UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia

Juliana Paiva Silveira Lacerda

O USO DA FERRAMENTA CRISPR/dCas9 PARA REPRIMIR E SUPEREXPRESSAR PROGRANULINA EM CÉLULAS HUMANAS

Belo Horizonte
2024

Juliana Paiva Silveira Lacerda

O USO DA FERRAMENTA CRISPR/dCas9 PARA REPRIMIR E SUPEREXPRESSAR PROGRANULINA EM CÉLULAS HUMANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola Mara Ribeiro

Coorientador: Dr. Pablo Leal Cardozo

Belo Horizonte
2024

043 Lacerda, Juliana Paiva Silveira.
O uso da ferramenta CRISPR/dCas9 para reprimir e superexpressar progranulina em células humanas [manuscrito] / Juliana Paiva Silveira Lacerda. – 2024.
80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola Mara Ribeiro. Coorientador: Dr. Pablo Leal Cardozo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Esquizofrenia. 3. Progranulinas. 4. Sistemas CRISPR-Cas. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Cardozo, Pablo Leal. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1

Ficha catalografica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 2680

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA PAIVA SILVEIRA LACERDA. Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de 2024 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O uso da ferramenta CRISPR/dCas9 para reprimir e superexpressar progranulina em células humanas", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Aristobolo Mendes da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Pablo Leal Cardozo - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(X) APROVADA
( ) REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2024.

Dr. Aristobolo Mendes da Silva (UFMG)

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG)

Dr. Pablo Leal Cardozo - Coorientador (UFMG)

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Professora Fabíola, por me acolher no laboratório, pela confiança e pelo respeito, por todas as discussões produtivas e engrandecedoras e por me inspirar a ser uma pesquisadora!

Ao meu coorientador e amigo, Pablo, que me adotou como pupila desde a iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pelas palavras de apoio! Você me mostrou como é divertido ser cientista e por isso eu sou grata!

A todos do laboratório RNAi, mas, principalmente, aos meus amigos do Laboratório de Neurobioquímica! Vocês tornaram o meu dia a dia mais alegre e sem a ajuda de todos vocês, eu não conseguiria.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e a minha família (Devlin, Iullus, Sophia, Mel, Xerife, Jasmine e Batman) por estarem sempre ao meu lado e apoiarem todos os meus sonhos!

E por fim, agradeço também às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave que afeta aproximadamente 23,6 milhões de pessoas no mundo, com uma prevalência estimada entre 0,3% e 0,7% da população mundial. Os indivíduos com essa patologia podem apresentar sintomas positivos, como alucinações e delírios, sintomas negativos, como comportamentos depressivos, pensamento e fala desordenados e retraimento social, além de déficits cognitivos, como problemas de atenção e do aprendizado. Além disso, considera-se que a esquizofrenia é um distúrbio multifatorial. Dessa forma, fatores genéticos e estressores ambientais atuam juntos tornando o indivíduo mais suscetível a desenvolver a doença. Estudos publicados sugerem que o gene *GRN*, que codifica uma glicoproteína conhecida como Progranulina, pode estar associado ao maior risco de desenvolver esquizofrenia. Dados prévios não publicados do nosso grupo de pesquisa demonstram que células microglia-*like* induzidas (iMGs) derivadas de indivíduos esquizofrênicos expressam níveis menores de Progranulina quando comparados àquelas derivadas de indivíduos saudáveis. Assim, o objetivo desse trabalho é estabelecer uma plataforma funcional utilizando o sistema CRISPR/dCas9 para modular a transcrição desse gene. Para isso, utilizamos os sistemas CRISPRa e CRISPRi através do uso da proteína dCas9 fusionada aos efetores transcricionais VPR e KRAB, respectivamente. Os dados aqui apresentados demonstram o correto funcionamento do sistema CRISPR/dCas9 tornando possível a modulação transcricional do gene *GRN* em células do sistema nervoso central. Interessantemente, observamos que astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos, assim como as iMGs, também apresentam uma desregulação nos níveis de expressão de Progranulina. Astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos produziram níveis maiores do mRNA de Progranulina, quando estimulados com TNF-α, em comparação aos astrócitos de indivíduos saudáveis. Dessa forma, poderemos utilizar as ferramentas de regulação transcricional desenvolvidas neste trabalho para modular a expressão da Progranulina em células derivadas de indivíduos esquizofrênicos visando melhor compreender a importância dessa proteína na esquizofrenia.

Palavras-chave: CRISPRa; CRISPRi; esquizofrenia; Progranulina.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder that affects about 23.6 million people worldwide, with an estimated worldwide prevalence of 0.3% to 0.7%. People with this pathology may present positive symptoms, such as hallucinations and delusions, negative symptoms, including depressive behaviors, disordered thinking, and speech and social withdrawal, as well as cognitive deficits, such as attention and learning problems. In addition, schizophrenia is considered to be a multifactorial disorder, with genetic factors and environmental stressors acting together, making individuals prone to develop this disease. Previous published studies suggest that the *GRN* gene, which encodes a glycoprotein known as Progranulin, may be associated with an increased risk of developing schizophrenia. Previous unpublished data from our research group shows that induced microglia-like cells (iMGs) derived from individuals with schizophrenia express lower levels of Progranulin compared to those derived from healthy individuals. Thus, this study aims at establishing a functional platform using the CRISPR/dCas9 system to modulate the transcription of this gene. To accomplish that, we employed both CRISPRa and CRISPRi systems, using the dCas9 protein fused with the transcriptional effectors VPR and KRAB, respectively. The present data demonstrates the proper functioning of the CRISPR/dCas9 system, making it possible to transcriptionally modulate the *GRN* gene in central nervous system cells. Interestingly, we observed that astrocytes derived from individuals with schizophrenia, as well as iMGs, also exhibit dysregulation in Progranulin expression levels. Astrocytes derived from individuals with schizophrenia produced higher levels of Progranulin mRNA when stimulated with TNF-α compared to astrocytes from healthy individuals. Therefore, we can use the transcriptional regulation tools developed in this study to modulate Progranulin expression in cells derived from individuals with schizophrenia, aiming to better understand the importance of this protein in schizophrenia.

Keywords: CRISPRa; CRISPRi; schizophrenia; Progranulin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: *GRN* codifica a proteína Progranulina que pode ser clivada em peptídeos conhecidos como granulinas. – **p. 17**

Figura 2: Ilustração do princípio de funcionamento do Sistema CRISPR/dCas9. – **p. 20**

Figura 3: Expressão de Progranulina (*GRN*) em iMGs derivadas de indivíduos saudáveis (HC) e esquizofrênicos (SCZ) não estimuladas (NS) e estimuladas com LPS. – **p. 22**

Figura 4: Mapa dos plasmídeos. – **p. 25**

Figura 5: Transformação de *E.coli* DH5α quimiocompetentes com o plasmídeo LentiGuide-BFP2. – **p. 41**

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de PCR de colônia de bactérias *E.coli* DH5a quimiocompetentes transformadas com o plasmídeo LentiGuide-BFP2. – **p. 42**

Figura 7: Digestão com enzima de restrição do plasmídeo lentiGuide-BFP2. – **p. 43**

Figura 8: Digestão com enzima de restrição dos plasmídeos lenti-dCas9-KRAB e lenti-dCas9-VPR. – **p. 44**

Figura 9: Digestão com enzima de restrição dos plasmídeos REV, VSV-G e MDL. – **p. 44**

Figura 10: Ilustração do processo de digestão do plasmídeo lentiGuide-BFP2 usando a enzima Esp3I para clonar gRNA. – **p. 46**

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de PCR de colônia de bactérias *E.coli* DH5a transformadas com o plasmídeo lentiGuide-BFP2 com os gRNAs clonados. – **p. 47**

Figura 12: Validação da clonagem por Sequenciamento de Sanger. – **p. 48 e 49**

Figura 13: Sítio de restrição da enzima Esp3I no plasmídeo lentiGuide-BFP2. – **p. 50**

Figura 14: Células HEK 293T transfectadas expressando a proteína fluorescente BFP. – **p. 51**

Figura 15: hiPSCs-VPR expressando a proteína fluorescente BFP. – **p. 53**

Figura 16: hiPSCs-VPR expressando a proteína fluorescente BFP após a seleção. – **p. 54**

Figura 17: Expressão de Progranulina e dCas9-VPR em hiPSCs-VPR. – **p. 55**

Figura 18: Expressão de Progranulina, dCas9-VPR, e LV2 em iMGs. – **p. 56**

Figura 19: iMGs expressando a proteína fluorescente BFP. – **p. 57**

Figura 20: Expressão de dCas9-KRAB e dCas9-VPR em HEK 293T. – **p. 58**

Figura 21: Expressão de Progranulina em astrócitos HC e SCZ estimulados com TNF-α. – **p. 59**

Figura 22: Astrócitos-VPR expressando a proteína fluorescente BFP. – **p. 60 e 61**

Figura 23: Astrócitos-KRAB expressando a proteína fluorescente BFP. – **p. 61 e 62**

Tabela 1: Sequências de gRNA. – **p. 77**

Tabela 2: Primers utilizados. – **p. 78**

Tabela 3: Linhagens utilizadas e dados dos indivíduos a partir dos quais as hiPSCs foram geradas. – **p. 79**

Tabela 4: Resultado da titulação feita através de RT-qPCR dos lentivírus produzidos. – **p. 52**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS-7: Metaloproteinase com motivo 7 de trombospondina tipo 1

BFP: Proteína fluorescente azul

$CaCl_2$: Cloreto de cálcio

Cas9: Endonuclease associada a CRISPR

CRISPR: Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas

CRISPRa: CRISPR *activation*

CRISPRi: CRISPR *interference*

ct: *threshold cycle*

dCas9: "dead" Cas9 ou Cas9 inativa

DMEM: *Modified Eagle Medium*; Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

EUA: Estados Unidos da América

EphA2: Receptor de efrina tipo A2

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GRN: Gene que codifica a proteína Progranulina

gRNA: RNA guia

GWASs: Estudos de Associação Genômica Ampla

HC: *health control;* indivíduos saudáveis

HEK: Células renais embrionárias humanas

hiPSCs: Células-tronco de pluripotência induzida

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

iMGs: Microglia-like induzidas

ITB: *Buffer* de Transformação Inoue

KCl: Cloreto de potássio

kDa: Quilodalton

KRAB: *Krüppel-associated box*

lentiGuide-BFP2: lentiGuide-Hygro-mTagBFP2

lenti-dCas9-KRAB: lenti-EF1a-dCas9-KRAB-Puro

lenti-dCas9-VPR: lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro

LPS: Lipopolissacarídeo

MDA: Meio de diferenciação de astrócitos

MDL: pMDLg/pRRE

Meio LB: Meio Luria-Bertani

Meio SOB: *Super Optimal Broth*

$MgCl_2$: Cloreto de magnésio

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MMA: Meio de maturação de astrócitos

MMP-12: Metaloproteinase de matriz 12

NaCl: cloreto de sódio

NCL: Lipofuscinose ceróide neuronal

NEM: Meio de expansão neural

NIM: Meio de Indução Neural

ng: nanograma

nm: nanômetro

NS: Controle não estimulado

NSCs: Células-tronco neurais

PAM: Motivos adjacentes ao protoespaçador

pb: Pares de bases

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Solução tamponada de fosfato sem cálcio e sem magnésio

