por 4 horas. Verde: Anti-Apo B - Alexa 488; Vermelho: Anti-LDLr - Alexa 647; Azul: núcleo (DAPI), escala de 10µm. Setas e círculos: Indicação de colocalização LDL-LDLR.

7. DISCUSSÃO

7.1. Perfil Lipídico e modelagem molecular

A HF é considerada a doença genética metabólica mais comum, caracterizada por elevadas concentração de LDL colesterol desde o nascimento. A exposição constante a concentrações elevadas tanto de CT quanto de LDL durante a vida aumenta o risco de desenvolvimento de placas ateroscleróticas e portanto de DCVs

(TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021). A análise do perfil lipídico encontrado nos pacientes desse estudo demonstrou uma concentração elevada desses dois parâmetros nos indivíduos do grupo HF, em comparação ao grupo controle, corroborando com os dados de Tokgozoglu e colaboradores (TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021).

A variante rs121908039 (c.551G>A p.C184Y), foi encontrada em apenas um indivíduo HeHF que, apesar de não apresentar alterações nos parâmetros lipídicos (CT, HDL, LDL e TG), apresentava arco córneo mesmo durante o uso de hipolipemiantes, sugerindo um potencial nível de patogenicidade para a variante.

Com relação à variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), uma das pacientes, de 60 anos, apresentava arco córneo, prega lobular diagonal e espessamento dos tendões, com valores de CT e LDL de 209 mg/dL e 144mg/dL, respectivamente. A presença de manifestações clínicas mesmo apresentando valores nem tão elevados desses dois parâmetros lipídicos pode ser explicado pelo uso de hipolipemiantes. A outra portadora, 49 anos, também apresenta valores elevados de CT e LDL (293 mg/dL e 225mg/dL, respectivamente), mesmo com o uso de hipolipemiantes. Como ambas as portadoras da variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) apresentavam valores elevados dos parâmetros lipídicos mesmo fazendo uso de medicamentos, a variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) apresenta, portanto, potencial patogênico.

Em se tratando da variante rs28941776 (c.1646G>A p.G549D), uma das portadoras não apresentava sinais clínicos (xantomas, xantelasmas, arco córneo) nem alterações nos parâmetros lipídicos, provavelmente devido ao uso de hipolipemiantes. Por outro lado, encontrou-se um resultado oposto em outra portadora HeHF dessa variante, que apesar de também fazer uso de hipolipemiantes, apresentava xantomas e xantelasmas, e valores elevados de CT, LDLc e TG (369 mg/dL, 288 mg/dL e 191 mg/dL, respectivamente). A discrepância nos valores encontrados demonstra ressaltar a relevância dos estudos genéticos e da aplicação da farmacogenética na medicina personalizada.

Para a variante rs750518671 (c.2389G>C p.V797L), a variante foi encontrada em dois pacientes, mãe e filho (38 anos e 15 anos, respectivamente), ambos pertencentes ao grupo HF. Nenhum deles possui xantomas ou xantelasmas, mas

ambos apresentam valores alterados de CT (280mg/dL e 261 mg/dL, respectivamente) e LDL (205 mg/dL e 184mg/dL, respectivamente). Apesar dos valores elevados desses parâmetros lipídicos, vale ressaltar que a mãe fazia uso de hipolipemiantes como Atorvastatina e Ezetimibe, enquanto o filho fazia uso apenas de Atorvastatina, o que, portanto, ressalta a patogenicidade dessa variante, uma vez que os parâmetros lipídicos estavam altos mesmo durante o uso desses medicamentos.

Para a variante rs5928 (c.2441G>A p.R814Q), nenhum dos dois portadores apresentavam sintomas físicos da HF (xantomas, xantelasmas, arco córneo, prega lobular diagonal ou espessamento dos tendões), mas destaca-se entre eles o paciente com idade de 8 anos, sem uso de hipolipemiantes e sem histórico de complicações cardíacas prévias, mas que apresentava valores elevados tanto de CT quanto de LDL (266mg/dL e 192mg/dL, respectivamente). Como a mãe e a avó do paciente, também pertencentes ao grupo HF, não eram portadoras da variante, a presença no paciente ressalta a patogenicidade desta variante, manifestando-se desde jovem. Outra paciente portadora dessa variante, 57 anos e não relacionada com o paciente anterior, não fazia uso de hipolipemiantes e também apresentava valores elevados de CT e LDL (274 mg/dL e 171 mg/dL, respectivamente), reforçando ainda mais o caráter patogênico da variante.

A variante rs137853964 (c.2479G>A p.V827I) foi encontrada em duas pacientes HeHF que, apesar do uso de hipolipemiantes, apresentaram valores elevados de CT (210 mg/dL e 241 mg/dL, respectivamente). Além disso, uma dessas pacientes apresentava ainda xantelasmas e prega lobular. As características encontradas nesses portadores indicam um provável potencial patogênico dessa variante e reforça a importância da medicina personalizada.

7.2. Análise da Expressão, Ligação e Internalização do LDLR

Considerando a alta frequência de indivíduos portadores de HF ao redor do mundo, e os diferentes critérios diagnósticos utilizados, a validação funcional das variantes identificadas têm-se tornado cada vez mais frequente na busca pela melhor compreensão das causas da HF. O gene *LDLR*, que responde por aproximadamente 80~90% dos casos de HF (BENITO-VICENTE et al., 2018b; TOKGOZOGLU; KAYIKCIOGLU, 2021) justamente por codificar para a proteína do

receptor de LDL, foi o primeiro gene associado com a doença (GOLDSTEIN; BROWN, 1974), e vem sendo amplamente estudado desde então.

O gene *LDLR* possui 18 éxons, e codifica para o LDLR, uma proteína transmembrana tipo 1 de 860 aminoácidos, incluindo um resíduo sinal de 21 aminoácidos. De maneira simplificada, o LDLR é composto por três grandes domínios: o ectodomínio, o domínio transmembrana; e o domínio citoplasmático. O ectodomínio compreende o domínio de interação com o ligante, sendo composto por sete repetições ricas em cisteína denominadas receptores de LDL (LR1 ao LR7), sendo composto também pelo domínio de homologia com o fator de crescimento epidermal (Epidermal Grow Factor – EGF) e o domínio de interação com os açúcares. A região transmembrana é responsável pelo processo de ancoramento da proteína na membrana celular; e o domínio citoplasmático é responsável pelo direcionamento do receptor para os poços revestidos de clatrina (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015; BENITO-VICENTE et al., 2018a; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

O desenvolvimento e aplicação em larga escala da tecnologia NGS permitiu a identificação de uma grande quantidade de variantes genéticas relacionadas a doenças hereditárias, contudo, muitas ainda carecem de validação funcional. Apesar de diversos estudos de variantes relacionadas ao quadro de HF já terem sido realizadas, principalmente do gene *LDLR* e de seus diferentes domínios, muitas ainda apresentam resultados contraditórios (ETXEARRIA et al., 2015; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

Apesar de não ter sido possível realizar a análise funcional das variantes rs121908039 (c.551G>A p.C184Y), rs28941776 (c.1646G>A p.G549D) e rs137853964 (c.2479G>A p.V827I), a análise de modelagem molecular revelou que a variante p.C184Y apresenta um perfil energético favorável, e que a interação do resíduo Y184 com a região EGF-A/B aumenta a estabilidade do LDLR, facilitando, portanto, sua interação com a APOB. Estudos realizados por Dušková e colaboradores, 2020 (DUŠKOVÁ et al., 2020), avaliaram variantes localizadas na região YWTD e propuseram sua patogenicidade, sugerindo que alterações na carga, na polaridade e/ou no volume do resíduo nessa região pode afetar o transporte proteico do retículo endoplasmático para a membrana plasmática. Esses achados

implicam que as variantes localizadas na região YWTD ou EGF-A/B podem afetar potencialmente a expressão do LDLR na superfície celular (GUO et al., 2019).

