



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Julia Hellena Mendes Ribeiro

Estratégias para investigação do efeito do gene LMX1B na síndrome de unha patela: CRISPR-Cas9 e diferenciação condrogênica

Orientadora: Prof. Dra. Maria Sueli Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. Robert E. Pogue

Brasília, 2024



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Julia Hellena Mendes Ribeiro

Estratégias para investigação do efeito do gene LMX1B na síndrome de unha patela: CRISPR-Cas9 e diferenciação condrogênica

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. Robert E. Pogue

Brasília, 2024



Dissertação de autoria de Julia Hellena Mendes Ribeiro, intitulado “Estratégias para investigação do efeito do gene LMX1B na síndrome de unha patela: CRISPR-Cas9 e diferenciação condrogênica.”, apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular, em 22 de Janeiro de 2024, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe - Orientadora
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular - UnB

Prof. Dr. Robert Pogue – Coorientador
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo – Avaliador Interno
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular - UnB

Prof. Dra. Rosângela Vieira Andrade – Avaliadora Externa
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB

Dra. Kamila Botelho Sampaio de Oliveira - Suplente
Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Brasília
2024

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus avós, S. Heliodoro, D. Cruz e D. Helena, que lutaram muito para que meus pais, Adilson e Débora, pudessem ter a oportunidade de uma educação melhor que a deles, aos meus pais que sempre me incentivaram a fazer o melhor com essa oportunidade. Às minhas irmãs Anna e Alice que são minhas primeiras e melhores amigas. Ao meu parceiro João Pedro e seu apoio incondicional durante os últimos anos, compreendendo o estresse, falta de sono, ansiedade e a dificuldade do tempo e da estatística. Obrigada por me ensinar a paciência, amor e tranquilidade no meio de momentos tão tempestuosos.

Agradeço a Erika, a quem estive grudada desde o dia zero e foi muito bonito ver uma colega virar uma amiga, obrigada pelas caronas e acima de tudo pela paciência. Bianca, minha mentora e grande amiga, sem seu apoio e orientação eu não teria chegado até aqui. À todas as minhas alunas de Iniciação Científica, em especial a Natália, Ana Julya e Paulinha que definitivamente vão trilhar um caminho lindo. Aos amigos que fiz durante esse período difícil, Michel, Letícia, Nady, Victor e Kamila, sem os quais seria muito mais pesado. Em especial, obrigada ao Samuel, técnico e parceiro de todas as horas.

Ao Lucas Oliveira e Ana Gualberto, bem como o Dr. Sebastien e Dr. Fábio, pela paciência no ensino e pela vontade de contribuir para esse trabalho. À professora Juliana Lott e a todo o LabIBC, em especial à Mavi e a Stefhani por terem me acolhido tão bem.

À Profa. Dra. Maria Sueli, pela oportunidade de estar em uma das melhores Universidades do Brasil, em um programa tão bem conceituado que é a Patologia Molecular e por todo apoio e confiança durante essa jornada. E por fim mas não menos importante ao Prof. Dr. Robert Pogue, sob sua orientação, eu encontrei meu lugar na ciência brasileira, muito obrigada por ser esse orientador excepcional, por ter me acolhido desde a Iniciação Científica e me acompanhado e orientado sempre que possível.

Agradeço também à Universidade de Brasília, CAPES e FAP-DF pelo apoio financeiro.

RESUMO

As doenças genéticas esqueléticas são um conjunto de doenças que podem afetar desde os ossos até os tecidos, possuindo uma manifestação clínica muito variável; são majoritariamente incuráveis e dependem de tratamentos paliativos. A Síndrome de Nail-Patella (NPS; OMIM: 161200) é uma anomalia autossômica dominante causada por mutações em heterozigose no gene *LMX1B*, e apesar de possuir sinais clínicos bem descritos pouco se compreende sobre seus mecanismos moleculares. Este projeto teve como objetivo principal o desenvolvimento de ferramentas para estudo da NPS usando CRISPR-Cas9 e condrogênese. Devido à expressão precoce do gene durante a embriogênese, células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) foram inicialmente escolhidas para o projeto, visando sua edição por meio do sistema CRISPR-Cas9. No entanto, devido à complexidade dos custos associados à cultura de iPSC, células estromais mesenquimais (CEM) e células renais embrionárias (HEK293T) foram escolhidas como alternativa. Testes com plasmídeos de fluorescência utilizando *Lipofectamine*TM e *Nucleofector*TM demonstraram que tanto as iPSC como as CEM foram viáveis para a entrega de plasmídeos, apesar da taxa de transfecção inferior à literatura. A inserção dos plasmídeos com sgRNA aumentou a mortalidade celular, bem como a inserção da puromicina para a seleção dos clones, dessa forma levanta-se a possibilidade da deleção do gene ser letal para as células. Concomitantemente foi realizada a otimização da diferenciação condrogênica de células iPS, facilitando o estudo de doenças genéticas do esqueleto a partir de células pluripotentes. No tocante à expressão gênica, observou-se que durante a condrogênese o gene *SOX9*, iniciador da condrogênese, apresenta o mesmo perfil de *LMX1B*, sugerindo sua associação. Para análise do perfil de expressão do gene em células renais utilizou-se as HEK293T Cas9 estáveis e resistentes à puromicina, coletando-se seu material após transfecção com sgRNA de interesse e analisando perturbações no genoma. Este projeto possibilitou a definição de protocolos para transfecção de iPSC e CEM, bem como HEK293T, demonstrando seu potencial de inserção de plasmídeos. Além disso foi definido também um novo protocolo para diferenciação condrogênica de iPSC e dados de qPCR evidenciaram ligação entre a expressão de *SOX9* e *LMX1B*, esses achados abrem portas para o estudo de doenças genéticas do esqueleto em sistemas *in vitro* utilizando diferentes estratégias de entrega do CRISPR-Cas9.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9; Edição gênica; Síndrome de unha-patela; Diferenciação condrogênica.

ABSTRACT

Skeletal genetic diseases are a group of conditions that can affect bones and tissues, exhibiting a highly variable clinical manifestation. These diseases are predominantly incurable and rely on palliative treatments. Nail-Patella Syndrome (NPS; OMIM: 161200) is an autosomal dominant anomaly caused by heterozygosity mutations in the *LMX1B* gene. Despite well-described clinical signs, little is understood about its molecular mechanisms. Due to the gene's early expression during embryogenesis, induced pluripotent stem cells (iPSC) were initially chosen for the project, aiming for CRISPR-Cas9-mediated gene editing. However, due to the complex and costly nature of iPSC culture, mesenchymal stem cells (MSC) and embryonic kidney cells (HEK293T) were chosen as alternatives. Fluorescent plasmid tests using Lipofectamine™ and Nucleofector™ demonstrated that both iPSC and MSC were viable for delivery, although the transfection rate was lower than reported in the literature. Plasmid insertion with sgRNA increased cell mortality, as did puromycin insertion for clone selection, raising the possibility that gene deletion might be lethal for cells. Simultaneously, optimization of iPSC chondrogenic differentiation was performed, facilitating the study of genetic skeletal diseases from pluripotent cells. Regarding gene expression, it was observed that during chondrogenesis, the *SOX9* gene, an initiator of chondrogenesis, exhibited a similar profile to *LMX1B*, suggesting their association. For gene expression analysis in renal cells, stable HEK293T Cas9 cells resistant to puromycin were used, collecting their material after transfection using sgRNA of interest and analyzing genome disturbances. This project enabled the establishment of protocols for the transfection of iPSC and CEM, as well as HEK293T, demonstrating their potential for plasmid insertion. Additionally, a new protocol for chondrogenic differentiation of iPSC was also defined, and qPCR data revealed a connection between the expression of *SOX9* and *LMX1B*, these findings open new doors for the study of skeletal genetic diseases using *in vitro* systems with different strategies of delivery of the CRISPR-Cas9 system.

Keywords: CRISPR-Cas9; Gene editing; Nail-patella syndrome; Chondrogenic differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Apresentação típica das unhas do polegar (a) e indicador (b).

Figura 2: Fluxo de trabalho da primeira parte do projeto, iniciando com cultura das diferentes linhagens celulares escolhidas para o projeto, transfecção do plasmídeo de interesse com os sgRNA específicos, expansão dos clones editados, seleção, isolamento de DNA, e amplificação por PCR e sequenciamento.

Figura 3: Fluxo de trabalho da segunda parte do projeto, iniciando com a cultura e expansão das iPSC e diferenciação a partir do kit de diferenciação condrogênica, extração de RNA com TRIzol, síntese da fita complementar e verificação de expressão gênica com qPCR e análise estatística.

Figura 4: Esquema de *knockout* pelo CRISPR-Cas9. Esquema do sgRNA (*single guide*, ou guia) formado por crRNA complementar com o alvo e tracrRNA (RNA trans-ativador de CRISPR). Ao detectar a sequência alvo a Cas9 é recrutada e na presença do PAM promove o corte molecular. A quebra da dupla fita leva a célula a iniciar o sistema de reparo, nesta figura por meio de *non homologous end joining* (NHEJ, junção não homóloga das extremidades) gerando um *knockout*.

Figura 5: Fluxograma de trabalho utilizando as 3 linhagens celulares. iPSC - células-tronco de pluripotência induzida; CEM - células estromais mesenquimais; HEK293T - células renais embrionárias; FC - fatores de crescimento.

Figura 6: Plasmídeo *all in one* utilizado para transfecção com o gene para transcrição de Cas9, em vermelho localizado aproximadamente do nucleotídeo 1200 a 5500, e gene de resistência à puromicina, em verde localizado aproximadamente do nucleotídeo 5600 a 6000.

Figura 7: Desenho esquemático da placa experimental para avaliação da toxicidade celular.

Figura 8: Desenho esquemático placa transdução viral com diferentes concentrações virais.

Figura 9: Células iPSC 24 horas após início da seleção com puromicina. a) 15 µg/mL de puromicina; b) 13 µg/mL; c) 10 µg/mL; d) 8µg/mL; e) 5µg/mL; f) 3µg/mL; g) 1 µg/mL e h) controle sem antibiótico.

Figura 10: Células CEM 24 horas após início do teste de toxicidade das CEM nas condições a) 15 µg/mL de puromicina; b) 13 µg/mL; c) 10 µg/mL; d) 8µg/mL; e) 5µg/mL; f) 3µg/mL; g) 1µg/mL e h) controle sem antibiótico.

Figura 11: Células CEM 48h após teste de toxicidade. a) 1µg/mL de puromicina, as células apresentaram morfologia esperada mas baixa taxa de proliferação comparada com b) controle sem antibiótico.

Figura 12: iPSC transfectadas com 100 ng de vetor contendo RFP e 4 µL *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 13: iPSC transfectadas por 250 ng vetor com RFP e 2 µL *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 14: iPSC transfectadas por 250 ng vetor com RFP e 4 µL *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 15: iPSC transfectadas por 500 ng vetor com RFP e 2 µL *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 16: iPSC transfectadas com 500 ng do vetor contendo RFP e 4 µL *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 17: iPSC transfectadas por eletroporação com o vetor GFP. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) GFP em verde; (c) sobreposição de DAPI com GFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 18: CEM transfectadas por eletroporação com o vetor RFP. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

Figura 19: Amplicons esperados pós PCR. Em negrito na sequência estão os alvos.

Figura 20: Eletroferograma amostra iPSC 4, amplicon Éxon 3, próximo a sequência alvo.

Figura 21: Eletroferograma amostra HEK293T 12, amplicon Éxon 3, próximo a sequência alvo.

Figura 22: Alinhamento da Amostra iPSC 4, demonstrando alinhamento ao genoma *homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA*. Demonstrando 99% de concordância com o genoma de referência.

Figura 23: Alinhamento da Amostra HEK293T 4, demonstrando alinhamento ao genoma *homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds*. Demonstrando 99% de concordância com o genoma de referência.

Figura 24: Diferenciação das células-tronco a partir da formação do zigoto.

Figura 25: Etapas da diferenciação condrogênica em células-tronco mesenquimais.

Figura 26: Coloração Alcian Blue anterior à diferenciação condrogênica.

Figura 27: Coloração por Alcian Blue em 7 dias de diferenciação (T7). (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.

Figura 28: Coloração por Alcian Blue em 14 dias de diferenciação (T14). (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.

Figura 29: Coloração por Alcian Blue em 21 dias de diferenciação (T21). (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.

Figura 30: Coloração por Alcian Blue em 28 dias de diferenciação (T28). (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.

Figura 31: Expressão gênica de *Col1A1*, *Col2A1*, *Col10A1* e *ACAN*, normalizado com *ACTB*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****), P value ≤ 0.001 é representado por (*****).

Figura 32: Expressão gênica *SOX9*, demonstrando um pico de expressão em T7, durante o início da diferenciação condrogênica.

Figura 33: Expressão gênica *Col2A1*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****), P value ≤ 0.001 é representado por (*****).

Figura 34: Expressão gênica *Col1A1*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****), P value ≤ 0.001 é representado por (*****).

Figura 35: Expressão gênica *Col10A1*.

Figura 36: Expressão gênica de *ACAN*. $P \text{ value} \leq 0.05$ é representado por (*), $P \text{ value} \leq 0.01$ é representado por (**), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (***) e $P \text{ value} \leq 0.0001$ é representado por (****), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (*****).

Figura 37: Expressão gênica de *LMX1B*, *OCT4*, *NANOG*, e *TBXT* normalizada com *GAPDH*. $P \text{ value} \leq 0.05$ é representado por (*), $P \text{ value} \leq 0.01$ é representado por (**), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (***) e $P \text{ value} \leq 0.0001$ é representado por (****), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (*****).

Figura 38: Expressão de *LMX1B* variante 7.

Figura 39: Expressão de *LMX1B* variante 2.

Figura 40: Expressão de *OCT4*.

Figura 41: Expressão de *NANOG*. $P \text{ value} \leq 0.05$ é representado por (*), $P \text{ value} \leq 0.01$ é representado por (**), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (***) e $P \text{ value} \leq 0.0001$ é representado por (****), $P \text{ value} \leq 0.001$ é representado por (*****).

Figura 42: Expressão de *TBXT*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers de genotipagem desenhados pela Dra. Angela Saito.

Tabela 2: Primers de genotipagem desenhados para nova otimização.

Tabela 3: Condições de RFP e *Lipofectamine Stem* e taxa obtida em cada condição.

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados na qPCR. F: primer *forward* e R: primer *reverse*.

[1] (SIMONASSI-PAIVA, 2019); [2] (BEHRENDT et al., 2018); [3] Primers desenhados pela autora.

Tabela 5: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *ACTB*, *COL1A1* e *COL2A1*.

Tabela 6: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *COL10A1*, *SOX9* e *ACAN*.

Tabela 7: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *GAPDH*, *LMX1B7* e *LMX1B2*.

Tabela 8: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *OCT4*, *NANOG* e *TBXT*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAN - Aggrecan

COL1A1 - Colágeno 1A1

COL2A1 - Colágeno 2A1

COL10A1 - Colágeno 10A1

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

COMP - proteína de matriz oligomérica de cartilagem (*cartilage oligomeric matrix protein*)

crRNA - CRISPR RNA

CRISPR-Cas9 - Repetições palindrômicas curtas, interespaçadas e regularmente agrupadas (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

DAPI - diamidino-2-phenylindole

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês *desoxyribonucleic acid*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-ácido (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

E8 - Meio essencial 8 (do inglês *Essential 8*)

FGFR3 - Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês *fibroblast growth factor receptor 3*)

FGFR8 - Receptor 8 do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês *fibroblast growth factor receptor 8*)

GFP - Proteína verde fluorescente (do inglês *green fluorescent protein*)

iPSC - Células-tronco de pluripotência induzida (do inglês *induced pluripotent stem cells*)

LMX1B - Fator de transcrição LIM homeobox 1-beta (do inglês *LIM homeobox transcription factor 1 beta*)

NPR2 - receptor 2 de peptídeo natriurético (*natriuretic peptide receptor 2*)

NPS - Síndrome de unha-patela (do inglês *nail patella-syndrome*)

PAM - protoespaçador com motivo adjacente (do inglês *protospacer adjacent motif*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcriptase reversa (do inglês *quantitative reverse transcriptase PCR*)

RPF - Proteína vermelha fluorescente (do inglês *red fluorescent protein*)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

sgRNA - RNA guia único (do inglês *single guide RNA*)

SOX9 - Fator de transcrição 9 de caixa SRY-box

OMIM - Herança mendeliana online do homem (do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*)

PBS - tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

TALEN - Nuclease efetora do tipo ativador de transcrição (do inglês *transcription activator-like effector nuclease*)

WNT - do inglês *wingless*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1. DOENÇAS GENÉTICAS DO ESQUELETO	14
1.2. SÍNDROME DE UNHA-PATELA	14
1.3. MODELAGEM DE DOENÇAS	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
Capítulo 1:	18
Capítulo 2:	18
4. METODOLOGIA COMUM	19
4.1. FLUXOGRAMA	19
5. CAPÍTULO 1. OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS PARA EDIÇÃO	21
5.1. INTRODUÇÃO	21
Sistema CRISPR-Cas9	21
5.2. METODOLOGIA	23
Cultivo de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC)	24
Cultivo de células-tronco mesenquimais	25
Cultivo de HEK293T	25
Mutagênese	25
Design de plasmídeos	26
Teste de toxicidade	28
Transfecção por Lipofectamine™ Stem	29
Seleção de células transfectadas por Lipofectamine™ Stem	29
Transfecção por Nucleofector™ 4D	30
Seleção de células transfectadas por Nucleofector™ 4D	31
Transfecção com Lipofectamine 3000™	32
Transfecção com lentivirus	32
Transdução viral de Células-tronco mesenquimais	33
Verificação de mutagênese e zigosidade	34
5.3. RESULTADOS	36
Teste de toxicidade celular	36
Transfecção por Lipofectamina Stem™	39
Transfecção por Nucleofector™ 4D	45
Transfecção por Lipofectamine 3000™	47
Transdução lentiviral	48
Sequenciamento Sanger	49
6. CAPÍTULO 2. DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA	54
6.1. INTRODUÇÃO	54
Células-tronco	54

Condrogênese	55
6.2. METODOLOGIA	57
Diferenciação condrogênica	57
Coloração por Alcian Blue	58
Verificação da expressão gênica	58
PCR em tempo real (qPCR)	59
6.3. RESULTADOS	62
Coloração por Alcian Blue	62
Expressão gênica	66
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA	76
8. REFERÊNCIAS	78
9. Material Suplementar	83
9.1. Alinhamento das sequências recebidas iPSC	83
9.2. Alinhamento das sequências recebidas HEK293T	97
9.3. Dados qPCR Condrogênese	108

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. DOENÇAS GENÉTICAS DO ESQUELETO

As doenças genéticas do esqueleto são um conjunto de doenças que acometem desde o tecido ósseo até a cartilagem, possuem uma clínica bastante variável (KRAKOW, 2015) com heterogeneidade genética e fenotípica, são em sua maioria incuráveis, de maneira que o paciente passa a depender apenas de tratamentos paliativos. Em uma ampla revisão realizada em 2019 (MORTIER *et al.*), definiu-se que as doenças genéticas do esqueleto compõem 461 doenças classificadas em 42 grupos diferentes e são causadas principalmente por defeitos nos genes *FGFR3* (Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos, do inglês *fibroblast growth factor receptor 3*), *COL2A1* (Colágeno 2A1), *COMP* (proteína de matriz oligomérica de cartilagem, do inglês, *cartilage oligomeric matrix protein*), *NPR2* (receptor 2 de peptídeo natriurético, do inglês, *natriuretic peptide receptor 2*) e *ACAN* (Agrecan). Um grande desafio no estudo dos mecanismos de etiologia e no tratamento dessas doenças é a inacessibilidade de seu objeto de estudo - os condrócitos.

Por serem as células mais abundantes em se tratando de esqueleto, muito se estuda sobre os condrócitos (PAZZAGLIA *et al.* 2011; YEUNG *et al.* 2014), já que têm papel importante tanto na produção como no desenvolvimento dos ossos. Nas placas de crescimento, essas células produzem proteínas que são exportadas da célula para produzir uma matriz extracelular rica em 90% de colágeno tipo II, proteoglicanas, entre outros (MONACO *et al.* 2021). As atividades destas células têm sido estudadas extensivamente (VAN GOOL *et al.* 2012; SKRETI *et al.* 2014; POGUE *et al.* 2004). Vários dos genes importantes na proliferação e diferenciação de condrócitos sofrem mutações nas doenças esqueléticas, resultando em problemas no estabelecimento da forma de elementos esqueléticos, e no crescimento dos mesmos.

1.2. SÍNDROME DE UNHA-PATELA

A síndrome de unha e patela - *nail patella syndrome* ou NPS - (OMIM: 161200) é uma doença autossômica dominante rara, com incidência de 1 caso para cada 50.000 pessoas, causada por mutações no gene *LMX1B*. A mutação no gene, causada em heterozigose, resulta em haploinsuficiência da proteína de mesmo nome, afetando diversos órgãos como os membros, olhos, rins, com apresentações clínicas principalmente envolvendo esqueleto.

Essa síndrome é caracterizada por defeitos de desenvolvimento em vários componentes esqueléticos e sua apresentação clínica mais comum é a displasia ungueal (Figura 1) e a hipoplasia ou ausência de patela, que dá o nome à síndrome (CARINELLI *et al.* 2020). O gene *LMX1B*, localizado no cromossomo 9q33.3, codifica um fator de transcrição da família das proteínas do homeodomínio LIM (acrônimo das proteínas Lin-11, Isl-1, e Mec-3).

Figura 1: Apresentação típica das unhas do polegar (a) e indicador (b).



Fonte: GeneReviews, 1993-2020 University of Washington

O gene *LMX1B* é expresso bem inicialmente no desenvolvimento fetal, trabalhando conjuntamente com a via de *WNT* (do inglês *wingless*), importante no desenvolvimento embrionário, com papel essencial no desenvolvimento de estruturas dos membros dorso-frontal, membrana basal glomerular, segmento anterior dos olhos e neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos (MORELLO; SCOTT; LEE, 2009). Juntamente com *FGFR8* (fator de crescimento de fibroblastos 8) e *WNT1*, o *LMX1B* contribui para a diferenciação e manutenção do istmo embrionário, possuindo associação tanto com desenvolvimento da mesoderme como ectoderme.

Além de afetar o esqueleto, a haploinsuficiência da proteína LMX1B provoca complicações renais, gerando insuficiência causada por depósito de colágeno tipo III na membrana glomerular basal (ANDREEN *et al.* 2018). Baseado nisso, o *knockout* do gene pode contribuir no estudo de toda a síndrome e análise do perfil de produção de colágenos pelos condrócitos com haploinsuficiência da proteína LMX1B. Concomitantemente, a compreensão do panorama geral molecular em células do epitélio renal na presença do *knockout* do *LMX1B* pode favorecer a compreensão da NPS e demonstrar novos potenciais alvos terapêuticos.

1.3. MODELAGEM DE DOENÇAS

A modelagem de doenças visa mimetizar um organismo ou seu estado, de forma que compreenda-se seu funcionamento fisiológico e molecular, assim é possível estudar os mecanismos moleculares da doença, potenciais tratamentos e resposta à eles. O uso de animais na pesquisa para estudo de doenças é bastante comum, no entanto, apresenta diversas limitações como as diferenças entre espécies e a necessidade de restrita regulação. Como alternativa, o desenvolvimento de modelos em cultura de células em monocamada tem sido bastante utilizado, pois garante uma maior flexibilidade do estudo além de permitir o estudo da progressão, permitindo diversas coletas (SHAH; TIRELLA, 2022).

Neste contexto, a utilização de células *in vitro* indiferenciadas, como células pluripotentes induzidas, permite a melhor representação do sistema *in vivo* (CORRÒ *et al.* 2020). A utilização da tecnologia de edição gênica, como o CRISPR-Cas9, possibilita o desenvolvimento de células que possuam características as quais objetiva-se estudar. A utilização dessa tecnologia permite o estudo de doenças raras e favorece o uso de linhagens celulares de difícil acesso, como o tecido cartilaginoso.

2. JUSTIFICATIVA

A síndrome de unha e patela chamou atenção por causa de uma família diagnosticada e estudada pelo grupo do Prof. Dr. Robert Pogue da Universidade Católica de Brasília (Polla *et al*, 2015). Vários membros da família que foram diagnosticados com a doença apresentaram uma mutação sem sentido (Tyr102Ter) no gene *LMX1B*. Apesar do interesse na doença, um modelo apropriado estava indisponível até o surgimento da nova tecnologia de edição gênica por CRISPR-Cas9.

Devido a inacessibilidade da cartilagem, uma vez que é composta por diversos tecidos acessórios, dificultando o estudo de muitas doenças do esqueleto, o uso de métodos de estudo *in vitro* para indução de condrogênese é a melhor abordagem. Com edição bem sucedida de genes nestas células, é possível induzir sua diferenciação em diferentes tipos de células, inclusive condrócitos, assim possibilitando estudar os defeitos moleculares que ocorrem na presença de mutação.

Esse projeto propõe-se a estabelecer estratégias de edição gênica utilizando o sistema CRISPR-Cas9, e avaliar sua eficiência em diferentes tipos de linhagens celulares, para futura realização do *knockout* de genes associados à condrogênese. Propõe-se estabelecer também um novo protocolo de diferenciação condrogênica de células pluripotentes, para análise do perfil de expressão gênica em estágios precoces de diferenciação.

Para melhor organização do trabalho, optou-se pela sua divisão em dois capítulos, abordando separadamente os mecanismos de edição e a diferenciação condrogênica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Utilização do sistema CRISPR Cas9 e variadas formas de entrega para edição *in vitro* do gene *LMX1B*, para criar uma ferramenta para futura modelagem da síndrome de unha-patela.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1:

- Desenho de construtos para *targeting* do gene *LMX1B*;
- Estabelecimento e otimização dos protocolos de entrega do sistema CRISPR-Cas9;
- Desenvolvimento de células-tronco Cas9 estáveis utilizando lentivirus;
- Indução de *knockout* do gene *LMX1B* em células-tronco de pluripotência induzida, células-tronco mesenquimais e células humanas renais embrionárias, a partir da transfecção de plasmídeos para estudo da síndrome de unha-patela.

Capítulo 2:

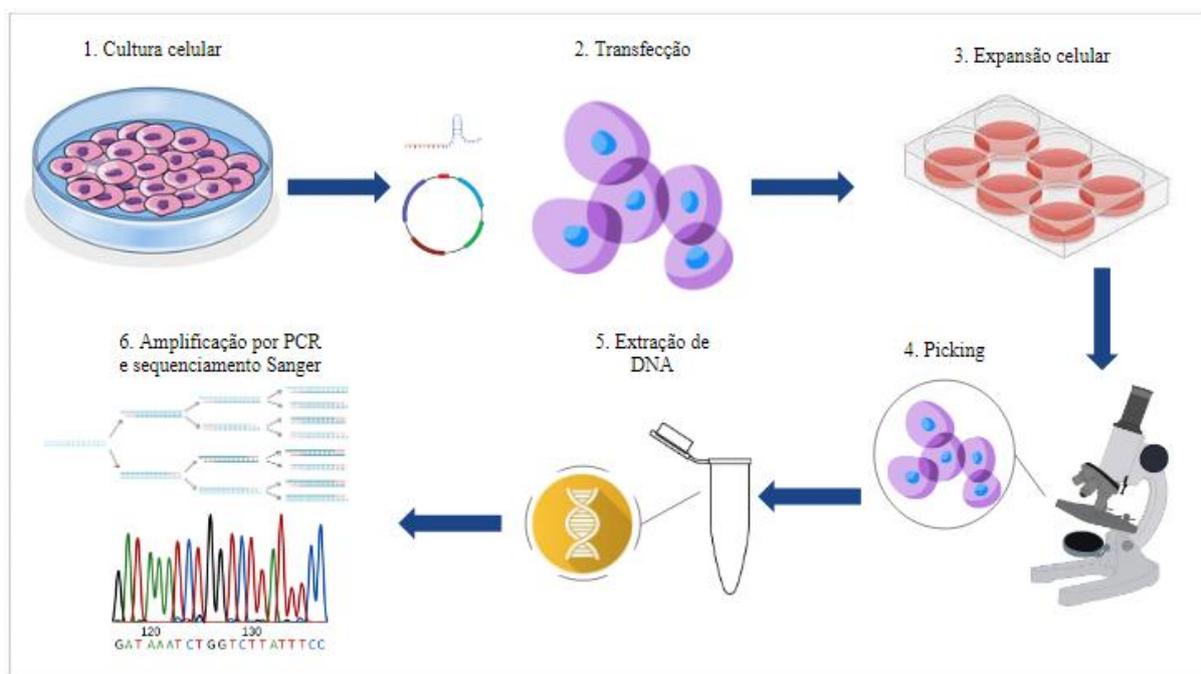
- Otimizar o protocolo de diferenciação condrogênica de iPSC com meio condrogênico *Stem Pro*;
- Avaliar a diferenciação condrogênica de células iPSC por meio de coloração e expressão gênica.

4. METODOLOGIA COMUM

4.1. FLUXOGRAMA

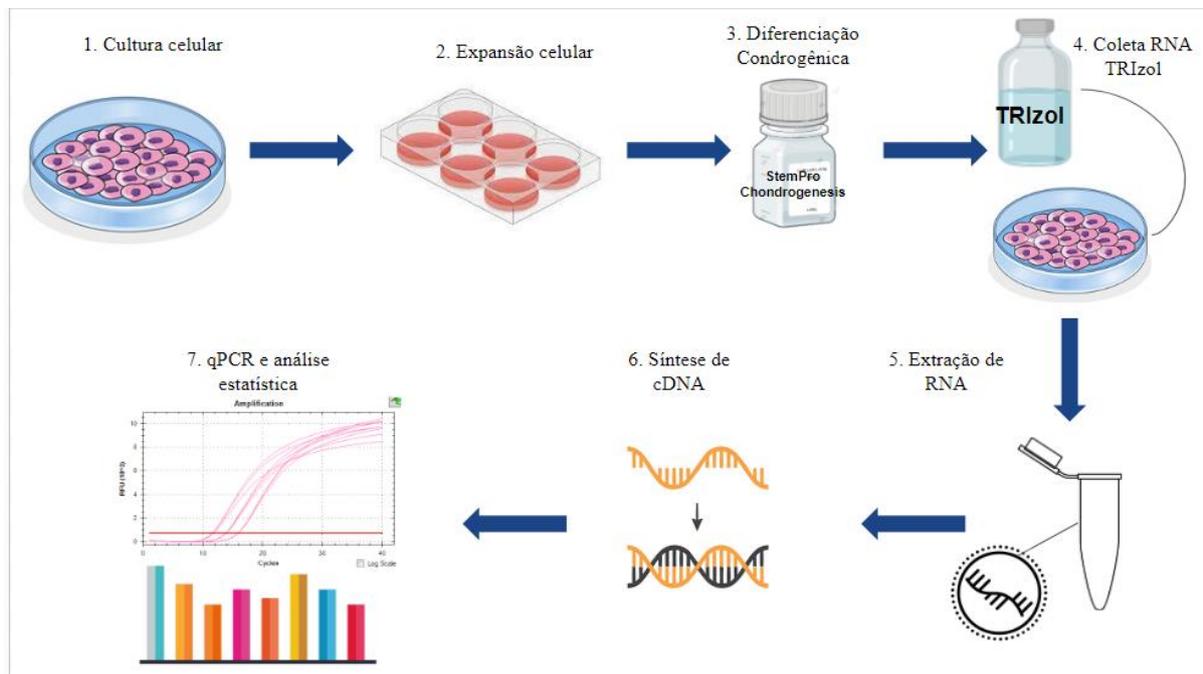
O fluxo de trabalho do projeto foi dividido em duas partes, a primeira (figura 2) visando a edição gênica do *LMX1B*, e a segunda (figura 3) visando a diferenciação condrogênica das iPSC.