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: PCR quantitativa

REV: pRSV-Rev

ROCK: Rho Quinase

RT-qPCR: Transcrição Reversa e PCR quantitativa

SCZ: *Schizophrenia;* indivíduos esquizofrênicos

SFB: Soro Fetal Bovino

SLPI: Inibidor de protease leucocitária secretora

SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único

TAE: Tampão de Tris-Acetato-EDTA

TDP-43: *Transactive DNA-binding protein 43*

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral α

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

VSV-G: pCMV-VSV-G

VPR: VP64-p65-Rta

°C: graus Celsius

μL: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **15**

1.1. Esquizofrenia 15

1.2. Progranulina 16

1.3. Sistema CRISPR/dCas9 18

1.4. Progranulina e Esquizofrenia 20

2. OBJETIVOS **21**

2.1. Objetivo Geral 21

2.2. Objetivos Específicos 21

3. MATERIAIS E MÉTODOS **22**

3.1. Declaração de Ética 22

3.2. Plasmídeos 22

3.3. Cultura de células 23

3.3.1. Cultivo das células HEK 293T 23

3.3.2. Linhagens e cultivo das células-tronco de pluripotência induzida humana (hiPSCs) 24

3.3.3. Diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais (NSCs) 26

3.3.4. Linhagens de NSCs 27

3.3.5. Diferenciação das NSCs em astrócitos 27

3.3.6. Estimulação dos astrócitos maduros com TNF-α 28

3.3.7. Cultivo e diferenciação de Células Microglia-like induzidas (iMGs) 29

3.3.7.1. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) 29

3.3.7.2. Diferenciação e cultivo de iMGs 29

3.4. Bactérias Escherichia coli DH5α 30

3.4.1. Geração de bactérias Escherichia coli DH5α quimiocompetentes 30

3.4.2. Transformação de bactérias Escherichia coli DH5α quimiocompetentes 31

3.4.3. PCR de colônia 31

3.5. Preparação dos plasmídeos 32

3.5.1. Purificação dos plasmídeos 32
3.5.1.1. Purificação em pequena escala (Mini Prep) 32
3.5.1.2. Purificação em média escala (Midi Prep) 33
3.5.2. Digestão dos plasmídeos com enzima de restrição 34
3.6. Design e clonagem do gRNA 34
3.6.1. Design do gRNA 34
3.6.2. Clonagem das sequências de gRNA no plasmídeo lentiGuide-BFP2 35
3.6.3. Sequenciamento 36
3.7. Produção dos lentivírus 36
3.7.1. Transfecção e coleta dos lentivírus 36
3.7.2. Purificação e concentração dos lentivírus 37
3.8. Titulação do número de cópias de genoma viral 37
3.9. Transdução das células com lentivírus e seleção por antibiótico 39
3.9.1. Preparo de células HEK 293T para transdução 39
3.9.2. Preparo das hiPSCs para transdução 39
3.9.3. Preparo dos astrócitos para transdução 39
3.9.4. Transdução com lentivírus e seleção das células 39
3.10. Transcrição Reversa e PCR quantitativa (RT-qPCR) 40
3.11. Análise estatística 40
4. RESULTADOS 41
4.1. Bactérias Escherichia coli DH5α quimiocompetentes pelo Método Inoue são mais eficientes 41
4.2. A qualidade dos plasmídeos foi verificada 42
4.3. As sequências dos gRNAs foram inseridas corretamente no plasmídeo lentiGuide-BFP2 45
4.4. As células HEK 293T foram transfectadas com sucesso e os lentivírus produzidos 50
4.5. hiPSCs VPR superexpressam GRN quando transduzidas com o lentivírus GRN_V1 52
4.6. Os lentivírus foram capazes de transduzir iMGs 55
4.7. Células HEK 293T transduzidas com os respectivos lentivírus expressam dCas9-KRAB mas não dCas9-VPR 57

4.8. Astrócitos SCZ produzem níveis elevados de GRN quando estimulados com TNF-α 58

4.9. Astrócitos que expressam constitutivamente dCas9-KRAB e dCas9-VPR foram transduzidos com os lentivírus 59

5. DISCUSSÃO 62

6. CONCLUSÃO 66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

8. MATERIAL SUPLEMENTAR 77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave que afeta aproximadamente 23,6 milhões de pessoas no mundo, com uma prevalência estimada entre 0,3% e 0,7% da população mundial (Solmi *et al*., 2023). No Brasil, mais de 1,6 milhão de indivíduos convivem com esse distúrbio (Matos *et al*., 2015). Embora a esquizofrenia seja relativamente rara em comparação com outros problemas de saúde mental, ela exerce um impacto profundo na vida daqueles que a enfrentam, assim como em suas famílias e comunidades (IHME, 2019; Green, 1996).

A esquizofrenia é uma desordem que se manifesta geralmente na adolescência e início da idade adulta, e apresenta sintomas que podem ser classificados em 3 categorias: (1) sintomas positivos, como as alucinações (sendo as mais comuns as auditivas e visuais), os delírios (ideias ou pensamentos que não correspondem à realidade) e agitação psicomotora; (2) sintomas negativos como comportamentos depressivos, pensamento e fala desordenados, retraimento social, diminuição da motivação e de demonstrações de emoções (embotamento afetivo); e (3) déficits cognitivos, como problemas de atenção, no aprendizado, na função executiva e na memória de curto prazo (Gejman *et al*., 2011; Perez & Lodge, 2014; Cannon, 2015; Sakurai *et al*., 2015; Sigurdsson, 2016). Embora o conjunto e a intensidade de sintomas varie entre os indivíduos, a esquizofrenia se torna uma condição desafiadora àqueles que a enfrentam, frequentemente resultando em prejuízos significativos no desempenho social e ocupacional do indivíduo, contribuindo para questões como desemprego e incapacidade de viver de forma independente (Luther *et al*., 2023; Green, 1996). Para indivíduos que vivenciam estas condições, o risco de suicídio é muitas vezes maior, sendo esta, portanto, uma das principais causas de morte prematura observada em jovens acometidos por esta doença, e um dos motivos pelos quais a esquizofrenia causa uma redução na expectativa de vida de 10 a 20 anos, quando comparada à população em geral (Hjorthøj *et al*., 2017; Jayatilleke *et al*., 2017).

A esquizofrenia é uma doença complexa e causada por interações entre fatores genéticos e ambientais. Juntos, esses fatores são capazes de promover alterações importantes nos padrões de neurodesenvolvimento, e, consequentemente, desencadear o distúrbio (Muller *et al*., 2015; Nimgaonkar *et al*., 2017). Dentre os estressores ambientais associados ao desenvolvimento da esquizofrenia, pode-se citar a urbanização, a idade avançada dos pais na

concepção, e eventos pré-natais e perinatais, como diversas complicações obstétricas (Faris & Dunham, 2016; Pedersen & Mortensen, 2001; Kirkbride *et al*., 2006; Henquet *et al*., 2005; Forti *et al*., 2009; Malaspina *et al*., 2001; Petersen *et al*., 2011; Cannon & Jones & Murray, 2002). Em infecções pré-natais, por exemplo, a exposição a certos microrganismos, como Influenza e Toxoplasma, é capaz de desencadear processos inflamatórios na mãe. Já foi demonstrado, que o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6, podem interferir na maturação do cérebro em desenvolvimento. Estas citocinas conseguem atravessar a barreira placentária afetando a conectividade neuronal (Brown *et al*., 2004; Brown *et al*., 2005; Muller *et al*., 2015). Assim, já foi demonstrado que esses moduladores podem desempenhar um papel na maturação anormal das células neuronais, além de contribuir para a poda acelerada das sinapses (Boin *et al*., 2001; Yang *et al*., 2017; Presumey *et al*., 2017; Ganguli *et al*., 2021). Isso pode resultar em alterações estruturais e funcionais no cérebro, que por sua vez estão associadas a um aumento no risco de desenvolvimento de esquizofrenia.

Estudos sobre esquizofrenia com gêmeos relataram uma estimativa de herdabilidade para esse distúrbio em torno de 60% a 80% (Sullivan *et al*., 2003). Assim, sabe-se que o fator genético tem também uma importante contribuição na patologia da doença. Estudos de Associação Genômica Ampla (GWASs) têm sido uma importante ferramenta na descoberta de genes associados à susceptibilidade à esquizofrenia (Dennison *et al*., 2020). Já foi demonstrado que muitos genes diferentes são capazes de aumentar o risco de desenvolver esse transtorno, entretanto, nenhum deles possui alta penetrância. Desse modo, individualmente, eles possuem efeitos pequenos e não são capazes de levar ao surgimento da doença. Entretanto, quando agregados, atuam de forma cumulativa, tornando o indivíduo mais suscetível a desenvolver esse distúrbio. Os polimorfismos identificados nos genes que codificam para *GRIN2A*, *BDNF*, *C4A* e *GRN* são alguns dos fatores genéticos associados à esquizofrenia (Trubetskoy *et al*., 2022; Riley & Kendler, 2006; Bergen *et al*., 2012; Wang *et al*., 2015; Sekar *et al*., 2016).

1.2. Progranulina

O gene *GRN* humano contém 12 éxons codificadores e é traduzido em uma glicoproteína conhecida como Progranulina. A Progranulina é uma proteína altamente glicosilada, contém 593 aminoácidos e apresenta 88 kDa. Estão presentes nessa proteína 7,5 repetições em tandem de motivos ricos em cisteína conhecidos como granulinas (Bhandari *et*

al., 1992; Bhandari & Bateman, 1992; Songsrirote *et al*., 2010; Bateman *et al*., 1990; He & Bateman, 2003). As sequências ligantes que separam as repetições de granulina podem ser clivadas por diversas proteases extracelulares e intracelulares, como por exemplo a Elastase Neutrofílica e a Proteinase 3, a Metaloproteinase com motivo 7 de Trombospondina tipo 1 (ADAMTS-7) e a Metaloproteinase de Matriz 12 (MMP-12), liberando, dessa forma, granulinas individuais de cerca de 6 kDa (Granulina A - G e Paragranulina) ou combinações ligadas de granulinas (**FIGURA 1**) (Kessenbrock *et al*., 2008; Bai *et al*., 2009; Suh *et al*., 2012; He & Bateman, 2003). Assim, a Progranulina pode atuar tanto como uma holoproteína ou por meio de seus produtos de granulina (De Muynck & Van Damme, 2011; Kessenbrock *et al*., 2008, Salazar *et al*., 2015).