Já com relação à variante p. G549D, a substituição por um ac. aspártico indica uma alteração energética desfavorável para a variante. A variante p.G549D têm se mostrado ser um variante patogênica, resultando em uma diminuição significativa na atividade residual do LDLR em linfócitos-T e células CholdIA7, conseqüentemente impactando a captura de LDL como evidenciado pela redução na taxa de internalização de partícula de LDL marcadas com fluorescência, em compartimentos semelhantes a endossomos (ROMANO et al., 2011; TURKYILMAZ et al., 2021; IANNUZZO et al., 2022). Além disso, um estudo anterior do nosso grupo avaliando a ligação com LDL e internalização do complexo LDLR-LDL, revelou uma redução (<60%) nos portadores das variantes p.G373D, p.G592E, p.167T e c.313+1G>C (BARBOSA et al., 2023).. Por fim, a variante rs137853964 (c.2479G>A p.V827I) não apresentou alterações significativas nas interações intramoleculares, sugerindo que essa variante não impacta diretamente a estrutura do LDLR.

Com relação às variantes rs879254797 c.1118G>A p.G373D; rs750518671 c.2389G>C p.V797L e rs5928 c.2441G>A p.R814Q), os estudos funcionais confirmaram menor expressão do LDLR, menor ligação com a partícula de LDL e também menor internalização do complexo LDLR-LDL, sugerindo fortemente a patogenicidade destas variantes, apesar que tais variantes podem também estar associados com outras variantes descritas em estudo realizado pelo grupo (BORGES et al., 2021).

7.3.A Variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D)

Os éxons 7 a 14 do LDLR são responsáveis pela codificação do domínio de homologia com o precursor de EGF. Essa região é composta por três repetições EGF (A, B e C), sendo a terceira separadas das demais pela presença de uma região contendo 6 folhas β entre eles, o domínio YWTD. Os domínios de homologia com os precursores de EGF estão envolvidos no processo de dissociação do receptor da partícula de LDL durante a etapa de endocitose (JEON; BLACKLOW, 2005; BENITO-VICENTE et al., 2018a; GUO et al., 2019; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

Uma das variantes estudada nesse projeto, a variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), está localizada no éxon 8 e codifica para o domínio semelhante ao EGF-B. A análise tanto da expressão do LDLR, quanto da ligação (4°C) e internalização (37°C) do receptor demonstraram valores de 31,20%, 5,67% e 14,73%, quando comparados com os mesmos parâmetros das células HepG2 controle (100%) (Figuras 19 e 20). Os valores obtidos durante a análise funcional dessa variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) em células HepG2 modificadas por CRISPR/Cas9, são semelhantes aos resultados obtidos em estudos anteriores de nosso grupo (BARBOSA et al., 2023), no qual utilizou-se técnicas diferentes para a validação funcional, sugerindo portanto, a eficiência da ferramenta CRISPR/Cas9. No estudo anterior, além da redução de 60% na ligação e internalização dos portadores das variantes p.G373D, p.G592E, p.167T e c.313+1G>C (BARBOSA et al., 2023), revelou-se também que portadores não apenas da variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), mas também os portadores das variantes p.C184Y, e p.C167T tiveram expressão reduzida de LDLR.

Além das análises de expressão, ligação e internalização, análises de modelagem e de *docking* molecular também vem sendo utilizadas em estudos de análise funcional de diversas variantes. No presente estudo, a alteração da energia livre de Gibbs proporcionada pela troca do aminoácido Glicina por Ác. Aspártico na posição 373 do LDLR (Tabela suplementar 2) pode explicar a alteração conformacional que foi encontrada na análise de *docking* molecular, cuja variante contendo o resíduo de aminoácido Asp apresenta uma maior distância de interação com o resíduo de Aspartato na posição 354 do receptor (Figura 13A). A alteração da energia livre de Gibbs e a consequente alteração estrutural reforçam o resultado encontrado em nosso estudo anterior (BARBOSA et al., 2023), cuja análise de *docking* molecular para a variante p.G373D demonstrou que essa variante está localizada próxima a sítios de interação com domínios da ApoB (<4 Å de distância), e portanto a alteração estrutural no LDLR provocada pela substituição de uma Glicina por uma Ác. Aspártico diminuiu a distância de interação entre o LDLR-Gly373 com ApoB-Arg383 do LDLR referência, e do LDLR-Asp373 do LDLR alterado com a ApoB-Arg383 (de 3,6 Å para 2,3 Å, respectivamente), bem como a interação dessa variante com a cadeia principal da ApoB na posição Glu416 (1,4 Å). Tal resultado aumenta a força de interação do complexo LDLR-ApoB, dificultando o processo de

dissociação do receptor no endossomo, e diminuindo, portanto, a reciclagem do receptor para a membrana plasmática (BARBOSA et al., 2023)

Ao avaliar nos principais banco de dados, a variante rs879254797 (c.1118G>A p.G373D) apresenta baixo MAF global, sendo considerada uma variante provavelmente patogênica pelo ClinVar, além de apresentar potencial patogênico/deletério de acordo com a análise *in silico* realizada pelo ANNOVAR. No Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM), banco de dados de variantes genéticas da população brasileira (NASLAVSKY et al., 2017), contudo, ainda não há dados para esta variante, até a data do estudo. Portanto, o presente estudo mostra pela primeira vez que esta variante tem alteração funcional, mostrados nos estudos *in vitro*, com modelo por nós obtidos e também com as avaliações de *docking* e dinâmica molecular, que mostram esse resultado confirmativo.

Nos estudos de Benito-Vicente e colaboradores (ALVES et al., 2021), foram avaliadas variantes do *LDLR* localizadas principalmente no domínio de interação com o ligante (p.C184Y, p.G207_S213del, p.D221Y, p.E288K e p.H211D), e além dos valores reduzidos de expressão, ligação e internalização do LDLR obtidos por citometria de fluxo e *western blotting*, a análise por *docking* molecular revelou que as alterações dos resíduos de aminoácidos codificado por essas variantes impactou nas interações com outros resíduos das regiões adjacentes, explicando os resultados (ALVES et al., 2021). Tais mudanças nas interações também foi descrito no estudo de Dušková e colaboradores, 2020, (DUŠKOVÁ et al., 2020). Além disso, ambas as pacientes apresentaram um episódio de Acidente Vascular Cerebral (AVC), e uma apresentou episódio de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), reforçando a patogenicidade da variante.