Figura 2: Fluxo de trabalho da primeira parte do projeto, iniciando com cultura das diferentes linhagens celulares escolhidas para o projeto, transfecção do plasmídeo de interesse com os sgRNA específicos, expansão dos clones editados, seleção, isolamento de DNA, e amplificação por PCR e sequenciamento.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3: Fluxo de trabalho da segunda parte do projeto, iniciando com a cultura e expansão das iPSC e diferenciação a partir do kit de diferenciação condrogênica, extração de RNA com TRIzol, síntese da fita complementar e verificação de expressão gênica com qPCR e análise estatística.



Fonte: Elaborada pela autora.

5. CAPÍTULO 1. OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS PARA EDIÇÃO

5.1. INTRODUÇÃO

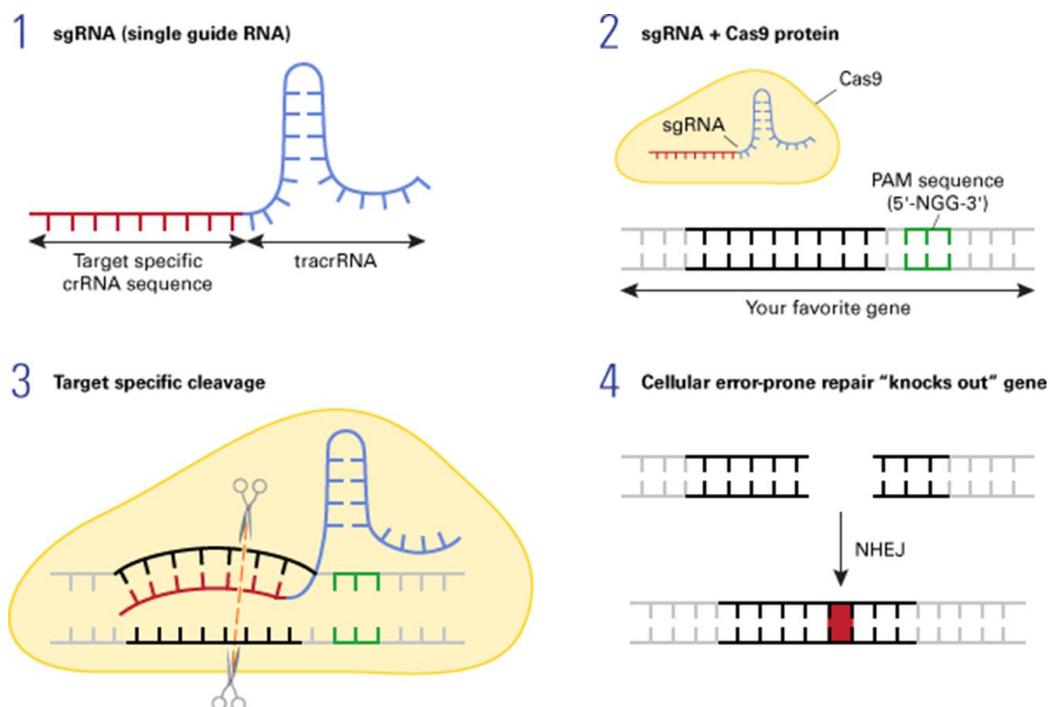
Sistema CRISPR-Cas9

Com o advento dos estudos genômicos no século XX iniciou-se uma miríade de estudos genômicos e engenharia genética, diagnóstico e controle de doenças. Diversas estratégias foram criadas para edição gênica como as nucleases “*zinc fingers*”, que realizam cortes no DNA e geram intervalos nas sequências gerando alterações na transcrição; outra metodologia é conhecida como TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*), baseada em recombinação gênica visualizada *in vivo* diante de sequências altamente repetitivas. Apesar de serem consideradas técnicas de edição altamente funcionais, a recombinação homóloga por *zinc finger* e por TALEN possui alto custo e grande possibilidade de geração de alterações inespecíficas (*off-targets*) (GUPTA *et al.* 2019).

Como alternativa a estas tecnologias, mais recentemente foi descoberto e desenvolvido o sistema CRISPR-Cas9 (Figura 4), baseado no mecanismo de edição gênica derivada do sistema imune de bactérias, o qual funciona principalmente para enfrentamento à infecção por vírus (RAN *et al.*, 2013; STERNBERG; DOUDNA, 2015). É um complexo sistema observado em procariotos que consiste em 3 etapas diferentes: (a) aquisição ou adaptação de sequência espaçadora, (b) expressão e processamento de crRNA (CRISPR RNA) e (c) síntese de CRISPR interferente. A aquisição ou adaptação da sequência espaçadora (a) consiste no contato com um agente externo e aquisição de sua sequência seguida pelo reconhecimento desta sequência incorporada no DNA da bactéria. (b) expressão de nucleases Cas (mais comumente Cas9) que se liga a um crRNA para efetuar o próximo passo; (c) uso do complexo crRNA e Cas9 para clivagem e inativação do DNA invasor (SHARMA *et al.*, 2020). Os trabalhos para caracterizar e adaptar o sistema de CRISPR como uma tecnologia inovadora de edição gênica foram premiados com o prêmio Nobel para química em 2020 (CHARPENTIER; DOUDNA 2020).

Posteriormente, esse sistema foi adaptado para possibilitar edição gênica em células eucariontes, inclusive células humanas. O reparo do DNA acontece por recombinação homóloga ou não homóloga que pode gerar mutações como deleção, inserção, adição ou inversões (STERNBERG; DOUDNA, 2015; SHARMA *et al*, 2020). Em células eucarióticas, há a necessidade de uso de uma sequência guia - o *single guide* RNA - que precisa ter cerca de 20 nucleotídeos para reduzir a geração de alterações *off-targets*. Para que a endonuclease Cas9 consiga atuar ela requer uma sequência denominada PAM (*protospacer adjacent motif*, ou em tradução livre, motivo adjacente protoespaçador), que se encontra adjacente à sequência onde o RNA guia hibridiza na região a ser editada. No que se diz respeito ao *knockout* de genes, a recombinação homóloga (ou não homóloga) pós-corte normalmente funciona editando a sequência o suficiente para que ela não mais consiga funcionar, no entanto no tocante ao *knock-in* das células, é necessário desenvolver uma sequência com a mutação desejada para se recombinar no sítio de corte, resultando em um novo gene.

Figura 4: Esquema de *knockout* pelo CRISPR-Cas9. Esquema do sgRNA (*single guide*, ou guia) formado por crRNA complementar com o alvo e tracrRNA (RNA trans-ativador de CRISPR). Ao detectar a sequência alvo a Cas9 é recrutada e na presença do PAM promove o corte molecular. A quebra da dupla fita leva a célula a iniciar o sistema de reparo, nesta figura por meio de *non homologous end joining* (NHEJ, junção não homóloga das extremidades) gerando um *knockout*.



Fonte: ©2023 Takara Bio Inc. All Rights Reserved.

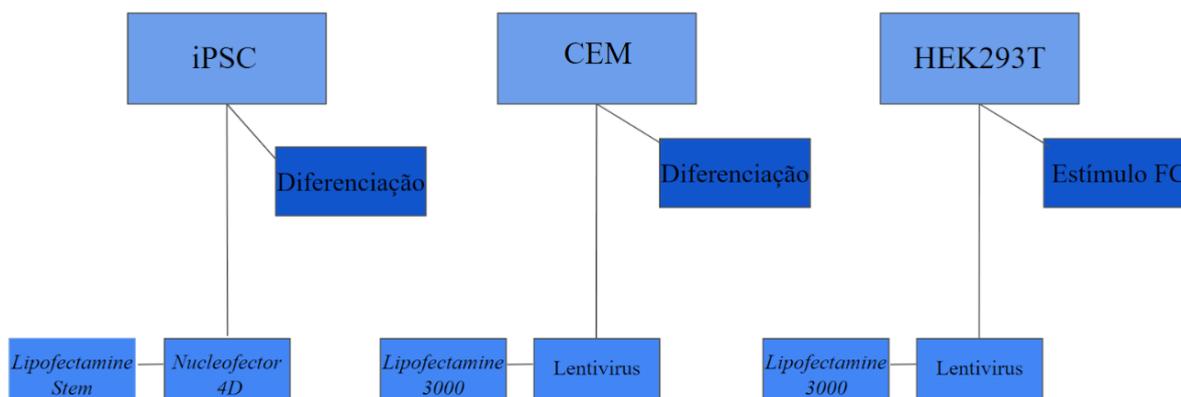
Essa tecnologia possui diversas aplicações, sendo que a mais comum é a edição gênica derivada das mutações, mas também triagem de genoma verificando nocaute de genes, aumento ou diminuição de função e regulação gênica, entre outros (STERNBERG; DOUDNA, 2015). Foi previamente aplicada em diversos organismos vivos, como os camundongos, e apresenta alta eficiência, sendo mais rápido e mais barato que métodos tradicionais de mutagênese. Além de aplicação em modelos vivos, o uso desta tecnologia em células-tronco de pluripotência induzida é bastante atrativo e pode gerar dados importantes na elucidação de mecanismos de doenças genéticas.

As estratégias e protocolos de entrega do sistema CRISPR-Cas9 são diversos, incluindo desde vetores lentivirais, eletroporação e reagentes lipossolúveis. Apesar de se tratar de um sistema simples, há a necessidade de adaptação e desenvolvimento de protocolos de entrega em um laboratório de pesquisa devido às especificidades de cada componente do sistema, bem como do seu uso desejado. O estudo das vantagens e desvantagens de cada protocolo, como sua taxa de eficiência, toxicidade, entre outros, possui importância para garantir o sucesso da edição.

5.2. METODOLOGIA

Para este trabalho foram utilizadas três linhagens celulares diferentes, duas de linhagem primária visando a diferenciação condrogênica, e uma imortalizada para estímulo com fatores de crescimento. Para cada uma delas utilizou-se diferentes estratégias para edição, ilustradas na figura 5 e explicadas ao longo do capítulo 1.

Figura 5: Fluxograma de trabalho utilizando as 3 linhagens celulares. iPSC - células-tronco de pluripotência induzida; CEM - células-tronco mesenquimais; HEK293T - células renais embrionárias; FC - fatores de crescimento.



Cultivo de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC)

As células-tronco de pluripotência induzida da linhagem DF19.9.11T, gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Juliana Lott, passagem entre p65 e p75, foram descongeladas em banho-maria a 37°C. O meio de congelamento (90% SFB e 10% DMSO) foi diluído em 1 mL de E8 comercial (*Essential 8 by Thermo Fisher scientific*) e essa solução foi centrifugada a 150 x g por 5 minutos.

O cultivo se deu em placas de 6 poços, revestida em matriz de Vitronectina (*VTN-N Recombinant Human Protein, Gibco™*). Para formação da matriz a VTN é diluída 1:10 em PBS (tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*) e adicionado a cada poço da placa de cultura pelo menos 30 minutos antes do uso. O uso da matriz é importante, uma vez que as células iPS não se aderem espontaneamente ao plástico como as outras células-tronco.

A cultura foi realizada com células de passagem entre p65 e p75, em placas de 6 poços, com trocas de meio a cada 24 horas, sem suplementação de antibiótico. As células passavam por repiques com EDTA (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) sempre que atingiam confluência superior a 60% e inferior a 70% para evitar a diferenciação espontânea e, mantidas em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

Cultivo de células-tronco mesenquimais

Foram utilizadas células-tronco mesenquimais isoladas a partir de tecido adiposo, neste trabalho denominadas CEM LP4, de passagem entre 3 e 5. As células, isoladas e caracterizadas em colaboração com a Prof. Dra. Juliana Lott, se encontravam criopreservadas em nitrogênio líquido em solução de criopreservação contendo 90% SFB e 10% DMSO, para lavagem foram adicionados 2 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% SFB, 1% penicilina/estreptomicina (p/s) e centrifugada a 300 x g por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em 2 mL meio de cultura para semeadura celular em garrafas de 75 cm² (T75).

As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, trocas de meio foram realizadas a cada 48h e passagem sempre que as células atingiam confluência superior a 70%, utilizando o reagente de dissociação Tripsina-EDTA (0,05%) (ThermoFisher Scientific).

Cultivo de HEK293T

Como alternativa às células primárias, células humanas renais embrionárias (HEK293T, do inglês, *human embryo kidney*) imortalizadas, cas9 estáveis e resistentes à puromicina foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Fábio Pittella (UnB).

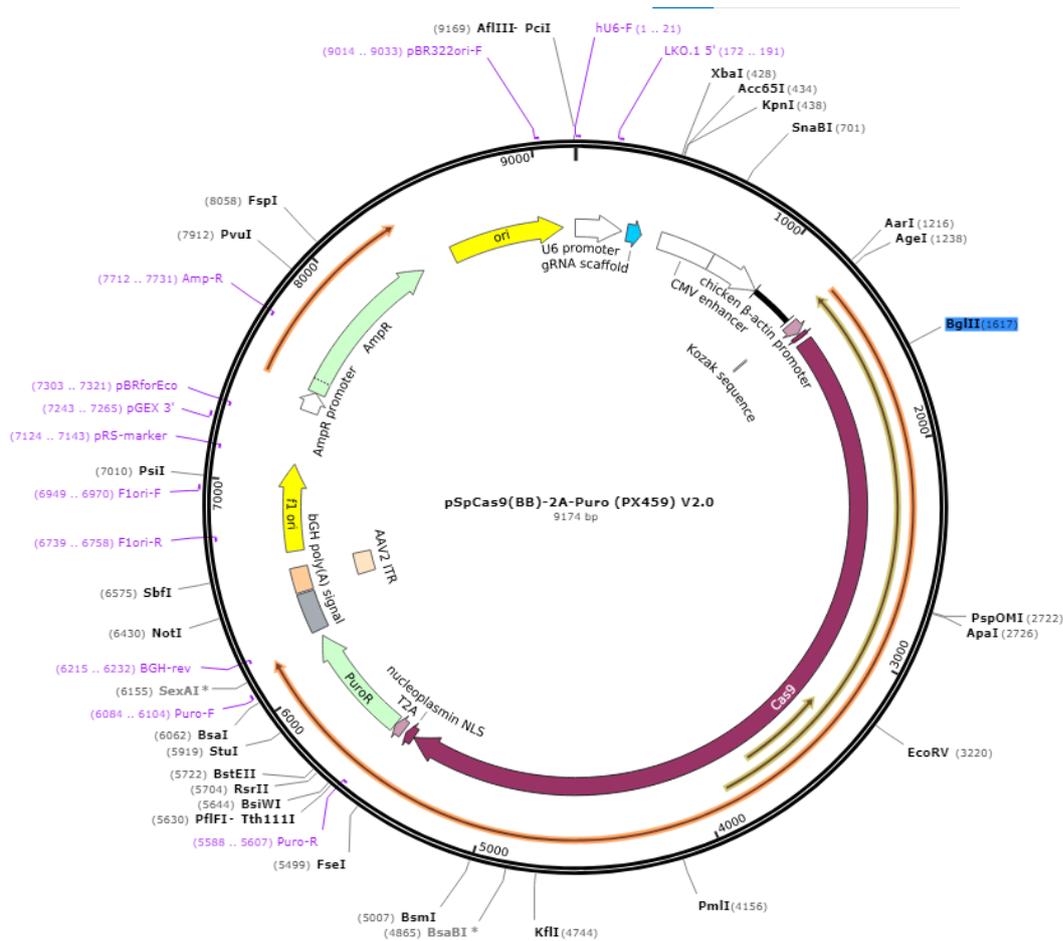
As células foram descongeladas em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1% p/s, e plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm². Depois de 24 horas de plaqueamento foi realizada troca de meio adicionando-se meio com 1 µg/mL de puromicina para manutenção da pureza da população com Cas9 estável resistente a antibiótico. Trocas de meio foram realizadas a cada 2 ou 3 dias, conforme avaliado, e passagem celular quando as células atingiam confluência superior a 80% utilizando o reagente de dissociação Tripsina-EDTA (0,05%) .

Mutagênese

Design de plasmídeos

Foi realizada a síntese química de dois plasmídeos para *knockout* do gene *LMX1B* junto ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pela Dra. Angela Saito. Foi utilizado o programa CRISPOR para identificação de possíveis sítios de corte, a partir disso escolheu-se duas sequências-alvo para os éxons 2 e 3, respectivamente identificados como sgRNA62 - CCTGATGCGAGTCAACGAGTCGT - e sgRNA45 - CCACCGAGTTCGTGATGCGGGCG. O plasmídeo doador é o pSpCas9(BB)-2A-Puro (pXM459) (Figura 6) que codifica a proteína Cas9 e apresenta um gene de resistência à puromicina, antibiótico de seleção.

Figura 6: Plasmídeo *all in one* utilizado para transfecção com o gene para transcrição de Cas9, em vermelho localizado aproximadamente do nucleotídeo 1200 a 5500, e gene de resistência à puromicina, em verde localizado aproximadamente do nucleotídeo 5600 a 6000.



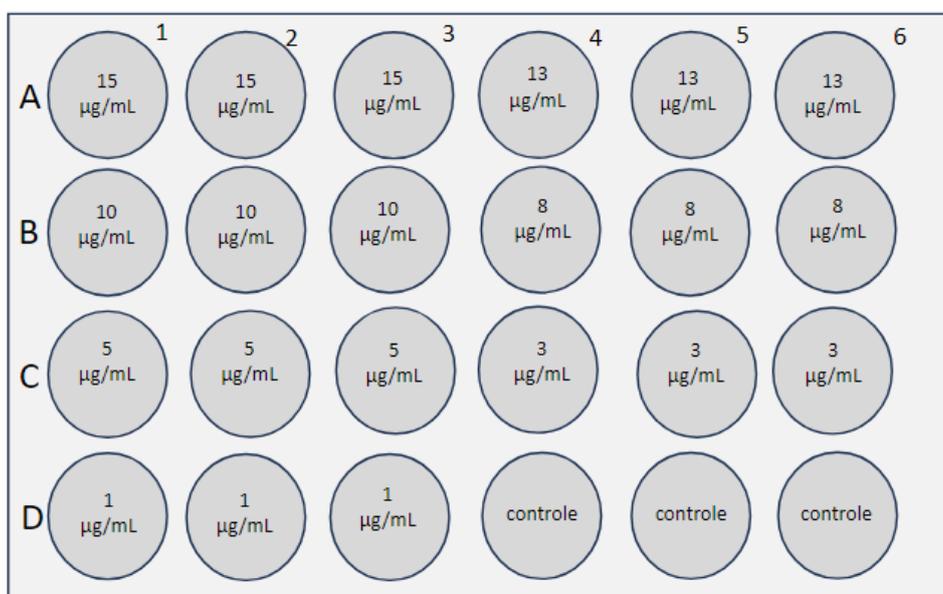
Fonte: AddGene

A seguir, procedeu-se à transfecção utilizando o reagente Lipofectamina (Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent da Thermo Fisher Scientifics), que, demonstrou baixa eficiência, e apresentou maior dificuldade no picking das colônias. Diante deste cenário, optou-se pela mutagênese por nucleofecção, empregando o Nucleofector 4D (4D-Nucleofector® X Unit da Lonza) e o kit Amaxa® Human Stem Cell Nucleofector® Starter Kit (Lonza). Para ampliar a variedade de células, decidiu-se transfectar células-tronco mesenquimais e células humanas embrionárias renais utilizando o Lipofectamine™ 3000.

Teste de toxicidade

Para avaliar o potencial citotóxico do antibiótico a ser utilizado para a seleção das células na ausência do plasmídeo doador (pXM459), foram realizados testes de toxicidade para as células iPS e CEM. Diferentes concentrações do antibiótico em triplicata foram utilizadas como mostrado na Figura 7. As concentrações escolhidas baseadas na literatura foram 15 $\mu\text{g/mL}$, 13 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$. Um controle (células não tratadas) também foi adicionado em triplicata.

Figura 7: Desenho esquemático da placa experimental para avaliação da toxicidade celular.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto para as iPSC como para as CEM foram utilizadas a mesma densidade de semeadura, com $0,1 \times 10^6$ células por poço. O tratamento das iPSC teve início no dia após o plaqueamento, uma vez que o tempo estimado para adesão celular é de 4 horas. Foram realizadas diluições seriadas a partir do estoque de puromicina em concentração de 10 mg/mL para obtenção das concentrações previamente descritas. Registros fotográficos foram retirados 24 horas após início do tratamento. O tratamento com as CEM teve início 48h após o plaqueamento celular, uma vez que são células que podem levar mais tempo para aderir. Registros fotográficos foram obtidos com 24 horas do início do tratamento e depois com 48 horas.

Transfecção por Lipofectamine™ Stem

A Lipofectamina é um reagente comercial, patenteado pela Thermo Fisher, amplamente utilizada para entrega de material genético por meio de transfecção. Seu uso foi otimizado a partir do protocolo do fabricante, com modificações. Com o intuito de analisar a taxa de transfecção, foram realizadas inicialmente transfecções de teste com RFP (proteína vermelha fluorescente, do inglês *red fluorescent protein*) em placas de 12 poços, utilizando cultura em lamínula para posterior análise no microscópio de fluorescência Zeiss AX10.

Para otimização foram utilizadas 5 condições de variação entre o complexo RFP - Lipofectamina, sendo elas 100 ng de RFP com 4 µL de lipofectamina, 250 ng RFP e 2 µL de lipofectamina, 250 ng RFP e 4 µL de lipofectamina, 500 ng RFP e 2 µL de lipofectamina, e por fim 500 ng RFP e 4 µL lipofectamina. Lipofectamina em qual concentração?

Realizou-se passagem e plaqueamento celular para que as células estivessem com uma confluência de 30 a 60% no dia da transfecção. Foram plaqueadas $0,1 \times 10^6$ células *overnight* e no dia seguinte iniciou-se a transfecção das iPSC, preparando dois mixes para cada condição - mix tubo 1 com Opti-MEM e RFP e mix tubo 2 Opti-MEM e Lipofectamina. Em uma proporção 1:1 o volume de cada tubo foi misturado e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação o volume total de cada condição foi transferido para o respectivo poço onde foi adicionado q.s.p. (quantidade suficiente para) 750 µL de meio de cultura E8.

A partir dos dados analisados estabeleceu-se como padrão o uso de 7 µL de Lipofectamina em 125 µL de OptiMEM (solução A) 1 µg sgRNA 45 e sgRNA 62 em 125 µL de OptiMEM (solução B). Os volumes de solução A e solução B foram adicionados em uma proporção de 1:1 e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos para formação do complexo DNA-lipídio.

Seleção de células transfectadas por Lipofectamine™ Stem

Após realizada a nucleofecção as células foram colocadas em cultivo com o meio E8 acrescido de antibiótico de seleção - 2 µg/mL puromicina nas primeiras 24h e 1 µg/mL até 48h - onde ficarão em cultivo por 5 dias. O tratamento visa a seleção de clones resistentes ao antibiótico, uma vez que o plasmídeo foi desenhado com gene de resistência à puromicina.

Transfecção por Nucleofector™ 4D

A transfecção foi otimizada de acordo com o protocolo do kit *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X* (Lonza™), com modificações. Inicialmente realizou-se a transfecção com GFP (proteína verde fluorescente, do inglês *green fluorescent protein*), com o vetor *pmaxGFP Vector™* (1 µg/µL) para análise da taxa de transfecção.

Para realização da transfecção foi feita passagem celular, que foi iniciada removendo o meio de cultura e lavando as células com PBS. Adicionou-se 1 mL de EDTA e após 5 minutos foi retirado com pipeta e uma nova lavagem cuidadosa foi realizada com PBS para retirar qualquer resquício do EDTA, mas sem dissociar as células do poço. As células foram então retiradas com 2 mL de meio E8 e transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL, centrifugadas por 5 minutos a 150 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

A contagem celular foi realizada na Câmara de Neubauer, e utilizou-se uma diluição das células retirando-se 10 µL da suspensão de células após centrifugação e 90 µL de meio E8. Foi transferido 10 µL da diluição para a Câmara de Neubauer e realizou-se a contagem nos quatro quadrantes laterais, realizando-se então o cálculo utilizando a fórmula abaixo:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{4 \text{ (quadrantes contados)}} \times 10 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4$$

Calculou-se o volume para obtenção de $0,8 \times 10^6$ de células e foi transferido para um novo tubo. Para preparação do tampão de nucleofecção foi utilizado 82 µL de “P3 Primary Cell Suspension” e 18 µL “Supplement 1”, adicionou-se também 15 µg de *pmaxGFP Vector™* e foi transferido metade de volume para o tubo de fundo cônico com as células. Após cuidadosa homogeneização do complexo “células - P3 solution - vetor” o material foi transferido para a cubeta de nucleofecção, a outra metade do volume foi utilizada para lavagem do tudo e em seguida também transferida para a cubeta.

A cubeta com a solução foi então colocada no aparelho eletroporador e realizou-se o pulso utilizando o programa CM-150. Após eletroporação 500 µL de meio E8 suplementado com 10% de Revitacell™ foram adicionados rapidamente à cubeta e o volume transferido para um novo tubo de fundo cônico que foi colocado na estufa 37°C com 5% de CO₂ por 10 minutos antes de plaquear as células. Passado o tempo de incubação, as células foram então plaqueadas em um poço de 9,6 cm² previamente preparado com matriz de VTN recoberta com 1,5 mL de

E8 suplementado contendo Revitacell™. Foi realizada troca de meio 24h após transfecção e leitura da fluorescência 48h no microscópio *Olympus BX51* utilizando o filtro FITC.

Determinada a taxa de transfecção e a efetividade do protocolo, seguiu-se para transfecção dos sgRNA de interesse - sgRNA 45 e sgRNA 62. Utilizou-se o mesmo protocolo com 82 µL de “P3 Primary Cell Suspension” e 18 µL “Supplement 1” e 15 µg de cada um dos guias, totalizando uma transfecção com 30 µg de sgRNA. Realizada a eletroporação, as células foram plaqueadas em 2 poços de 9,6 cm² preparados com VTN. Nas primeiras 24 horas foi feita a troca de metade do meio de cultura para aumentar a chance das células aderirem e a partir das 48h a troca foi realizada normalmente a cada 24h. Passados 5 dias da eletroporação foi possível observar a formação de colônia na morfologia esperada e foi possível a realização do *picking* celular.

Seleção de células transfectadas por Nucleofector™ 4D

Diferentemente do protocolo com *Lipofectamine™ Stem*, optou-se por realizar a seleção a partir de *picking* manual, que se deu com o microscópio dentro do fluxo. Sem a adição da puromicina as células formaram colônias robustas que foram então marcadas para serem coletadas, para tal o meio de cultura foi retirado, e o poço lavado com PBS antes da adição de EDTA diluído em PBS para dissociar as células do fundo do poço. Passados 3 minutos o EDTA foi retirado e substituído por meio de cultura, as colônias foram então visualizadas no microscópio e coletadas com auxílio de uma micropipeta p200, programada para 20 µL. Foi escolhido dessa forma pois apesar do volume de coleta ser baixo o maior calibre da ponteira era de grande importância para evitar quebra das colônias durante a sua coleta.

As colônias coletadas foram então transferidas para tubos de 0,2 mL até que todas as colônias fossem coletadas. As colônias coletadas foram então plaqueadas em placas de 96 poços (área de 0,3 cm²), em 100 µL de meio de cultura. Vinte e uma colônias viáveis tiveram seu material genético extraído para verificação de mutagênese por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*).

Transfecção com Lipofectamine 3000™

A transfecção utilizando *Lipofectamine 3000* foi realizada nas CEM e nas HEK293T, seguindo o protocolo do fabricante, com algumas alterações. As células foram plaqueadas a uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células *overnight* e no dia seguinte iniciou-se a transfecção. Como com as iPSC, preparou-se 2 mixes com cada condição - mix tubo 1 com 125 µL Opti-MEM e 1 µg de sgRNA, para as HEK293T, e RFP para as CEM, e mix tubo 2 com 125 µL Opti-MEM, 7 µL de *Lipofectamine 3000* e 3 µL de reagente P3000.

As células-tronco mesenquimais foram então coletadas para avaliação da taxa de transfecção por análise de fluorescência com RFP, e as HEK293T, por já possuírem sua transfecção otimizada, foram coletadas para isolamento de material genético e sequenciamento.