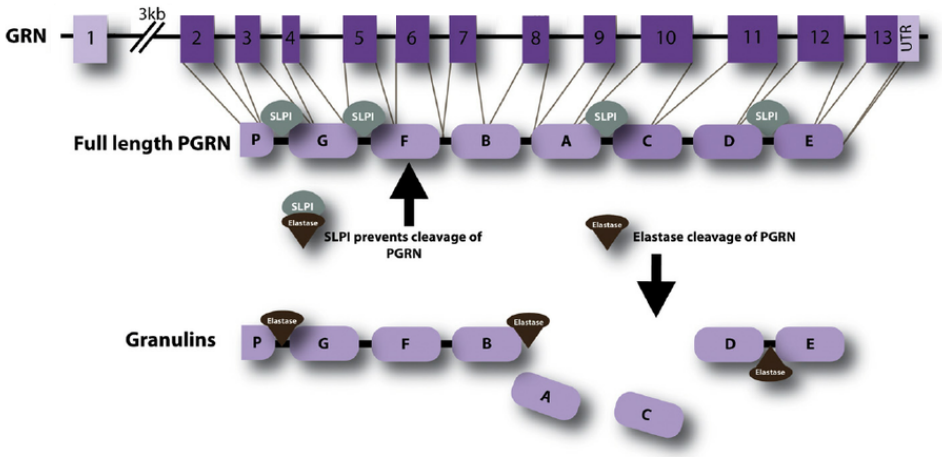


FIGURA 1: *GRN* codifica a proteína Progranulina que pode ser clivada em peptídeos conhecidos como granulinas. O gene *GRN* codifica uma proteína de 593 aminoácidos chamada Progranulina. Essa proteína é composta por subunidades que, quando clivadas, dão origem a peptídeos, conhecidos como granulinas. O Inibidor de Protease Leucocitária Secretora (SLPI) é capaz de se ligar às sequências entre os módulos de granulina para proteger a Progranulina da ação de proteases, como a Elastase, evitando, assim, a clivagem em peptídeos de granulina. Adaptado de **Gass *et al.*, 2012.**

A Progranulina é expressa em uma ampla variedade de tecidos e em muitos tipos de células em todo o corpo (Daniel *et al*., 2000). Dados de RNA-seq mostram que, no cérebro humano, ela é expressa principalmente por micróglias e astrócitos, e em menor extensão, por neurônios (Zhang *et al*., 2016). Uma vez sintetizada e após sofrer modificações pós-traducionais no complexo de Golgi, a Progranulina pode ser secretada através de vacúolos, sofrendo exocitose. No meio extracelular, essa proteína pode ser, portanto, clivada, ou permanecer como holoproteína pela ação de SLPI que é capaz de evitar a clivagem ao se ligar nas sequências de ligação da Progranulina (Zhu *et al*., 2002; Suh *et al*., 2012). A

Progranulina pode interagir com receptores de superfície celular (Receptores TNF, EphA2 e Notch) mediando efeitos anti-inflamatórios e neurotróficos (Neill *et al.,* 2016; Altmann *et al*., 2016; Tang *et al*., 2011). Essa proteína pode ser também captada, através da ligação direta à Sortilina ou complexada com Prosaposina, sendo deslocada para os lisossomos via tráfego dos endossomos (Hu *et al*., 2010; Capell *et al*., 2011; Zhou *et al*., 2015).

Assim, no meio intracelular, a Progranulina localiza-se principalmente nos lisossomos, com diversos estudos sugerindo que ela pode ter um papel em sua formação e função (Tanaka *et al.,* 2013; Lui *et al*., 2016). Visto a importância dessa organela em células fagocíticas, a Progranulina foi também implicada na função microglial. Já foi demonstrado que a deficiência de Progranulina leva ao aumento da atividade de fagocitose e da produção de citocinas pró-inflamatórias em micróglias, além de induzir a sua ativação (Yin *et al*., 2010; Kao *et al*., 2011; Martens *et al*., 2012). Consistente com isso, Lui e colaboradores (2016) revelaram que a deficiência de Progranulina em camundongos leva a uma regulação positiva dependente da idade de genes lisossomais em micróglias. Dessa forma, eles demonstraram que micróglias deficientes em Progranulina apresentavam defeitos lisossomais, como aumento no tamanho e no número de lisossomos, além de expressarem mais componentes do complemento, como C1q e C3, importantes fatores envolvidos no processo de poda sináptica (Stevens *et al*., 2007; Schafer *et al*., 2012; Wang *et al*., 2020).

A outra principal célula que expressa Progranulina são os astrócitos, mas pouco se conhece sobre a influência dessa proteína nessas células. Já foi demonstrado, entretanto, que, em camundongos, a Progranulina exógena é capaz de atenuar o fenótipo pró-inflamatório astrocitário. Além disso, foi observado que camundongos idosos *knockout* para Progranulina apresentam astrogliose (Menzel *et al*., 2017). Consistente com isso, foram observadas no plasma de indivíduos com demência frontotemporal portadores de mutação *GRN* elevadas concentrações de Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), um marcador desse processo (Heller *et al*., 2020).

Juntos, esses dados sugerem que a Progranulina possui efeitos diversos no funcionamento do sistema nervoso central. Entretanto, é necessário maior clareza sobre as funções do gene *GRN* e sobre a sua influência na patogênese de doenças mentais.

1.3. Sistema CRISPR/dCas9

As ferramentas de modulação transcricional têm sido importantes para o estudo das funções de genes. Dentre elas, a tecnologia CRISPR/Cas9 vem se destacando devido à sua simplicidade, especificidade e eficiência (Jinek *et al*., 2012). Desenvolvido a partir do sistema imunológico bacteriano, o sistema CRISPR/Cas9 inclui originalmente os seguintes componentes: a proteína Cas9 e duas moléculas de RNA chamadas crRNA e tracrRNA. Para simplificar o sistema, partes dessas moléculas de RNA foram combinadas, originando uma única molécula de RNA artificial conhecida como *single guide* RNA (sgRNA), também referida como *guide* RNA ou RNA guia (gRNA). O RNA guia é um pequeno RNA sintético composto por uma sequência de aproximadamente 20 nucleotídeos, definida pelo usuário, complementar à sequência do genoma que se pretende modificar, bem como de uma outra sequência essencial para a ligação da proteína Cas9, conhecida como gRNA *scaffold* (Brouns *et al*., 2008; Deltcheva *et al*., 2011; Jinek *et al*., 2012; Cong *et al*., 2013).

Originalmente empregada como uma endonuclease, a proteína Cas9 reconhece sequências de motivos adjacentes ao protoespaçador (PAM) no genoma, clivando a dupla fita de DNA em locais específicos (entre 3 e 4 nucleotídeos a montante da sequência PAM). Dessa forma, o sistema CRISPR se aproveita das vias de reparo de DNA da célula para realizar o *knock out* ou o *knock in* de genes (Mali *et al*., 2013; Cong *et al*., 2013). Embora a variante Cas9 isolada da bactéria *Streptococcus pyogenes* seja a mais conhecida e mais utilizada em experimentos CRISPR, outras nucleases foram também isoladas de diferentes espécies de bactérias, diferindo entre si principalmente quanto à sequência PAM que reconhecem (Gasiunas *et al*., 2020). Além disso, ao longo dos anos outras variantes foram projetadas para permitir funcionalidades adicionais, como é o caso da "*dead"* Cas9 ou Cas9 Inativa (dCas9). Conforme dito anteriormente, a proteína Cas9 possui a capacidade de clivar a fita dupla de DNA. Ela possui essa propriedade devido a ação combinada de dois domínios de nuclease, RuvC e HNH. Ao introduzirem mutações pontuais nestas regiões, Qi e colaboradores (2013) os inativaram de tal forma que a atividade de endonuclease foi removida, resultando em uma proteína Cas9 incapaz de clivar a fita dupla de DNA. Entretanto, ela ainda é capaz de se ligar ao RNA guia formando um complexo com a região genômica alvo. Além disso, foi demonstrado que o direcionamento de dCas9 para os locais de início da transcrição era suficiente para reprimir o gene por impedir que fatores de transcrição e a RNA polimerase acessassem o DNA (Qi *et al*., 2013; Gilbert *et al*., 2013; Thakore *et al.,* 2015). A partir daí,

novas estratégias visando a modulação transcricional foram desenvolvidas, dando origem aos sistemas conhecidos como CRISPR *interference* (CRISPRi) e CRISPR *activation* (CRISPRa), usados para reduzir e aumentar, respectivamente, a expressão de um gene alvo.

Os sistemas CRISPRi e CRISPRa funcionam utilizando dCas9 fusionada a efetores transcricionais. Um dos efetores mais comumente usado no sistema CRISPRi é conhecido como *Krüppel-associated box* ou KRAB (Margolin *et al*., 1994; Gilbert *et al*., 2013; Thakore *et al.,* 2015). Esse efetor interage com proteínas de estrutura, como TRIM28/KAP1, montando um complexo proteico com modificadores de histonas (CBX5/HP1α e SETDB1, por exemplo), levando à formação de heterocromatina e, dessa forma, suprimindo a expressão gênica (Ecco *et al*., 2015). Para o sistema CRISPRa, o ativador VP64-p65-Rta, ou VPR, tem sido muito utilizado. VPR é uma combinação de três domínios ativadores em série que são capazes de recrutar diversos fatores de transcrição, promovendo assim o aumento da expressão do gene alvo (Chavez *et al*., 2015; Chavez *et al*., 2016; Lin *et al*., 2015). Dessa forma, em contraste com outras ferramentas de edição de genoma baseadas em CRISPR-Cas9, esses sistemas proporcionam a modulação da expressão gênica sem a necessidade de cortes e alterações significativas na sequência genômica alvo, permitindo, assim, a investigação da função de genes específicos (**FIGURA 2**).

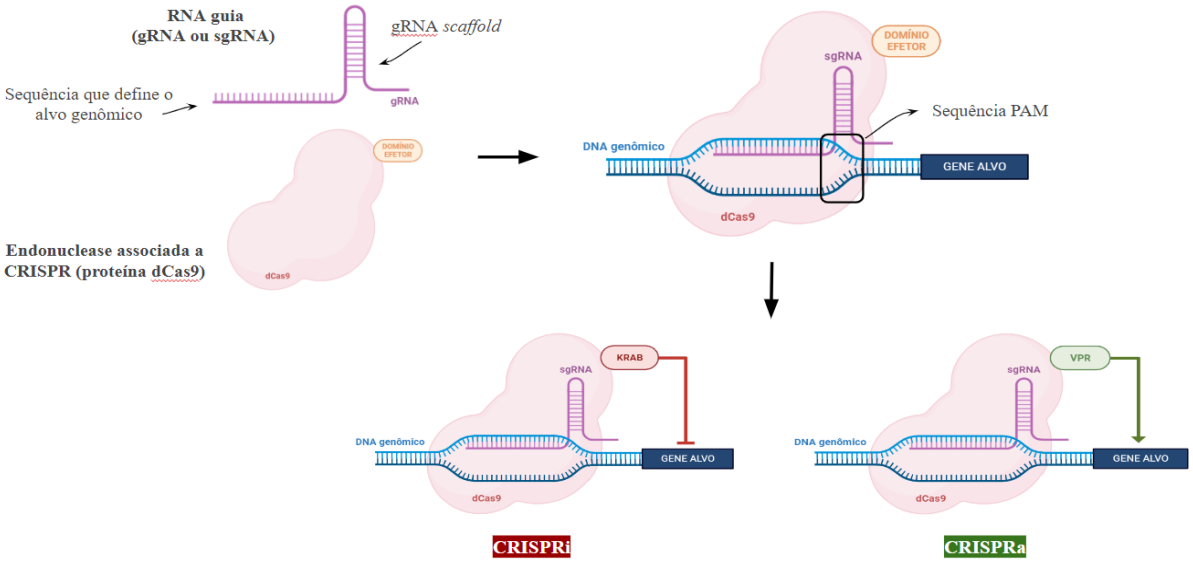


FIGURA 2: Ilustração do princípio de funcionamento do Sistema CRISPR/dCas9. A figura mostra os dois componentes do sistema CRISPR: gRNA com sequência *scaffold* e sequência que define o alvo genômico a ser modificado; e proteína dCas9 com o domínio efetor. gRNA e dCas9 são combinados formando um complexo que reconhece sequências PAM no genoma, combinando-se com a sequência alvo através do emparelhamento complementar de bases. Os domínios efetores, como por

exemplo KRAB (sistema CRISPRi) e VPR (sistema CRISPRa), atuam em regiões promotoras promovendo a regulação transcricional do gene alvo. Figura criada em BioRender.