A alteração das propriedades dos pseudópodes e sua influência em quadros hipercolesterolêmicos também foi revelada por outros pesquisadores. Além dos efeitos fisiopatológicos provocados nos grandes vasos pelo acúmulo de colesterol plasmático, a hipercolesterolemia também pode afetar a microcirculação. Estudos de Xioyan Zhang e colaboradores avaliaram a influência da quantidade de colesterol presente na membrana de leucócitos, mais especificamente neutrófilos, e obtiveram resultados que demonstraram alterações na permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica, e os impactos na expansão e retração de pseudópodes (ZHANG

et al., 2011, 2014). A alteração na mobilidade de neutrófilos, promove alterações nas suas interações com demais células leucocitárias, e afetam a microvasculatura, aumentando a resistência periférica e os riscos de DCVs.

7.4. As variantes Transmembrana

As variantes rs750518671 (c.2389G>C p.V797L) e rs5928 (c.2441 G>A p.R814Q) avaliados no presente estudo estão localizadas nos éxons 16 e 17 do *LDLR*, respectivamente. O éxon 16, juntamente com a porção 5' do éxon 17, são responsáveis por codificar os domínios da região transmembrana do receptor. Essa região transmembrana é composto por 22 aminoácidos hidrofóbicos, e são responsáveis pelo ancoramento do receptor à membrana (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

Devido ao caráter hidrofóbico da bicamada lipídica na membrana plasmática, as proteínas transmembrana geralmente possuem resíduos da alfa-hélice transmembrana enriquecidas com resíduos alifáticos e hidrofóbicos que estabilizam a estrutura no interior apolar da bicamada lipídica.(STRØM et al., 2014). Dessa forma, variantes localizadas nos domínios de ancoramento, principalmente variantes com resíduos carregados, podem afetar o processo com o qual o receptor se fixa à membrana, impactando principalmente o processo de internalização do receptor. Estudos de Strøm e colaboradores demonstraram que, a depender da variante, as proteínas geradas podem sofrer clivagem por metaloproteínases no retículo endoplasmático, separando o ectodomínio da proteína dentro do lúmen do retículo para posteriormente ser secretado (p.G805R)(STRØM et al., 2014); ou pode ser armazenado e secretado ainda inteira (p.L799R)(STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015).

Strøm e colaboradores, em 2014, pela análise do alinhamento da sequência do *LDLR* humano com a de outros vertebrados, reforça a importância de resíduos neutros na região transmembrana, pois mostrou uma falta desses resíduos carregados nas cadeias laterais do domínio transmembrana, demonstrando uma clara seleção evolutiva contra mutações que introduzem resíduos carregados na camada bilipídica. A maioria das variantes nessa posição resultaram da troca de um resíduo hidrofóbico por outro igualmente hidrofóbico (STRØM et al., 2014; STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015).

No nosso presente estudo, a variante p.V797L apresentou baixa alteração da energia livre de Gibbs proporcionado pela troca do resíduo de aminoácido Valina por uma Leucina na posição 797 do LDLR (Tabela suplementar 2) reforçando o caráter conservativo de resíduos hidrofóbicos na região transmembrana. Tal variante também foi encontrada em estudos da população japonesa realizados por Tada e colaboradores (TADA et al., 2020) porém com diferença na troca c.2389G>A p.V797M, ao invés da p.V797L, e nesse caso os pesquisadores a classificaram como VUS (TADA et al., 2020). Apesar da diferença, ambos os resíduos de aminoácidos alterados, bem como o resíduo de Valina referência, possuem cadeia lateral hidrofóbica, e reforçam o caráter conservativo hidrofóbico dessa região. Esse caráter conservativo pode explicar, em parte, a presença dessa variante encontrada apenas em dois indivíduos HeHF aparentados e portadores dessa variante: mãe e filho.

Os baixos valores encontrados tanto para a análise da expressão quanto de ligação e internalização do complexo LDLR-LDL em células HepG2 transfectadas com essa variante rs750518671 (c.2389G>C p.V797L) (0,45%, 8,01% e 12,13% respectivamente) em relação às células HepG2 controle (100%) (Figuras 19 e 20) podem explicar as características clínicas dos dois indivíduos HeHF aparentados e portadores dessa variante. Como descrito no item 7.1, nenhum dos pacientes apresentava xantomias ou xantelasmas, mas apresentavam valores elevados de CT (280mg/dL e 261mg/dL) e LDL (205mg/dL e 184mg/dL), mesmo durante o uso de hipolipemiantes. Além disso, reforça-se o caráter patogênico desta variante, considerando os episódios de AVC, IAM, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e de morte súbita experienciado por ambos.

Por outro lado, em outro estudo, Strøm e colaboradores, em 2017, demonstraram que a introdução de Arginina nas regiões adjacentes ao domínio transmembrana (789-791 e 806-810) não afetou significativamente a quantidade de LDLR presente no meio ou no lisado celular, mas a inserção desse mesmo resíduo nas posições 797-803 resultou em quantidades muito baixas tanto no meio de cultura quanto no lisado, devido à má incorporação da proteína na membrana do RE. A introdução de um resíduo positivo no núcleo hidrofóbico pode evitar a devida integração do LDLR mutante no RE (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2017)

Outro exemplo da importância da conservação da região transmembrana foi demonstrado por Futema e colaboradores, 2021, que encontraram a variante c.2547+1G>A p.Val797Glufs*9, presente em populações de Portugal e da Holanda, e a classificaram como variante de classe I do LDLR, ou seja, variantes que impactam a própria síntese do receptor (FUTEMA et al., 2021). Nesse estudo, a variante foi classificada como classe IV da classificação ACMG. A troca nucleotídica nessa posição impacta o quadro de leitura (*frameshift*) durante o processo de tradução do mRNA, de forma que a própria síntese da proteína fica comprometida.

Com relação à variante transmembrana rs5928 (c.2441G>A p.R814Q) presente em nosso estudo, que também apresentou valores menores tanto de expressão quanto de ligação e internalização do complexo LDLR-LDL (40,92%, 6,19% e 7,34%) em relação às células HepG2-WT referência (100%) (Figuras 19 e 20), foi considerando patogênica. Esta variante também foi descrita no estudo de Futema e colaboradores na população holandesa (FUTEMA et al., 2021), e classificada como de classe 2 da ACGS (provavelmente não patogênica). Contudo, com relação à classe de variantes do LDLR, Futema e colaboradores não incluíram essa variante em nenhuma dos cinco grupos tradicionais, tendo-a classificado no grupo 6, nos quais foram classificadas todas as que não pertenciam a nenhum dos cinco grupos.