Transfecção com lentivirus

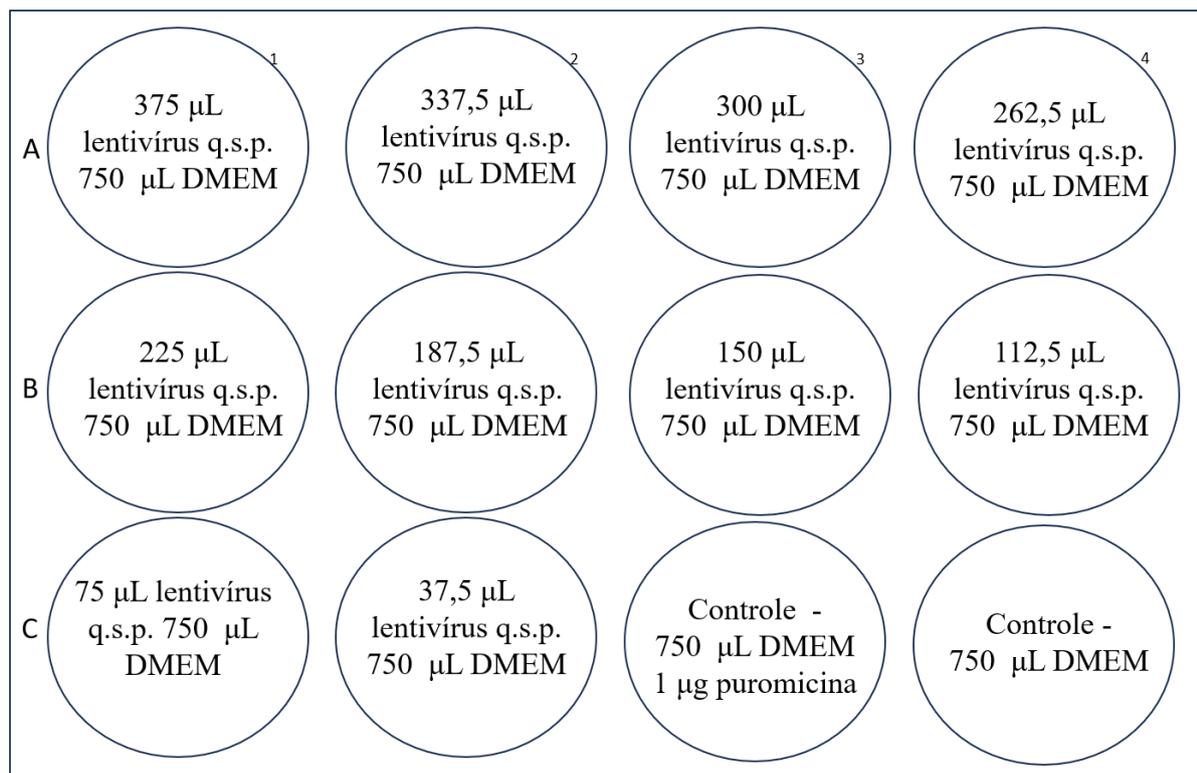
A produção dos vetores lentivirais foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Fabio Pittella, onde para produção dos vírus era realizada a transfecção utilizando *Lipofectamine CRISPRMAX* com três diferentes plasmídeos: lentiCRISPR v2 (resistente à puromicina), pD8.2 (gal/pol) (empacotamento viral), pVSVg (formação envelope viral). A verificação da inserção, bem como MOI e expressão de Cas9 foi realizada por eles utilizando PCR, Western Blot para detecção da proteína Cas9 e qPCR para quantificação das partículas virais.

Foram produzidos também vetores lentivirais para inserção de Cas9 no genoma de células-tronco mesenquimais, de forma a torná-las Cas9 estáveis buscando estabelecer a metodologia de transfecção simplificada com sgRNA.

Transdução viral de Células-tronco mesenquimais

Vetores lentivirais foram produzidos e ressuspensos em meio DMEM, visando a inserção de Cas9 no genoma das CEM. Para transdução inicial as células foram plaqueadas em placa de 12 poços para teste de concentração viral (Figura 8).

Figura 8: Desenho esquemático placa transdução viral com diferentes concentrações virais.



Para transdução foi removido o meio de cultura e lavou-se o poço com PBS, então em cada poço foi adicionado o volume correspondente de vírus e meio de cultura. A espinoção viral aconteceu por meio de centrifugação a 150 x g durante 1 hora a 37°C, seguida de incubação em estufa com 5% CO₂ até o dia seguinte. 24 horas após a espinoção retirou-se o meio de cultura, lavou-se com PBS e substituiu-se por DMEM suplementado com 10% SFB, 1% p/s e 1 µg/mL de puromicina para seleção das melhores condições de transfecção. Os resultados foram analisados após 48 horas.

Verificação de mutagenese e zigosidade

Os clones de iPSC selecionados foram examinados por PCR usando primers específicos para genotipagem. Sendo o objetivo inicial a realização de uma PCR de colônia, as amostras eram coletadas em meio de cultura e centrifugadas por 5 minutos a 1.000 x g, descartado o sobrenadante e ressuspensas em água ultrapura. Para cada reação utilizou-se 1 µL da suspensão de colônias.

Extração de DNA

Dado que algumas amostras não possuíam uma boa amplificação optou-se por realizar a extração do DNA com o kit *PureLink™ Genomic DNA* (Thermo Fisher Scientifics). Para extração por kit as amostras foram ressuspendidas em 200 µL de PBS e 20 µL da enzima de digestão proteinase K, seguida de 20 µL de RNase A. A solução foi misturada por vortex e incubada em temperatura ambiente por 2 minutos antes de adicionar-se 200 µL de tampão de lise, foi realizada uma nova incubação por 10 minutos a 55°C.

Foi adicionado a mistura 200 µL de etanol de 96-100%, seguido de vortex por 5 segundos. A solução foi colocada em uma mini coluna cromatográfica, fornecida pelo kit, para realização de um “*spin*” - centrifugação de curto período - a partir de onde começa o processo de ligação do DNA na membrana da coluna. Seguiram-se duas lavagens com tampões de lavagem fornecidos pelo kit. Por fim, foi realizada a eluição do DNA com 30 µL de água ultrapura, livre de DNases e outros contaminantes.

A quantificação das amostras foi realizada por Qubit® (Invitrogen™), utilizando 199 µL de tampão e 1 µL de fluoróforo do *Qubit 1X dsDNA HS (High Sensitivity)*. Deste mix, utilizou-se 199 µL e 1 µL da amostra de DNA, o que foi incubado por 2 minutos em temperatura ambiente em local protegido de luz antes da leitura. NanoDrop (Thermo Scientific™) também foi utilizado para avaliação da presença de contaminantes por meio das razões 260/280 nm e 230/260 nm.

Reação em Cadeia da Polimerase

No intuito de realizar a genotipagem das amostras foram desenhados dois pares de primers juntamente com os sgRNA 45 e sgRNA 62 identificados na tabela 1.

Tabela 1: Primers de genotipagem desenhados pela Dra. Angela Saito.

Nome do primer	Sequência	Temperatura de <i>melting</i>
-----------------------	------------------	--------------------------------------

hsLMX1b_sgRNA45_genot F	TGACAAGCAGGTGACAGAGG	Tm 59.6
hsLMX1b_sgRNA45_genot R	TTCCTTTATCCGTTGGCCCC	Tm 60.0
hsLMX1b_sgRNA62r_genot F	CGAGGACTGGGACGGACTA	Tm 60.0
hsLMX1b_sgRNA62r_genot R	CTCGGAACCCTTGGAGCTG	Tm 60.0

Devido à dificuldade de amplificação em detrimento do alto conteúdo de GC (%GC), novos pares de primers foram desenhados para a mesma região, identificados na tabela 2.

Tabela 2: Primers de genotipagem desenhados para nova otimização.

Nome do primer	Sequência	Temperatura de <i>melting</i>
hsLMX1b_sgRNA45_new F	GCTGCATGGAGAAGATCGC	Tm 62.0
hsLMX1b_sgRNA45_new R	TTCTCGTAGTCACCCTTGCA	Tm 59.4
hsLMX1b_sgRNA62r_new F	GGAGAAGGGGAGAGCACAG	Tm 59.9
hsLMX1b_sgRNA62r_new R	GCACTGCAAACACTCCTCG	Tm 60.6

Após otimização foram estabelecidas as condições de 1,5 mM de betaína e 1,5 mM de MgCl₂+ à 59°C para sgRNA 45 e 1,5 mM de betaína e 2,5 mM de MgCl₂+ à 60°C para sgRNA 62. Realizou-se primeiro um *hotstart* a 95°C de 5 minutos antes da adição da *Taq Polimerase* e em seguida utilizou-se a programação de [95° 1:00; 35x (95°C 0:30; 59°C ou 60°C 0:45; 72°C 0:30); 72°C 7:00; 4°C ∞]. Após a amplificação foi possível identificar amplicons de 163 pb sgRNA 45 e 362 pb sgRNA 62 em gel de agarose 1,5%.

Sequenciamento Sanger

O envio para sequenciamento se deu após a purificação das amostras com a enzima *Exosap*. A digestão enzimática aconteceu com a edição de 1 μL da enzima para 4 μL do amplicon, 37°C por 60 minutos com digestão a 65°C por 5 minutos. Foi adicionado q.s.p. (quantidade suficiente para) 7 μL de água ultrapura e encaminhou-se as amostras para sequenciamento Sanger.

5.3. RESULTADOS

Teste de toxicidade celular

O uso de antibióticos no cultivo de CEM e HEK293T é padrão, sendo que os antibióticos mais amplamente utilizados para manutenção dessas células são Penicilina (100 U/mL) e Estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Na cultura de iPSC, o uso de antibióticos é contraindicado pois são células altamente sensíveis às alterações do microambiente.

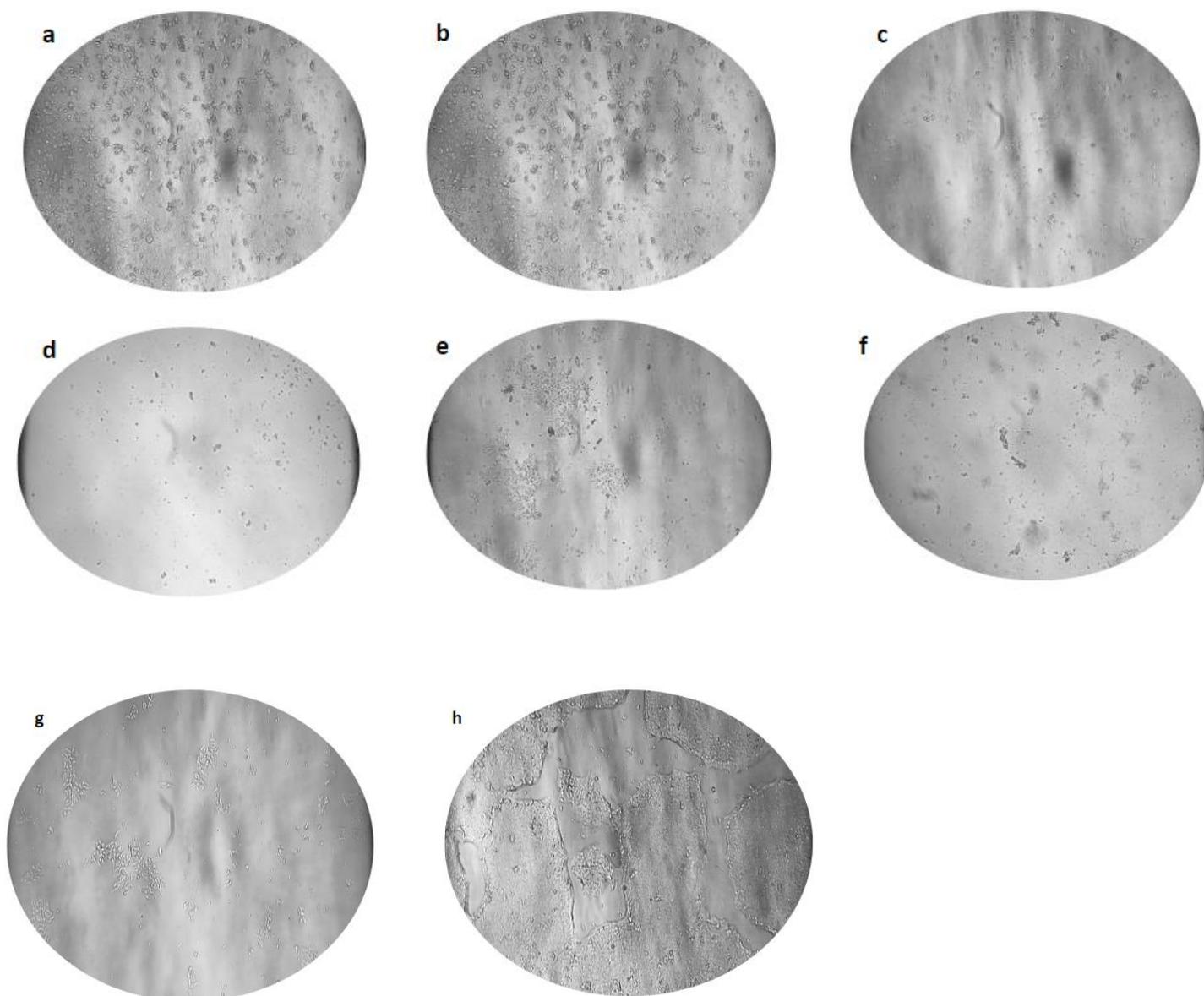
O plasmídeo de escolha (pXM459) foi sintetizado com o gene de resistência à puromicina, um antibiótico que favorece a inibição da síntese de proteínas, não utilizado na clínica, mas amplamente utilizado para seleção de células procarióticas e eucarióticas, uma vez que mata as células que não permitem resistência, parando a transdução de proteínas prematuramente. Para identificar a concentração ideal para seleção das células iPSC transfectadas com pXM459 foi realizado teste de toxicidade com 7 diferentes concentrações e um controle (Figura 9) em placa de 24 poços, objetivando identificação da concentração onde o antibiótico eliminava todas as células não-transfectadas. As concentrações do antibiótico foram escolhidas de acordo com a literatura, utilizando-se 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Observou-se extensa morte celular em todas as condições exceto o controle e após 24 horas de avaliação determinou-se que as melhores condições foram 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nos poços onde houve morte celular (9 a - d e f), as células encontravam-se no sobrenadante, apresentando morfologia diferente da esperada, com tamanho reduzido, indicando desidratação e apoptose. Em contrapartida, nos poços com concentração de 5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apesar de observar-

se bastante células no sobrenadante com morfologia alterada, ainda foi possível observar células aderidas e formando colônias.

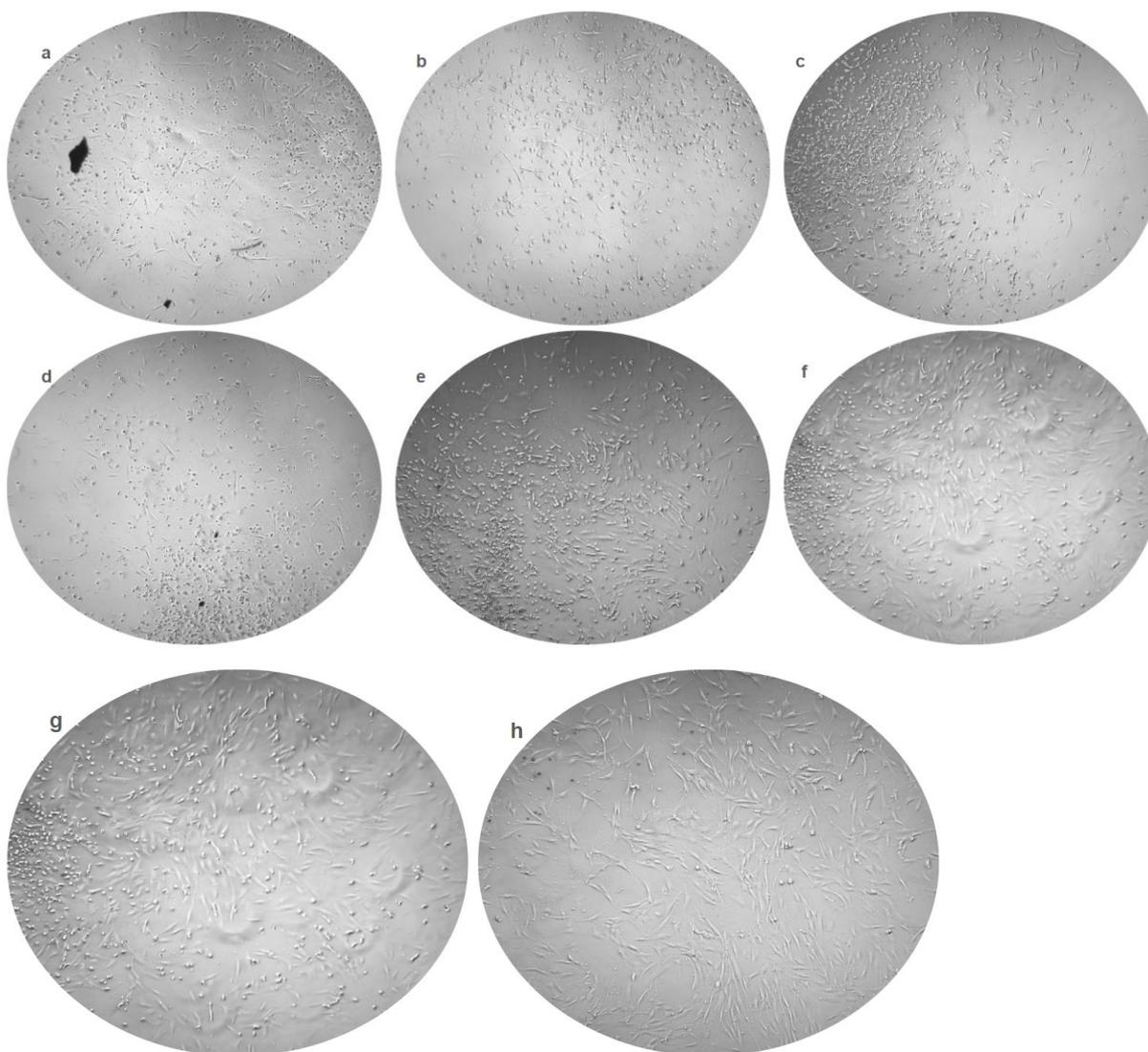
O tratamento de seleção indicado pela literatura é de 7 dias de para identificação da concentração ideal (MA; YUAN; CHANG, 2020) mesmo em células não resistentes. No entanto, passadas 24 horas observou-se alta toxicidade celular mesmo em concentrações mais baixas. Desta forma, optou-se por realizar a seleção das células transfectadas utilizando a menor concentração de puromicina testada, por um curto período de tempo.

Figura 9: Células iPSC 24 horas após início da seleção com puromicina. a) 15 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina; b) 13 $\mu\text{g/mL}$; c) 10 $\mu\text{g/mL}$; d) 8 $\mu\text{g/mL}$; e) 5 $\mu\text{g/mL}$; f) 3 $\mu\text{g/mL}$; g) 1 $\mu\text{g/mL}$ e h) controle sem antibiótico.



Foi realizado também o teste de toxicidade (Figura 10) das células estromais mesenquimais, a fim de estabelecer a melhor concentração para seleção após transfecção com plasmídeo, e também para manutenção após edição com vetor lentiviral.

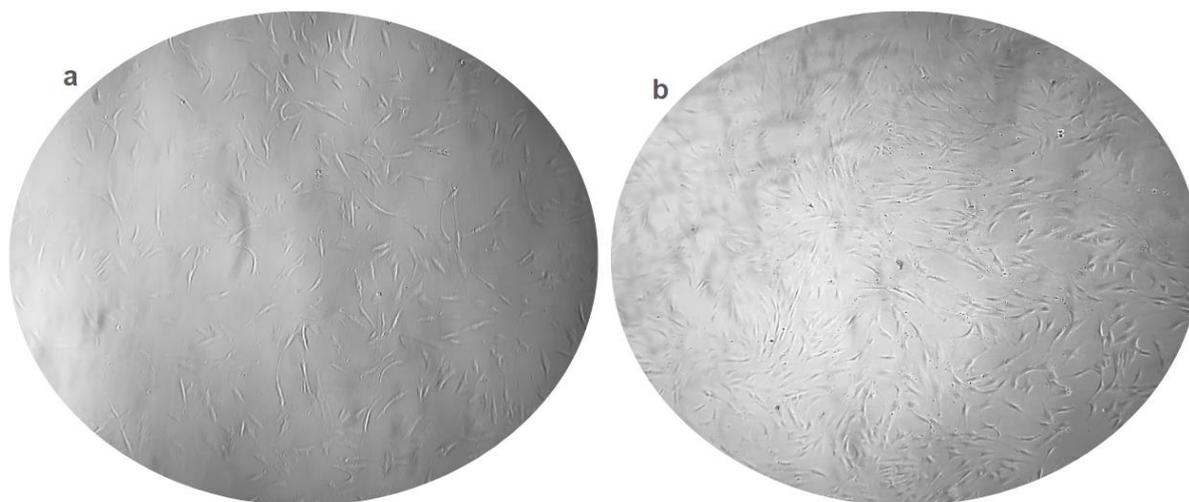
Figura 10: Células CEM 24 horas após início do teste de toxicidade das CEM nas condições a) 15 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina; b) 13 $\mu\text{g/mL}$; c) 10 $\mu\text{g/mL}$; d) 8 $\mu\text{g/mL}$; e) 5 $\mu\text{g/mL}$; f) 3 $\mu\text{g/mL}$; g) 1 $\mu\text{g/mL}$ e h) controle sem antibiótico.



Semelhante aos resultados com as iPSC, as CEM apresentaram também baixa tolerância às concentrações mais altas, apresentando alta morte celular, perda de morfologia, e células agrupadas no sobrenadante. Mostraram-se mais resistentes ao antibiótico que as células iPSC nas condições de menor concentração (10f e 10g), comparativamente com o controle (12h), onde

não houve morte celular, ou perda da densidade. Passadas 48 horas do início do teste de toxicidade (Figura 11) não haviam mais células remanescentes nas concentrações mais altas, apenas em $1\mu\text{g/mL}$, possivelmente devida a alto déficit de produção proteica causado pelo antibiótico as células não conseguiram se proliferar e entraram em apoptose.

Figura 11: Células CEM 48h após teste de toxicidade. a) $1\mu\text{g/mL}$ de puromicina, as células apresentaram morfologia esperada mas baixa taxa de proliferação comparada com b) controle sem antibiótico.



O teste de toxicidade confirmou que as CEM apresentavam uma maior resistência à puromicina que as iPSC, de forma a sugerir a possibilidade de manter o antibiótico em cultura mesmo após as 48h de seleção dos clones. No entanto, como a puromicina é um antibiótico que interfere na síntese proteica seu uso deve ser de forma controlada, e deve-se certificar que o vetor de expressão foi de fato incorporado às células. Após 72h em cultura com a puromicina, as células transduzidas com lentivirus não resistiram, demonstrando que apesar de resistentes as células tornam-se mais sensíveis após transdução lentiviral (KALLIFATIDIS *et al* 2008), indicando que a concentração deve ser diminuída em trabalhos subsequentes.

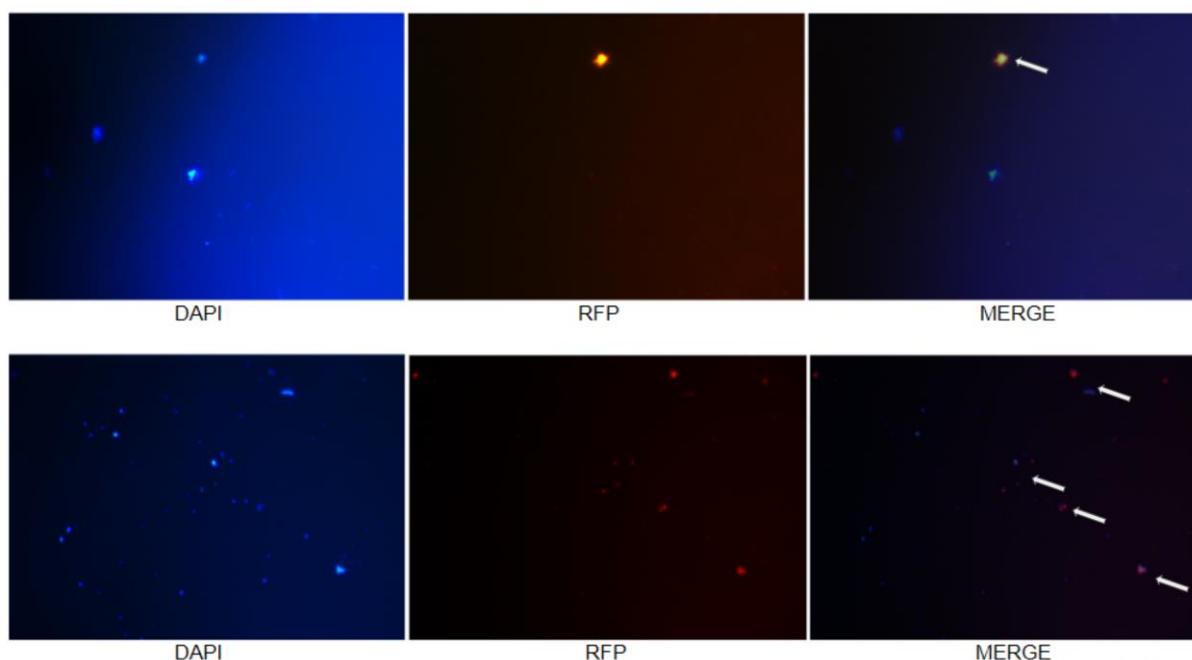
Transfecção por Lipofectamina Stem™

A primeira metodologia de entrega do plasmídeo escolhida foi a *Lipofectamina Stem* e para análise de taxa de transfecção utilizou-se um plasmídeo expressando a *Red Fluorescence Protein* (RFP) em diferentes concentrações de plasmídeo e LipoStem. Baseado no protocolo do fabricante escolheu-se 5 condições diferentes - 100 ng de plasmídeo com 4 μL de

lipofectamina (Figura 12), 250 ng plasmídeo e 2 μ L de lipofectamina (Figura 13), 250 ng plasmídeo e 4 μ L de lipofectamina (Figura 14), 500 ng plasmídeo e 2 μ L de lipofectamina (Figura 15), e por fim 500 ng plasmídeo e 4 μ L lipofectamina (Figura 16).

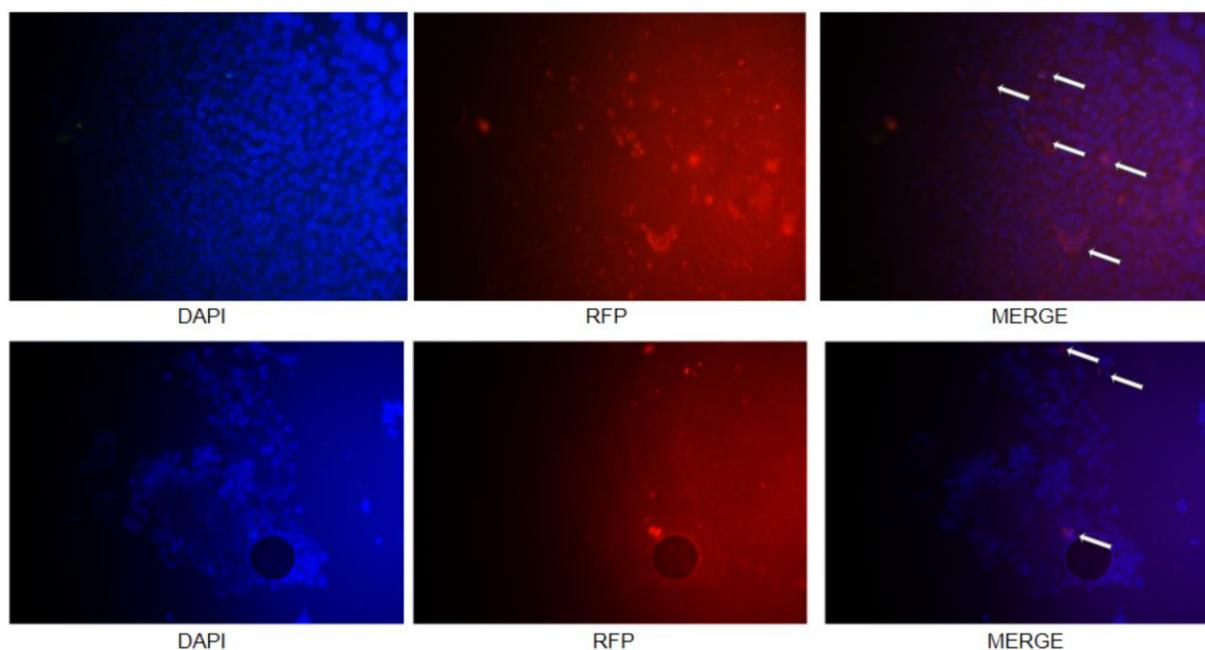
Na primeira condição (figura 12) observou-se baixo crescimento celular e em 100 células contadas com DAPI, contou-se 36 células com RFP positivo, demonstrando uma taxa de transfecção de 36%.

Figura 12: iPSC transfectadas com 100 ng de vetor contendo RFP e 4 μ L *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



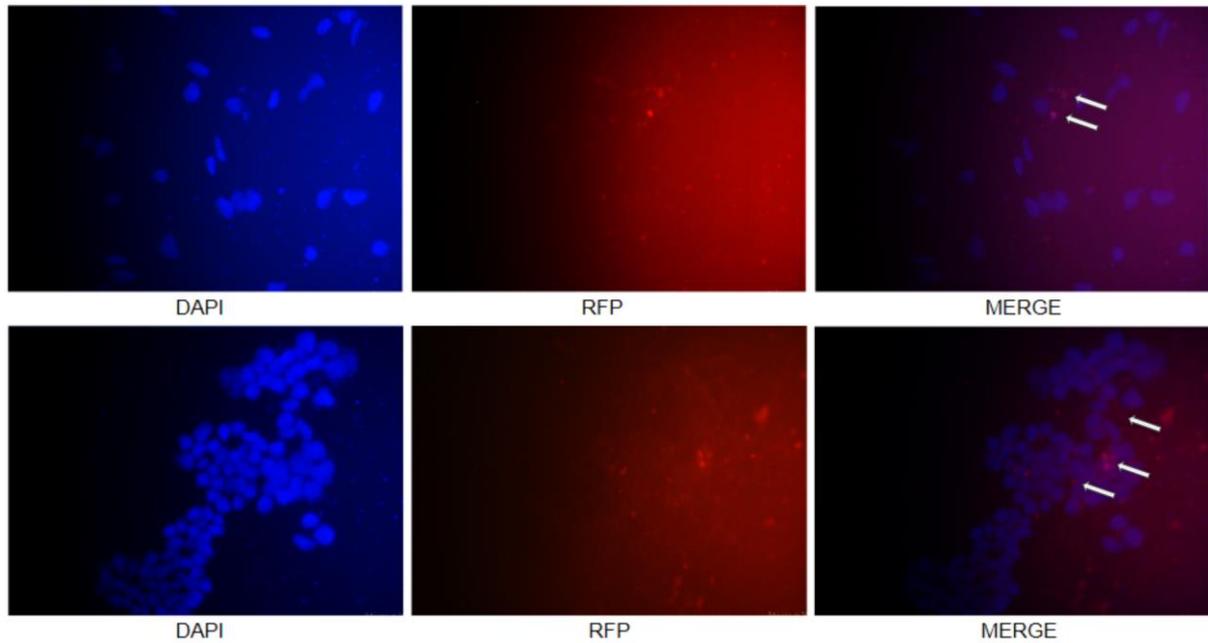
Na segunda condição (figura 13) houve um aumento da taxa de proliferação com maior número de células DAPI, porém contabilizou-se menor taxa de transfecção com 21% de células RFP positivas.