1.4. Progranulina e Esquizofrenia

Há evidências que sugerem que o gene *GRN*, localizado no cromossomo 17q21, pode estar envolvido com a esquizofrenia. Estudos identificaram a região deste gene como um dos loci que podem aumentar a susceptibilidade a esse distúrbio (Escamilla *et al*., 2009; Lewis *et al*., 2003). Mutações de perda de função no gene *GRN* são uma das principais causas de demência frontotemporal (Baker *et al*., 2006). Velakoulis e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes diagnosticados com essa doença e que exibiam sintomas também observados na esquizofrenia até 5 anos antes do diagnóstico de demência, apresentavam achados neuropatológicos consistentes com estas mutações, como o acúmulo de proteínas tau e TDP-43 no tecido cerebral *post-mortem*. Além disso, Momeni *et al.* (2010), ao realizar a genotipagem de dois irmãos de uma família latina, um diagnosticado com demência frontotemporal e o outro com esquizofrenia, relataram em ambos a mesma mutação no gene *GRN* gerando perda de função. Foi revelada também uma associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *GRN* com o risco de desenvolver esquizofrenia (Galimberti *et al.*, 2012). Por fim, He e colaboradores (2022) observaram que os níveis de Progranulina, proteína codificada pelo gene *GRN*, estão diminuídos no tecido *post mortem* do córtex cingulado de pacientes esquizofrênicos. Em conjunto, todos estes estudos sugerem que pode haver uma associação entre esquizofrenia e o gene *GRN*, sendo este, portanto, um alvo relevante de estudo.

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa demonstram que células microglia-like induzidas (iMGs) derivadas de indivíduos esquizofrênicos, quando não estimuladas com LPS (100 ng/mL), expressam níveis menores de Progranulina quando comparados àqueles de iMGs derivadas de indivíduos saudáveis (**FIGURA 3**) (Cordeiro, 2021). Assim, devido à possível influência do gene *GRN* na esquizofrenia, esse trabalho visa estabelecer uma plataforma de modificação transcricional utilizando o sistema CRISPR/dCas9 para compreender melhor a função e a contribuição desse gene na esquizofrenia, objetivando, assim, ampliar o conhecimento acerca dessa patologia.

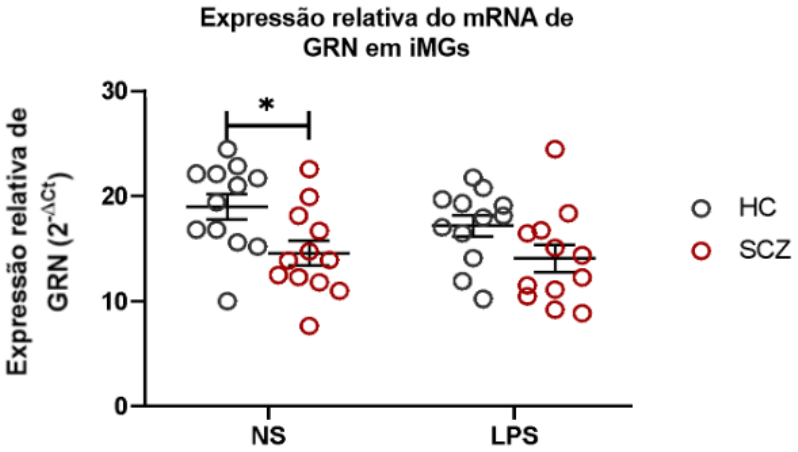


FIGURA 3: Expressão de Progranulina (GRN) em iMGs derivadas de indivíduos saudáveis (HC) e esquizofrênicos (SCZ) não estimuladas (NS) e estimuladas com LPS. iMGs HC e SCZ foram estimuladas ou não com 100 ng/mL de LPS por 24 h e os níveis de mRNA de Progranulina (GRN) analisados por RT-qPCR. Observa-se que iMGs SCZ não estimuladas produzem níveis menores de GRN. n = 12. *Two-way* ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Sidak: * $p < 0.05$. Laboratório de Neurobioquímica UFMG. Dado não publicado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer uma plataforma funcional utilizando o sistema CRISPR/dCas9 para reprimir e ativar o gene *GRN*, um provável gene associado à susceptibilidade a esquizofrenia, em células humanas do SNC.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Verificar a eficiência de produção de bactérias quimiocompetentes e a qualidade dos plasmídeos utilizados, elementos estes importantes para o correto funcionamento do sistema CRISPR/dCas9;

2.2.2. Produzir vetores lentivirais funcionais em células HEK 293T;

2.2.3. Analisar a expressão de *GRN* em astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos;

2.2.4. Validar o sistema CRISPR/dCas9 em iMGs e astrócitos derivados de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Declaração de Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), sob o número 90424518.3.1001.5149 e foi executado de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e a Declaração de Helsinque.

3.2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados abaixo e foram cedidos pela Profa. Kristen Brennand (Yale University, EUA). Os mapas com as sequências podem ser visualizados na **FIGURA 4** .

- lentiGuide-Hygro-mTagBFP2 (lentiGuide-BFP2): Permite a expressão do elemento gRNA do sistema CRISPR/dCas9 adaptado de *Streptococcus pyogenes*, ou seja, a sequência *scaffold* necessária para a ligação da proteína dCas9 e a sequência personalizável que define o alvo genômico a ser modificado, sob controle do promotor U6. Esse plasmídeo também possui marcadores: um gene que confere resistência ao antibiótico higromicina e um gene que expressa uma proteína fluorescente azul (mTagBFP2), ambos sob o controle do promotor EF-1a, separados por sequência peptídica P2A auto-cliváveis. Além disso, possui gene que confere resistência a ampicilina em bactérias (Ho *et al*., 2017).

- lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro (lenti-dCas9-VPR): Apresenta sequência que codifica dCas9 (*Streptococcus pyogenes*) fundido com o efetor transcricional VP64-p65-Rta (VPR) e marcador de resistência ao antibiótico puromicina, sob o controle do promotor EF-1A e presença de sequência P2A. Possui gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina em bactérias (Ho *et al*., 2017).

- lenti-EF1a-dCas9-KRAB-Puro (lenti-dCas9-KRAB): Possui gene que codifica dCas9 fundido com o efetor transcricional KRAB, elemento do sistema CRISPR-dCas9 adaptado de *Streptococcus pyogenes*, e gene que confere resistência ao antibiótico puromicina, ambos sob ação do promotor EF-1a e separados por sequência T2A. Também possui sequência que confere resistência à ampicilina (Ho *et al*., 2017).

- pRSV-Rev (REV): Possui gene sob ação do promotor RSV que codifica a proteína REV, importante na exportação do RNA viral do núcleo para o citoplasma. Também possui gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (Dull *et al.*, 1998).

- pCMV-VSV-G (VSV-G): Possui gene sob ação do promotor CMV que codifica a proteína de envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) para a produção de partículas lentivirais. Essa proteína confere ao vetor viral amplo tropismo, e, assim, a capacidade de infectar diversos tipos celulares. Também possui gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (Stewart *et al.,* 2003).

- pMDLg/pRRE (MDL): Contém sequências que inclui Gag, que codifica as proteínas estruturais do lentivírus (matriz, capsídeo e nucleoproteínas), Pol, responsável pelas enzimas virais, e RRE, um sítio de ligação para a proteína Rev, sob ação do promotor CMV. Possui sequência que confere resistência a ampicilina (Dull *et al*., 1998).

3.3. Cultura de células

3.3.1. Cultivo das células HEK 293T

Células renais embrionárias humanas (HEK 293T) foram mantidas em placas para cultivo celular de 100 mm em meio de cultura DMEM completo (Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, 11965092), 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, 12657-029) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, 15410-122)). Quando atingida a confluência 80-90%, as células foram lavadas com solução tamponada de fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS) 1x e em seguida com Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco, 25200-072). A suspensão celular foi coletada e plaqueada em novas placas para expansão na proporção 1:4. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO_2, com trocas de meio realizadas a cada 2-3 dias, até atingirem 70-90% de confluência, quando foram utilizadas para ensaios posteriores.

3.3.2. Linhagens e cultivo das células-tronco de pluripotência induzida humana (hiPSCs)

As hiPSCs utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Profa. Kristen Brennand, Yale University.