Segundo Strøm e colaboradores, estudos das variantes que afetam o domínio transmembrana podem afetar o quadro de HF por diferentes formas. A introdução de um resíduo básico no centro do domínio transmembrana previne a síntese do precursor de ligação à membrana do LDLR no retículo endoplasmático. Isso resultaria em redução da quantidade de LDLR na superfície celular (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2017). Além disso, apesar de não ser consenso, especula-se que a secreção dos receptores contendo essas variantes são capazes de manter sua atividade de se ligar tanto à partícula de LDL, que não conseguiria ser internalizada e portanto resultaria em aumento de LDL colesterol plasmático; como também poderiam manter sua atividade de ligação à PCSK9, de forma que, em indivíduos heterozigotos, a proteína mutada poderia atuar como alvo da PCSK9, preservando proteína funcional de ser degradada por essa enzima (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015). Dessa forma, é improvável que mutações nos domínios transmembrana afetem a interação LDLR-LDL (classe III) ou nas regiões revestidas

de clatrina (classe IV), bem como também é improvável que afetem a liberação do LDLR da LDL (Classe V) (STRØM; LAERDAHL; LEREN, 2015).

No presente estudo, a baixa alteração de energia proporcionada pela troca de um resíduo de amino ácido Arginina por uma Glutamina na posição 814 (Tabela suplementar 2) e o aumento na distância de interação com o resíduo L14 (5,1 Å para 8,4 Å)(Figura 13) exemplifica uma situação na qual a presença da carga seria essencial para a devida expressão, ligação e internalização do complexo LDLR-LDL, uma vez que a substituição por um resíduo neutro resultou em porcentagens muito menores nesses parâmetros. Dessa forma, tal substituição poderia explicar os parâmetros fenotípicos encontradas nos portadores dessa variante (item 7.1), uma vez que uma criança de 8 anos, sem uso de hipolipemiantes, cuja mãe e avó não apresentavam a variante, apresentava valores elevados de CT e LDL (266mg/dL e 192mg/dL, respectivamente), indicando um caráter patogênico. Além disso, tal caráter é reforçado quando se analisa o segundo portador, que além dos elevados valores de CT e LDL (274mg/dL e 171mg/dL, respectivamente) sem uso de hipolipemiantes, também apresentou episódios de IAM, DAC e HAS.

A informação obtida com as caracterizações funcionais permite inferências sobre a relação entre a variante e o efeito da proteína, e também sobre a resposta ao tratamento e a severidade do fenótipo. Tais informações são importantes para a terapia e o prognóstico do paciente, especialmente no estabelecimento de tratamentos personalizados. Por exemplo, se um indivíduo é homozigoto para variantes nulas do LDLR, um medicamento que estimule a produção de LDLR não terá resultado, mas se o paciente for heterozigoto para uma variante que afete a reciclagem, então ele poderá ter respostas à estatina.

8. CONCLUSÃO

A utilização da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 propiciou uma solução eficaz para estudos de análise funcional de variantes genéticas, associada com a utilização de ferramentas de predição *in silico*.

A análise *in silico* de patogenicidade possibilitou a seleção de variantes *missense* e de *stop gain* identificadas em pacientes HF

A análise *in silico* de *docking* molecular possibilitou a seleção de seis variantes do *LDLR* para construção de sgRNAs e modelos de reparo de DNA.

As variantes rs879254797 (c.1118G>A p.G373D), rs750518671 (c.2389G>C p.V797L) e rs5928 (c.2441G>A p.R814Q) são variantes que, devido as alterações energéticas na análise de *docking* molecular, e a associação desses resultados com os dados clínicos e experimentais, devem ser consideradas patogênicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, abr. 2010.
- ALVES, A. C. et al. LDLR variants functional characterization: Contribution to variant classification. **Atherosclerosis**, v. 329, n. April, p. 14–21, jul. 2021.
- BAMSHAD, M. J. et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 11, p. 745–755, 27 nov. 2011.
- BARBOSA, T. K. A. et al. LDLR missense variants disturb structural conformation and LDLR activity in T-lymphocytes of Familial hypercholesterolemia patients. **Gene**, v. 853, n. December 2022, p. 147084, fev. 2023.
- BAUER, D. E.; CANVER, M. C.; ORKIN, S. H. Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, p. 1–10, 3 jan. 2014.
- BENITO-VICENTE, A. et al. Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1676, 5 jun. 2018a.
- BENITO-VICENTE, A. et al. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3426, 1 nov. 2018b.
- BENITO-VICENTE, A. et al. p.(Asp47Asn) and p.(Thr62Met): non deleterious LDL receptor missense variants functionally characterized in vitro. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16614, 9 dez. 2018c.
- BORGES, J. B. **Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 29 mar. 2019.
- BORGES, J. B. et al. Genomics, epigenomics and pharmacogenomics of familial hypercholesterolemia (FHBGEP): A study protocol. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 17, n. 7, p. 1347–1355, 28 jul. 2021.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram

Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. A Review on Molecular Docking : Novel Tool for Drug Discovery. **JSM Chem**, v. 4, n. September, p. 1–4, 2016.

CHEMELLO, K. et al. Lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**, v. 62, n. 5, p. 100062, 2021.

CHEN, P.; CHEN, X.; ZHANG, S. Current Status of Familial Hypercholesterolemia in China: A Need for Patient FH Registry Systems. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–11, 20 mar. 2019.

CHOI, Y. et al. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46688, 8 out. 2012.

CHOUMERIANOU, D. M.; DEDOUSSIS, G. V. Z. Familial hypercholesterolemia and response to statin therapy according to LDLR genetic background. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 43, n. 8, p. 793–801, 1 jan. 2005.

CONG, L. et al. Target Sequence Cloning Protocol. **Science**, v. 339, n. February, p. 819–824, 2013.

CUI, Y. et al. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 455–465, 11 jun. 2018.

DEFESCHE, J. C. et al. Familial hypercholesterolaemia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17093, 2017.

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

DUŠKOVÁ, L. et al. Low Density Lipoprotein Receptor Variants in the Beta-Propeller Subdomain and Their Functional Impact. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. June, p. 1–10, 30 jun. 2020.

ETXEARRIA, A. et al. Functional characterization of splicing and ligand-binding domain variants in the LDL receptor. **Human mutation**, v. 33, n. 1, p. 232–43, jan. 2012.

ETXEARRIA, A. et al. Advantages and Versatility of Fluorescence-Based Methodology to Characterize the Functionality of LDLR and Class Mutation Assignment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112677, 11 nov. 2014.

ETXEARRIA, A. et al. Activity-associated effect of LDL receptor missense variants located in the cysteine-rich repeats. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 2, p. 304–312, fev. 2015.

FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FREITAS, A. I. DA C. Caracterização Bioquímica e Molecular da Hipercolesterolemia Familiar na Região Norte e Centro de Portugal. 2010.

FUTEMA, M. et al. Comparison of the mutation spectrum and association with pre and post treatment lipid measures of children with heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH) from eight European countries. **Atherosclerosis**, v. 319, n. February 2020, p. 108–117, 2021.

GARCÍA-GIUSTINIANI, D.; STEIN, R. Genetics of Dyslipidemia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 106, n. 5, p. 434–8, maio 2016.