Figura 13: iPSC transfectadas por 250 ng vetor com RFP e 2 μ L *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



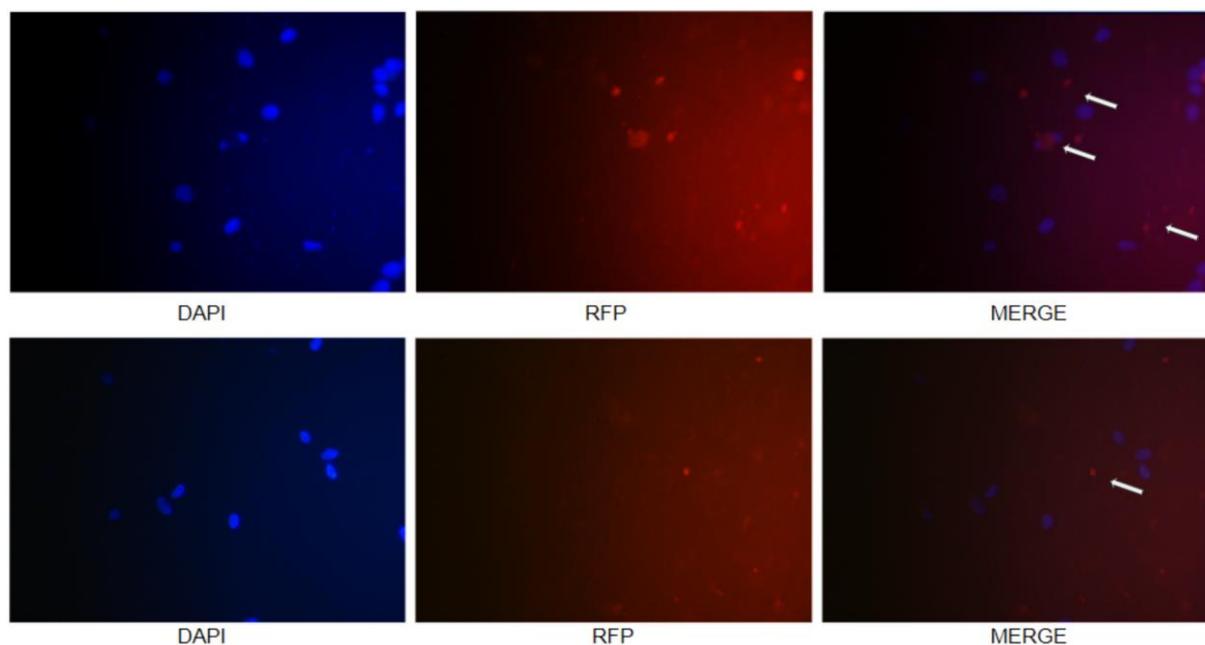
Na terceira condição (figura 14) houve novamente redução da proliferação celular, aparentemente em detrimento do aumento da concentração de LipoStem, de 2 μ L na segunda condição para 4 μ L, observou-se também uma queda na taxa de transfecção uma vez que se obteve 18% de células RFP positivas.

Figura 14: iPSC transfectadas por 250 ng vetor com RFP e 4 μ L *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



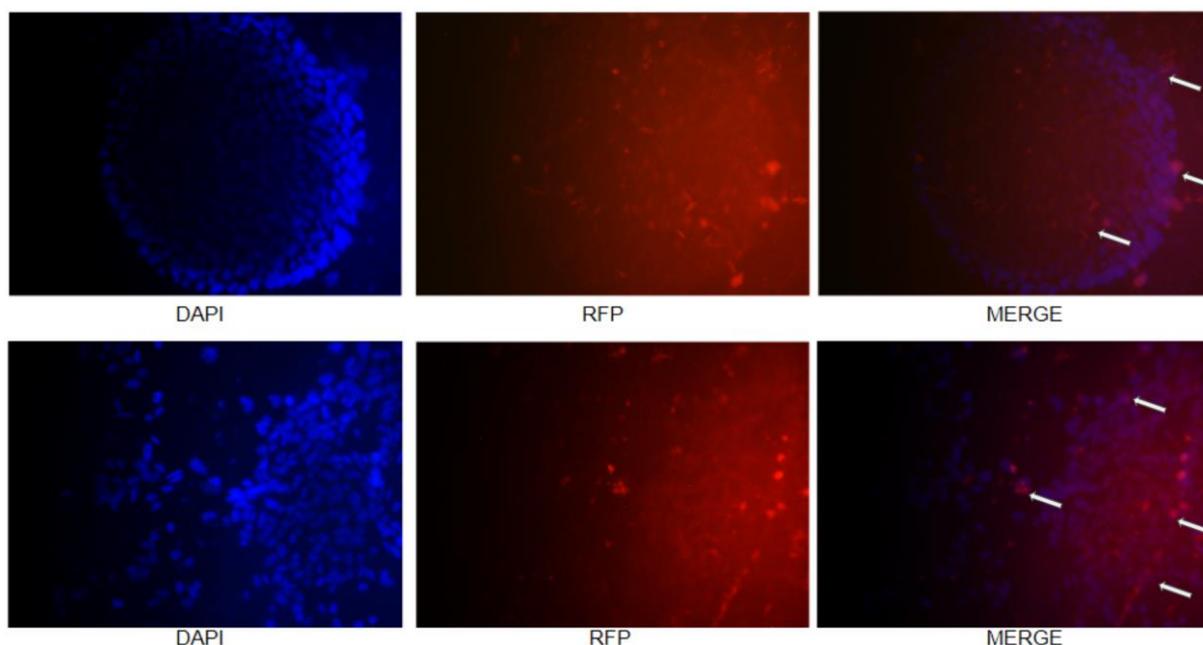
Na quarta (Figura 15) condição adicionou-se o dobro de vetor/RFP, comparada à terceira condição, e 2 μ L LipoStem. Observou-se uma proliferação ainda mais inferior quando comparado com as condições anteriores, no entanto, o número de células RFP positivas foi consistente com os outros achados, resultando em 26% de transfecção.

Figura 15: iPSC transfectadas por 500 ng vetor com RFP e 2 μ L *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



Na quinta e última condição testada (Figura 16) observou-se uma melhor consistência das células, com proliferação considerável e taxa de transfecção observada pela presença de RFP de 24%.

Figura 16: iPSC transfectadas com 500 ng do vetor contendo RFP e 4 μ L *Lipofectamine Stem*. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



Diante desses dados (Tabela 3), foi observado que uma alta concentração de LipoStem, bem como uma alta concentração de RFP foi tóxico para as células, provocando morte celular e dificuldade na proliferação. Observou-se também que a penetrância da fluorescência na colônia não aconteceu de forma eficiente, sendo que houve depósito de RFP mais na margem da colônia do que no centro. Apesar das concentrações 1 (100 ng plasmídeo e 4 μ L Lipofectamina), 3 (250 ng plasmídeo e 4 μ L de Lipofectamina) e 4 (500 ng plasmídeo e 2 μ L de Lipofectamina) apresentarem poucas células, apresentaram também a maior taxa de transfecção, respectivamente 36%, 26% e 24%, embora valores inferiores aos 72% apontados pelo fabricante para transfecção de células iPS utilizando mRNA e Cas9 (ThermoFisher Scientifics, 2017).

Tabela 3: Condições de RFP e *Lipofectamine Stem* e taxa obtida em cada condição.

Condições	1	2	3	4	5
<i>Red Fluorescence Protein (RFP)</i> em ng	100	250	250	500	500
<i>Lipofectamine Stem</i> em μL	4	2	4	2	4
Taxa de transfecção em %	36	21	18	26	24

Dada as proporções da placa, a transfecção com o plasmídeo de interesse pXM459 foi realizada com 7 μL de LipoStem, 1 μg de sgRNA acoplado ao plasmídeo. Observou-se morte celular esperada devido à toxicidade da LipoStem, e após as 48 horas indicadas pelo protocolo adicionou-se 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina ao meio de cultura. A cada etapa as células ficaram mais sensibilizadas e ao final do tratamento com puromicina não havia mais a formação de colônia.

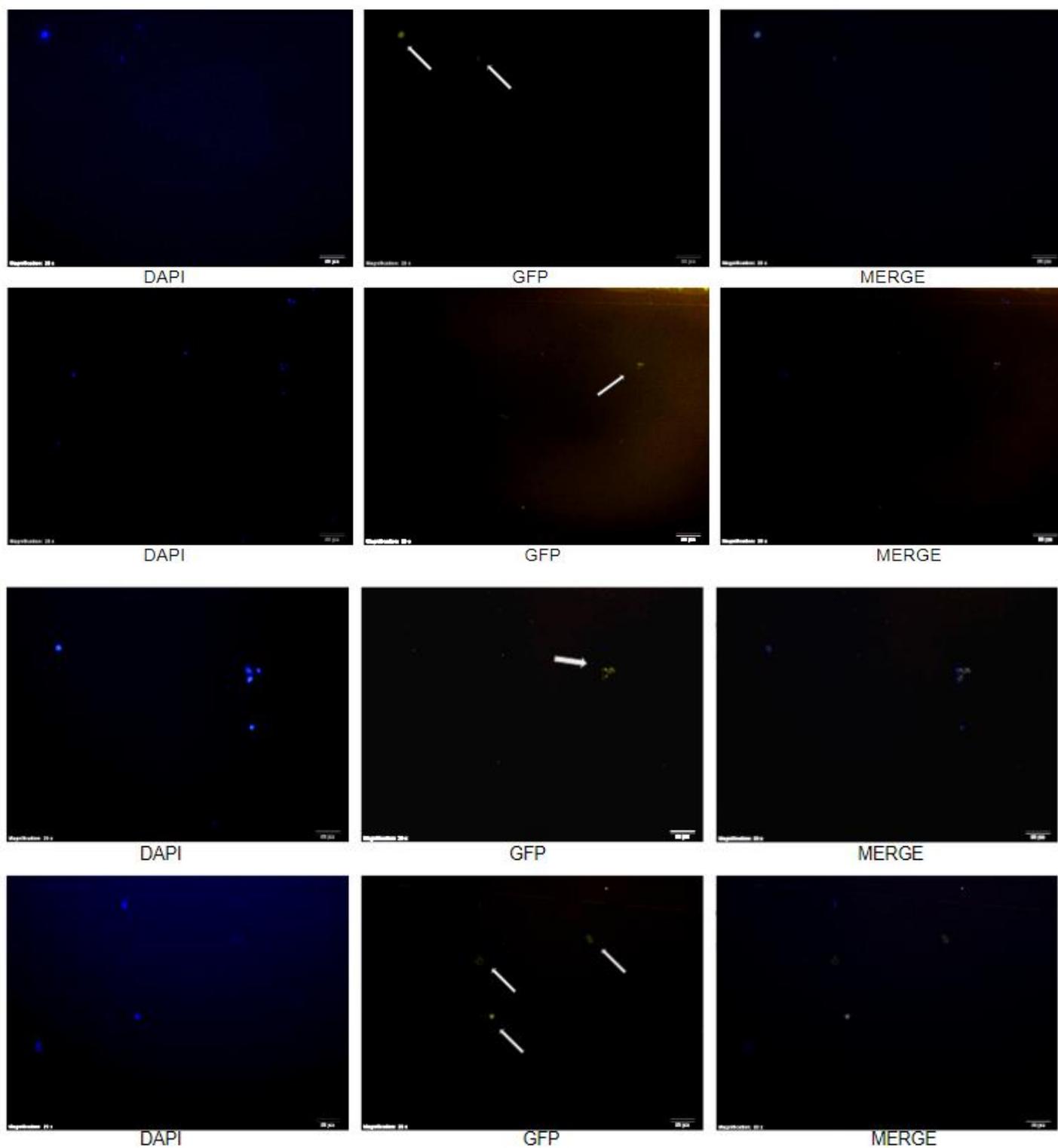
Passados 10 dias do final do tratamento com a puromicina não se observou proliferação celular, uma vez que as células se mantiveram na mesma densidade pós-puromicina, de forma que não foi possível realizar a seleção das células individuais. Apesar da seleção com antibióticos ser bastante utilizada, a metodologia de seleção ideal para iPSC é a seleção ativada por fluorescência (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) (YUMLU *et al.* 2017), uma vez que são células muito sensíveis ao uso de antibióticos, e mesmo as células que desenvolveram resistência pela incorporação do gene de resistência sofrem influência da população devido a comunicação célula-célula.

Transfecção por Nucleofector™ 4D

Visando a análise da taxa de transfecção das iPSC com Nucleofector 4D utilizando o kit *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X* (Lonza™) utilizou-se a transfecção teste com *pmaxGFP Vector™*. Incubou-se as células em lâmina revestida com VTN e em 48 horas realizou-se a montagem da lâmina com lamínula utilizando o reagente de montagem VECTASHIELD® (Vector Laboratories) com DAPI. Após contagem de células, aferiu-se uma taxa de 14% de transfecção, já a literatura demonstra uma eficiência entre 18 e 35% para outras células pluripotentes (HOHENSTEIN *et al.* 2008). A taxa de transfecção foi menor que a esperada, potencialmente devido à alta sensibilidade das iPSC 19.9.11DF frente à metodologia de eletroporação, o que dificulta a formação de colônias.

A figura 17 mostra a comparação entre DAPI e GFP em diferentes pontos da placa. O GFP demonstrou baixo sinal, o que pode ser devido à sua meia vida ser de 26 horas (KITSERÁ; KHOBTÁ; EPE, 2018). Dessa forma, idealmente a montagem da lâmina seria realizada após 24 horas do início do experimento.

Figura 17: iPSC transfectadas por eletroporação com o vetor GFP. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) GFP em verde; (c) sobreposição de DAPI com GFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.

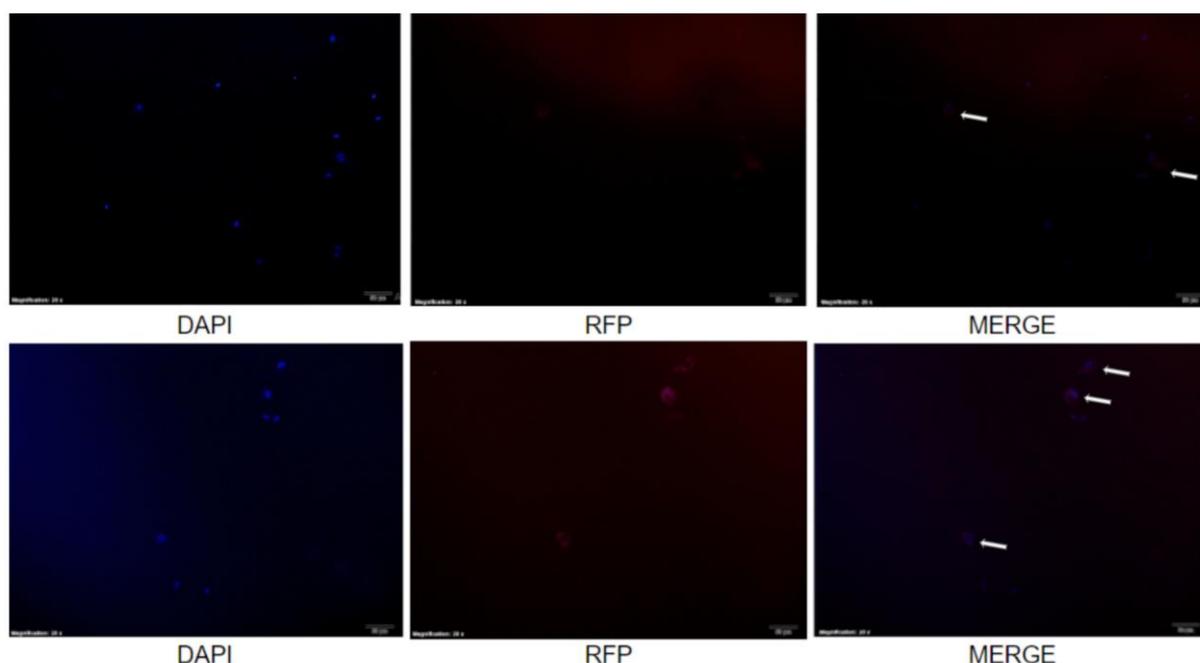


Após análise da taxa de transfecção por meio do GFP, foi realizada uma nova transfecção com pXM459, optando-se pela não utilização do antibiótico de seleção para evitar estresse celular. Uma vez que as colônias estavam com morfologia e tamanho adequado, coletaram-se manualmente as colônias, plaqueando-as em placas de 96 poços até que atingissem confluência suficiente para coleta de material genético. Das colônias coletadas, 21 resistiram à passagem, e realizou-se a coleta de material genético para genotipagem.

Transfecção por Lipofectamine 3000™

A fim de determinar a taxa de transfecção para células estromais mesenquimais utilizou-se RFP, e registros foram realizados em microscópio de fluorescência Zeiss AX10 (Figura 18).

Figura 18: CEM transfectadas por eletroporação com o vetor RFP. (a) DAPI em azul corando o núcleo celular; (b) RFP em vermelho; (c) sobreposição de DAPI com RFP demonstrando transfecção bem-sucedida na presença das duas fluorescências indicada pelas setas.



Após 48h de transfecção foi possível observar uma taxa de 17% de fluorescência, inferior a 26% encontrado na literatura para CEM (CARVALHO *et al.* 2018). Apesar de a

transfecção com *Lipofectamine 3000* ser bastante descrita na literatura, o fabricante sugere a utilização de *Lipofectamine Stem* para linhagens multipotentes, tanto quanto para as pluripotentes, apontando uma taxa de sucesso de 44% para células mesenquimais isoladas a partir de tecido adiposo (ThermoFisher Scientifics, 2017).

Devido ao maior sucesso de transfecção nas iPSC, e dificuldade de isolamento de células singulares das CEM optou-se por não seguir com essa linhagem celular para transfecção com os plasmídeos de interesse.

Como alternativa, utilizou-se as células HEK293T, que apresentam taxa de transfecção superior à 90% (SHI *et al.* 2018) utilizando-se *Lipofectamine 3000*. A transfecção foi realizada em triplicata para cada sgrNA (65 e 42) separadamente e o material genético foi coletado e isolado 48 horas após transfecção. As amostras então foram amplificadas por PCR e enviadas para sequenciamento Sanger.

Transdução lentiviral

Após transdução lentiviral, as células-tronco mesenquimais passaram por uma seleção com 1 µg/mL de puromicina e após 48 horas observou-se resistência em apenas 4 das 10 condições iniciais. Foram as condições 300 µL, 262,5 µL, 150 µL e 112,5 µL lentivirus. No entanto, como mencionado anteriormente, não foi possível realizar a expansão das células na presença de puromicina, uma vez que essas ficam bastante sensibilizadas após transdução. A transdução lentiviral, bem como o tratamento com puromicina foi previamente citado na literatura (KALLIFATIDIS *et al.* 2008) para uso terapêutico de CEM, e identificaram que apesar de manterem sua característica morfológica e de diferenciação, as células se proliferam mais lentamente e entraram em senescência de forma precoce.

Sequenciamento Sanger

O material genético das amostras coletadas foi isolado utilizando kit *PureLink™ Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific)* e as PCRs com os primers de genotipagem foram efetuadas com o protocolo otimizado. A análise da amplificação foi feita em gel de agarose 1,5%, onde foram observadas as bandas de tamanhos esperados, 362 pb para o éxon 2 e 163 pb para o éxon 3. As 21 colônias de iPSC geraram 42 produtos de PCR, e 7 amostras de HEK293T geraram 14 produtos.

Após digestão enzimática, com a enzima *Exosap*, os reagentes remanescentes foram degradados e realizou-se o envio das amostras para sequenciamento por Sanger. Os amplicons esperados no sequenciamento podem ser observados na Figura 19, onde em negrito está a sequência alvo.

Figura 19: Amplicons esperados pós PCR. Em negrito na sequência estão os alvos.

Sequência esperada Éxon 2:

```
>chr9:126615131+126615492 362bp GGAGAAGGGGAGAGCACAG GCACTGCAAACACTCCTCG
GGAGAAGGGGAGAGCACAGcgcgagccaaggctcgaggcccgcggcctc
tccacgccggagcccaggactgggacggactagccggggccgcccggcc
cctggcgcggtccggggagcgcaggcggcaggcgggtgatccccggcg
gcccgagccctcggggcaggggctgtgggcccgggtgcgaccgggacgcc
gggctgggcccggcgctgacggccgggctttccctgtgcgctac
aggctccgactgcccgcaccccgctctgcgagggctgccagcgccca
tctccgaccgttctgatgcgagtcaacgagtcgtcctggcaCGAGGAG TGTTTGCAGTGC
```

Sequência esperada Éxon 3:

```
>chr9:126690859+126691021 163bp GCTGCATGGAGAAGATCGC TTCTCGTAGTCACCCTTGCA
GCTGCATGGAGAAGATCGCccccaccgagttcgtgatcggggcgtggag
tgctgtaccacctgggctgcttctgctgctgctgctgtgtaacggcagct
acgcaagggcgacgaattcgtgctcaaggaggccagctgctgTGCAAGG GTGACTACGAGAA
```

As amostras recebidas das iPSC e HEK293T foram analisadas com o software *Chromas 2.5* (Figura 20 e 21 e Material Suplementar), e o alinhamento foi realizado utilizando a plataforma *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 22 e 23 e Material Suplementar).

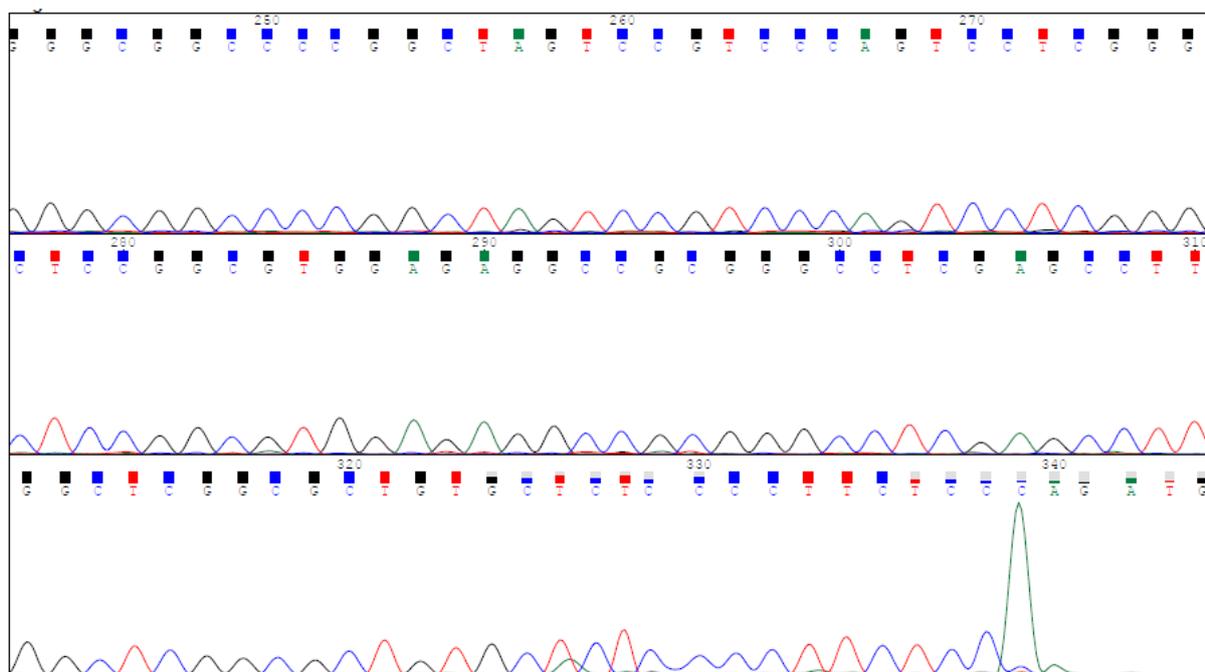


Figura 22: Alinhamento da Amostra iPSC 4, demonstrando alinhamento ao genoma *homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA*. Demonstrando 99% de concordância com o genoma de referência.

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 914 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
220 bits(119)	5e-53	120/121(99%)	0/121(0%)	Plus/Plus
Query 16	CGCTGGAGTGC	CGCTGGAGTGC	CGCTGGAGTGC	75
Sbjct 914	CGCTGGAGTGC	CGCTGGAGTGC	CGCTGGAGTGC	973
Query 76	GCAAGGGCGACGAATTC	GCAAGGGCGACGAATTC	GCAAGGGCGACGAATTC	135
Sbjct 974	GCAAGGGCGACGAATTC	GCAAGGGCGACGAATTC	GCAAGGGCGACGAATTC	1033
Query 136	A	A	A	136
Sbjct 1034	A	A	A	1034

Figura 23: Alinhamento da Amostra HEK293T 4, demonstrando alinhamento ao genoma *homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds*. Demonstrando 99% de concordância com o genoma de referência.

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds
 Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 938 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	4e-154	305/306(99%)	1/306(0%)	Plus/Minus
Query 30	CGGA-ATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAG	88		
Sbjct 938	CGGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAG	879		
Query 89	CGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCGGCGTCCCGGTCGC	148		
Sbjct 878	CGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCGGCGTCCCGGTCGC	819		
Query 149	ACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCC	208		
Sbjct 818	ACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCC	759		
Query 209	TGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAGTCCT	268		
Sbjct 758	TGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAGTCCT	699		
Query 269	CGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGGCTCGGGCGCTGTGCTCTCCC	328		
Sbjct 698	CGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGGCTCGGGCGCTGTGCTCTCCC	639		
Query 329	TTCTCC 334			
Sbjct 638	TTCTCC 633			

Após análise das sequências foi observado que algumas apresentavam um sinal baixo ou não possuíam leitura. Diante disso, procedeu-se à reanálise do desenho dos primers. Observou-se que a localização do RNA guia 45 (éxon 3) não favorecia a amplificação, uma vez que a sequência PAM encontrava-se muito próxima ao início do primer *reverse*. Essa proximidade inviabiliza a visualização da edição no sentido 5'-3' e prejudicava a amplificação das amostras. A amplificação do RNA guia 62 foi também prejudicada pelo desenho dos primers, apresentando dificuldade de leitura no sentido 3'-5', dessa forma, apenas edições no sentido 5'-3' seriam identificadas.

Em contrapartida, apesar da dificuldade de sequenciamento das amostras, foi possível observar a formação de bandas no gel de agarose com diferentes intensidades, o que levanta a hipótese da mutação ter acontecido em heterozigose, de forma que no gel é possível observar apenas uma das fitas. Essa hipótese justifica a diferença de intensidade das bandas observadas no gel, apesar da realização da PCR com a mesma concentração de DNA. Também justificaria a dificuldade de sequenciamento das amostras, já que o sequenciamento estaria detectando dois materiais genéticos diferentes.

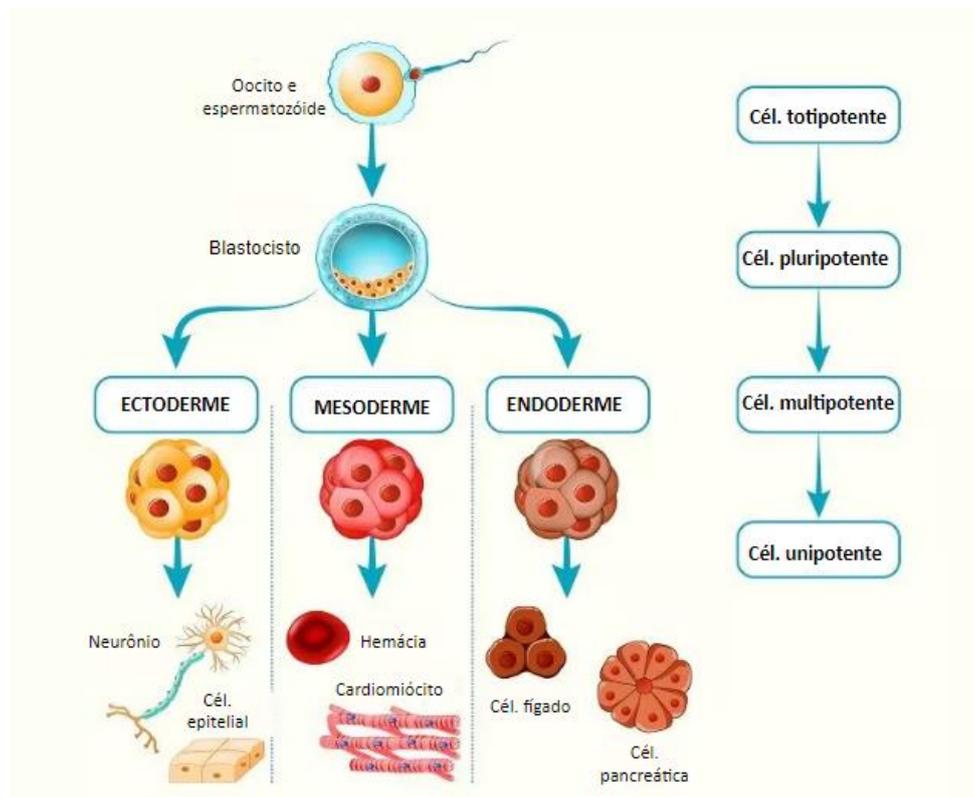
6. CAPÍTULO 2. DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA

6.1. INTRODUÇÃO

Células-tronco

Caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagens celulares (Figura 24), as células-tronco são encontradas desde o período embrionário até o período adulto, em diferentes estágios de diferenciação - totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente e unipotente. As células totipotentes são as células primordiais na formação do embrião, pois originam todos os folhetos embrionários e extra-embriônicos. No desenvolvimento humano, a única célula totipotente é o zigoto, derivado da fecundação do espermatozoide e óvulo (ZAKRZEWSKI *et al.* 2019).

Figura 24: Diferenciação das células-tronco a partir da formação do zigoto.



Fonte: Adaptado © 2023 Biology Dictionary.

As células pluripotentes são aquelas que podem se diferenciar nos principais folhetos embrionários, mas não nos folhetos extra-embriônicos. No ser humano elas são as células-tronco embrionárias (ou ESC do inglês *embryonic stem cells*), encontradas apenas no embrião, elas se diferenciam em ectoderme, mesoderme e endoderme. Como alternativa ao seu uso em pesquisa foram desenvolvidas as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC, do inglês *induced pluripotent stem cells*) (TAKAHASHI, YAMANAKA, 2006), possibilitando modelagem de doenças, *screening* de drogas, entre outros.