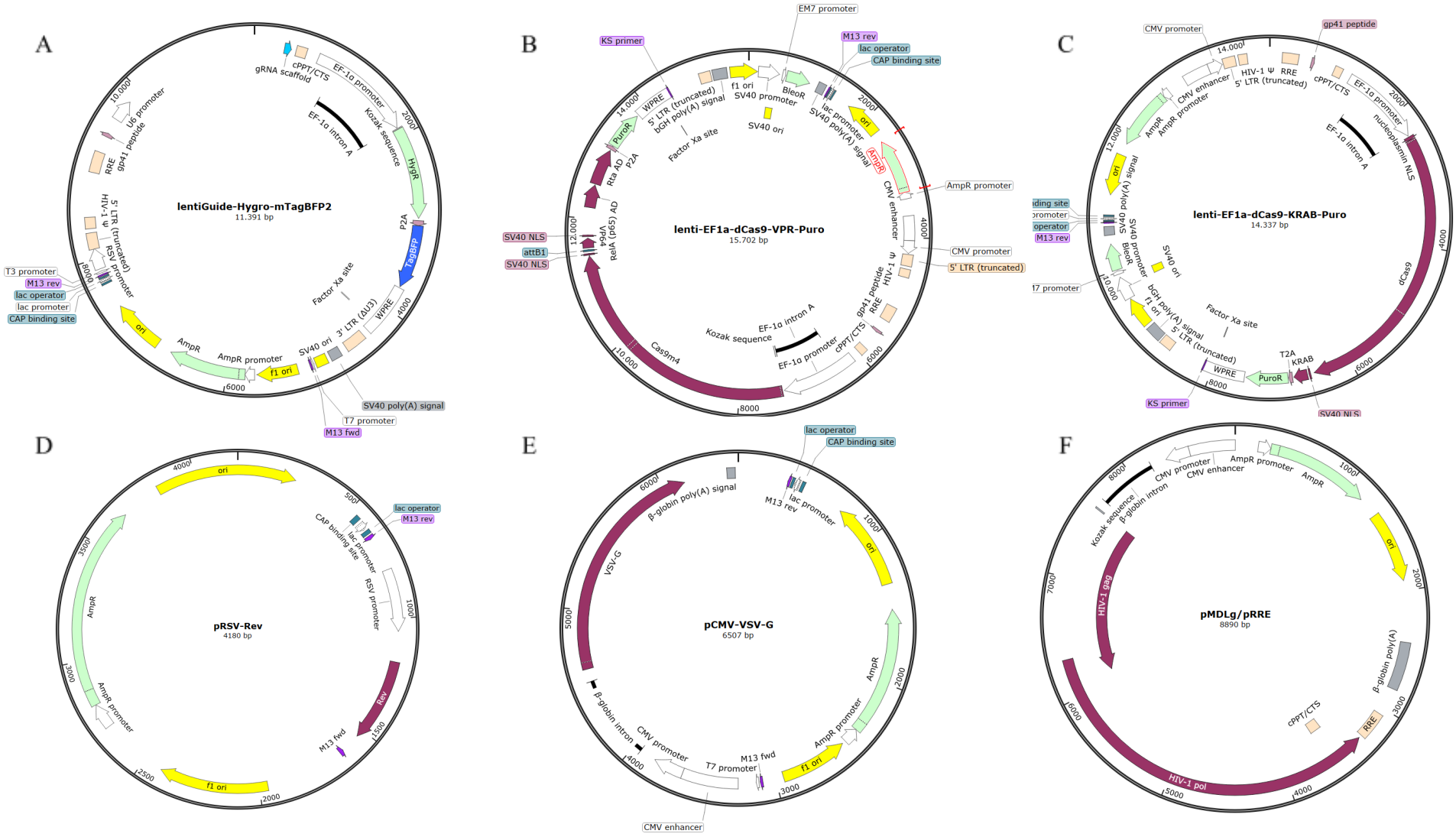


FIGURA 4: Mapa dos plasmídeos. Legenda completa na página seguinte.

FIGURA 4 (continuação). As figuras mostram os mapas dos plasmídeos utilizados neste estudo. É possível identificar os genes presentes. Plasmídeos: lentiGuide-BFP2 (plasmídeo Addgene #99374: lentiGuide-Hygro-mTagBFP2, plasmídeo de transferência de 3ª geração com 11391 pb) (**A**), lenti-dCas9-VPR (plasmídeo Addgene #99373: lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro, plasmídeo de 3ª geração com 15702 pb) (**B**), lenti-dCas9-KRAB (plasmídeo Addgene #99372: lenti-EF1a-dCas9-KRAB-Puro, plasmídeo de 3ª geração com 14337 pb) (**C**), REV (plasmídeo Addgene #12253: pRSV-Rev, plasmídeo de 3ª geração de empacotamento viral com 4180 pb) (**D**), VSV-G (plasmídeo Addgene #8454: pCMV-VSV-G, plasmídeo de 3ª geração de empacotamento viral de 6507 pb) (**E**) e MDL (plasmídeo Addgene #12251: pMDLg/pRRE, plasmídeo de empacotamento lentiviral de 3ª geração de 8890 bp) (**F**). Figura criada com SnapGene.

Foram utilizadas hiPSCs das linhagens: hiPSC 690 2c1-5 dCas9/VPR e hiPSC 553-3 dCas9/KRAB. Essas são linhagens que expressam constitutivamente as proteínas dCas9-VPR e dCas9-KRAB, respectivamente.

As hiPSCs foram mantidas em placas de 6 poços previamente tratadas com Geltrex 0,4x, conforme recomendação do fabricante (Gibco, A1413302) e cultivadas em Meio StemFlex (Gibco, A3349301, acrescido de 1% de solução antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240112)). Quando atingida a confluência entre 80-90%, a monocamada de células foi lavada com PBS 1x e em seguida incubada por 3-4 minutos com solução de EDTA 500 µM (Sigma, EDS, em PBS 1x). As células foram dissociadas em grumos e plaqueadas em novas placas de 6 poços pré-tratadas com Geltrex 0,4x para expansão. As hiPSCs foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO_2, com trocas de meio realizadas a cada 2-3 dias, até atingirem 80-90% de confluência, quando foram utilizadas para ensaios posteriores.

3.3.3. Diferenciação de hiPSCs em células-tronco neurais (NSCs)

A diferenciação de hiPSCs em NSCs foi feita como descrito em Yan *et al*. (2013). Após atingirem cerca de 90% de confluência, a monocamada de hiPSCs foi lavada com PBS 1x e, em sequência, incubada por 5 minutos a 37°C com Solução de Accutase (Gibco, A1110501). Após ter se desprendido da placa, a suspensão celular foi coletada em um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 800 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas, e em seguida plaqueadas em placas de 6 poços, previamente tratadas com Geltrex 0,4x, na densidade de $3{,}125 \times 10^4$ células/cm^2 em Meio StemFlex complementado com 10 µM de inibidor da Rho Quinase (ROCK) Tiazovivina (Sigma Aldrich, SML1045). Para dar início à diferenciação (dia 0), o meio foi trocado no dia seguinte para o Meio de Indução Neural (Meio NIM) (Meio Neurobasal (Gibco, 21103-049), Suplemento de Indução Neural 1x (Gibco, A1647701), e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, 15410-122)). O

meio foi trocado a cada 2 dias. No dia 7 da indução neural, a monocamada de células foi lavada com PBS 1x e incubada por 4 minutos a temperatura ambiente com Accutase. Após esse período, foi feita mais uma lavagem com PBS 1x e as células foram incubadas novamente com Accutase por 4 minutos a 37°C. A suspensão celular foi coletada em um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 300 g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas e plaqueadas em Meio de Expansão Neural (Meio NEM) (50% Meio Neurobasal, 50% de meio Advanced-DMEM/F12 (Gibco, 12634-010) e suplemento de indução neural 1x, acrescido de 1% de penicilina-estreptomicina) complementado com 10 μM de Tiazovivina na densidade de $1x10^5$ células/cm^2 em placas de 60 mm previamente tratadas com Geltrex 1x. O meio foi trocado a cada 2-3 dias até que as células atingiram cerca de 90% de confluência, quando foram utilizadas para geração de astrócitos.

3.3.4. Linhagens de NSCs

Além das NSCs diferenciadas das linhagens de hiPSCs que expressam dCas9 VPR e dCas9 KRAB, também foram utilizados neste estudo NSCs cedidas pelo Prof. Stevens K. Rehen, UFRJ/Instituto D'or. Essas NSCs também foram geradas a partir de hiPSCs, como descrito em Yan *et al*. (2013), sendo provenientes de doadores saudáveis e esquizofrênicos. As informações sobre as características de cada linhagem de células bem como dos doadores encontram-se na **TABELA 3**, em material suplementar.

3.3.5. Diferenciação das NSCs em astrócitos

A diferenciação das NSCs em astrócitos foi feita como descrito em Trindade *et al*. (2020). Após atingida a confluência entre 80-90%, a monocamada de NSCs foi lavada por duas vezes com PBS 1x e incubada por 5 minutos a 37°C com solução de Accutase. Após terem se desprendido da placa, a suspensão celular foi coletada e centrifugada a 300 g por 4 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio de diferenciação de astrócitos (Meio MDA), que é composto por: DMEM/F12 (Gibco, 12400-024), suplemento N-2 1x (Gibco, 17502-048), 1% de SFB e 1% de solução antibiótico-antimicótico. $5x10^4$ células/cm^2 de NSCs foram plaqueadas em uma garrafa de 25 cm^2 previamente tratada com Geltrex 1x, e o meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. Sempre que atingiram confluência acima de 90%, as células foram soltas, centrifugadas e ressuspendidas, como descrito, e plaqueadas em garrafas de 75 cm^2 e, em seguida, de 175 cm^2, também tratadas com Geltrex 1x, na proporção 1:3.

Após o período de 21 dias de diferenciação, os astrócitos foram passados na proporção 1:2 para garrafas de 175 cm^2 tratadas com Geltrex 0,5x, e em seguida para garrafas sem esse tratamento, como uma forma de selecionar positivamente as células diferenciadas em detrimento daquelas que estão indiferenciadas (não aderidas). Além disso, os astrócitos passaram a ser mantidos em meio de maturação de astrócitos (MMA), que consiste em: DMEM/F12, 10% SFB e 1% de solução antibiótico-antimicótico, sendo mantidas assim por mais 5 semanas. Durante este período, sempre que as células atingiam confluência acima de 90%, elas eram passadas para garrafas de 175 cm^2 na proporção 1:2. Para isso, elas eram lavadas duas vezes com PBS 1x e, em seguida, incubadas durante 5 minutos a 37°C com solução de Tripsina/EDTA 0,125%. Em seguida, a suspensão celular foi coletada em tubos cônicos de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 800 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio MMA e plaqueadas em garrafa. Ao final desse período de 5 semanas, essas células foram consideradas astrócitos maduros. Durante todo o período de diferenciação e maturação as células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO_2.

3.3.6. Estimulação dos astrócitos maduros com TNF-α

Após atingirem pelo menos 90% de confluência, os astrócitos maduros derivados de indivíduos saudáveis (HC) e de indivíduos esquizofrênicos (SCZ) com pelo menos 5 semanas de diferenciação, foram plaqueados em placas de 6 poços. Para isso, a monocamada de células foi lavada por duas vezes com PBS 1x e em seguida incubada com Tripsina/EDTA por 5 minutos a 37 °C. A suspensão celular foi coletada e centrifugada por 5 minutos a 800 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio MMA. $1x10^5$ células foram plaqueadas por poço.

No 5º dia após o plaqueamento, a monocamada de células foi lavada por 3 vezes com PBS 1x para remoção total do SFB e carenciadas por 24 h em meio MMA desprovido de SFB. Ao fim deste período, os astrócitos foram estimulados com 10 ng/mL de Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α, Biolegend, 717904) por 24 h, como uma forma de mimetizar um dos fatores de risco ambientais capazes de induzir uma resposta pró-inflamatória. Aos controles não estimulados (NS) foi adicionado BSA 0,1% m/v durante 24 h.

Ao fim da estimulação, o RNA total foi extraído pelo método de TRIzol para análise dos níveis de mRNA de GRN.

3.3.7. Cultivo e diferenciação de Células Microglia-like induzidas (iMGs)

3.3.7.1. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Cerca de 40 mL de sangue foi coletado de um doador saudável (homem, 31 anos) por meio de punção venosa na fossa cubital a vácuo em tubos estéreis contendo heparina sódica. Após coletado, o sangue foi armazenado a temperatura ambiente sendo processado dentro de um período máximo de 2 horas. Em um tubo falcon de 50 mL, o sangue total foi diluído na proporção 1:1 em PBS 1x e, em seguida, transferido gentilmente para um novo tubo sobre 10 mL do gradiente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, 10771), evitando-se misturá-los. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 900 g por 25 minutos à temperatura ambiente com aceleração e desaceleração mínimas. Após a centrifugação, a fase contendo as PBMCs (fração localizada entre o plasma e o gradiente) foi coletada e transferida para um tubo falcon de 50 mL. O volume foi completado para 50 mL com PBS 1x e a suspensão celular centrifugada a 400 g por 8 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado. Foi feita uma nova lavagem adicionando 50 mL de PBS 1x e centrifugando nas mesmas condições. Novamente, o sobrenadante foi descartado, e o pellet contendo as PBMCs foi homogeneizado e ressuspendido em meio de plaqueamento de PBMCs (Meio RPMI 1640 (Thermo, 11875085), 1% de Penicilina-estreptomicina e 10% de SFB) ou em SFB com 10% de DMSO e congelado no nitrogênio líquido para uso posterior.