GOEDEKE, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 6, p. 915–930, 19 mar. 2012.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 249(16), n. 16, p. 5153–5162, 1974.

GUO, J. et al. Systematic prediction of familial hypercholesterolemia caused by low-density lipoprotein receptor missense mutations. **Atherosclerosis**, v. 281, n. December 2018, p. 1–8, fev. 2019.

HEGELE, R. A. et al. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. **Current opinion in lipidology**, v. 26, n. 2, p. 103–13, abr. 2015.

HORTON, J.; COHEN, J.; HOBBS, H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 71–77, fev. 2007.

HSU, P. D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 827–832, 2013.

IANNUZZO, G. et al. Association between causative mutations and response to PCSK9 inhibitor therapy in subjects with familial hypercholesterolemia: A single center real-world study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 32, n. 3, p. 684–691, mar. 2022.

IZAR, M. C. DE O. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 4, p. 782–844, 27 set. 2021.

JARRETT, K. E. et al. Somatic Editing of Ldlr With Adeno-Associated Viral-CRISPR Is an Efficient Tool for Atherosclerosis Research. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 1997–2006, set. 2018.

JEON, H.; BLACKLOW, S. C. STRUCTURE AND PHYSIOLOGIC FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 535–562, jun. 2005.

KHAN, M. H. U. et al. Induced mutation and epigenetics modification in plants for crop improvement by targeting CRISPR/Cas9 technology. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 6, p. 4578–4594, jun. 2018.

- LAMBERT, G. et al. Molecular basis of PCSK9 function. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 1, p. 1–7, mar. 2009.
- LI, H.; ROBERTSON, A. D.; JENSEN, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 4, p. 704–721, 17 out. 2005.
- LI, Q.; WANG, K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. **The American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 2, p. 267–280, fev. 2017.
- LINDGREN, V. et al. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 24, p. 8567–8571, 1 dez. 1985.
- MA, H. et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 413–419, 2017.
- MABUCHI, H. Half a Century Tales of Familial Hypercholesterolemia (FH) in Japan. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 24, n. 3, p. 189–207, 1 mar. 2017.
- MACH, F. et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. **European Heart Journal**, v. 41, n. 1, p. 111–188, 1 jan. 2020.
- MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 12 mar. 2013.
- MANGHWAR, H. et al. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 12, p. 1102–1125, dez. 2019.
- MOLLAKE, V.; PROGIAS, P.; DROGARI, E. Novel LDLR Variants in Patients with Familial Hypercholesterolemia: In Silico Analysis as a Tool to Predict Pathogenic Variants in Children and Their Families. **Annals of Human Genetics**, v. 77, n. 5, p. 426–434, set. 2013.
- MUTHUSAMY, V. V. BR 08-3 MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA IN HYPERTENSION. **Journal of hypertension**, p. e545, set. 2016.
- NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751–763, jul. 2017.
- NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. **Genome Research**, v. 11, n. 5, p. 863–874, 1 maio 2001.
- O'CONNOR-GILES LAB. WILDONGER LAB. HARRISON LAB. CRISPR-Cas9 experiment using a single-stranded oligo donor (ssODN). p. 9–11, [s.d.].
- PELLAGATTI, A. et al. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and

treatment of disease. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 7, p. 1023–1034, 1 jul. 2015.

PIERCE, B. G. et al. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. **Bioinformatics**, v. 30, n. 12, p. 1771–1773, 15 jun. 2014.

PIERCE, B. G.; HOURAI, Y.; WENG, Z. Accelerating Protein Docking in ZDOCK Using an Advanced 3D Convolution Library. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24657, 19 set. 2011.

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

RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, C. et al. Functional analysis of new variants at the Low Density Lipoprotein Receptor associated with familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**, p. humu.23801, 20 maio 2019.

ROMANO, M. et al. An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 11, p. 2095–2100, nov. 2011.

ROSE, B. I.; BROWN, S. Genetically Modified Babies and a First Application of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9). **Obstetrics & Gynecology**, v. 134, n. 1, p. 157–162, jul. 2019.

SARRAJU, A.; KNOWLES, J. W. Genetic Testing and Risk Scores: Impact on Familial Hypercholesterolemia. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. January, p. 1–7, 29 jan. 2019.

SCHAEFER, J. R. et al. Pharmacogenetic aspects in familial hypercholesterolemia with the special focus on FHMarburg (FH p.W556R). **Clinical Research in Cardiology Supplements**, v. 7, n. S1, p. 2–6, 28 jun. 2012.

SCHAEFFER, S. M.; NAKATA, P. A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. **Plant Science**, v. 240, p. 130–142, nov. 2015.

SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature Methods**, v. 11, n. 4, p. 361–362, 28 abr. 2014.

SHARMA, G. et al. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. **Molecular Therapy**, v. 29, n. 2, p. 571–586, fev. 2021.

SIM, N. et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W452–W457, 1 jul. 2012.

STRØM, T. B. et al. Mutation G805R in the transmembrane domain of the LDL receptor gene causes familial hypercholesterolemia by inducing ectodomain cleavage of the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. **FEBS Open Bio**, v. 4, n. 1, p. 321–327, 1 jan. 2014.

STRØM, T. B.; LAERDAHL, J. K.; LEREN, T. P. Mutation p.L799R in the LDLR, which affects the transmembrane domain of the LDLR, prevents membrane insertion and causes secretion of the mutant LDLR. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 20, p. 5836–5844, 15 out. 2015.

STRØM, T. B.; LAERDAHL, J. K.; LEREN, T. P. Mutations affecting the transmembrane domain of the LDL receptor: impact of charged residues on the membrane insertion. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 9, p. 1634–1642, 1 maio 2017.

TADA, H. et al. A catalog of the pathogenic mutations of LDL receptor gene in Japanese familial hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 14, n. 3, p. 346- 351.e9, maio 2020.

TESSADORI, F. et al. Effective CRISPR/Cas9-based nucleotide editing in zebrafish to model human genetic cardiovascular disorders. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 10, p. 1–8, 1 out. 2018.

THORMAEHLEN, A. S. et al. Systematic Cell-Based Phenotyping of Missense Alleles Empowers Rare Variant Association Studies: A Case for LDLR and Myocardial Infarction. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 2, p. e1004855, 3 fev. 2015.

TOKGOZOGLU, L.; KAYIKCIOGLU, M. Familial Hypercholesterolemia: Global Burden and Approaches. **Current Cardiology Reports**, v. 23, n. 10, p. 151, 4 out. 2021.

TURKYILMAZ, A. et al. The Spectrum of Low-Density Lipoprotein Receptor Mutations in a Large Turkish Cohort of Patients with Familial Hypercholesterolemia. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 19, n. 6, p. 340–346, 1 ago. 2021.

UNIYAL, A. P. et al. An overview of designing and selection of sgRNAs for precise genome editing by the CRISPR-Cas9 system in plants. **3 Biotech**, v. 9, n. 6, p. 223, 21 jun. 2019.

VRABLIK, M. et al. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. October, p. 1–10, 7 out. 2020.