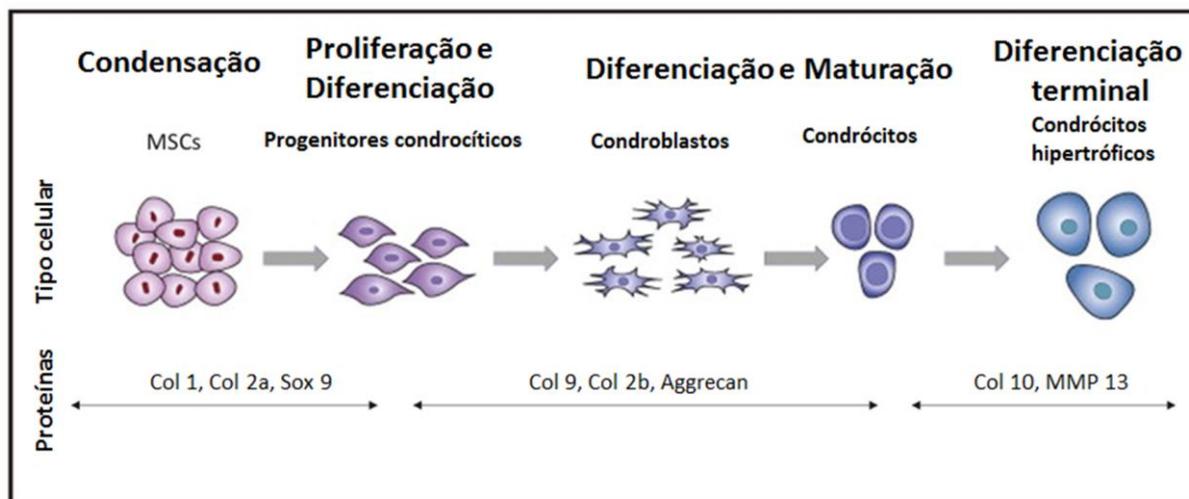
O espectro de diferenciação das células multipotentes é mais reduzido, uma vez que somente originam um determinado número de linhagens, e essas linhagens são especializadas. Um exemplo são as células estromais mesenquimais (CEM), derivadas da diferenciação mesodérmica, são células capazes de realizar a diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica. Além de seu potencial de diferenciação, característica que as torna bastante utilizadas para estudo *in vitro* de doenças e mecanismos funcionais dos organismos, elas são também bastante utilizadas na medicina regenerativa.

Os dois últimos estágios de diferenciação celular acontecem por meio das células oligopotentes, capazes de se diferenciar em poucos tipos celulares e as unipotentes, que se diferenciam apenas em um determinado tipo celular. Seu uso é mais limitado à terapia celular do que à modelagem *in vitro* (ZAKRZEWSKI *et al.* 2019).

Condrogênese

A condrogênese é um processo fisiológico pelo qual células-tronco passam para gerar tecido cartilaginoso, ainda no processo embrionário. Na diferenciação, células-tronco originam mesoderme, que são capazes de se diferenciar com condroblastos, constituindo tecido cartilaginoso imaturo (figura 25).

Figura 25: Etapas da diferenciação condrogênica em células-tronco mesenquimais.



Fonte: Adaptado de Kelc *et al* 2013.

Esse processo possui uma regulação de expressão gênica bastante delicada, de forma que é controlada por diversos genes. O primeiro sinal para início da diferenciação é a alta condensação das células, seguido pela expressão do gene *SOX9*, fator de transcrição que codifica proteína de mesmo nome responsável por interagir com o DNA de maneira flexível e dinâmica (SHIMIZU *et al*, 2007).

A partir da expressão do *SOX9*, outros genes passam então a serem expressos, genes que possuem como principal função a secreção de matriz extracelular (ECM, do inglês, *extracellular matrix*). O *COL1A1* é um dos genes expressos a partir do estímulo do *SOX9*, codificando as cadeias pró-alfa 1 e gerando a proteína formada por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2, gerando assim o colágeno tipo I, importante no desenvolvimento da ECM e produção de outras proteínas como o colágeno do tipo II. A produção do colágeno tipo II se dá pela expressão do *COL2A1*, que acontece pela codificação da cadeia do tipo alfa-1 para um colágeno do tipo fibrilar, gerando cartilagem hialina (MONTERO; HURLÉ, 2007).

Apesar de expresso durante o processo inicial de condrogênese, o colágeno do tipo I é comum também em estágios finais na condrogênese, sendo comum à cartilagem fibrosa, tal como o colágeno do tipo X, proteína codificada pelo gene *COL10A1*, expresso em condrócitos hipertróficos na ossificação endocondral, demonstrando o final da diferenciação condrogênica. Outro gene que participa da diferenciação condrogênica é o *ACAN* ou *Aggrecan*, membro da família das proteoglicanas, e parte integral da matriz extracelular dos condrócitos, possuindo importância na adesão e manutenção dos condrócitos na ECM (SHIMIZU *et al*. 2007).

Métodos de condrogênese *in vitro* são bastante descritos na literatura (AGUIAR, 2015), e necessários para estudo e compreensão de doenças ósseas, que compreendem o complexo mecanismo pelo qual a cartilagem é formada. Além da co-cultura e da utilização de meio condicionado de condrócitos pode-se também utilizar de meios comerciais, tanto para diferenciação mesodérmica como também para diferenciação condrogênica.

6.2. METODOLOGIA

Diferenciação condrogênica

A capacidade das células editadas de realizar o processo de condrogênese foi verificada usando meio comercial para condrogênese (*StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit - Gibco™*) e confirmação da diferenciação por qRT-PCR para verificação de expressão gênica e coloração de Alcian Blue, o qual reage com as proteoglicanas da matriz extracelular da cartilagem. As células editadas serão comparadas com células *wild-type*.

A diferenciação condrogênica de células iPS normalmente é realizada em duas etapas, a primeira sendo a diferenciação mesodérmica e a segunda a diferenciação condrogênica de fato (DICKS *et al.* 2023). A diferenciação mesodérmica é realizada com kits de diferenciação específicos, no entanto, a diferenciação condrogênica direta dessas células já havia sido realizada pelo grupo, utilizando vesículas e meio condicionado de condrócitos de camundongo (MANRIQUE, 2018).

Coloração por Alcian Blue

Para avaliar a formação de proteoglicanas sulfatadas da matriz extracelular durante o período de 28 dias de diferenciação condrogênica, foi realizada a coloração de Alcian Blue a cada 7 dias. Nesse processo o meio de cultura foi removido e o poço foi cuidadosamente lavado com PBS. Após a remoção do PBS, as células foram fixadas com Formalina 10% por 30 minutos, seguido de nova lavagem com PBS. Em seguida foi aplicada solução de Alcian Blue

1% diluído em HCl 0,1 M por 30 minutos. O poço foi lavado com solução de HCl 0,1 M por três vezes e então adicionou-se água destilada para registro fotográfico no microscópio invertido e subsequente armazenamento.

Verificação da expressão gênica

Em cada ponto de parada da diferenciação condrogênica - T0, T7, T14, T21 e T28 - com meio comercial *Stem Pro*TM foi coletado o material com TRIzolTM para extração de RNA e qPCR. A coleta foi realizada por meio da retirada do meio de cultura, lavagem com 500 µL de PBS e adição de 300 µL de TRIzolTM. Foi realizada a raspagem das células com ponteira de 1000 µL e então o volume foi transferido para um tubo de 1,5 mL, o qual foi armazenado a -80°C até o momento da extração de RNA.

Extração de RNA

A extração se deu utilizando o reagente TRIzolTM (InvitrogenTM), seguindo o protocolo do fabricante, com alterações. Inicialmente completou-se o volume coletado com 200 µL de TRIzolTM, de forma que a amostra ficou com um volume final de 500 µL. Adicionou-se 100 µL de clorofórmio às amostras e elas foram submetidas a aproximadamente 1 minuto de vortex, até que observou-se um aspecto leitoso, foram então incubadas em gelo por 10 minutos.

Centrifugou-se as amostras a 9.000 x g por 20 minutos à 4°C e após centrifugação observou-se a separação de fases, coletando-se cerca de 250 µL da fase aquosa. Adicionou-se então 250 µL de Isopropanol e acondicionou-se a -20°C *overnight* para a precipitação do RNA. Ao fim da incubação, centrifugou-se a 20.000 x g por 20 minutos a 4°C.

Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 80%, as amostras foram então centrifugadas a 20.000 x g por 5 minutos a 4°C e após retirada do sobrenadante o *pellet* foi mantido à temperatura ambiente até secar e ressuspenso em 42 µL de água ultrapura (*RNase free*).

Quantificação de RNA

O material foi quantificado no equipamento Qubit® (Invitrogen™), a fim de determinar o volume a ser utilizado para síntese de cDNA. Utilizou-se o protocolo do fabricante utilizando *RNA Buffer* e *Qubit® RNA Reagent*, onde para cada amostra utilizou-se 199 µL de tampão e 1 µL de fluoróforo. Deste mix, utilizou-se 199 µL, ao qual foi adicionado 1 µL de amostra, e após vortex a amostra foi incubada no escuro por dois minutos, após leitura o aparelho permite calcular a concentração final da amostra por µg/mL.

Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 100-150 ng/mL de RNA diluído em 10 µL de água ultrapura utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®* (Applied Biosystems). Para cada reação de cDNA foi usado 2 µL de *Buffer RT 10X*; 0,8 µL dNTP 25X; 2 µL *Random Primers RT 10X*; 1 µL de Inibidor de RNase 20 U/µL; e 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* 50 U/µL, totalizando um volume final de 20 µL. A síntese se deu no termociclador seguindo o ciclo de 10 minutos a 25°C; 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C com armazenamento a 10°C.

PCR em tempo real (qPCR)

Análise de expressão gênica deu-se por meio da utilização de SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Foram realizadas duas placas, a primeira para avaliação dos genes da condrogênese *SOX9*, *COL1A1* (colágeno tipo I), *COL2A1* (colágeno tipo II), *COL10A1* (colágeno tipo X) e *ACAN* (Agrecan). Como controle constitutivo dessa placa foi utilizado o gene *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Na segunda placa colocou-se genes para avaliação do perfil indiferenciação celular das iPSC utilizando-se os genes *OCT4*, *TBXT* (fator de transcrição T-box T, ou *hT*), *NANOG* (proteína homeobox NANOG), *LMX1B 2* (LIM homeobox beta-1 variante 2) e *LMX1B 7* (LIM homeobox beta-1 variante 7). Como controle constitutivo dessa placa foi utilizado o gene *ACTB* (β-actina).

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados na qPCR. F: primer *forward* e R: primer *reverse*. [1] (SIMONASSI-PAIVA, 2019); [2] (BEHRENDT et al., 2018); [3] Primers desenhados pela autora.

GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER
<i>COL1A1</i> [1]	F: GCTATGATGAGAAATCAACCG R: TCATCTCCATTCTTTCCAGG
<i>COL2A1</i> [1]	F: GAAGAGTGGAGACTACTGG R: CAGATGTGTTTCTTCTCCTTG
<i>COL10A1</i> [3]	F: GCTAGTATCCTTGAACCTGG R: CCTTACTCTTTATGGTGTAGG
<i>ACAN</i> [1]	F: CACCCCATGCAATTTGAG R: AGATCATCACCACACAGTC
<i>LMX1B 2</i> [3]	F: TGAACCCCTATGGGAACGAC R: CTCTGCATGGAGTAGAGCCG
<i>GAPDH</i> [1]	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
<i>SOX9</i> [2]	F: CTCGGAGACTTCTGAACGAGAG R: CGTTCTTCACCGACTTCCTCC
<i>OCT4</i> [3]	F: GGCTGGACACCTGGCTTCAGA R: TGGTCCGATTCCAGGCCCA
<i>NANOG</i> [3]	F: AAGTCTTAAAGCTGCCTTAACCTT R: TTGCTATTCTTCGGCCAGT
<i>TBXT</i> [3]	F: TCTACATCCACCCCGACT R: GCTGTCTCCGGGTTCTC
<i>LMX1B 7</i> [3]	F: CCGAAAGGTCCGAGAGACAC R: CGTTCCCATAGGGGTTTCATGT
<i>ACTB</i> [3]	F: CGAGGACTGGGACGGACTA R: CTCGGAACCCTTGGAGCTG

Análise estatística

A partir dos dados da qPCR foram calculados ΔCt e $\Delta\Delta Ct$, e para visualização, os dados foram apresentados no formato $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para aqueles que apresentaram valores acima de 1 e $1/(2^{-\Delta\Delta Ct})$ para aqueles que apresentaram expressão negativa, visualizados a partir do *fold*

change, para melhor visualização gráfica. Para análise estatística realizou-se um TWO-WAY ANOVA com comparações múltiplas, utilizando-se o programa GraphPad Prism 10.0.2. Os valores de p seguem a seguinte representação estatística nos gráficos: $P\ value \leq 0.05$ é representado por (*), $P\ value \leq 0.01$ é representado por (**), $P\ value \leq 0.001$ é representado por (***) e $P\ value \leq 0.0001$ é representado por (****).

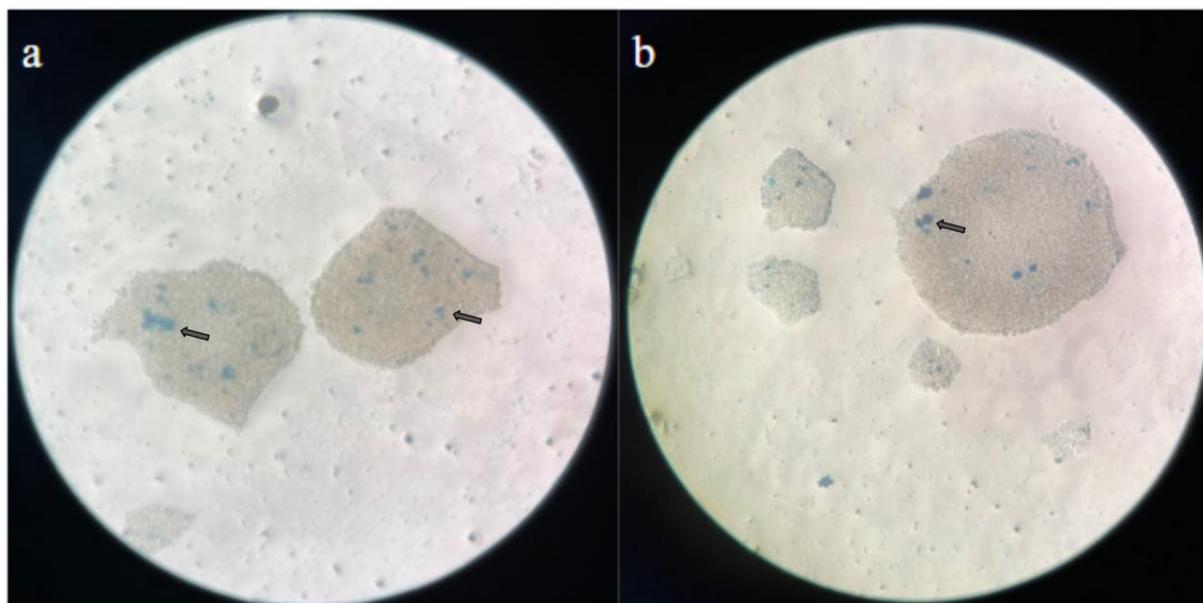
6.3. RESULTADOS

Coloração por Alcian Blue

Durante o processo de diferenciação condrogênica, as células passam a produzir colágeno e agrecan, componentes de matriz extracelular, e essa produção pode ser observada por meio de corantes como o *Alcian Blue*, que diante da presença de proteoglicanas sulfatadas se liga a matriz, formando um complexo azul. A coloração por Alcian Blue para acompanhamento do processo de diferenciação foi realizada a cada 7 dias, nos tempos T0, T7, T14, T21 e por fim T28.

Para esse projeto, um novo protocolo de diferenciação foi desenvolvido sem a utilização de meio condicionado ou vesículas extracelulares obtidas a partir de condrócitos, a partir do uso de meio comercial para diferenciação. Realizou-se o plaqueamento das células e após 3 dias, quando as células atingiram confluência entre 50-60% realizou-se o início da diferenciação e uma coloração controle com Alcian Blue (Figura 26).

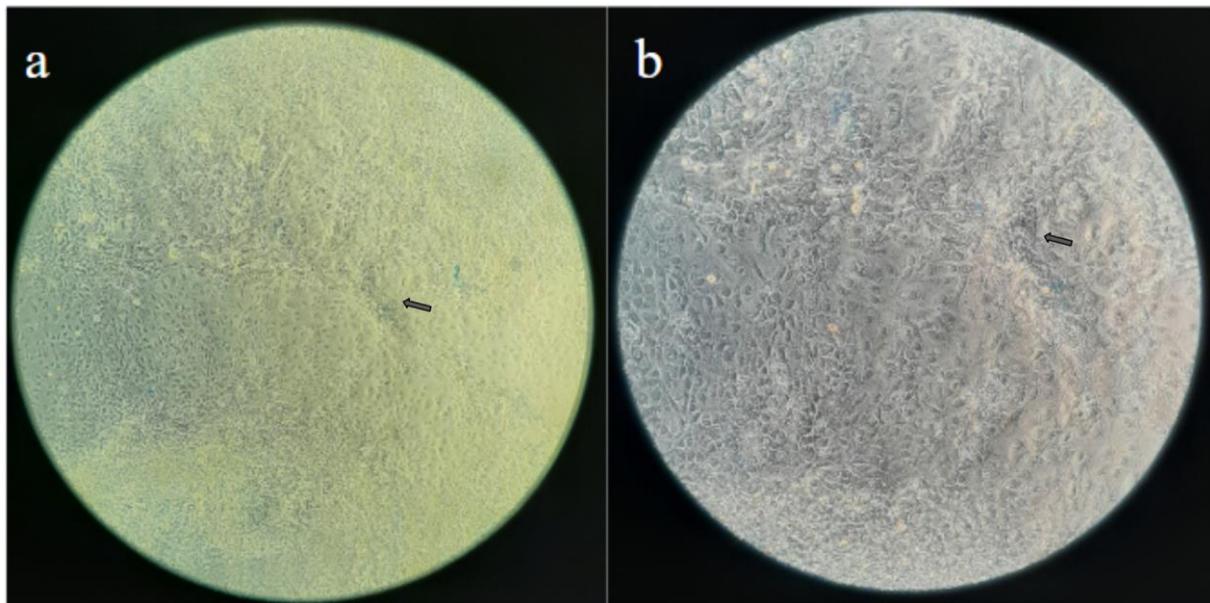
Figura 26: Coloração Alcian Blue anterior à diferenciação condrogênica. Setas em azul indicando depósito de corante.



Na figura é possível observar as colônias bem delimitadas, sem separação entre as células dentro da colônia e não há a formação de matriz extracelular, sendo a única coloração advinda de depósitos de corante.

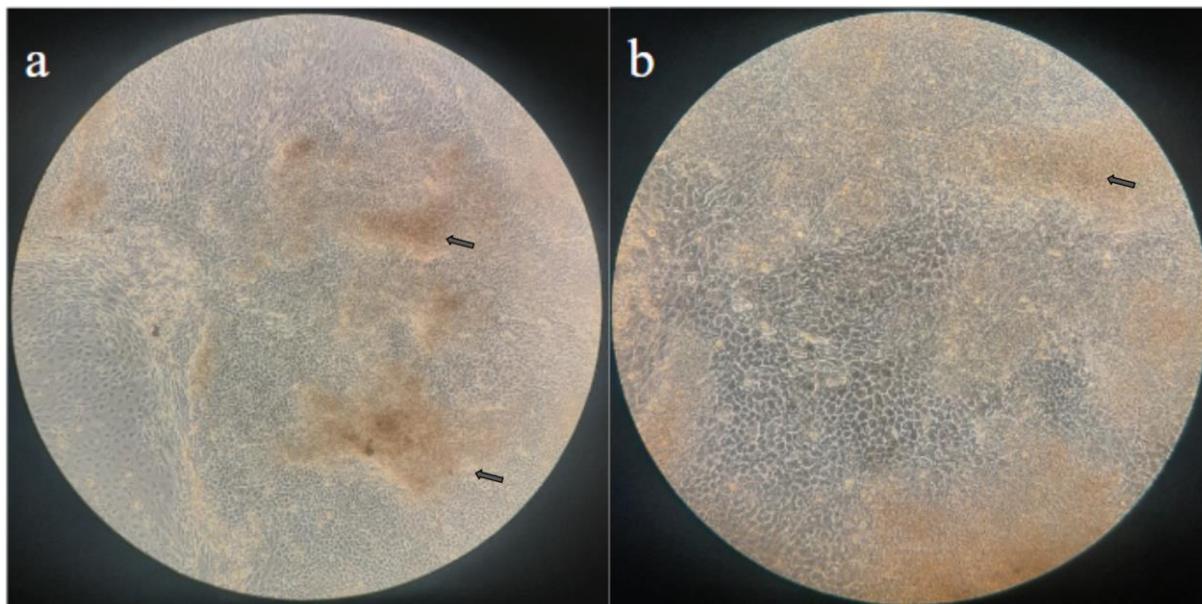
Em 7 dias após o início da coloração (Figura 27) não foi mais possível observar as colônias, mas sim células com uma morfologia bem diferente das iPSC originais, formando uma monocamada celular ao invés das colônias. A confluência celular era esperada, pois as colônias apresentam bastante células em sua composição, favorecendo o desenvolvimento de condrócitos diferenciados, que preferem alta confluência.

Figura 27: Coloração por Alcian Blue em 7 dias de diferenciação (T7), com setas indicando maior densidade celular. (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.



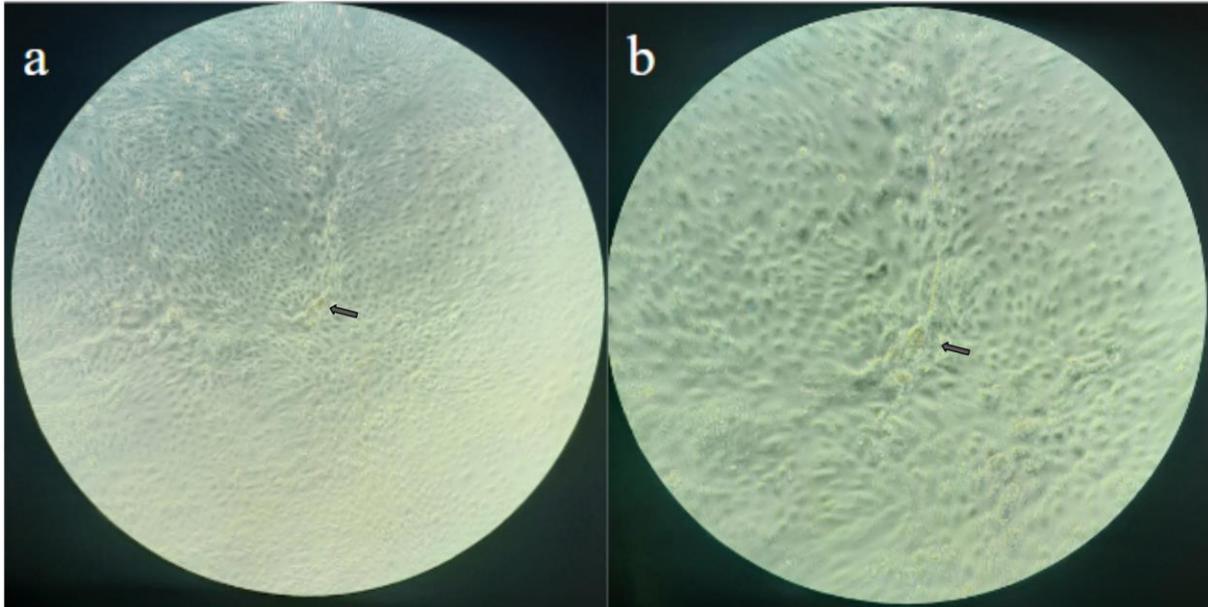
Com 14 dias de diferenciação (Figura 28) já foi possível observar amontoados celulares que se assemelhavam bastante à formação de matriz extracelular. As células estavam mais arredondadas e uma separação entre as células foi notável.

Figura 28: Coloração por Alcian Blue em 14 dias de diferenciação (T14), com setas indicando a formação de matriz extracelular. (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.



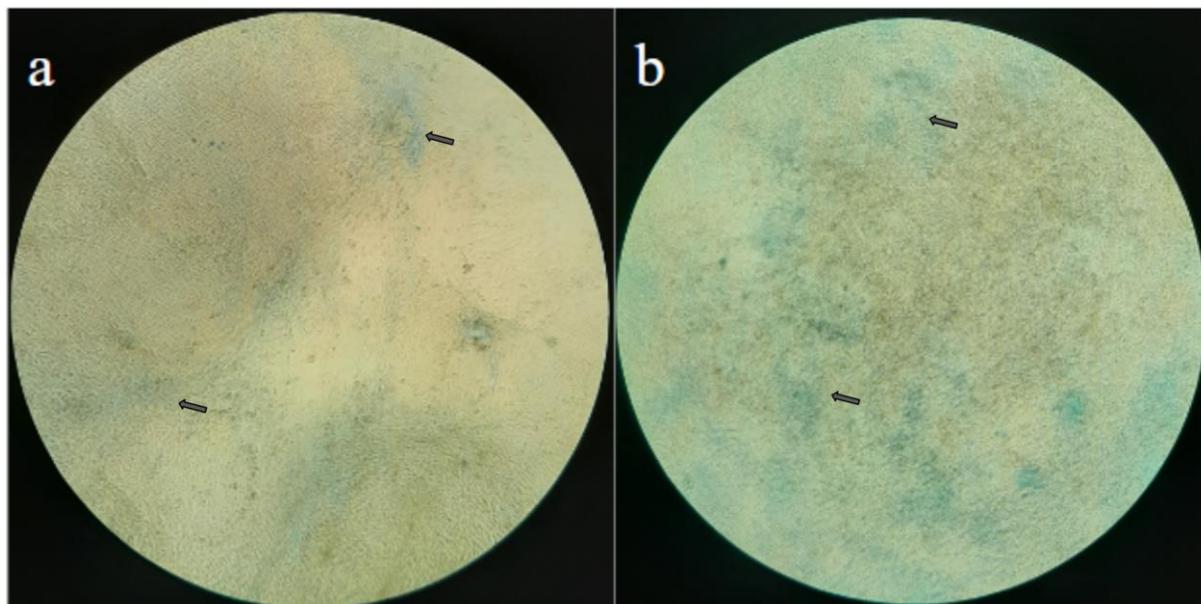
Células estromais mesenquimais normalmente apresentam diferenciação condrogênica completa com 21 dias de diferenciação, apresentando a morfologia esperada e a formação de matriz (AGUIAR, 2019; MOTA, 2020). No entanto, apesar da coloração de 21 dias das células iPS (figura 29) demonstrarem morfologia adequada, células maiores, arredondadas e mais separadas, ainda não foi possível observar a coloração azul característica das proteoglicanas sulfatadas que compõe a matriz extracelular dos condrócitos.

Figura 29: Coloração por Alcian Blue em 21 dias de diferenciação (T21), setas demonstrando condensação celular e espaço célula-célula. (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.



No último ponto de coleta de RNA e coloração, T28 (figura 30), as células estavam completamente diferenciadas, mostrando a morfologia esperada em condrócitos finais e havia bastante coloração azulada, resultado da coloração das proteoglicanas sulfatadas presentes na matriz extracelular, como era esperado.

Figura 30: Coloração por Alcian Blue em 28 dias de diferenciação (T28), setas demonstrando o depósito de corante (em azul) na matriz extracelular. (a) poço de coloração em aumento de 10X; (b) poço de coloração em aumento de 20X.

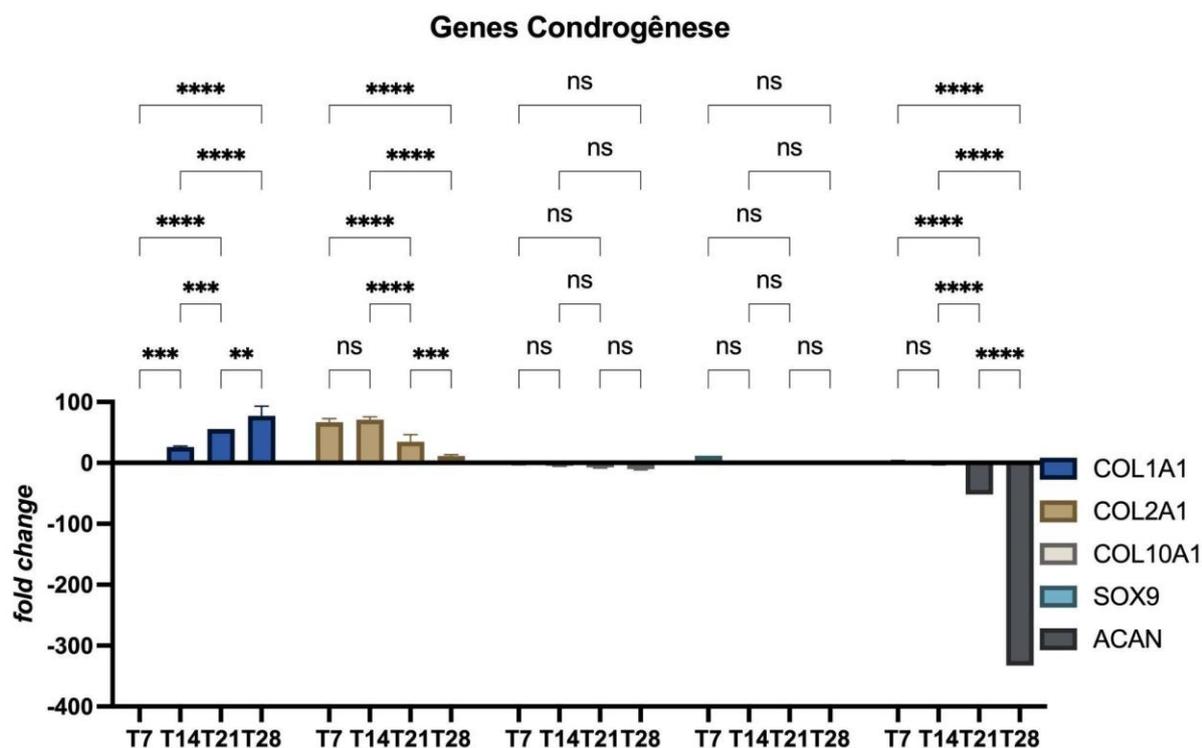


Expressão gênica

Outra análise feita para validação da diferenciação condrogênica foi a expressão gênica avaliada por qPCR com *Sybr Green*. Foram preparadas 2 placas, a primeira com os genes associados à condrogênese - *SOX9*, *Col1A1*, *Col2A1*, *Col10A1* e *ACAN* (Figura 31), e a segunda placa com genes associados à pluripotência - *OCT4*, *hT*, *LMX1B* e *NANOG* (Figura 37). A metodologia de análise foi *fold change* ($-1/(2^{-\Delta\Delta Ct})$), indicando a variação de expressão comparado ao gene constitutivo, *GAPDH* e *ACTB*.