3.3.7.2. Diferenciação e cultivo de iMGs

As PBMCs congeladas foram descongeladas rapidamente a 37°C e lavadas com PBS 1x. Essa solução foi coletada em um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 400 g por 8 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as PBMCs ressuspendidas em meio de plaqueamento de PBMCs.

A diferenciação das PBMCs em iMGs foi realizada como descrito por Ohgidani *et al*. (2014) e modificado por Sellgren *et al*. (2017). $1{,}5x10^5$ células/cm^2 de PBMCs foram plaqueadas em placas de 12 poços, previamente tratadas com Geltrex 1x, ou em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro limpas e estéreis também tratadas com Geltrex 1x. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído pelo meio de diferenciação (Meio RPMI 1640, Glutamax 1x, 100 ng/mL IL-34 (Biolegend, 577906), 10 ng/mL GM-CSF (Biolegend,

572903) e 1% de penicilina-estreptomicina). Após 9 dias de diferenciação, o meio de cultura foi aspirado, a monocamada de células foi lavada por 3 vezes com meio RPMI 1640 e meio de diferenciação fresco foi adicionado às células. Após 12 dias de diferenciação, o RNA total foi extraído pelo método de TRIzol para análises por RT-qPCR. Durante toda a diferenciação, as células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO2.

3.4. Bactérias *Escherichia coli* DH5α

3.4.1. Geração de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes

Para a geração de bactérias quimiocompetentes, dois protocolos foram utilizados.

Na primeira forma testada (Método $CaCl_2$, descrito em Mandel & Higa (1970) com algumas modificações) foi preparado um pré-inóculo com 10 µL da bactéria *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, 18258012) não competente em 5 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani (meio LB) que consiste em 10 g/L de bacto-triptona (Acumedia, 7351A), 5 g/L de extrato de levedura (Acumedia, 7184A) e 10 g/L de cloreto de sódio (NaCl) (Sigma, 31434) em água MilliQ. O pré-inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C a 200 rpm de agitação. Passado esse período, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio LB e incubado sob agitação a 200 rpm e 37°C até atingir uma densidade óptica (OD) a 600 nm entre 0,4-0,5. Em seguida, o meio de cultura contendo as bactérias foi incubado no gelo por 10 minutos e centrifugado a 4000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 mL de solução gelada de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 100 mM e incubado no gelo por 5 minutos. Em seguida, centrifugado novamente nas mesmas condições. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL de solução gelada de $CaCl_2$ a 100 mM com 20% de glicerol (Sigma, 56-81-5) e incubado a 4°C por 24 horas. Passado esse período, as bactérias competentes foram aliquotadas no gelo e armazenadas a -80°C até o seu uso para a transformação.

Foram também produzidas bactérias "Ultracompetentes" através do Método Inoue. Foi feito como descrito em Green *et al*. (2020) com algumas modificações. 20 µL da bactéria *Escherichia coli* DH5α foram adicionados a 80 µL de meio LB. Essas bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (meio LB com 15 g/L de Bacto Ágar (BD, 214010)). A placa foi incubada em estufa a 37°C por 16 horas. Para fazer o pré-inóculo, uma colônia da placa anteriormente preparada foi adicionada a 5 mL de meio LB e incubada, sob agitação a 200 rpm, a 37°C por 8 horas. Após esse período, 4 mL do pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de

meio SOB (bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, 1% de solução de cloreto de potássio (KCl) a 250 mM, complementado com 0,5% de solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) a 2M, em água MilliQ) e incubado a 20°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma absorbância a 600 nm de 0,55. Em seguida, o meio de cultura contendo as bactérias foi incubado no gelo por 10 minutos e centrifugado a 2500 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 2 minutos. Após esse período, o pellet foi ressuspendido em 80 mL de *Buffer* de Transformação Inoue (ITB) composto de 55 mM de cloreto de manganês tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Sigma, 221279), 15 mM de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Sigma, 223506), 250 mM de KCl (Sigma, P3911) e 10 mM de PIPES (piperazine-1,2-bis[2-ethanesulfonic acid], 0,5 M, pH 6,7). Em seguida, essa suspensão foi centrifugada novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, o pellet foi seco por 2 minutos e ressuspendido em 20 mL de ITB gelado. 1,5 mL de DMSO foi adicionado a essa suspensão bacteriana, a qual foi incubada no gelo por 10 minutos. As bactérias foram aliquotadas no gelo e armazenadas a -80°C.

Todas as soluções utilizadas foram esterilizadas, autoclavando-as ou filtrando-as (Biomed Scientific, Sterile PVDF 0,22 μm). Todos os procedimentos também foram realizados sob condições estéreis, trabalhando próximo a chama de um queimador a álcool.

3.4.2. Transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes

Bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes e o plasmídeo de interesse foram descongelados no gelo. Em um tubo estéril, foi adicionado 50 μL da bactéria e 25 ng de plasmídeo. Bactéria e plasmídeo foram incubados por 30 minutos no gelo, depois a 42°C por 1 minuto e 2 minutos novamente no gelo. Em seguida, 400 μL de meio LB sem antibiótico foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm por 1 hora. Após esse período, 100 μL desta cultura bacteriana foi adicionada a uma placa de petri contendo meio LB Ágar com 100 μg/mL de ampicilina (Sigma, A9518). A placa foi incubada em estufa a 37°C por 16 horas. Ao restante da cultura bacteriana, foi adicionado solução de glicerol a 50%, sendo armazenada a -80°C. Todo o processo de transformação foi feito sob condições estéreis trabalhando próximo a chama de um queimador a álcool.

3.4.3. PCR de colônia

Colônias individuais de bactérias *Escherichia coli* DH5α previamente transformadas foram transferidas para microtubos contendo 50 μL de água estéril e foram ressuspendidas. 10

µL desta suspensão de colônia foi transferida para um novo tubo contendo uma mistura estéril de 30 µL de meio LB com 20 µL de glicerol 50%, e armazenado a -80°C para propagação futura. O restante da suspensão foi lisado incubando a 100°C por 2 min. 2 µL dessa suspensão foi utilizada para PCR com o mix de reação consistindo de: Tampão 10x (200 mM Tris (pH 8,4) (Sigma, 252859), 500 mM KCl (Sigma, P3911), 10% de Polietilenoglicol (PEG) 400 (Sigma, P5413) e 10% de Formamida (Sigma, F9037) na concentração final 1x), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 mM dNTP (GE Healthcare, 28-4065-52), 0,1 mM de primer (forward e reverse) e Taq DNA polimerase em água livre de nucleases. As condições de termociclagem foram: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; 72°C por 10 minutos, 12 ºC por tempo indeterminado.

O produto da PCR de colônia foi submetido a separação por meio de eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado utilizando agarose (Biotech, D0012) na concentração de 3% em Tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5 X (Tris 40mM, EDTA 2 mM e ácido acético glacial 0,18%) e SYBR Safe 1x (Invitrogen, 1691988). 4 µL de Tampão DNA Loading Dye 6x (Thermo Scientific, R0611) foi adicionado a cada amostra. A migração eletroforética foi realizada sob uma tensão de 100V a 150V. Foi utilizado o marcador de tamanho *Thermo Scientific™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific, 10787018) como padrão do tamanho dos fragmentos de DNA em pares de base. O fragmento foi visualizado e documentado utilizando um transiluminador ultravioleta (LPIX, Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

3.5. Preparação dos plasmídeos

3.5.1. Purificação dos plasmídeos

3.5.1.1. Purificação em pequena escala (Mini Prep)

A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit *Qiagen QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen, 27104), de acordo com as instruções do fabricante.

Colônias individualizadas de bactérias previamente transformadas com o plasmídeo de interesse foram adicionadas a 6 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas, sob agitação a 200 rpm, a 37°C por 16 horas. Após esse período, o meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 4000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 250 µL de *Buffer P1*. A essa solução, 250 µL de

Buffer P2 foi adicionado, homogeneizando por inversão. Em seguida, 350 µL de *Buffer N3* foi adicionada a solução que foi centrifugada por 10 minutos a 17900 g a 20°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna e centrifugado por 60 segundos a 17900 g a 20°C. A coluna foi lavada adicionando 0,5 mL de *Buffer PB* e centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e uma nova lavagem foi feita adicionando 0,75 mL de *Buffer PE,* centrifugando nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e uma centrifugação adicional de 1 minuto foi feita para eliminar qualquer resíduo do tampão de lavagem. O DNA plasmidial foi eluído aplicando 50 µL de *Buffer EB* (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) à coluna. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 17900 g a 20°C. A concentração e qualidade do DNA foi analisada por espectrofotômetro (Multiskan® GO, Thermo Scientific). Os plasmídeos purificados foram armazenados a -20°C.

3.5.1.2. Purificação em média escala (Midi Prep)

A purificação dos plasmídeos em média escala foi realizada utilizando o kit *Qiagen QIAprep Spin Midiprep* (Qiagen, 12143), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações.

Colônias individualizadas de bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse foram inoculadas em 6 mL meio LB com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas, sob agitação a 200 rpm, a 37°C por 16 horas. Após esse período, 100 µL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio *Terrific Broth* (meio TB) (bacto triptona 12 g/L, extrato de levedura 24 g/L, 0,4% de Glicerol 100%, em água MilliQ, complementado com 10% de solução de fosfato de potássio (0,17M KH_2PO_4 e 0,72M K_2HPO_4, pH 7,2)) com 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após esse período, o meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 4000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 4 mL de *Buffer P1*. Foi adicionado a essa solução 4 mL de *Buffer P2*. Essa solução foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 4 mL de *Buffer P3* gelado, seguido por incubação por 15 minutos no gelo e centrifugação por 30 minutos a 20000 g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente por 15 minutos a 20000 g a 4°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna previamente lavada com 4 mL de *Buffer QBT,* a qual foi drenada por gravidade. A coluna foi então lavada por duas vezes com 10 mL de *Buffer QC*. O DNA foi eluído com 5 mL de *Buffer QF* e precipitado adicionando 3,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente, sendo então centrifugado a 15000 g por 30 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 2 mL de etanol 70% e centrifugado a 15000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por 10 minutos. Após esse período, o pellet foi ressuspendido em 200 µL de água livre de nucleases e incubado a 4°C por 16 horas. Após esse período, essa solução foi incubada a 56°C por 5 minutos e depois a 4°C por 5 minutos. A concentração e qualidade do DNA foi analisada por espectrofotômetro (Multiskan® GO, Thermo Scientific) e os plasmídeos purificados foram armazenados a -20°C.