WALDMANN, E. et al. Effect of mipomersen on LDL-cholesterol in patients with severe LDL-hypercholesterolaemia and atherosclerosis treated by lipoprotein apheresis (The MICA-Study). **Atherosclerosis**, v. 259, p. 20–25, 2017.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 16, p. e164–e164, 1 set. 2010.

WATTS, G. F. et al. Translational Research for Improving the Care of Familial Hypercholesterolemia: The “Ten Countries Study” and Beyond. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 23, n. 8, p. 891–900, 2016.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 01–22, 2013.

YAMAMOTO, T. et al. The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. **Cell**, v. 39, n. 1, p. 27–38, 1 nov. 1984.

YANG, G.; HUANG, X. Methods and applications of CRISPR/Cas system for genome editing in stem cells. **Cell Regeneration**, v. 8, n. 2, p. 33–41, dez. 2019.

ZHANG, C.; QUAN, R.; WANG, J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. R2, p. R79–R88, 1 ago. 2018.

ZHANG, X. et al. Membrane cholesterol modulates the fluid shear stress response of polymorphonuclear leukocytes via its effects on membrane fluidity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 2, p. C451–C460, ago. 2011.

ZHANG, X. et al. Shear-Sensitive Regulation of Neutrophil Flow Behavior and Its Potential Impact on Microvascular Blood Flow Dysregulation in Hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 3, p. 587–593, mar. 2014.

ZHENG, X. et al. Heterologous and endogenous U6 snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 2, 8 dez. 2018.

ZHOU, Y. et al. DDMut: predicting effects of mutations on protein stability using deep learning. **Nucleic Acids Research**, p. 1–7, 7 jun. 2023.

10. ANEXO

10.1. Anexo 1 – Tabelas e figuras suplementares

Tabela Suplementar 1: Critérios utilizados por cada um dos programas de predição in silico.

Ferramenta	Critérios de Predição
PROVEAN (CHOI et al., 2012)	Deletério; Neutro
SIFT (SIM et al., 2012)	Deletério (índice \leq 0.05); T: Tolerado (índice $>$ 0.05)
PolyPhen2 HDIV (ADZHUBEI et al., 2010)	Provavelmente deletéria (índice \geq 0.957); Possivelmente deletéria (0.453 \leq índice \leq 0.956); Benigna (índice \leq 0.452)
Mutation Taster 2 (SCHWARZ et al., 2014)	A: Causador de doença automático; D: Causador de doença; N: Polimorfismo; P: Polimorfismo automático. O índice de corte entre “D” e “N” é de 0,5 para MTori e 0,31655 para o rankscore

Tabela Suplementar 2: Tabela demonstrando os aminoácidos referência e suas respectivas trocas, bem como a estabilidade para cada uma das variantes.

Posição	Referência	Aminoácido trocado	Predição (Estabilidade $\Delta\Delta G$ wt->mt)	Predição Reversa (Estabilidade $\Delta\Delta G$ mt->wt)
184	C	Y	-4.07	2.99
373	G	D	-1.87	1.77
549	G	D	-1.51	1.21
797	V	L	-0.02	0.2
814	R	Q	0.15	-0.52
827	V	I	0.08	0.11

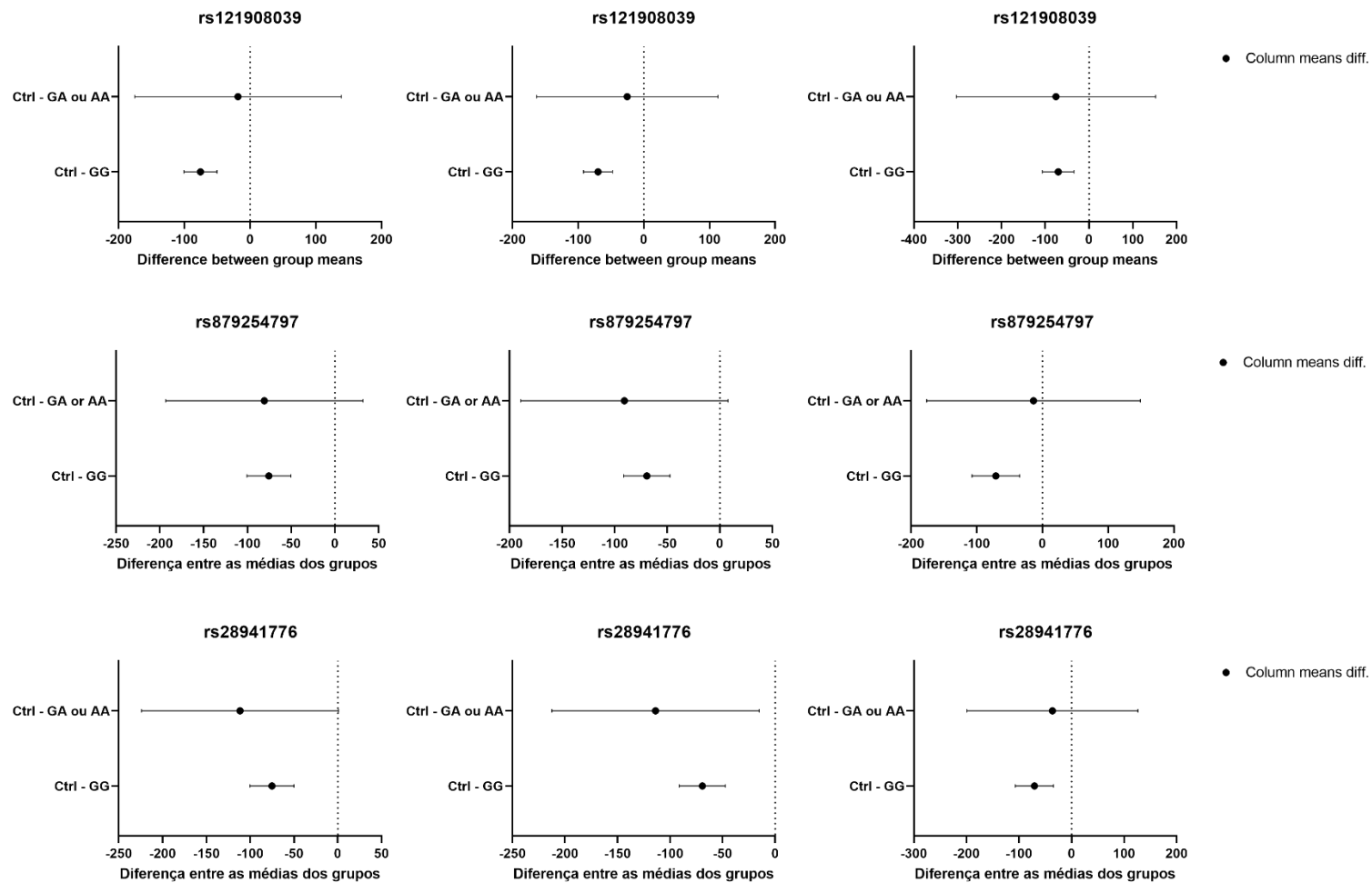


Figura suplementar 1: Intervalo de confiança da análise de variação com correção de Bonferroni para as variantes rs121908039, rs879254797 e rs28941776, considerando os parâmetros de CT, LDL e TG, respectivamente.