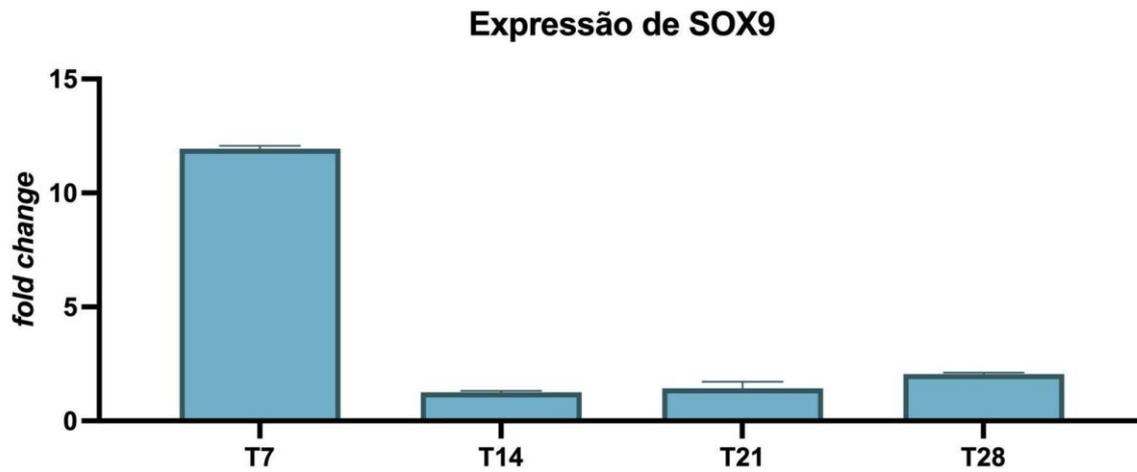
Com o aumento de expressão do *SOX9* há uma queda progressiva da expressão dos genes *OCT4*, *TBXT*, *LMX1B* e *NANOG*, fatores de transcrição responsáveis pela manutenção da pluripotência, proliferação e renovação celular, mais expressos quando as iPSC estão indiferenciadas. Essa alteração no padrão de expressão das células durante a diferenciação demonstra que os genes de manutenção da pluripotência possuem uma correlação negativa com o *SOX9*, enquanto os genes da primeira placa (Figura 31), tem uma relação positiva, passando a serem expressos após início da expressão do *SOX9*.

Figura 31: Expressão gênica de *Col1A1*, *Col2A1*, *Col10A1* e *ACAN*, normalizado com *ACTB*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****), P value ≤ 0.001 é representado por (****).



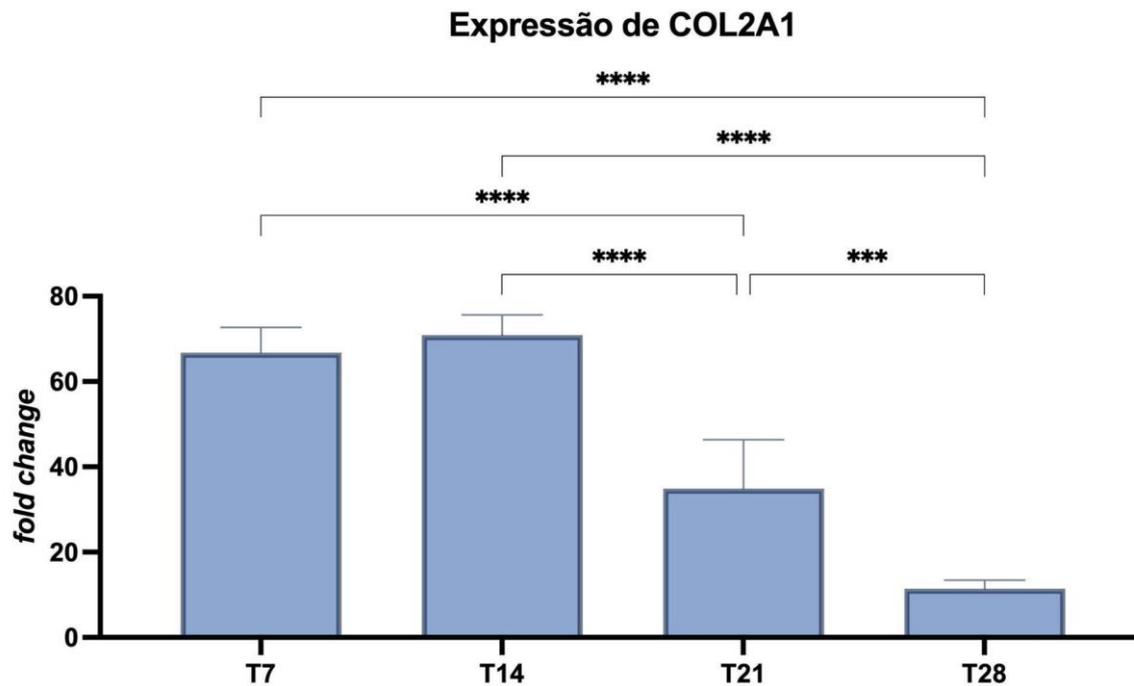
Durante a diferenciação condrogênica, placa 1 (Figura 31), o primeiro gene a ser expresso é o *SOX9* (Figura 32), fator de transcrição que dá início ao processo de condrogênese, e após o T14 tem sua expressão reduzida e substituída pela expressão dos colágenos (Figura 36, 37 e 38).

Figura 32: Expressão gênica *SOX9*, demonstrando um pico de expressão em T7, durante o início da diferenciação condrogênica.



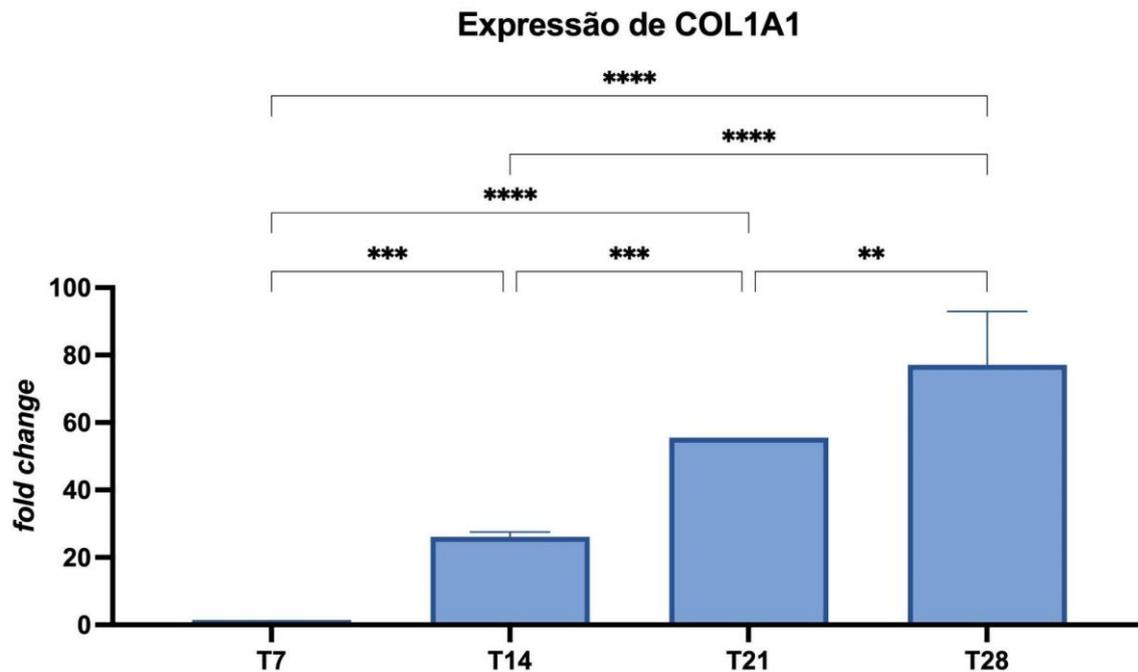
O primeiro gene a ser expresso seguindo o estímulo de *SOX9* é *Col2A1*, gene responsável pela produção de colágeno do tipo II e expresso na formação de cartilagem hialina. Sua expressão foi mais significativa em T14, diminuindo posteriormente e dando lugar à expressão de *Col1A1* (Figura 33), responsável pela produção de colágeno tipo I.

Figura 33: Expressão gênica *Col2A1*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****).

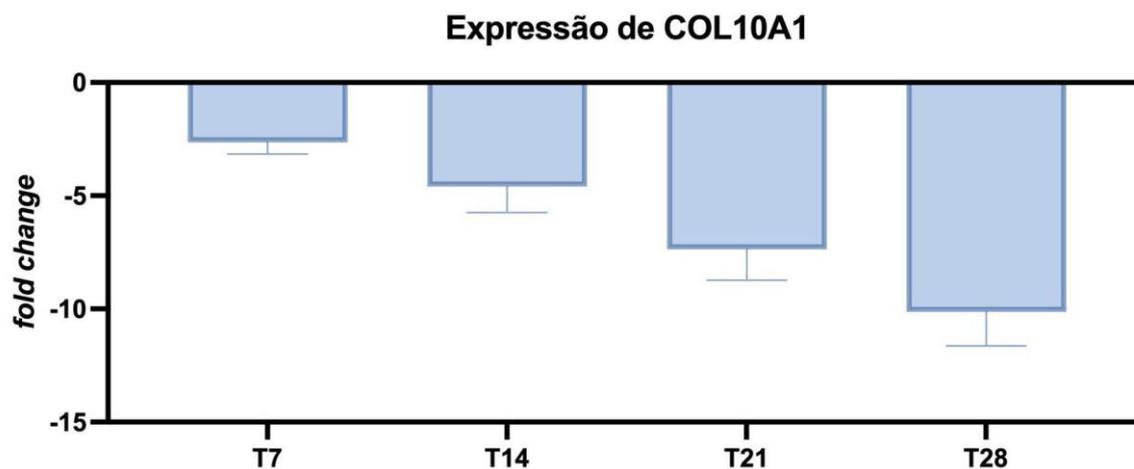


O colágeno tipo I, produzido a partir da expressão de *Col1A1* (Figura 34), é um componente da ECM, e apesar de não ser o principal componente da cartilagem confere assistência aos tecidos acessórios formados durante o desenvolvimento embrionário. Sua expressão progressiva durante a diferenciação condrogênica das iPSC demonstra a capacidade de diferenciação dessas células em resposta ao estímulo.

Figura 34: Expressão gênica *Col1A1*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****).

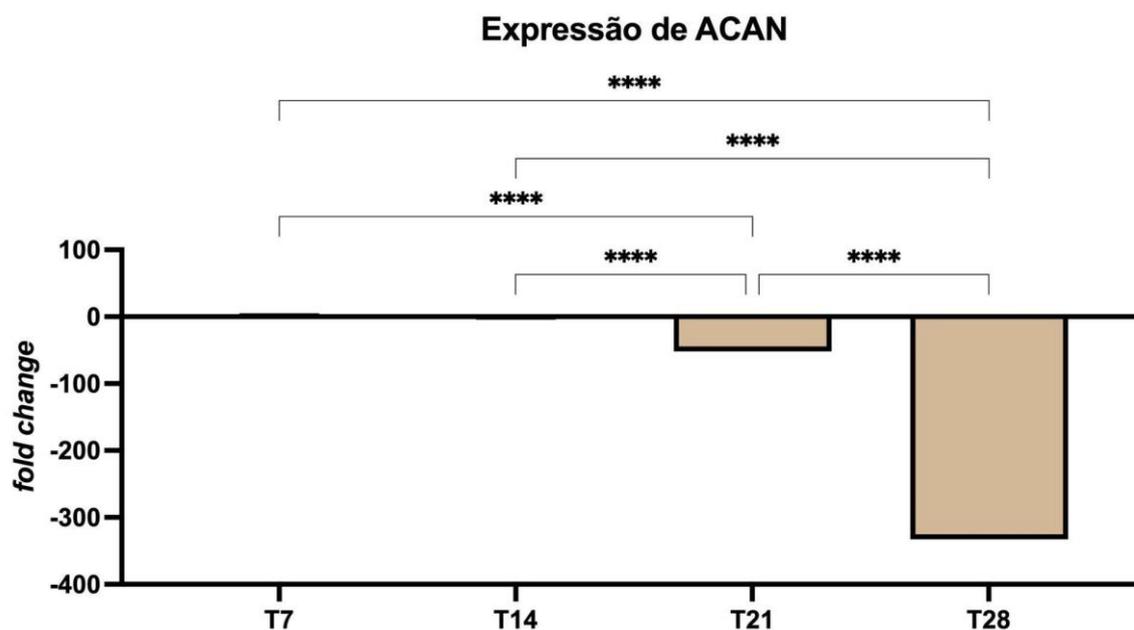


O *Col10A1* (figura 35), gene expresso na formação da cartilagem fibrosa, manteve-se negativamente regulado durante toda a condrogênese, com pico em T28, em contrapartida à expressão positiva de *Col2A1*, demonstrando que mesmo em estágios finais de diferenciação este gene manteve-se mais expresso.

Figura 35: Expressão gênica *Col10A1*.

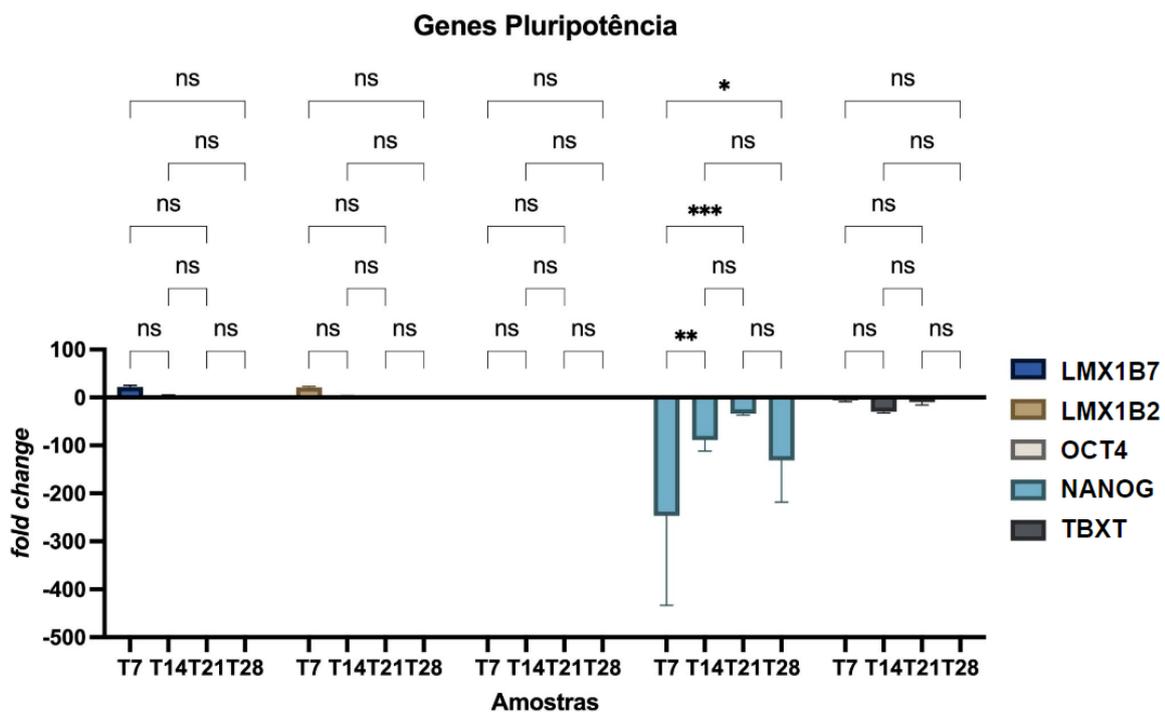
O *ACAN* (Figura 36), gene codificador da proteína Aggrecan, da mesma família das proteoglicanas, deve ser expressa para a produção da matriz extracelular. Manteve-se negativamente expresso durante a diferenciação, apresentando pico em T28 quando a produção de matriz apresenta uma normalização e constância.

Figura 36: Expressão gênica de *ACAN*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****).

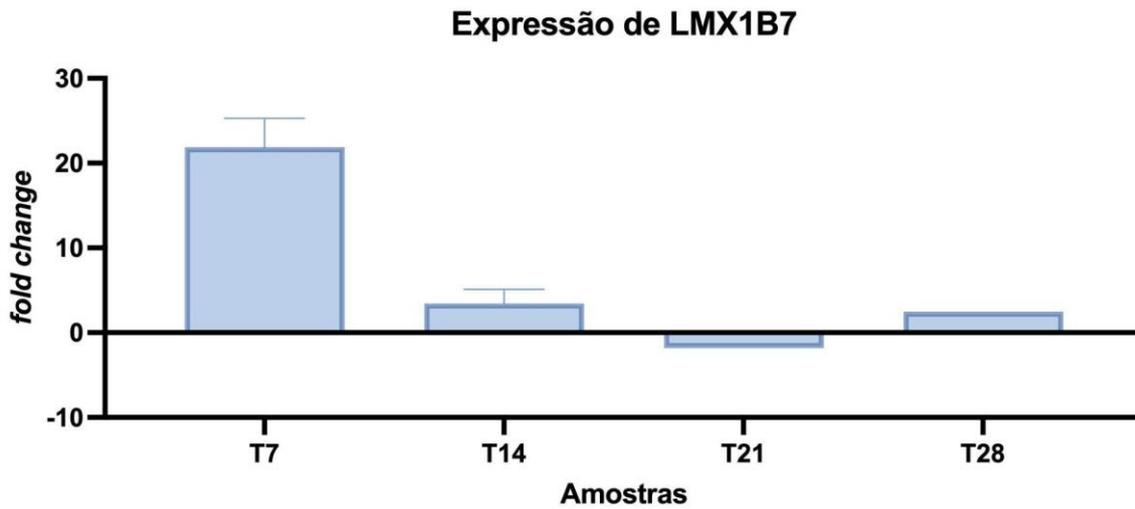
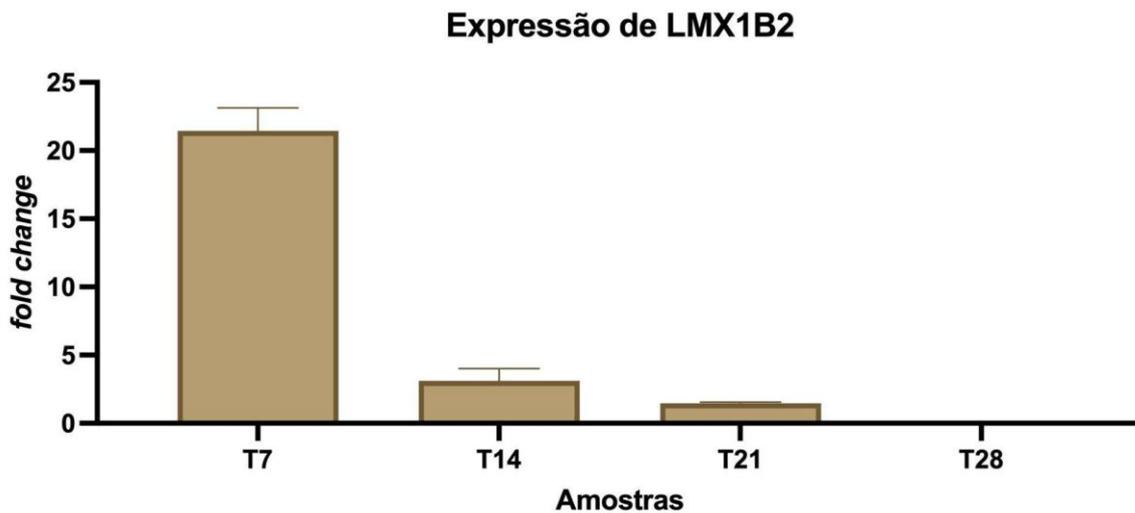


Na segunda placa (Figura 37) observou-se a expressão dos genes de pluripotência, iniciando-se pelo gene de interesse do projeto, o *LMX1B*, fator de transcrição associado ao desenvolvimento embrionário, possuindo um papel constitutivo.

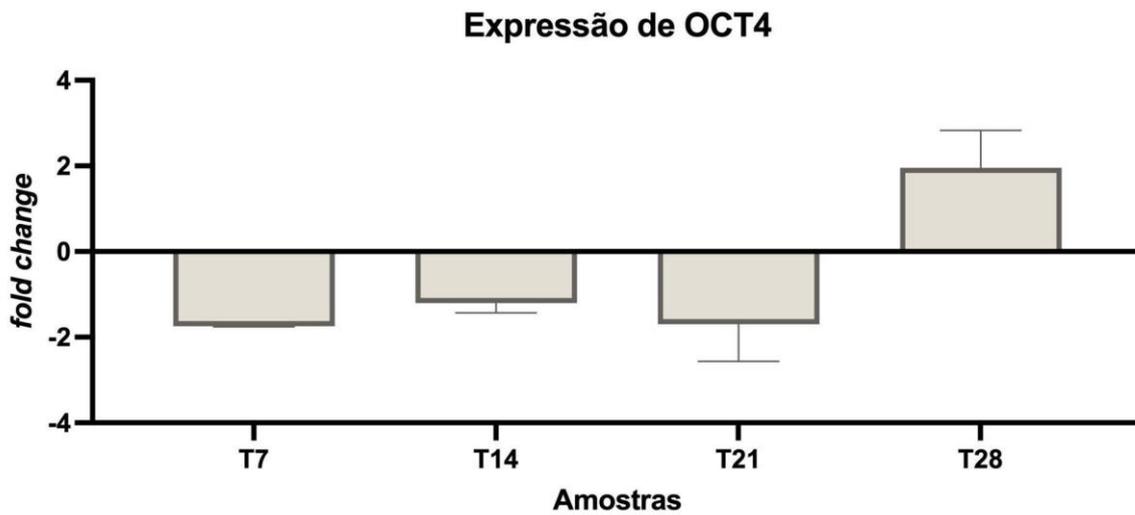
Figura 37: Expressão gênica de *LMX1B*, *OCT4*, *NANOG*, e *TBXT* normalizada com *GAPDH*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****), P value ≤ 0.001 é representado por (****).



Observa-se que ambas as variantes de *LMX1B* (Figura 38 e 39) apresentam o mesmo padrão de expressão do *SOX9*, com expressão precoce durante a diferenciação, sugerindo que alterações na produção do transcrito, como na NPS, geram alterações nos genes que seguem a condrogênese.

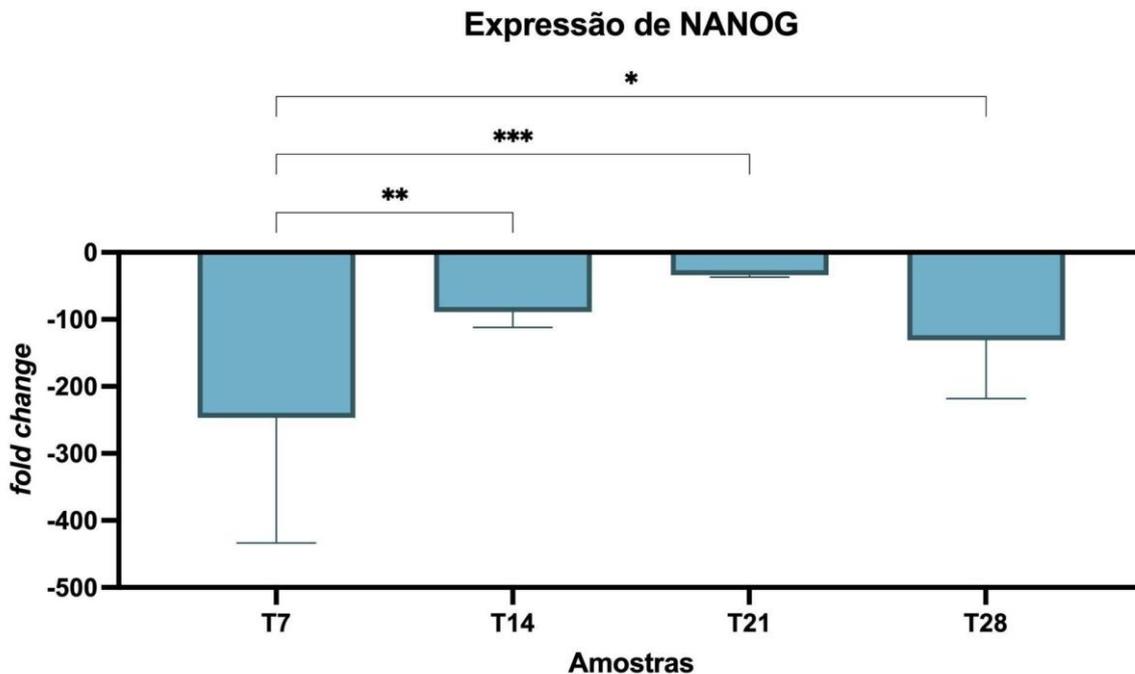
Figura 38: Expressão de *LMX1B* variante 7.Figura 39: Expressão de *LMX1B* variante 2.

Concomitantemente com a expressão de genes associados à condrogênese, ocorre a queda da expressão dos genes de pluripotência. O *OCT4* (Figura 40), um dos marcadores mais importantes da pluripotência de iPSC, mantém-se com baixa expressão durante todo o processo de condrogênese, possuindo um baixo aumento pouco significativo ao final.

Figura 40: Expressão de *OCT4*.

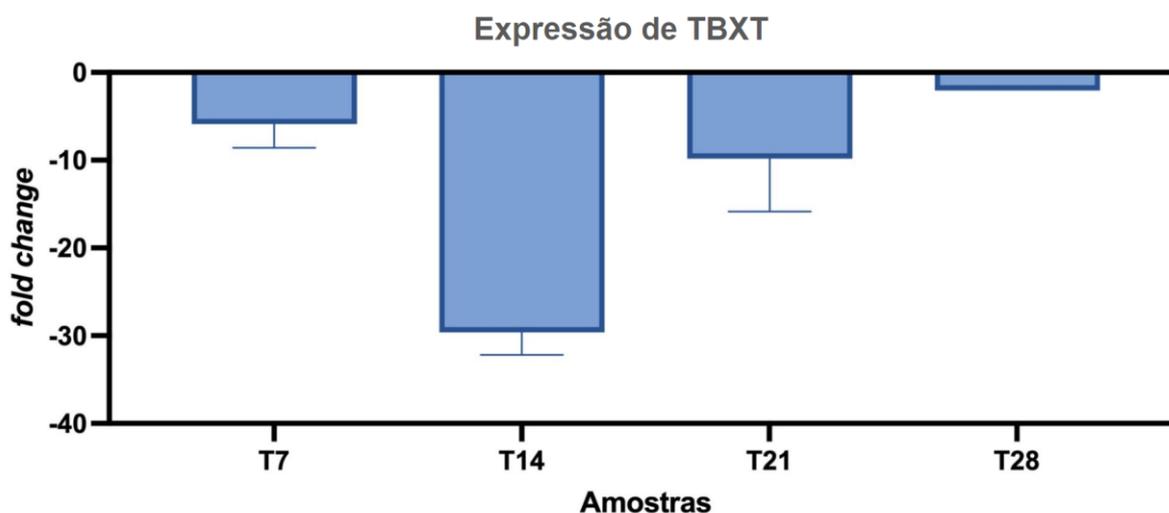
A expressão de *NANOG* (Figura 41), relacionada à proliferação e pluripotência de iPSC, é bastante negativa, demonstrando que os genes de pluripotência deixaram de ser expressos durante a diferenciação condrogênica a partir de T7 e mantiveram-se com expressão negativa.

Figura 41: Expressão de *NANOG*. P value ≤ 0.05 é representado por (*), P value ≤ 0.01 é representado por (**), P value ≤ 0.001 é representado por (***) e P value ≤ 0.0001 é representado por (****).



Para avaliação da diferenciação mesodérmica adicionou-se o fator de transcrição *TBXT* (Figura 42), onde observou-se um expressão negativa durante toda a diferenciação, com pico em T14, demonstrando que o estímulo da diferenciação mesodérmica aconteceu, e as iPSC passaram por mesoderme antes de entrarem em diferenciação condrogênica.

Figura 42: Expressão de *TBXT*.



Desta forma, conclui-se que a expressão das iPSC foram condizentes com sua diferenciação condrogênica, evidenciada também a partir da morfologia celular e coloração de Alcian Blue. Mais informações acerca da qPCR podem ser encontradas no Material Suplementar.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

O estudo de doenças genéticas raras do esqueleto, como a síndrome de unha-patela, é importante pois seu diagnóstico é lento, e possui tratamento limitado, de forma que se faz necessário a compreensão de mecanismos moleculares. Por ser uma doença genética cujo principal gene associado entra em ação bem no início da embriogênese, células em estágio de imaturidade como as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) foram a escolha inicial do projeto, visando o *knockout* do gene em etapas iniciais do desenvolvimento. No entanto, devido à dificuldade e custos envolvendo o cultivo e manutenção das iPSC, células alternativas foram também escolhidas como as células estromais mesenquimais e as células renais embrionárias. O objetivo da diversificação das células foi primariamente favorecer a otimização e o funcionamento das metodologias escolhidas para edição gênica, nucleofecção para as iPSC, lipofecção e edição lentiviral para as CEM e HEK293T. Testes com plasmídeos de fluorescência foram realizados nas iPSC (GFP e RFP) e nas CEM (RFP), demonstrando que as células foram capazes de sobreviver às metodologias de entrega dos plasmídeos. A inserção do RNA guia levou ao aumento da morte celular, sugerindo que provavelmente a ausência do gene de interesse (*LMX1B*) seja letal para as células, contribuindo para a inviabilidade da proliferação. Como alternativa às células primárias utilizou-se as células HEK293T imortalizadas Cas9 estáveis, já resistentes à puromicina.

Foi realizada a otimização do protocolo de diferenciação condrogênica direta destas células com meio comercial *Stem Pro Chondrogenesis differentiation* sem utilização de meio para diferenciação em mesoderme, vesículas extracelulares ou meio condicionado de condrócitos como previamente descrito na literatura. O padrão de expressão gênica, juntamente com a coloração de Alcian Blue, demonstrou que não houve prejuízo na diferenciação das iPSC, chegando a um padrão de diferenciação já previamente observado em diferenciação de CEM. A otimização de um protocolo simples de diferenciação dessas células facilita o estudo de alterações na expressão de genes expressos antes da diferenciação mesodérmica até a diferenciação condrogênica, favorecendo o estabelecimento de um modelo *in vitro* para estudo de doenças da cartilagem, que necessitem ou não de edição gênica. Durante a diferenciação o padrão de expressão dos genes *SOX9* e *LMX1B* foram semelhantes, pois ambos apresentaram um aumento no início da diferenciação condrogênica, podendo ser associados ao estímulo, atuando como iniciadores. Dessa forma, tal qual alterações no *SOX9*, a haploinsuficiência causada pela mutação do *LMX1B* pode levar à redução da expressão gênica de fatores

associados à produção de cartilagem, levando assim as manifestações esqueléticas bem descritas da NPS.

Os dados obtidos com este trabalho abrem portas para o estudo de doenças genéticas do esqueleto utilizando a diferenciação condrogênica de iPSC e a transdução de CEM com vetores lentivirais para que passem a expressar a proteína Cas9, contribuindo para a compreensão dos mecanismos genéticos das doenças do esqueleto e facilitando o uso da ferramenta CRISPR-Cas9 para seu estudo.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. R. (2015). Avaliação do potencial condrogênico em células-tronco mesenquimais da fração microvesicular de meio condicionado com cultura de condroblastos.