3.5.2. Digestão dos plasmídeos com enzima de restrição

Os plasmídeos purificados foram digeridos utilizando-se enzimas de restrição. Para os plasmídeos lentiGuide-BFP2 e lenti-dCas9-KRAB foi utilizado Kit com Enzima de restrição SalI (Thermo Scientific, ER0641). Para o restante dos plasmídeos, lenti-dCas9-VPR, REV, VSV-G e MDL, foi utilizado Kit com Enzima de restrição EcoRI (Thermo Scientific, ER0271).

No gelo, foram descongelados os reagentes do kit da enzima de restrição junto ao plasmídeo de interesse. As digestões foram realizadas perfazendo um volume final de 10 µL, contendo 500 ng de DNA, 1µL da enzima de restrição (10 U/µL) e 1 µL do tampão da enzima (Tampão 10X), em água livre de nucleases. A reação ocorreu em um termociclador nas condições: 37 °C por 1 hora; 65 °C por 20 minutos; 4 °C por tempo indeterminado. Para o controle negativo, a enzima foi substituída por água na reação.

O produto da digestão foi submetido a eletroforese. Foi preparado gel de agarose, conforme já descrito, na concentração de 1%. A migração eletroforética foi realizada sob uma tensão de 100V a 150V. O fragmento foi visualizado e documentado utilizando um transiluminador ultravioleta.

3.6. *Design* e clonagem do gRNA

3.6.1. *Design* do gRNA

O desenho dos gRNAs foi feito conforme descrito em Ho *et al*. (2017). Os gRNAs foram projetados usando a ferramenta web Benchling (https://benchling.com/). Os gRNAs foram selecionados com base na distância do local do início da transcrição (TSS: *transcription start site*), sendo selecionados aqueles localizados entre -1000 a -50 pb a

montante do TSS. Também foi considerado para a escolha as pontuações “on-target” e “off target” que dizem respeito à probabilidade de ligação à sequência alvo e fora do alvo, respectivamente. Essas pontuações variam entre 0 a 100 sendo as mais altas consideradas melhores. Assim, quanto maior a pontuação “on-target” maior a probabilidade do gRNA se ligar a sequência alvo, e quanto maior a pontuação “off-target” menos chance o gRNA tem de se ligar a outras sequências inespecíficas no resto do genoma.

A sequência do gRNA SCRAMBLE foi construída utilizando a mesma composição de nucleotídeos do gRNA GRN_V3, através da ferramenta online GenScript (https://www.genscript.com/tools/create-scrambled-sequence). Além disso, foi utilizada a ferramenta BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para analisar a especificidade das sequências projetadas.

Os oligonucleotídeos de gRNAs foram sintetizados por *Integrated DNA Technologies*, IDT, e suas sequências e informações estão inseridas na **TABELA 1**, em material suplementar.

3.6.2. Clonagem das sequências de gRNA no plasmídeo lentiGuide-BFP2

As sequências de gRNAs foram inseridas no plasmídeo lentiGuide-BFP2 em um processo de clonagem descrito em Ho *et al*. (2017). Os oligonucleotídeos contendo as sequências dos gRNAs foram sintetizados como duas fitas simples (oligos senso e antisenso) para cada gRNA. Assim, foi feita uma etapa de fosforilação e anelamento dos oligonucleotídeos antes da clonagem. Para essa reação, foi utilizado 0,5 µL da enzima T4 Polinucleotídeo Quinase (T4 PNK; Thermo Scientific, EK0032), 1 µL do tampão A da enzima 10X, 1 µL de ATP (diluído em água nuclease-free para 10 mM; Thermo Scientific, R0441) e 1 µL dos oligonucleotídeos senso e antisenso (100 µM) em água livre de nucleases, perfazendo um volume final da reação de 10 µL. A reação ocorreu em um termociclador nas condições: 37°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos; redução da temperatura a 5°C/minuto até a temperatura final de 25°C.

Findada a etapa de fosforilação e anelamento, os oligos foram diluídos em água livre de nucleases na proporção 1:10, e prosseguiu-se para a etapa de clonagem no vetor plasmidial lentiGuide-mTagBFP2. A reação consistiu em: 1 µL do plasmídeo a 25 ng/mL, 1 µL dos oligos diluídos anelados, 0,125 µL de T7 DNA Ligase (3 x 10^6 U/mL; (New England Biolabs, M0318S)), 12,5 µL de DNA Ligase Buffer 2x, 0,125 µL de BSA (diluído em água

nuclease-free para 20 ng/µL; (Sigma, A7906)) e 1 µL de FastDigest Esp3I (isoesquizômero de BsmBI; (Thermo Scientific, FD0454)), em água livre de nucleases perfazendo o volume final de reação de 25 µL. A reação de clonagem (digestão do plasmídeo, seguida do seu anelamento) ocorreu em um termociclador nas seguintes condições: 15 ciclos de reação de 37°C por 5 min e 23°C por 5 min; e 4°C por tempo indeterminado. Os plasmídeos com gRNAs clonados foram armazenados a -80°C.

Posteriormente, bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes pelo método Inoue foram transformadas com os plasmídeos com os gRNAs clonados e a purificação dos plasmídeos com o inserto realizada por Mini Prep.

3.6.3. Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado pelo CT Vacinas (UFMG, Belo Horizonte, Brasil). As amostras foram enviadas conforme as instruções fornecidas pela instituição. Dessa forma, para a reação de sequenciamento, foram preparadas amostras contendo 100 ng do plasmídeo com o inserto purificado e 10 pmol do primer *gRNA_insert* antisenso.

A análise do sequenciamento foi feita utilizando *SnapGene software* (www.snapgene.com) e as sequências oriundas do sequenciamento alinhadas ao plasmídeo de interesse por meio da ferramenta web de análise de sequência *ClustalOmega* descrita em Madeira *et al.* (2022).

3.7. Produção dos lentivírus

3.7.1. Transfecção e coleta dos lentivírus

Células HEK 293T foram transfectadas utilizando polietilenimina (PEI-Max, Polysciences, #23966-2) para a produção de lentivírus de 3ª geração derivados de HIV-1. Esses lentivírus gerados foram utilizados como vetores virais para induzir a expressão dos genes contidos no plasmídeo de transferência. O procedimento foi feito como descrito em Brennand *et al*. (2011), com modificações.

Para a transfecção, foram utilizadas células HEK 293T a uma confluência de 70-80%, sendo duas placas de 100 mm por lentivírus produzido. Opti-MEM (Gibco, 31985062) e PEI Max foram pré-aquecidos a 37°C. Em um tubo falcon de 15 mL foi adicionado: 250 µL de

Opti-MEM e os plasmídeos purificados: 8,1 µg de MDL, 3,1 µg de Rev, 4,1 µg de VSV-G e 12,2 µg do plasmídeo de transferência de interesse (lentiGuide-BFP2 com o inserto clonado ou lenti-dCas9-VPR ou lenti-dCas9-KRAB). Em um outro tubo falcon de 15 mL foi adicionado: 250 µL de Opti-MEM e 110 µL de PEI-Max. A mistura de PEI-Max foi transferida ao tubo com a mistura de DNA inicialmente em pequenos volumes e aumentando gradativamente até a completa transferência. A mistura foi agitada suavemente durante todo o processo de transferência. Em seguida, a mistura foi vortexada e incubada por 15 min à temperatura ambiente (20°C–25°C) e depois adicionada por gotejamento nas placas com as células HEK 293T. Após 6 horas, foi feita a troca completa de meio.

Após 48 horas da transfecção, o meio de cultura foi coletado e clarificado por centrifugação a 2500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo falcon e iniciou-se o processo de purificação e concentração dos lentivírus.

Células HEKs 293T foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% CO_2 durante todo o período.

3.7.2. Purificação e concentração dos lentivírus

A purificação e concentração dos lentivírus foi feito conforme protocolo descrito em *Functional Genomics Core* (s.d.). Ao meio de cultura contendo os lentivírus produzidos foi adicionado 1 volume da solução de concentração (40% PEG-8000 (Sigma, 24889230), 7% NaCl, 10% de PBS 10X, em água de injeção, pH 7,0-7,2) para cada 3 volumes do meio. Essa solução contendo o lentivírus foi então incubada por pelo menos 4 horas sob agitação (cerca de 60 rpm) a 4 °C e, em seguida, centrifugada a 1600 g por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. 500 µL de PBS 1x gelado foi adicionado ao pellet, o qual foi incubado por 10 minutos no gelo e só depois ressuspendido e centrifugado a 16000 g por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o lentivírus foi aliquotado e armazenado a -80°C.

3.8. Titulação do número de cópias de genoma viral

A titulação do número de cópias do genoma viral dos lentivírus produzidos foi realizada por RT-qPCR. Assim, o RNA total da amostra lentiviral foi extraído pelo método de TRIzol e ressuspendido em 10 µL de água livre de nucleases. O RNA purificado foi então tratado com DNase. A reação consistiu de: 5 µL da amostra de RNA, 3 µL de Tris HCl (50 mM, pH 7,4), 1,44 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,1 µL de BSA (10 mg/mL), 0,5 µL de DNase I

(recombinant Roche, 04716728001), em água livre de nucleases perfazendo um volume final de 12 µL. A reação ocorreu em um termociclador nas condições: 37°C por 1 hora; 70°C por 2 minutos; 4°C por tempo indeterminado. 6 µL desse RNA tratado com DNase foi utilizado para a transcrição reversa com o mix de reação consistindo de: 15 ng/µL de primers randômicos, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 625 µM dNTP, 10 µM DTT e transcriptase reversa em água livre de nucleases. As condições de termociclagem foram: 70°C por 10 minutos, 4°C por 10 minutos, 42°C por 1 h e 70°C por 15 minutos.

Em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas do cDNA (de não diluída até uma diluição de 10^{-3}). As amostras diluídas foram então submetidas à PCR quantitativa (qPCR) para LV2 (as sequências dos primers estão na **TABELA 2**, no material suplementar), utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix e 200 nM de primers senso e antisenso no sistema QuantStudio 7 (Applied Biosystems). As condições de termociclagem da qPCR foram: 95°C por 3 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos; 95°C por 15 segundos.

Findada a RT-qPCR, foi determinado os valores de *threshold cycle* (Ct) para cada amostra diluída. Cada valor Ct corresponde a um número de cópias do genoma viral de uma curva padrão gerada a partir de diluições em série de um modelo de RNA viral controle calibrado. Assim, para cada amostra diluída foi calculado um valor de número de cópias do genoma viral/mL de acordo com a fórmula abaixo. A média dos valores encontrados para cada diluição foi utilizada para determinar o conteúdo de genoma viral de cada lentivírus produzido.

$$Cópias/mL = \frac{(nº\ cópias) * (1000) * (volume\ RNA) * (fator\ de\ diluição) * (diluição\ DNase) * (diluição\ RT)}{(volume\ qPCR) * (volume\ vírus)},$$

sendo:

- Cópias/mL: cópias do genoma viral/mL de cada amostra diluída
- n° cópias: número de cópias na curva padrão RT-qPCR
- volume RNA: volume (µL) utilizado para ressuspender o RNA na etapa de extração
- fator de diluição: fator de diluição da amostra cDNA
- diluição DNase: fator de diluição da amostra no tratamento com a DNase
- diluição RT: fator de diluição da amostra na transcrição reversa (RT)
- volume qPCR: volume (µL) da amostra utilizado para qPCR por well
- volume vírus: volume (µL) de lentivírus utilizado

3.9. Transdução das células com lentivírus e seleção por antibiótico

3.9.1. Preparo de células HEK 293T para transdução

Para a transdução com os lentivírus, células HEK 293T foram plaqueadas em placas de 12 poços. Para isso, a monocamada de células foi lavada com PBS 1x e em seguida com Tripsina/EDTA 0,25%. A suspensão de células foi coletada e ressuspendida em meio DMEM completo. $1x10^5$ células foram plaqueadas por poço.