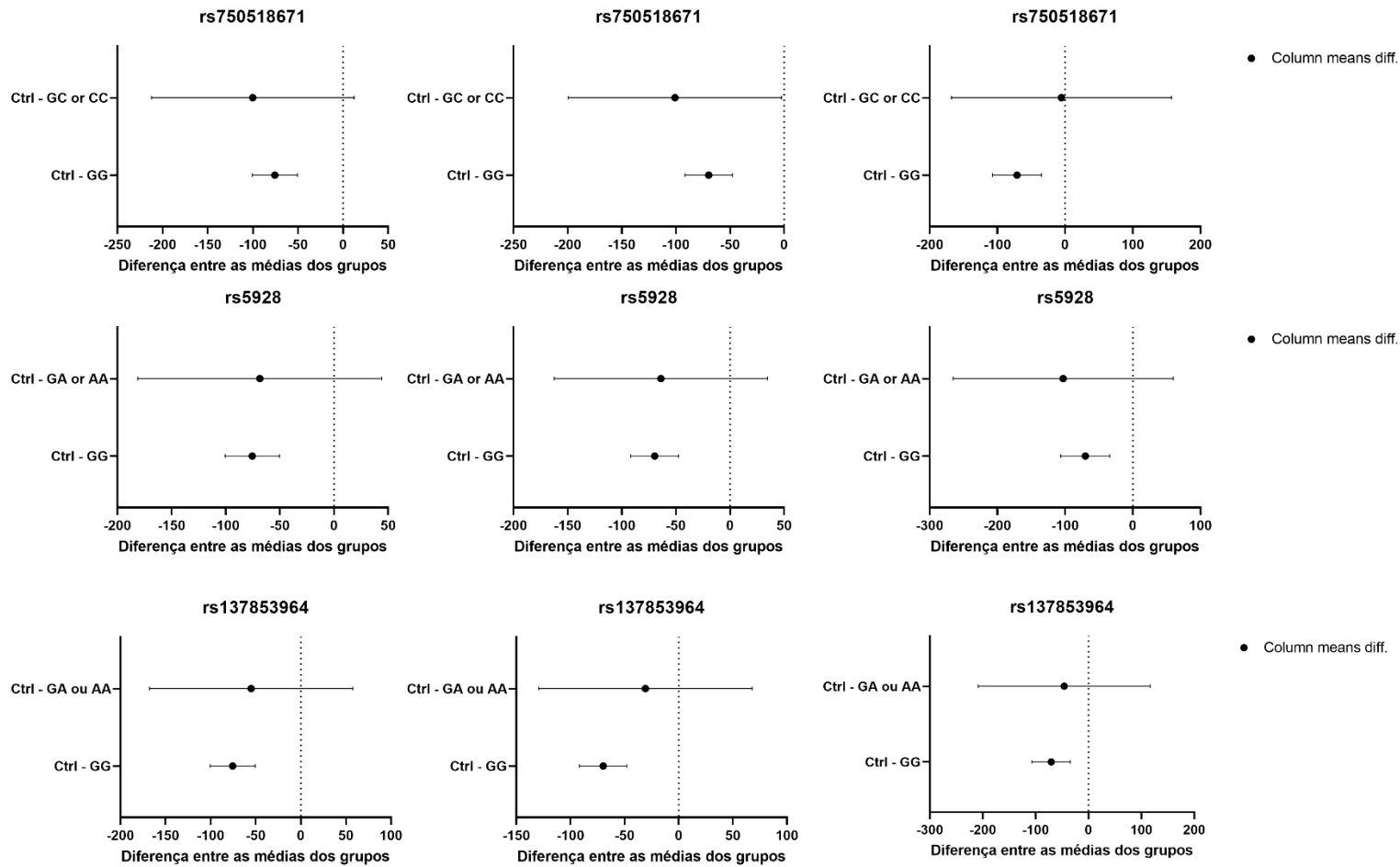


Figura suplementar 2: Intervalo de confiança da análise de variação com correção de Bonferroni para as variantes rs750518671, rs5928 e rs137853964, considerando os parâmetros de CT, LDL e TG, respectivamente.

10.2. Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese de
Cardiologia

CAAE nº 24618713.0.1001.5462

10.3. Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas-USP
CAAE nº 24618713.0.3001.0067

10.4. Anexo 4 - Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de
Rio Preto (FAMERP)

CAAE: 24618713.0.2004.5415

10.5. Anexo 5 - Parecer do Comitê de Ética da Real e Benemerita
Associação Portuguesa de Beneficência de São Paulo (BP)
Parecer nº 4.341.106

10.6. Anexo 6 - Parecer da Comissão Interna de Biossegurança



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0062020/FCF

São Paulo, 17 de fevereiro de 2020

Senhor Professor,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada em 13 de fevereiro p.p., o Projeto "*Construção de modelo in vitro baseados em edição gênica por CRISP/cas9 no gene LDLR visando melhor compreensão de influência genética na hipercolesterolemia familiar*" foi aprovado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO
Presidente da CIBio

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP
NESTA

Curriculum Lattes



Augusto Akira Mori

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6878311187421614>
ID Lattes: **6878311187421614**
Última atualização do currículo em 25/10/2022

Doutorando do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), desenvolvendo trabalhos relacionados à edição gênica por CRISPR/Cas9 em estudos de variantes genéticas ligadas à Hipercolesterolemia Familiar. Graduado em Farmácia-Bioquímica pela FCF-USP, com participação em projetos de iniciação científica envolvendo análise de polimorfismos e tecnologias de sequenciamento genético de próxima geração (NGS). Apresentação em simpósios de iniciação científica da USP durante a graduação. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Augusto Akira Mori
Nome em citações bibliográficas	MORI, A. A.;MORI, AUGUSTO AKIRA
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/6878311187421614
Orcid ID	https://orcid.org/0000-0001-9786-8946

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2018	Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Mário Hiroyuki Hirata. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2011 - 2018	Graduação em Farmácia-Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Formação Complementar

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Japonês	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.

DAGLI-HERNANDEZ, CAROLINA ; BORGES, JÉSSICA BASSANI ; MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES ; DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA ; **MORI, AUGUSTO AKIRA** ; GONÇALVES, RODRIGO MARQUES ; FALUDI, ANDRE ARPAD ; DE OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES ; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO ; BASTOS, GISELE MEDEIROS ; ZHOU, YITIAN ; LAUSCHKE, VOLKER M. ; CERDA, ALVARO ; HIRATA, MARIO HIROYUKI ; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO . Genetic Variant ABCC1 rs45511401 Is Associated with Increased Response to Statins in Patients with Familial Hypercholesterolemia. *PHARMACEUTICS* **JCR**, v. 14, p. 944, 2022.