ANDREEN, N. K.; SCHLEIT, J.; BLOSSER, C. D.; DORSCHNER, M. O.; HISAMA, F. M.; SMITH, K. D. LMX1B-Associated Nephropathy With Type III Collagen Deposition in the Glomerular and Tubular Basement Membranes. *American Journal Of Kidney Diseases*, v. 72, n. 2, p. 296-301, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.09.023>.

CARINELLI, S.; BLANCO, O.; PERDOMO-RAMIREZ, A.; CLAVERIE-MARTIN, F. Nail-Patella syndrome with early onset end-stage renal disease in a child with a novel heterozygous missense mutation in the LMX1B homeodomain: a case report. *Biomedical Reports*, v. 13, n. 5, p. 1-1, 4 set. 2020. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/br.2020.1356>.

CARVALHO, T. G.; PELLEENZ, F. M.; LAUREANO, A.; da ROCHA SILLA, L. M.; GIUGLIANI, R.; BALDO, G.; MATTE, U. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*, v. 40, n. 3, p. 617-622, mar. 2018. DOI: 10.1007/s10529-018-2505-8. Epub 17 Jan 2018. PMID: 29344849.

CORRÒ, C.; NOVELLASDEMUNT, L.; LI, V.S.W. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020 Jul 1;319(1):C151-C165. doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020. Epub 2020 May 27. PMID: 32459504; PMCID: PMC7468890.

DICKS, A. R.; STEWARD, N.; GUILAK, F.; WU, C. L. Chondrogenic Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, v. 2598, p. 87-114, 2023. DOI: 10.1007/978-1-0716-2839-3_8. PMID: 36355287; PMCID: PMC9830630.

GUPTA, D.; BHATTACHARJEE, O.; MANDAL, D.; SEN, M. K.; DEY, D.; DASGUPTA, A.; KAZI, T. A.; GUPTA, R.; SINHARROY, S.; ACHARYA, K. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, v. 232, p. 116636, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>.

HOHENSTEIN, K. A. et al. Nucleofection® Mediates High-efficiency Stable gene Knockdown and Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells; *Stem Cells* First published online March 20, 2008; doi:10.1634/stemcells.2007-0857.

JIMÉNEZ-MORENO, Natalia et al. LIR-dependent LMX1A/LMX1B autophagy crosstalk shapes human midbrain dopaminergic neuronal resilience. *bioRxiv*, 636712, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1101/636712>.

KALLIFATIDIS, G; BECKERMANN, B M; A GROTH,; SCHUBERT, M; A APEL,; A KHAMIDJANOV,; RYSCHICH, E; WENGER, T; WAGNER, W; A DIEHLMANN,. Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Therapy*, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 231-240, 18 jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cgt.7701097>.

KELC, R.; NARANDA, J.; KUHTA, M.; VOGRI, M. Novel Therapies for the Management of Sports Injuries. In: *Current Issues in Sports and Exercise Medicine* [Internet]. InTech, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/53593>.

KITSERA, N.; KHOBTA, A.; EPE, B. Destabilized green fluorescent protein detects rapid removal of transcription blocks after genotoxic exposure. *Biotechniques*, v. 43, n. 2, RESEARCH REPORTS, 16 May 2018. <https://doi.org/10.2144/000112479>.

KNOTT, G. J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, v. 361, n. 6405, p. 866-869, 31 ago. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aat5011>.

KRAKOW, D. Skeletal Dysplasias. *Clinics In Perinatology*, v. 42, n. 2, p. 301-319, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2015.03.003>.

LUTHER, D. C.; LEE, Y. W.; NAGARAJ, H.; SCALETTI, F.; ROTELLO, V. M. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. *Expert Opinion On Drug Delivery*, v. 15, n. 9, p. 905-913, 2 set. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2018.1517746>.

MONACO, G.; HAJ, A. J. El; ALINI, M.; STODDART, M. J. Ex Vivo Systems to Study Chondrogenic Differentiation and Cartilage Integration. *Journal Of Functional Morphology And Kinesiology*, v. 6, n. 1, p. 6, 5 jan. 2021. MDPI AG.

<http://dx.doi.org/10.3390/jfmk6010006>.

MONTERO, J. A.; HURLÉ, J. M. Deconstructing digit chondrogenesis. *Bioessays*, 2007 Aug;29(8):725-37. DOI: 10.1002/bies.20607. PMID: 17621635.

MORTIER, G. R.; COHN, D. H.; CORMIER-DAIRE, V.; HALL, C.; KRAKOW, D.; MUNDLOS, S.; NISHIMURA, G.; ROBERTSON, S.; SANGIORGI, L.; SAVARIRAYAN, R. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *American Journal Of Medical Genetics Part A*, v. 179, n. 12, p. 2393-2419, 21 out. 2019. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.61366>.

PAZZAGLIA, U. E.; BELUFFI, G.; BENETTI, A.; BONDIONI, M. P.; ZARATTINI, G. A Review of the Actual Knowledge of the Processes Governing Growth and Development of Long Bones. *Fetal And Pediatric Pathology*, v. 30, n. 3, p. 199-208, 28 fev. 2011. Informa UK Limited.

POGUE, R.; SEBALD, E.; KING, L.; KRONSTADT, E.; KRAKOW, D.; COHN, D. H. A transcriptional profile of human fetal cartilage. *Matrix Biology*, v. 23, n. 5, p. 299-307, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2004.07.003>.

POLLA, Daniel L.; CARDOSO, Maria T. O.; SILVA, Mayara C. B.; CARDOSO, Isabela C. C.; MEDINA, Cristina T. N.; ARAUJO, Rosenelle; FERNANDES, Camila C.; REIS, Alessandra M. M.; ANDRADE, Rosangela V. de; PEREIRA, Rinaldo W.. Use of Targeted Exome Sequencing for Molecular Diagnosis of Skeletal Disorders. *Plos One*, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 0138314-0, 18 set. 2015. Public Library of Science (PLoS).

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138314>.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; SCOTT, D. A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.

MANRIQUE, A. L. Avaliação de protocolo de diferenciação de condrócitos a partir de células-tronco com pluripotência induzida e células-tronco mesenquimais. Monografia, Universidade Católica de Brasília. Dezembro de 2018.

MORELLO, R.; SCOTT, D.; LEE, B. Nail-Patella Syndrome. *Genetic Diseases Of The Kidney*, p. 545-557, 2009. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-449851-8.00031-0>.

SHARMA, G.; SHARMA, A. R.; BHATTACHARYA, M.; LEE, S. S.; CHAKRABORTY, C. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Molecular Therapy*, v. 29, n. 2, p. 571-586, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.028>.

SHAH, Lekha; TIRELLA, Annalisa. Engineered in vitro models: mimicking in vivo physiology. *Biomedical Product And Materials Evaluation*, [S.L.], p. 555-609, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-823966-7.00002-5>.

SKRETI, G.; BEI, E. S.; KALANTZAKI, K.; ZERVAKIS, M. Temporal and Spatial Patterns of Gene Profiles during Chondrogenic Differentiation. *Ieee Journal Of Biomedical And Health Informatics*, v. 18, n. 3, p. 799-809, maio 2014. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/jbhi.2014.2305770>.

STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, v. 58, n. 4, p. 568-574, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>.

SHI, B., XUE, M., WANG, Y., WANG, Y., LI, D., ZHAO, X., & LI, X. (2018). An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 10(2), 95-104. Disponível em: www.ijppp.org /ISSN:1944-8171/IJPPP0076908

VAN GOOL, S. A.; EMONS, J. A. M.; LEIJTEN, J. C. H.; DECKER, E.; STICHT, C.; VAN HOUWELINGEN, J. C.; GOEMAN, J. J.; KLEIJBURG, C.; SCHERJON, S. A.; GRETZ, N. Fetal Mesenchymal Stromal Cells Differentiating towards Chondrocytes Acquire a Gene Expression Profile Resembling Human Growth Plate Cartilage. *Plos One*, v. 7, n. 11, p.

44561-0, 5 nov. 2012. Public Library of Science (PLoS).

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044561>.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663-676, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

MA, Y.; YUAN, J.; CHANG, X. Genetic Modulation of RNA Splicing with a CRISPR-Guided Cytidine Deaminase. *Star Protocols*, v. 1, n. 1, p. 100005, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xpro.2019.100005>.

SHIMIZU, H.; YOKOYAMA, S.; ASAHARA, H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ*, 2007 Aug;49(6):449-54. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2007.00945.x. PMID: 17661739.

ZAKRZEWSKI, W.; DOBRZYŃSKI, M.; SZYMONOWICZ, M. et al. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*, v. 10, 68 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.

YUMLU, Saniye; STUMM, Jürgen; BASHIR, Sanum; DREYER, Anne-Kathrin; LISOWSKI, Pawel; DANNER, Eric; KÜHN, Ralf. Gene editing and clonal isolation of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9. *Methods*, [S.L.], v. 121-122, p. 29-44, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.05.009>.

9. Material Suplementar

9.1. Alinhamento das sequências recebidas iPSC

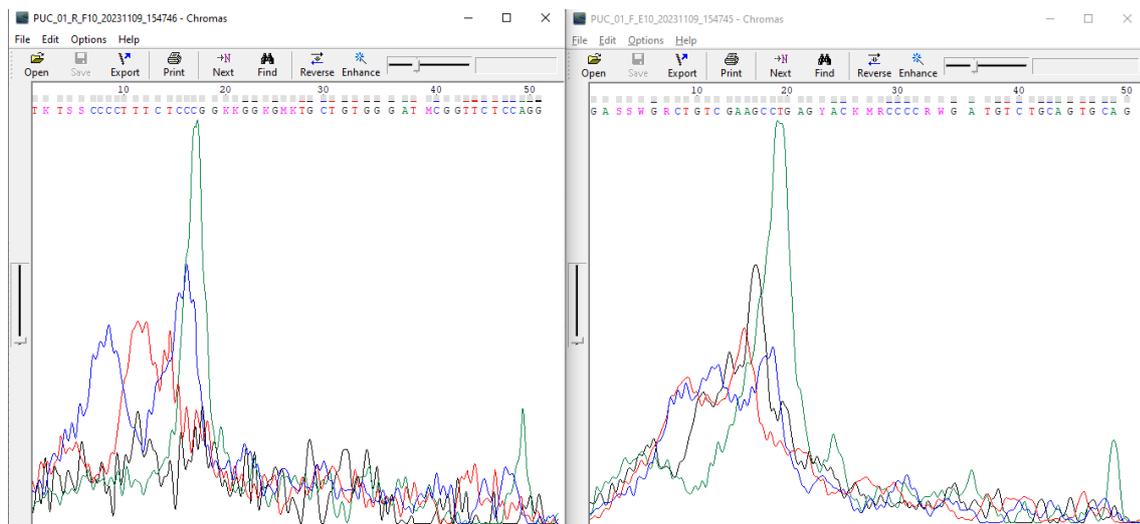
Amostra 1 (Éxon 2)

>PUC_01_F

GASSWGRCTGTCGAAGCCTGAGYACKMRCCCRWGATGTCTGCAGTGCAG

>PUC_01_R

TKTSSCCCCTTTCTCCCGGKKGKGMKTGCTGTGGGATMCGGTTCTCCAGG



Amostra 2 *Forward* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 911 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
211 bits(114)	3e-50	121/125(97%)	2/125(1%)	Plus/Plus
Query 20	GGGCGCTGGARTGCGTGTAC-ACCTGGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGARCGGCAG	78		
Sbjct 911	GGGCGCTGGAGTGCCTGTACACCT-GGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAG	969		
Query 79	CTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC	138		
Sbjct 970	CTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC	1029		
Query 139	GAGAA 143			
Sbjct 1030	GAGAA 1034			

Amostra 2 Reverse (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 991 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
219 bits(118)	2e-52	119/120(99%)	0/120(0%)	Plus/Minus
Query 21	CGAATTCGTCGCCCTTGCCTAGCTGCCGYTCACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT	80		
Sbjct 991	CGAATTCGTCGCCCTTGCCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT	932		
Query 81	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	140		
Sbjct 931	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	872		

Amostra 3 Forward (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 719 to 979 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	6e-116	250/261(96%)	0/261(0%)	Plus/Plus
Query 70	GGGGCCGCACGGCCCTTGGCGCGKCGGTCTGGGCAGCGCAGGCGGTAGGCGGTGATCCGG	129		
Sbjct 719	GGGGCCGCCCGGCCCTTGGCGCGCGGTCCGGGAGCGCAGGCGGAGGCGGTGATCCCG	778		
Query 130	GGCGGSCKAGCCCTCAGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCT	189		
Sbjct 779	GGCGGCCCGGAGCCCTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCT	838		
Query 190	GGGCCGGGCGCGCTGACGGCCGGGCTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCCG	249		
Sbjct 839	GGGCCGGGCGCGCTGACGGCCGGGCTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCCG	898		
Query 250	CATCCCGCCGTCTGCGAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTC	309		
Sbjct 899	CATCCCGCCGTCTGCGAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTC	958		
Query 310	AACGAGTCGTCCTRGACACRAG	330		
Sbjct 959	AACGAGTCGTCCTGGCACGAG	979		

Amostra 3 Reverse (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 924 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
529 bits(286)	2e-145	289/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Minus
Query 52	TGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGKATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTMGCGCACAGGGCGAAA			111
Sbjct 924	TGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAA			865
Query 112	GCCCGGYCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGC			171
Sbjct 864	GCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGC			805
Query 172	CCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCGGAC			231
Sbjct 804	CCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCGGAC			745
Query 232	CGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGTAGTCCGTCAGTCCCGGGCTCCGGCGTG			291
Sbjct 744	CGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGTAGTCCGTCAGTCCCGGGCTCCGGCGTG			685
Query 292	GAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCTGTGCTCTCCCTTCTCC			343
Sbjct 684	GAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCTGTGCTCTCCCTTCTCC			633

Amostra 5 Reverse (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 923 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
516 bits(279)	2e-141	285/291(98%)	0/291(0%)	Plus/Minus
Query 57	GGCAGCMCTCGCAGAYGSGGGATGCGGGCAGTCGGAKCCTGTAKCGCACAGGGCGAAAG			116
Sbjct 923	GGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAG			864
Query 117	CCCGGYCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCC			176
Sbjct 863	CCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCC			804
Query 177	CTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCGGACC			236
Sbjct 803	CTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCGGACC			744
Query 237	GCCCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGTAGTCCGTCAGTCCCGGGCTCCGGCGTGG			296
Sbjct 743	GCCCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGTAGTCCGTCAGTCCCGGGCTCCGGCGTGG			684
Query 297	AGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCTGTGCTCTCCCTTCTCC			347
Sbjct 683	AGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCTGTGCTCTCCCTTCTCC			633

Amostra 6 Forward (Éxon 3)

PREDICTED: Gorilla gorilla gorilla LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant X4, mRNA

Sequence ID: [XM_055351929.1](#) Length: 6042 Number of Matches: 1

Range 1: 646 to 766 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Related Inform
[Genome Data Vie](#)
genomic context

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
209 bits(113)	1e-49	121/124(98%)	3/124(2%)	Plus/Plus
Query 17	CGCTGGGAGTGCGTGTACACCTGGGCCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAGCGGCAGC	76		
Sbjct 646	CGCT-GGAGTGCGTGTACACCTGGGC-TG-CTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAGCGGCAGC	702		
Query 77	TACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	136		
Sbjct 703	TACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	762		
Query 137	AGAA 140			
Sbjct 763	AGAA 766			

Amostra 6 Reverse (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 872 to 987 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
158 bits(85)	4e-34	111/124(90%)	8/124(6%)	Plus/Minus
Query 27	TTCGKCGCCCTTGCCTAGCKGGCSGYTTCMMACAMCGCAGGCAGGCAGAARGCAAGCCCC	86		
Sbjct 987	TTCGTCGCCCTTGCCTAGC-TGCCG-TTCACACA-CGCA-GCA-GCAGAA-GC-AG-CCC	936		
Query 87	AGGTGGTACACGCACCTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATG	146		
Sbjct 935	AGGTGGTACACGCACCTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATG	876		
Query 147	CAGC 150			
Sbjct 875	CAGC 872			

Amostra 8 Forward (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 914 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
211 bits(114)	3e-50	119/122(98%)	1/122(0%)	Plus/Plus
Query 23	CGCTGGGAGTGCGTGTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGARCAGGAGCTA	82		
Sbjct 914	CGCT-GGAGTGCGTGTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTA	972		
Query 83	CGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACRAG	142		
Sbjct 973	CGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAG	1032		
Query 143	AA 144			
Sbjct 1033	AA 1034			

Amostra 8 Reverse (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 872 to 996 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
180 bits(97)	9e-41	121/133(91%)	8/133(6%)	Plus/Minus
Query 16	GAGACASGAAWTTCGGTCGCCCC	TTGCGWRGCTGGCCSGSTT	CACACACGCRGCAAGCAGA	75
Sbjct 996	GAG-CACGAA-TTC-GTCGCCCTT	GCGTAGCTG-CC-G-TTCACAC	CGCAGCA-GCAG-	945
Query 76	AAGCAGCCAGGTGGTACACGCACT	CCAGCGCCCGCATCACGA	ACTCGGTGGGGGCGATC	135
Sbjct 944	AAGCAGCCAGGTGGTACACGCACT	CCAGCGCCCGCATCACGA	ACTCGGTGGGGGCGATC	885
Query 136	TTCTCCATGCAGC		148	
Sbjct 884	TTCTCCATGCAGC		872	

Amostra 10 Forward (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 914 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
198 bits(107)	2e-46	119/125(95%)	4/125(3%)	Plus/Plus
Query 26	CGCTGGAGTGCCTGWMCCACCCTGGGCTGCTTTCTTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGC			85
Sbjct 914	CGCTGGAGTGCCTGTACCACC-TGGGCTGC-TTC-TGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGC			970
Query 86	TACGCAAGGGCCACGAAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC			145
Sbjct 971	TACGCAAGGGCCACG-AATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC			1029
Query 146	GAGAA		150	
Sbjct 1030	GAGAA		1034	

Amostra 10 Reverse (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 872 to 990 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
183 bits(99)	7e-42	116/124(94%)	6/124(4%)	Plus/Minus
Query 22	GAATTCGTCG-CCTTGCGRGCTGCCCGYTCACACACGCCAGGCAGCAGAAAGGCAGCCC			80
Sbjct 990	GAATT-CGTCGCCCTTGCCTAGCTGCC-GTTACACACGC-A-GCAGCAGAA-GCAGCCC			936
Query 81	AGGTGGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGA	ACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG		140
Sbjct 935	AGGTGGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGA	ACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG		876
Query 141	CAGC		144	
Sbjct 875	CAGC		872	

Amostra 11 *Forward* (Éxon 2)

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 698 to 989 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
427 bits(231)	8e-115	270/293(92%)	7/293(2%)	Plus/Plus
Query 51	GAGKACYGGGACGGACGAKCCGGGGCCGCCSGGCCCTGGYGCGGCGGTCCGGGGAGCGC	110		
Sbjct 698	GAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTGGCGCGGCGGTCCGGGGAGCGC	757		
Query 111	AG-CGG-AGGCRGTGATCCC-AGCGGCCCGAGCCCTCRGGGCCGARGGCTGTGGGCCCGG	167		
Sbjct 758	AGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCCGCCGAGCCCTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGG	817		
Query 168	-GCRACCGGGA-GCCGGGGCTGGGCCGGGCGCGCTGARGGCCGGGCTTTC-CCCTGTGC	224		
Sbjct 818	TGGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCGGGCGCGCTGACGGCCGGGCTTTCGCCCTGTGC	877		
Query 225	GCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGGTGCCAGCGGCCATCTCC	284		
Sbjct 878	GCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGGTGCCAGCGGCCATCTCC	937		
Query 285	GACCGCTTCTTGATGCGAGTCAACRAGTCGTCCGGGCACGRGGAGTGTTC	337		
Sbjct 938	GACCGCTTCTTGATGCGAGTCAACRAGTCGTCCGGGCACGAGG-AGTGTTC	989		

Amostra 12 *Forward* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 915 to 1031 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
176 bits(95)	1e-39	115/124(93%)	7/124(5%)	Plus/Plus
Query 24	GCTGGRTGCGTGTAAACACCTTGGGCTGCTTTCTTGCTTGCTGCGGTGTGAARCGCA	83		
Sbjct 915	GCTGGAGTGGCGTGA-CCACC-TGGGCTGC-TTC-TGC-TGCTGCGTGTGTAA-CGGC-	967		
Query 84	AGCTACGCAAGGGCGACGAATTCTGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAARGGTGACT	143		
Sbjct 968	AGCTACGCAAGGGCGACGAATTCTGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAARGGTGACT	1027		
Query 144	ACGA 147			
Sbjct 1028	ACGA 1031			

Amostra 12 *Reverse* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 871 to 989 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
167 bits(90)	7e-37	111/124(90%)	5/124(4%)	Plus/Minus
Query 20	AATTCCGTCGCCCTTGCCTARGCTGCCGGYTCAMMCAGCCAGCAGCARAARCARCCA	79		
Sbjct 989	AATT-CGTGC-CCCTTGGCTA-GCTGCC-GTTCACACAGC-CAGCAGCAGAAGCAGCCCA	935		
Query 80	GGTGGTACACGCCTCCAGCGCCCGCATCACRAACTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATGC	139		
Sbjct 934	GGTGGTACACGCCTCCAGCGCCCGCATCACGAACCTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATGC	875		
Query 140	ARCC 143			
Sbjct 874	AGCC 871			

Amostra 14 *Forward* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 915 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	3e-45	117/123(95%)	3/123(2%)	Plus/Plus
Query 26	GCKGGARTGCGTGTACCACCCCTGGGCTTGCTTYYTGGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCT	85		
Sbjct 915	GCTGGAGTGCCTGTACCACC-TGGGC-TGCTT-CTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCT	971		
Query 86	ACGCAAGGGCGACGAATTCTGTCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGA	145		
Sbjct 972	ACGCAAGGGCGACGAATTCTGTCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGA	1031		
Query 146	GAA 148			
Sbjct 1032	GAA 1034			

Amostra 15 *Forward* (Éxon 2)

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 695 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
466 bits(252)	2e-126	290/309(94%)	10/309(3%)	Plus/Plus
Query 49	CCCGAGGACTGGGGACGGGAAGTAGCCGGGGCCGCCGGGCCCTGGCGCGGGGGT-CGG	107		
Sbjct 695	CCCGAGGACT-GGGAC-GG-ACTAGCC-GGGGCCGCCGGCCCTGGCGCGGGGGTCCGG	750		
Query 108	GGAGCGCAGGCGGCAAGCGGGTGAACCCGGGGCGGCCGAGCCCTGGGGCCGARGGCTG	167		
Sbjct 751	GGAGCGCAGGCGGCAAGCGGGTGAACCCGGGGCGGCCGAGCCCTGGGGCCGARGGCTG	808		
Query 168	TGGGCCCGGKGCGRACCCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGGCGGCTGACGGCCGGGGCTT	227		
Sbjct 809	TGGGCCCGGTGCG-ACCGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGGCGGCTGACGGCC-GGGCTT	866		
Query 228	TCSCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGGCTGCCAGC	287		
Sbjct 867	TCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGGCTGCCAGC	926		
Query 288	GGCCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCTGGCACRRRGAGTGT	347		
Sbjct 927	GGCCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCTGGCACGA-GGAGTGT	985		
Query 348	TTGMAGTGC 356			
Sbjct 986	TTGCAGTGC 994			

Amostra 16 *Forward* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 923 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
161 bits(87)	3e-35	109/119(92%)	8/119(6%)	Plus/Plus
Query 31	GCGTGTAMCACCTGGGGCYTGCTTCTGCTTGTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTACGAA	90		
Sbjct 923	GCGTGTACCACCTGGG-C-TG-CTTCTGC-TGCTGCGTGTGTGAACGG-CAGCTACGC-A	976		
Query 91	AGGGCGACRAATTCTGTGCTCAAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC-AGAA	148		
Sbjct 977	AGGGCGACGAATTCTGTGCTCAAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGAA	1034		

Amostra 16 Reverse (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 1006 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
183 bits(99)	7e-42	124/138(90%)	4/138(2%)	Plus/Minus
Query 9	GGCCCCCTTTGAAAACSAATTCGTCGCCCCCTTTGCGTAGSTGGCSGYTCACA-ACRCAGCA	67		
Sbjct 1006	GGCCCTCCTTGAGCACGAATTCGTCGCCCCCTT-GCGTAGCT-GCCGTTACACACGCAGCA	949		
Query 68	GCAAAAGCAGCCAGGTGGTACACGCACTCCAGCGGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGG	127		
Sbjct 948	GCAGAAGCAGCCAGGTGGTACACGCACTCCAGCG-CCCGCATCACGAACTCGGTGGGGG	890		
Query 128	CGATCTTCTCCATGCAGC	145		
Sbjct 889	CGATCTTCTCCATGCAGC	872		

Amostra 17 Forward (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 681 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
534 bits(289)	4e-147	306/316(97%)	4/316(1%)	Plus/Plus
Query 31	TCTCCMCGCCGGAGGCCCGAGGACTGGGASGGACTAGCC-GGGCCGCCGGCCCCCTGGCG	89		
Sbjct 681	TCTCCACGCCGGA-GCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTGGCG	739		
Query 90	CGGCGGGTCCGGGGAGCG-MRGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCCGAGCCCTCAGGG	148		
Sbjct 740	CGGCGG-TCCGGGGAGCGCAGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCCGAGCCCTCAGGG	798		
Query 149	CCGAGGGCTGTGGGCCCCGGTGCACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGGCCTGACGG	208		
Sbjct 799	CCGAGGGCTGTGGGCCCCGGTGCACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGGCCTGACGG	858		
Query 209	CCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCCGCTGCGAGGG	268		
Sbjct 859	CCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCCGCTGCGAGGG	918		
Query 269	CTGCCAGCGGCCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCGGCACRA	328		
Sbjct 919	CTGCCAGCGGCCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCGGCACGA	978		
Query 329	GGAGTGTTCAGTGC	344		
Sbjct 979	GGAGTGTTCAGTGC	994		

Amostra 17 Revers (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 952 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
542 bits(293)	3e-149	313/324(97%)	5/324(1%)	Plus/Minus
Query 21	CATCATGAAGSGGTCGGGAGATGGGGCCCGCNRGCA			79
Sbjct 952	CATCAGGAAGCGGTCGG-AGAT-GGG-CCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGG-ATGCG			897
Query 80	GGCAGTCGGAGCCTGTAKCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAG			139
Sbjct 896	GGCAGTCGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAG			837
Query 140	CCCCGGCGTCCCAGTCCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGGAGGGCTCGGGCCGCCG			199
Sbjct 836	CCCCGGCGTCCCAGTCCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGGAGGGCTCGGGCCGCCG			777
Query 200	GGATCACCGCTGCGCGCTGCGCTCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGGCCGGCGGCCCGG			259
Sbjct 776	GGATCACCGCTGCGCGCTGCGCTCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGGCCGGCGGCCCGG			717
Query 260	CTAGTCCGTCACAGTCTCCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCCTCGAGCCTTGGCT			319
Sbjct 716	CTAGTCCGTCACAGTCTCCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCCTCGAGCCTTGGCT			657
Query 320	CGGCGCTGTGCTCTCCCTTCTCC	343		
Sbjct 656	CGGCGCTGTGCTCTCCCTTCTCC	633		

Amostra 18 Forward (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 914 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	6e-52	120/121(99%)	1/121(0%)	Plus/Plus
Query 14	CGCTGGAGTGCCTGTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTG-ACGGCAGCTAC			72
Sbjct 914	CGCTGGAGTGCCTGTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTAC			973
Query 73	GCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGA			132
Sbjct 974	GCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGA			1033
Query 133	A	133		
Sbjct 1034	A	1034		

Amostra 18 Reverse (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 989 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
206 bits(111)	1e-48	117/120(98%)	2/120(1%)	Plus/Minus
Query 24	AATTCGTCGCCCTTGGCTAGCTTGGCCGYTCACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT			83
Sbjct 989	AATTCGTCGCCCTTGGCTAGCT--GCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT			932
Query 84	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			143
Sbjct 931	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			872

Amostra 20 *Forward* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 911 to 1029 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
169 bits(91)	2e-37	110/119(92%)	5/119(4%)	Plus/Plus
Query 17	GGGCGCTGGAKTGC	GTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTG-ACGGCARC	75	
Sbjct 911	GGGCGCTGGAGTGC	GTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGC	970	
Query 76	TACGCAAGGGCGAC	GAATTC-TGCTCAAG-AGGGCCA-CTGCTGTGCA-GGGTGACTAC	130	
Sbjct 971	TACGCAAGGGCGAC	GAATTCGCTCTAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC	1029	

Amostra 20 *Reverse* (Éxon 3)

Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA

Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1

Range 1: 872 to 990 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
187 bits(101)	5e-43	117/124(94%)	6/124(4%)	Plus/Minus
Query 25	GAATTCGGTTCG-	CCTTGCCTAGGCTGCCGYTCACAACACGGCAGCAGCAGAAGGCAGCCC	83	
Sbjct 990	GAATTC-GTCGCC	CTTGCCTAGGCTGCCGYTCACAACACGGCAGCAGCAGAAGGCAGCCC	936	
Query 84	AGGTGGTACACGCA	CTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG	143	
Sbjct 935	AGGTGGTACACGCA	CTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG	876	
Query 144	CAGC	147		
Sbjct 875	CAGC	872		

Amostra 23 *Forward* (Éxon 2)

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 705 to 976 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
316 bits(171)	2e-81	243/278(87%)	17/278(6%)	Plus/Plus
Query 55	GGGACGGRMCTRGM	CCCCGGGCCCCGGGCGGCGGTCGGGGAGCGCAWGGC	114	
Sbjct 705	GGGACGG-ACTAG-	CCGGGGCCCGCCGGCCCTGGGCGGCGGTCGGGGAGCGCA-GGC	761	
Query 115	CGCA-GCGGTGGAT	CCCCGGGCGGCCCCGA-CCCTCCRGGCCCRAGGCTGTGGGCCCCG-T-	170	
Sbjct 762	GGCAGGCGGT-GAT-	CCCGGGCGGCCCCGAGCCCTCGGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCCGGTG	819	
Query 171	CGMACGGGACGCC-	GGGCTGGGCGGGCG-CGCTGACGGGCCGGGCTTTCGCCGTGTGC-	227	
Sbjct 820	CGACCGGACGCCC	GGGCTGGGCGGGCG-CGCTGACGGGCCGGGCTTTCGCCCTGTGCG	878	
Query 228	CTA-RGGCTCCGACT	GCCCCGCATCCCCCGCTGTGC-AGGGCTGCCA-CGG-CCATCTCCG	283	
Sbjct 879	CTACAGGCTCCGACT	GCCCCGCATCCCCCGCTGTGCAGGGGCTGCCAGCGGCCCATCTCCG	938	
Query 284	ACCGCTTCCTGATG	CGAGTACGGAGTCGTCTGGGAC	321	
Sbjct 939	ACCGCTTCCTGATG	CGAGTCAACGAGTCGTCTGGGAC	976	