Citações: WEB OF SCIENCE [™] 2

2. DAGLI-HERNANDEZ, CAROLINA ; DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA ; MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES ; GONÇALVES, RODRIGO MARQUES ; FALUDI, ANDRE ARPAD ; BORGES, JÉSSICA BASSANI ; BASTOS, GISELE MEDEIROS ; LOS, BRUNA ; **MORI, AUGUSTO AKIRA** ; BORTOLIN, RAUL HERNANDES ; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO ; DE OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES ; HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ CRESPO ; HIRATA, MARIO HIROYUKI ; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO . Late response to rosuvastatin and statin-related myalgia due to SLC01B1, SLC01B3, ABCB11, and CYP3A5 variants in a patient with Familial Hypercholesterolemia: a case report. *Annals of Translational Medicine* **JCR**, v. 9, p. 76-76, 2021.

Citações: WEB OF SCIENCE [™] 4





3. BORGES, JÉSSICA BASSANI OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES DE FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO LOS, BRUNA BARBOSA, THAIS KRISTINI ALMENDROS AFONSO MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES DAGLI-HERNANDEZ, CAROLINA DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA BORTOLIN, RAUL HERNANDES **MORI, AUGUSTO AKIRA** HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ CRESPO NAKAYA, HELDER TAKASHI IMOTO BASTOS, GISELE MEDEIROS THUROW, HELENA STRELOW GONÇALVES, RODRIGO MARQUES ARAUJO, DANIEL BRANCO DE ZATZ, HENRY PAULO BERTOLAMI, ADRIANA FALUDI, ANDRÉ ARPAD BERTOLAMI, MARCELO CHIARA SOUSA, AMANDA GUERRA DE MORAES REGO FRANÇA, JOÃO ÍTALO DIAS JANNES, CINTHIA ELIM PEREIRA, ALEXANDRE DA COSTA NAKAZONE, MARCELO ARRUDA , *et al.* ; Genomics, epigenomics and pharmacogenomics of familial hypercholesterolemia (FHBGEP): A study protocol. *Research in Social & Administrative Pharmacy* **JCR**, v. 17, p. 1347-1355, 2021.

Citações: WEB OF SCIENCE [™] 7

4.  **MORI, AUGUSTO AKIRA**; CASTRO, LARA REINEL DE ; BORTOLIN, RAUL HERNANDES ; BASTOS, GISELE MEDEIROS ; OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES DE ; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO ; HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ CRESPO ; FAJARDO, CRISTINA MORENO ; SAMPAIO, MARCELO FERRAZ ; MOREIRA, DALMO ANTONIO RIBEIRO ; PACHÓN-MATEOS, JOSÉ CARLOS ; CORREIA, EDILEIDE DE BARROS ; SOUSA, AMANDA GUERRA DE MORAES REGO ; BRIÓN, MARIA ; CARRACEDO, ANGEL ; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO ; HIRATA, MARIO HIROYUKI . Association of variants in MYH7, MYBPC3 and TNNT2 with sudden cardiac death-related risk factors in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Forensic Science International-Genetics* **JCR**, v. 52, p. 102478, 2021.

Citações: WEB OF SCIENCE [™] 6

Apresentações de Trabalho

1.  **MORI, A. A.**; CASTRO, L.R. ; HERNANDES, R.B. ; BASTOS, G. M. ; FAJARDO, C. M. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . Associação de variantes dos genes MYH7, MYBPC3 e TNNT2 com fatores de risco para Morte Súbita Cardíaca em pacientes com Cardiomiopatia Hipertrófica. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2.  **MORI, A. A.**; BASTOS, G. M. ; HIRATA, M. H. . ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DOS GENES MYH7, MYBPC3 E TNNT2 E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE RISCO DE MORTE SÚBITA CARDÍACA EM PACIENTES COM CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3.  BASTOS, G. M. ; SOUZA, D. D. ; GERMANO, J. F. ; SALDARRIAGA, M. E. G. ; **MORI, A. A.** ; FAJARDO, C. M. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . Hypertrophic Cardiomyopathy: Novel Variants in MYH7, MYBPC3 and TNNT2.. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4.  **MORI, A. A.**; SOUZA, D. D. ; GUIMARAES, G. ; BASTOS, G. M. ; RAMOS, E. ; HIRATA, T. ; FAJARDO, C. M. ; HIRATA, M. H. . ANÁLISE EXÔMICA DOS GENES MYH7, MYBPC3 E TNNT2 RELACIONADOS COM CARDIOMIOPATIA HIPERTRÓFICA, E SUA INFLUÊNCIA NA MORTE SÚBITA CARDÍACA. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
5. **MORI, A. A.**; SOUZA, M. C. ; MORAES, T. I. ; OLIVEIRA, R. ; CERDA, A. ; HIRATA, M. H. ; FAJARDO, C. M. ; DOREA, E. L. ; HIRATA, R. D. C. . INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO AdipoQ NO PERFIL METABÓLICO E INFLAMATÓRIO DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME METABÓLICA. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

10.7. Ficha do Aluno



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 7609234/1 - Augusto Akira Mori

Email: augusto.akira.mori@usp.br
Data de Nascimento: 03/12/1989
Cédula de Identidade: RG - 35.108.063-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2018

Curso: Doutorado Direto
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 27/07/2018
Início da Contagem de Prazo: 27/07/2018
Data Limite para o Depósito: 24/07/2023
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 27/07/2018 até o presente. Email: mhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 27/07/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/11/2020
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 27/07/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 10/07/2023 15:17:23



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9136 - 7609234/1 - Augusto Akira Mori

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-8/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2018	14/11/2018	15	1	100	A	N	Concluída
BMM5709-1/1	Aspectos Fundamentais de Reparo de DNA e Mutagênese (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2018	13/09/2018	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5754-1/2	Da Clonagem à Análise de Proteínas – Métodos e Estratégias (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	02/09/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5781-7/2	Fundamentos da Citometria de Fluxo – Aplicações em Biologia Celular, Molecular e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	05/11/2018	11/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída
MCP5835-3/10	Princípios de Análise de Dados e de Bioestatística (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/03/2019	24/03/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5792-5/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	B	N	Concluída
BIO5749-3/2	Biologia Molecular da Célula-Tronco (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	13/03/2019	21/05/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5954-1/3	Redação de Trabalhos Científicos	07/05/2019	13/05/2019	15	1	100	A	N	Concluída
EPI5713-2/2	Introdução ao R para a Análise de Dados (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/06/2019	07/07/2019	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MAG5002-1/5	Genética Molecular Humana e Genômica (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/08/2019	06/12/2019	120	8	93	A	N	Concluída
FBC5766-6/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	06/08/2019	18/11/2019	15	1	87	A	N	Concluída
FBC5957-1/1	Farmacogenômica e Epigenômica	09/09/2019	07/10/2019	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5804-8/4	Tópicos de Epistemologia e Didática (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	09/03/2020	15/06/2020	120	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5793-14/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	10/03/2020	23/06/2020	15	1	100	A	N	Concluída
VCM5748-2/2	Preparação Pedagógica em Medicina Veterinária (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	17/08/2020	31/08/2020	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 10/07/2023 15:17:24