Amostra 25 Forward (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 697 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	7e-140	292/301(97%)	4/301(1%)	Plus/Plus
Query 43	CGAGGTASTWGGGACGGACTAGCCGGGGCCGGCCGGGCCCTGGSGCGGCGGTCCGGGGA	102		
Sbjct 697	CGAGG- ACT- GGGACGGACTAGCCGGGGCC- GCCCGGCCCTGGCGCGGCGGTCCGGGGA	753		
Query 103	GCGCA- GCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCRGGGCCGAGGGCTGTGGGC	161		
Sbjct 754	GCGCAGGCGGCGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGGGGCCGAGGGCTGTGGGC	813		
Query 162	CCGGTGCACCGGGACGCCGGGCTGGGCCGGCGGCGTGACGGCSGGGCTTTCGCCCT	221		
Sbjct 814	CCGGTGCACCGGGACGCCGGGCTGGGCCGGCGGCGTGACGGCSGGGCTTTCGCCCT	873		
Query 222	GTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCCGTCTGCGAGGGCTGCCAGCGGCCAT	281		
Sbjct 874	GTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCCGTCTGCGAGGGCTGCCAGCGGCCAT	933		
Query 282	CTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCACGAGGAGTGTTCAGATG	341		
Sbjct 934	CTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCACGAGGAGTGTTCAGATG	993		
Query 342	C 342			
Sbjct 994	C 994			

Amostra 25 Reverse (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 952 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
555 bits(300)	3e-153	312/321(97%)	2/321(0%)	Plus/Minus
Query 14	CATCAYGGAAGCRGTCTRGAGATGGGYCKTRGCAGCMCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGC	73		
Sbjct 952	CATCA- GGAAGCGGTCGGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGC	894		
Query 74	AGTCGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTACGCGCCGCCCGGCCAGCCC	133		
Sbjct 893	AGTCGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTACGCGCCGCCCGGCCAGCCC	834		
Query 134	-GRCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCGGGA	192		
Sbjct 833	CGGCGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCGGGA	774		
Query 193	TCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTA	252		
Sbjct 773	TCACCGCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTA	714		
Query 253	GTCCGTCCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCCTCGG	312		
Sbjct 713	GTCCGTCCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCCTCGG	654		
Query 313	CGCTGTGCTCTCCCTTCTCC 333			
Sbjct 653	CGCTGTGCTCTCCCTTCTCC 633			

Amostra 26 Forward (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 922 to 1029 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
150 bits(81)	7e-32	104/114(91%)	8/114(7%)	Plus/Plus
Query 32	TGCGTGT-CCMCCTGGGGCCTGCCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCCTACGCAA			90
Sbjct 922	TGCGTGTACCACCT-GGG-CTG-CTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAG-CTACGCAA			977
Query 91	GGGCGACGAAATTCCTGGCTCAAGGAGGG-CAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC			143
Sbjct 978	GGGCGACGAA-TTCGT-GCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC			1029

Amostra 26 Reverse (Éxon 3)**Human ORFeome Gateway entry vector pENTR223-LMX1B, complete sequence**Sequence ID: [LT739223.1](#) Length: 3906 Number of Matches: 1Range 1: 768 to 886 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
198 bits(107)	2e-46	115/120(96%)	2/120(1%)	Plus/Minus
Query 22	GAATTCSTCGCCCTTGGTAGCTGCCGSTC-CACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGGGK			80
Sbjct 886	GAATTCGTCGCCCTTGGTAGCTGCCGCTCACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGG-T			828
Query 81	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			140
Sbjct 827	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			768

Amostra 28 Reverse (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 988 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
206 bits(111)	1e-48	115/117(98%)	1/117(0%)	Plus/Minus
Query 26	ATTCGTGCG-CCTTGGTAGCTGCCGYTCACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGGTGGT			84
Sbjct 988	ATTCGTGCGCCTTGGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGGTGGT			929
Query 85	ACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			141
Sbjct 928	ACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			872

Amostra 29 Reverse (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 944 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
492 bits(266)	3e-134	305/323(94%)	14/323(4%)	Plus/Minus
Query 26	AGCRGGTCGGTAGATGGGGCCGGCAWGGCAGCCCTCGCAGACGGGCGGGATGCGGGGCAR			85
Sbjct 944	AGC-GGTCGG-AGAT-GGGCC-GC-TGGCAGCCCTCGCAGACGG-CGGGATGC-GGGCA-			893
Query 86	GTCKGAGCCYTGTARCGCACAGGGCGAAAGCC-GGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAG-C			143
Sbjct 892	GTCGGAGCC-TGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCC-GGCCAGCC			835
Query 144	CCGGCGTCCCGGTGCGACCCGGGCCACAGCCCTCGGCC-CGAGGGCTCGGGCCGCCCGGG			202
Sbjct 834	CCGGCGTCCCGGTGCGACCCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGG			775
Query 203	ATCACCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCGGGCGGGCCCGGST			262
Sbjct 774	ATCACCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCGGGCGGGCCCGGST			715
Query 263	AGTCCGTCCAGTCTCGGGCTCGGGCTGGAGAGGCCGCGGGGCTCGAGCCTTGCTC			322
Sbjct 714	AGTCCGTCCAGTCTCGGGCTCGGGCTGGAGAGGCCGCGGGG-CCTCGAGCCTTGCTC			656
Query 323	GGCGCTGTGCTCTCCCCTTCTCC	345		
Sbjct 655	GGCGCTGTGCTCTCCCCTTCTCC	633		

Amostra 30 Forward (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 916 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	3e-45	116/121(96%)	4/121(3%)	Plus/Plus
Query 25	CTGGARTGCGGTACCACCTGGGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTG-ACGGCAGCTAC			83
Sbjct 916	CTGGAGTGCCTGTACCACCT--GGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTAC			973
Query 84	GCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAA-GAGGGCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGA			142
Sbjct 974	GCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGA			1033
Query 143	A 143			
Sbjct 1034	A 1034			

Amostra 38 Reverse (Éxon 3)**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 989 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
191 bits(103)	4e-44	113/120(94%)	2/120(1%)	Plus/Minus
Query 23	AATTCGTCGCCCTTGGCGTARCTTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT			82
Sbjct 989	AATTCGTCGCCCTTG-CGTAGC-TGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT			932
Query 83	GGTACACGCACTCCAGCGCCGCATCACGAACCTCGGTGGGGGCRATKTKMTCATGCAGC			142
Sbjct 931	GGTACACGCACTCCAGCGCCGCATCACGAACCTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC			872

Amostra 39 Forward (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 674 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
422 bits(228)	3e-113	292/324(90%)	14/324(4%)	Plus/Plus
Query 17	CGCCGCACTCT-CMCgcccggagyc	CGCCGCACTCT-CMCgcccggagyc	CGCCGCACTCT-CMCgcccggagyc	CGCCGCACTCT-CMCgcccggagyc
Sbjct 674	CGCGGC-CTCTCCACGCCGGAG-CCC	CGCGGC-CTCTCCACGCCGGAG-CCC	CGCGGC-CTCTCCACGCCGGAG-CCC	CGCGGC-CTCTCCACGCCGGAG-CCC
Query 74	cctggggcgccggggcgggggGCGCAGG	cctggggcgccggggcgggggGCGCAGG	cctggggcgccggggcgggggGCGCAGG	cctggggcgccggggcgggggGCGCAGG
Sbjct 732	CCCTGGCGCGGCGTCCGGGAGCGCAGG	CCCTGGCGCGGCGTCCGGGAGCGCAGG	CCCTGGCGCGGCGTCCGGGAGCGCAGG	CCCTGGCGCGGCGTCCGGGAGCGCAGG
Query 132	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG
Sbjct 792	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG	CTCGGGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTG
Query 190	CTGACRGC	CTGACRGC	CTGACRGC	CTGACRGC
Sbjct 852	CTGACRGC	CTGACRGC	CTGACRGC	CTGACRGC
Query 248	TGC-A-GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGC-A-GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGC-A-GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGC-A-GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC
Sbjct 911	TGCAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGCAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGCAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC	TGCAGGGCTGCCAGCGGCCATCTCCGAC
Query 306	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC
Sbjct 971	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC	TGGCACRAGGAGTGTTCGAGTGC

Amostra 41 Forward (Éxon 2)**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 762 to 868 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
106 bits(57)	3e-18	90/107(84%)	4/107(3%)	Plus/Minus
Query 103	GAAAGCTCGG-CWTTTGC	GAAAGCTCGG-CWTTTGC	GAAAGCTCGG-CWTTTGC	GAAAGCTCGG-CWTTTGC
Sbjct 868	GAAAGCCGGCCGTCAGCGCCGCGCCAG	GAAAGCCGGCCGTCAGCGCCGCGCCAG	GAAAGCCGGCCGTCAGCGCCGCGCCAG	GAAAGCCGGCCGTCAGCGCCGCGCCAG
Query 159	CRGCCCTGGGACCCKAGGGCTCGGGCC	CRGCCCTGGGACCCKAGGGCTCGGGCC	CRGCCCTGGGACCCKAGGGCTCGGGCC	CRGCCCTGGGACCCKAGGGCTCGGGCC
Sbjct 808	CAGCCCTCGGCCCCGAGGGCTCGGGCC	CAGCCCTCGGCCCCGAGGGCTCGGGCC	CAGCCCTCGGCCCCGAGGGCTCGGGCC	CAGCCCTCGGCCCCGAGGGCTCGGGCC

9.2. Alinhamento das sequências recebidas HEK293T

Amostra 1 - Éxon 2 forward

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 938 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	4e-154	305/306(99%)	1/306(0%)	Plus/Minus
Query 30	CGGA-ATGGGCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAG	88		
Sbjct 938	CGGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAG	879		
Query 89	CGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCGGCGTCCCGGTCCG	148		
Sbjct 878	CGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCGGCGTCCCGGTCCG	819		
Query 149	ACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCC	208		
Sbjct 818	ACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCTGCCGCC	759		
Query 209	TGCGCTCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAGTCCT	268		
Sbjct 758	TGCGCTCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAGTCCT	699		
Query 269	CGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGCGCTGTGCTCTCCC	328		
Sbjct 698	CGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGCGCTGTGCTCTCCC	639		
Query 329	TTCTCC 334			
Sbjct 638	TTCTCC 633			

Amostra 1 - Éxon 2 reverse

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 677 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
588 bits(318)	3e-163	318/318(100%)	0/318(0%)	Plus/Plus
Query 21	GGCCTCTCCACGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGCCCTG	80		
Sbjct 677	GGCCTCTCCACGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGCCCTG	736		
Query 81	GCGCGGCGGTCCGGGAGCGCAGGCGGCGAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG	140		
Sbjct 737	GCGCGGCGGTCCGGGAGCGCAGGCGGCGAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG	796		
Query 141	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGGCGTGAC	200		
Sbjct 797	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGGCGTGAC	856		
Query 201	GGCCGGGCTTTGCGCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG	260		
Sbjct 857	GGCCGGGCTTTGCGCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG	916		
Query 261	GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC	320		
Sbjct 917	GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC	976		
Query 321	GAGGAGTGTTCAGTGC 338			
Sbjct 977	GAGGAGTGTTCAGTGC 994			

Amostra 2 - Éxon 2 forward

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 677 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
588 bits(318)	3e-163	318/318(100%)	0/318(0%)	Plus/Plus
Query 21	GGCCTCTCCACGCCGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGCCCTG			80
Sbjct 677	GGCCTCTCCACGCCGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGCCCTG			736
Query 81	GCGCGGCGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG			140
Sbjct 737	GCGCGGCGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG			796
Query 141	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCGGGCGGCGCTGAC			200
Sbjct 797	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCGGGCGGCGCTGAC			856
Query 201	GGCCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG			260
Sbjct 857	GGCCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG			916
Query 261	GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC			320
Sbjct 917	GGCTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGCTTCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC			976
Query 321	GAGGAGTGTTCAGTGC	338		
Sbjct 977	GAGGAGTGTTCAGTGC	994		

Amostra 2 - Éxon 2 reverse

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 946 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
551 bits(298)	6e-152	309/314(98%)	2/314(0%)	Plus/Minus
Query 33	GAA-CGGTCGGA-AAGGGCCGATGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGCTGCGGGCAGTCGGA			90
Sbjct 946	GAAGCGGTTCGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGA			887
Query 91	GCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTC			150
Sbjct 886	GCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTC			827
Query 151	CCGGTCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGC			210
Sbjct 826	CCGGTCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGC			767
Query 211	CTGCCGCCTGCGCTCCCGGACCGCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTC			270
Sbjct 766	CTGCCGCCTGCGCTCCCGGACCGCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTC			707
Query 271	CCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCCTCGAGCCTTGGCTCGGCGCTGTG			330
Sbjct 706	CCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCCTCGAGCCTTGGCTCGGCGCTGTG			647
Query 331	CTCTCCCCTTCTCC	344		
Sbjct 646	CTCTCCCCTTCTCC	633		

Amostra 3 - Éxon 2 forward

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 679 to 993 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
575 bits(311)	3e-159	314/315(99%)	1/315(0%)	Plus/Plus
Query 26	CCTCT-CACGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTGGC			84
Sbjct 679	CCTCTCACGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTGGC			738
Query 85	GCGGGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTGGGG			144
Sbjct 739	GCGGGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTGGGG			798
Query 145	CCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGGCGGCTGACGG			204
Sbjct 799	CCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGGCGGCTGACGG			858
Query 205	CCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGG			264
Sbjct 859	CCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAGGG			918
Query 265	CTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCTGGCACGA			324
Sbjct 919	CTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCCTGGCACGA			978
Query 325	GGAGTGTTCAGTG	339		
Sbjct 979	GGAGTGTTCAGTG	993		

Amostra 3 - Éxon 2 reverse

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 949 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	9e-151	311/318(98%)	1/318(0%)	Plus/Minus
Query 23	CAGAAACCGGTCCGGAACCGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGTGCGGGCAGT			82
Sbjct 949	CAGGAAGCGGT-CGGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGT			891
Query 83	CGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGG			142
Sbjct 890	CGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGG			831
Query 143	CGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCA			202
Sbjct 830	CGTCCCGGTGCGACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCA			771
Query 203	CCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCAGGGGCCGGGGCGGCCCGGCTAGTC			262
Sbjct 770	CCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCAGGGGCCGGGGCGGCCCGGCTAGTC			711
Query 263	CGTCCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGC			322
Sbjct 710	CGTCCAGTCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGC			651
Query 323	TGTGCTCTCCCTTCTCC	340		
Sbjct 650	TGTGCTCTCCCTTCTCC	633		

Amostra 4 - Éxon 2 forward**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 949 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	9e-151	311/318(98%)	1/318(0%)	Plus/Minus
Query 23	CAGAAACCGGTCCGGAAACCGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGCTGCGGGCAGT			82
Sbjct 949	CAGGAAGCGGT-CGGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGT			891
Query 83	CGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCC GGCCGTACGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGG			142
Sbjct 890	CGGAGCCTGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCC GGCCGTACGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGG			831
Query 143	CGTCCCAGTCCGACCCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCA			202
Sbjct 830	CGTCCCAGTCCGACCCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCA			771
Query 203	CCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGCTAGTC			262
Sbjct 770	CCGCCTGCCGCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGGCTAGTC			711
Query 263	CGTCCCAGTCCGACCCGGGCCGAGAGGGCCGCGGCCCTCGAGCCTTGCTCGGGC			322
Sbjct 710	CGTCCCAGTCCGACCCGGGCCGAGAGGGCCGCGGCCCTCGAGCCTTGCTCGGGC			651
Query 323	TGTGCTCTCCCTTCTCC	340		
Sbjct 650	TGTGCTCTCCCTTCTCC	633		

Amostra 4 - Éxon 2 reverse**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 677 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
575 bits(311)	3e-159	316/318(99%)	1/318(0%)	Plus/Plus
Query 21	GGTCTCTCC-CGCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTG			79
Sbjct 677	GGCCTCTCCACGCCGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTG			736
Query 80	GCGCGGGGTCCGGGAGCGCAGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG			139
Sbjct 737	GCGCGGGGTCCGGGAGCGCAGGCGGCAGGCGGTGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG			796
Query 140	GGCCGAGGGCTGTGGGCCGTTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGCGCTGAC			199
Sbjct 797	GGCCGAGGGCTGTGGGCCGTTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCCGGGCGCGCTGAC			856
Query 200	GGCCGGGCTTTTCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCCTGCTGCGAG			259
Sbjct 857	GGCCGGGCTTTTCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCCTGCTGCGAG			916
Query 260	GGTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC			319
Sbjct 917	GGTGCCAGCGGCCATCTCCGACCGTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC			976
Query 320	GAGGAGTGTGTCAGTGC	337		
Sbjct 977	GAGGAGTGTGTCAGTGC	994		

Amostra 5 - Éxon 2 forward**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 633 to 937 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
553 bits(299)	2e-152	303/305(99%)	0/305(0%)	Plus/Minus
Query 9	GGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAGC	68		
Sbjct 937	GGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCTGTAGC	878		
Query 69	GCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTGAGCGCCGCCCGCCAGCCCCGACGTCGCCGGTCGCA	128		
Sbjct 877	GCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTGAGCGCCGCCCGCCAGCCCCGACGTCGCCGGTCGCA	818		
Query 129	CCGGGCCACACAGCCCTCGGCCCGGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTGCCGCCT	188		
Sbjct 817	CCGGGCCACACAGCCCTCGGCCCGGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTGCCGCCT	758		
Query 189	GCGCTCCCCGGACCGCCGCCAGGGGCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCGCCAGTCCTC	248		
Sbjct 757	GCGCTCCCCGGACCGCCGCCAGGGGCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCGCCAGTCCTC	698		
Query 249	GGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGCGCTGTGCTCTCCCA	308		
Sbjct 697	GGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCGCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGCGCTGTGCTCTCCCA	638		
Query 309	TCTCC 313			
Sbjct 637	TCTCC 633			

Amostra 5 - Éxon 2 reverse**Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds**Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1Range 1: 677 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
575 bits(311)	4e-159	316/318(99%)	1/318(0%)	Plus/Plus
Query 20	GGCCTCTCC-CGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAACCGGGCCGCCCGGCCCTG	78		
Sbjct 677	GGCCTCTCCACGCCGGAGCCCGAGGACTGGGACGGACTAGCCGGGGCCGCCCGGCCCTG	736		
Query 79	GCGCGGCGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGCGGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG	138		
Sbjct 737	GCGCGGCGGTCCGGGGAGCGCAGGCGGCGGATCCCGGGCGGCCGAGCCCTCGG	796		
Query 139	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCGGGCGGCGTGAC	198		
Sbjct 797	GGCCGAGGGCTGTGGGCCCGGTGCGACCGGGACGCCGGGGCTGGGCGGGCGGCGTGAC	856		
Query 199	GGCCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG	258		
Sbjct 857	GGCCGGGCTTTTCGCCCTGTGCGCTACAGGCTCCGACTGCCCGCATCCCGCGTCTGCGAG	916		
Query 259	GGCTGCCAGCGGCCCATCTCCGACCGCTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC	318		
Sbjct 917	GGCTGCCAGCGGCCCATCTCCGACCGCTTCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTGGCAC	976		
Query 319	GAGGAGTGTGTTGCAAGTGC 336			
Sbjct 977	GAGGAGTGTGTTGCAAGTGC 994			

Amostra 6 - Éxon 2 forward

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 942 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
568 bits(307)	8e-157	309/310(99%)	0/310(0%)	Plus/Minus
Query 29	CGGTCCGAGACGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCT			88
Sbjct 942	CGGTCCGAGATGGGCCGCTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCCT			883
Query 89	GTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGG			148
Sbjct 882	GTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCGG			823
Query 149	TCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTGC			208
Sbjct 822	TCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTGC			763
Query 209	CGCCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAG			268
Sbjct 762	CGCCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCAG			703
Query 269	TCCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCCTGTGCTCT			328
Sbjct 702	TCCTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCCTGTGCTCT			643
Query 329	CCCCCTTCTCC	338		
Sbjct 642	CCCCCTTCTCC	633		

Amostra 6 - Éxon 2 reverse

Homo sapiens chromosome 9 LIM homeodomain protein (LMX1B) gene, complete cds

Sequence ID: [AH006310.2](#) Length: 3927 Number of Matches: 1

Range 1: 633 to 942 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
545 bits(295)	3e-150	306/311(98%)	2/311(0%)	Plus/Minus
Query 29	CGGTCCGGA-ACGGGCCGCCAGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGCTGCGGGCAGTCGGAGCC			87
Sbjct 942	CGGTCCGAGATGGGCCG-CTGGCAGCCCTCGCAGACGGCGGGATGCGGGCAGTCGGAGCC			884
Query 88	TGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCG			147
Sbjct 883	TGTAGCGCACAGGGCGAAAGCCCGGCCGTCAGCGCCGCCCGGCCAGCCCCGGCGTCCCG			824
Query 148	GTCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTG			207
Sbjct 823	GTCGCACCGGGCCACAGCCCTCGGCCCGAGGGCTCGGGCCGCCCGGGATCACCGCCTG			764
Query 208	CCGCCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCCA			267
Sbjct 763	CCGCCTGCGCTCCCCGGACCGCCGCGCCAGGGGCCGGGCGGCCCGGCTAGTCCGTCCCA			704
Query 268	GTCTTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCCTGTGCTC			327
Sbjct 703	GTCTTCGGGCTCCGGCGTGGAGAGGCCCGGGCCTCGAGCCTTGCTCGGGCCTGTGCTC			644
Query 328	TCCCCCTTCTCC	338		
Sbjct 643	TCCCCCTTCTCC	633		

Amostra 7 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 911 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	8e-51	122/125(98%)	1/125(0%)	Plus/Plus
Query 14	GGGACGCAGGTGTGCGTGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAG	73		
Sbjct 911	GGG-CGCTGGAGTGCCTGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAG	969		
Query 74	CTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC	133		
Sbjct 970	CTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTAC	1029		
Query 134	GAGAA 138			
Sbjct 1030	GAGAA 1034			

Amostra 7 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 871 to 990 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	7e-52	120/121(99%)	1/121(0%)	Plus/Minus
Query 21	GAATTCGTCGCCCTTTCGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT	80		
Sbjct 990	GAATTCGTCG-CCCTTTCGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGT	932		
Query 81	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACCTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	140		
Sbjct 931	GGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACCTCGGTGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	872		
Query 141	C 141			
Sbjct 871	C 871			

Amostra 8 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 918 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
202 bits(109)	2e-47	116/119(97%)	2/119(1%)	Plus/Plus
Query 14	GGTGTGCGTGTACCACCTGGGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTACGC	73		
Sbjct 918	GGAGTGCCTGTACCACCT--GGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTACGC	975		
Query 74	AAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGAA	132		
Sbjct 976	AAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGAA	1034		

Amostra 8 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 871 to 986 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
215 bits(116)	2e-51	116/116(100%)	0/116(0%)	Plus/Minus
Query 23	TCGTCGCCCTTGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTGGTAC	82		
Sbjct 986	TCGTCGCCCTTGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTGGTAC	927		
Query 83	ACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	138		
Sbjct 926	ACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	871		

Amostra 9 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 909 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	8e-52	123/126(98%)	0/126(0%)	Plus/Plus
Query 32	GCGGGAGCAGGCGTGCCTGACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCA	91		
Sbjct 909	GCGGGCGCTGGAGTGCCTGACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCA	968		
Query 92	GCTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTA	151		
Sbjct 969	GCTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTA	1028		
Query 152	CGAGAA 157			
Sbjct 1029	CGAGAA 1034			

Amostra 9 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 871 to 987 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	7e-52	117/117(100%)	0/117(0%)	Plus/Minus
Query 27	TTCGTCGCCCTTGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTGGTA	86		
Sbjct 987	TTCGTCGCCCTTGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTGGTA	928		
Query 87	CACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	143		
Sbjct 927	CACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	871		

Amostra 10 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 911 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
219 bits(118)	2e-52	122/124(98%)	0/124(0%)	Plus/Plus
Query 15	ggggg	CTGGTGTGCGTGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGC	74	
Sbjct 911	GGGCGCTGGAGTGC	TGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGC	970	
Query 75	TACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	134		
Sbjct 971	TACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	1030		
Query 135	AGAA	138		
Sbjct 1031	AGAA	1034		

Amostra 10 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 871 to 990 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
222 bits(120)	1e-53	120/120(100%)	0/120(0%)	Plus/Minus
Query 17	GAATTCGTCGCCCTTGGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTG	76		
Sbjct 990	GAATTCGTCGCCCTTGGCGTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCAGGTG	931		
Query 77	GTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAATTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	136		
Sbjct 930	GTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAATTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGCC	871		

Amostra 11 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 908 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
219 bits(118)	2e-52	124/127(98%)	0/127(0%)	Plus/Plus
Query 12	tGGGGGCGCTGGCGTGC	TGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGC	71	
Sbjct 908	TGCGGGCGCTGGAGTGC	TGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGC	967	
Query 72	AGCTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTAACT	131		
Sbjct 968	AGCTACGCAAGGGCGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTAACT	1027		
Query 132	ACGAGAA	138		
Sbjct 1028	ACGAGAA	1034		

Amostra 11 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 988 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	6e-52	117/117(100%)	0/117(0%)	Plus/Minus
Query 23	ATTCGTCGCCCTTGGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGGTGGT	82		
Sbjct 988	ATTCGTCGCCCTTGGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCCAGGTGGT	929		
Query 83	ACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	139		
Sbjct 928	ACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATGCAGC	872		

Amostra 12 - Éxon 3 forward**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 911 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
222 bits(120)	1e-53	123/124(99%)	1/124(0%)	Plus/Plus
Query 12	GGGCGCTGGA-TGCGTGACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTAACGGCAGC	70		
Sbjct 911	GGGCGCTGGAGTGCCTGTACACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTAACGGCAGC	970		
Query 71	TACGCAAGGGGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	130		
Sbjct 971	TACGCAAGGGGACGAATTCGTGCTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACG	1030		
Query 131	AGAA 134			
Sbjct 1031	AGAA 1034			

Amostra 12 - Éxon 3 reverse**Homo sapiens LIM homeobox transcription factor 1 beta (LMX1B), transcript variant 2, mRNA**Sequence ID: [NM_001174147.2](#) Length: 6312 Number of Matches: 1Range 1: 872 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(117)	7e-52	122/124(98%)	1/124(0%)	Plus/Minus
Query 20	gCAGGAATTCGGTCGCCCTTGGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCC	79		
Sbjct 994	GCACGAATTC-GTCGCCCTTGGCTAGCTGCCGTTACACACGCAGCAGCAGAAGCAGCCC	936		
Query 80	AGGTGGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG	139		
Sbjct 935	AGGTGGTACACGCACTCCAGCGCCCGCATCACGAACTCGGTGGGGGCGATCTTCTCCATG	876		
Query 140	CAGC 143			
Sbjct 875	CAGC 872			

9.3. Dados qPCR Condrogênese

Tabela 5: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *ACTB*, *COL1A1* e *COL2A1*.

ACTB		COL1A1			COL2A1				
	Mean	Mean	$\Delta\Delta Ct$	fold change	Mean	$\Delta\Delta Ct$	fold change		
T0	17,598	T0	25,922	0	0	T0	27,794	0	0
T7	18,44	T7	26,229	-0,535	1,86915 8879	T7	22,578	-6,058	0,16507 09805
T14	19,126	T14	22,744	-4,706	0,21249 46876	T14	23,176	-6,147	0,16268 09826
T21	17,497	T21	20,026	-5,795	0,17256 25539	T21	22,607	-5,086	0,19661 81675
T28	17,82	T28	19,89	-6,254	0,15989 76655	T28	24,513	-3,503	0,28546 95975

Tabela 6: Média CT, $\Delta\Delta Ct$ e fold change de *COL10A1*, *SOX9* e *ACAN*.

COL10A1				SOX9				ACAN			
	Mean	$\Delta\Delta Ct$	fold change		Mean	$\Delta\Delta Ct$	fold change		Mean	$\Delta\Delta Ct$	fold change
T0	27,032	0	0	T0	26,611	0	0	T0	29,999	0	0
T7	29,261	1,388	0,7204 610951	T7	23,874	-3,579	0,2794 076558	T7	29,006	-1,835	0,5449 591281
T14	30,736	2,176	0,4595 588235	T14	27,815	-0,324	3,0864 19753	T14	31,989	0,462	2,1645 02165
T21	29,8	2,87	0,3484 320557	T21	26,002	-0,508	1,9685 03937	T21	35,594	5,696	0,1755 617978
T28	30,586	3,332	0,3001 20048	T28	25,79	-1,043	0,9587 727709	T28	38,6	8,379	0,1193 45984

Tabela 7: Média CT, $\Delta\Delta\text{Ct}$ e fold change de *GAPDH*, *LMX1B7* e *LMX1B2*.

GAPDH		LMX1B7				LMX1B2			
	Mean		Mean	$\Delta\Delta\text{Ct}$	fold change		Mean	$\Delta\Delta\text{Ct}$	fold change
T0	18,939	T0	33,041	0	0	T0	32,755	0	0
					0,22512				0,22619
T7	19,64	T7	29,299	-4,442	38181	T7	29,035	-4,421	3169
					0,58754				0,62150
T14	21,479	T14	33,878	-1,702	40658	T14	33,686	-1,609	40398
					-				1,77619
					1,16550				8934
T21	19,97	T21	34,929	0,858	1166	T21	33,223	-0,563	8934
					0,75700				0
T28	20,925	T28	33,706	-1,321	2271	T28	0	0	0

Tabela 8: Média CT, $\Delta\Delta\text{Ct}$ e fold change de *OCT4*, *NANOG* e *TBXT*.

OCT4				NANOG				TBXT			
	Mean	$\Delta\Delta\text{Ct}$	fold change		Mean	$\Delta\Delta\text{Ct}$	fold change		Mean	$\Delta\Delta\text{Ct}$	fold change
T0	32,096	0	0	T0	26,734	0	0	T0	30,86	0	0
			-				-				-
			1,2484				0,1298				0,4045
T7	33,598	0,801	39451	T7	35,138	7,704	026999	T7	34,032	2,472	307443
			-				-				-
			3,8759				0,1550				0,2047
T14	34,893	0,258	68992	T14	35,721	6,448	868486	T14	38,285	4,885	082907
			-				-				-
			1,5128				0,1966				0,3176
T21	33,787	0,661	59304	T21	32,848	5,084	955153	T21	35,038	3,148	620076
			-				-				-
			1,1173				0,1458				0,9661
T28	33,187	-0,895	18436	T28	35,575	6,855	789205	T28	33,881	1,035	835749