3.9.2. Preparo das hiPSCs para transdução

Para a transdução com os lentivírus, a monocamada de hiPSCs, com 80-90% de confluência, foi lavada com PBS 1x e em seguida incubada com Solução de Accutase por 5 minutos a 37°C. A suspensão celular foi então coletada em um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 800 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em Meio StemFlex. $5x10^4$ células/cm^2 foram plaqueadas em uma placa de 12 poços previamente tratadas com Geltrex 0,4X.

3.9.3. Preparo dos astrócitos para transdução

Para a transdução com os lentivírus, astrócitos maduros com 5-6 semanas de diferenciação e com 100% de confluência foram plaqueados em placas de 6 poços. Para isso, a monocamada de células foi lavada por duas vezes com PBS 1x e incubada com Tripsina/EDTA 0,125% por 5 minutos a 37 °C. A suspensão de células foi coletada e centrifugada por 5 minutos a 800 g. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio MMA. $1x10^5$ células foram plaqueadas por poço.

3.9.4. Transdução com lentivírus e seleção das células

Para a transdução das células alvo, as alíquotas lentivirais foram descongeladas no gelo e adicionadas aos poços com as células HEK 293T, hiPSCs ou com os astrócitos ainda em suspensão. Para as iMGs, os lentivírus foram adicionados ao poço com as células em suspensão após descongelamento ou no 8° dia de diferenciação. No dia seguinte, foi realizada a troca do meio celular por meio fresco.

De 4 a 6 dias após a transdução, foi verificada fluorescência para as células que foram infectadas com lentivírus contendo o ventor LentiGuide-BFP2. Imagens de microscopia

foram obtidas no microscópio digital EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher). Também após esse período, a seleção das células transduzidas foi iniciada substituindo o meio por meio fresco contendo 1 μg/ml de puromicina (Gibco, A1113803) ou 0,2 mg/ml de higromicina B (Gibco, 10687010) (a depender do vetor lentiviral). Após 24 horas, foi feita uma lavagem da monocamada celular com PBS 1x, e novamente foi adicionado meio com antibiótico. Após 24 horas, foi feita uma nova lavagem e o meio substituído por meio fresco. Após 6-15 dias, o RNA total da cultura celular foi extraído pelo método de TRIzol para análises por RT-qPCR.

3.10. Transcrição Reversa e PCR quantitativa (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído pelo método de TRIzol, de acordo com as instruções do fabricante, e ressuspendido em 12 μL de água livre de nucleases. A concentração e qualidade do RNA foi analisada por espectrofotômetro (Multiskan® GO, Thermo Scientific). 1 μg de RNA foi utilizado para a transcrição reversa com o mix de reação consistindo de: 15 ng/μL de primers randômicos, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 625 μM dNTP, 10 μM DTT e transcriptase reversa em água livre de nucleases. As condições de termociclagem foram: 70°C por 10 minutos, 4°C por 10 minutos, 42°C por 1 h e 70°C por 15 minutos. Em seguida, o cDNA resultante foi submetido à PCR quantitativa (qPCR) para *GRN*, *dCas9_VPR*, *dCas9_KRAB*, *LV2*, *RPLP0* e *IPO8* (as sequências dos primers estão na **TABELA 2** em material suplementar), utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix e 200 nM de primers senso e antissenso no sistema QuantStudio 7 (Applied Biosystems). As condições de termociclagem da qPCR foram: 95°C por 3 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos; 95°C por 15 segundos. A expressão relativa de cada gene foi normalizada pela média geométrica dos genes de expressão constitutiva (*RPLP0* e *IPO8*) e calculada pelo método $2^{-\Delta Ct}$.

3.11. Análise estatística

As análises estatísticas e gráficos de dados foram realizados utilizando o software GraphPad Prism (v. 8.0.1). A distribuição normal foi assumida e foi realizada *One-Way* ou *Two-way ANOVA*, de acordo com indicação na legenda, seguida pelos testes de comparação múltipla de Sidak.

4. RESULTADOS

4.1. Bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes pelo Método Inoue são mais eficientes

Uma vez observadas alterações na expressão de Progranulina em iMGs derivadas de indivíduos esquizofrênicos (**FIGURA 3**), faz-se necessário entender melhor a contribuição e a função dessa proteína na esquizofrenia. Uma das formas de começar a desvendar isso é através da modulação da transcrição, seja pela ativação ou repressão do gene, por meio do sistema CRISPR/dCas9.

Assim, para a utilização dessa ferramenta, o primeiro passo é obter bactérias quimiocompetentes para a amplificação dos plasmídeos necessários. Para a produção dessas bactérias, dois protocolos foram testados (Método $CaCl_2$ e Método Inoue). Após o período de incubação, foram observadas colônias bacterianas em ambas as placas, mas em maior número na placa com as bactérias produzidas pelo Método Inoue (**FIGURA 5**).

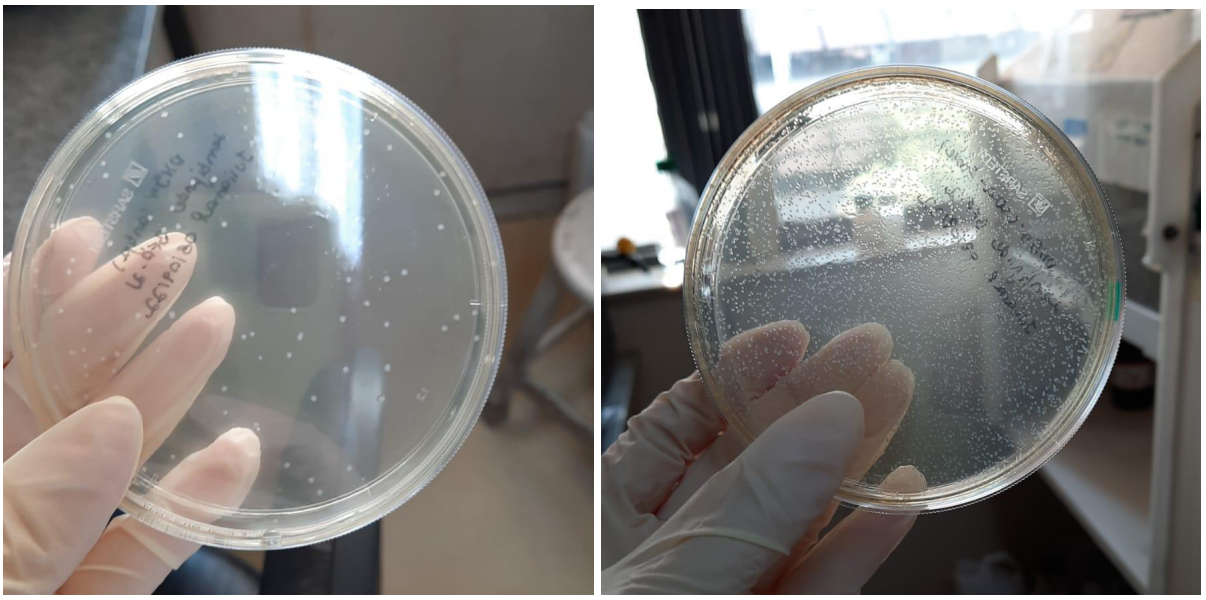


FIGURA 5: Transformação de *E.coli* DH5α quimiocompetentes com o plasmídeo LentiGuide-BFP2. Imagens mostram placas de acrílico contendo meio LB ágar com antibiótico ampicilina (100 µg/mL), nas quais foram inoculadas cepas de *E.coli* DH5α quimiocompetentes pelo Método $CaCl_2$ (esquerda) e pelo Método Inoue (direita) transformadas com o plasmídeo LentiGuide-BFP2.

A eficiência do processo de transformação foi validada por PCR de colônia. Assim, 5 colônias foram selecionadas de cada placa. Foi possível visualizar os amplicons no gel de agarose (**FIGURA 6**) indicando a presença do plasmídeo para ambas as bactérias produzidas.

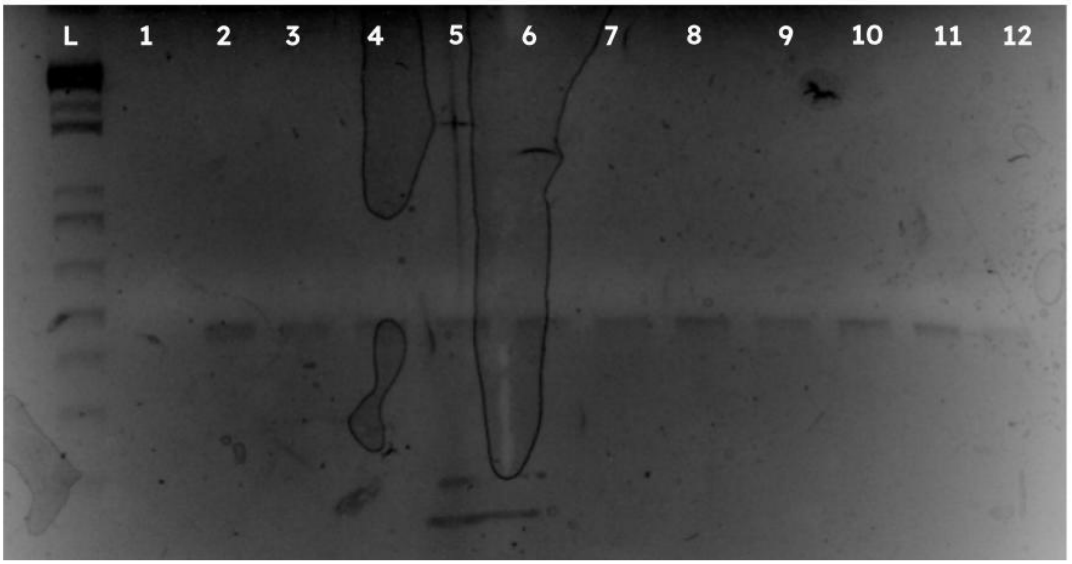


FIGURA 6: **Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de PCR de colônia de bactérias *E.coli* DH5a quimiocompetentes transformadas com o plasmídeo LentiGuide-BFP2**. Os primers *gRNA_insert forward* e *reverse* foram utilizados. Os resultados da PCR com amplicons indicam a presença do plasmídeo. L: Ladder 1 kb Plus, poço 1 sendo o controle negativo (água), poço 2 o controle positivo (Plasmídeo LentiGuide-BFP2 a 10ng/uL), poços 3-7 amostras de colônias de bactérias competentes pelo Método Inoue e poços 8-12 amostras de colônias de bactérias competentes pelo Método $CaCl_2$.

Assim, a quimiocompetência das bactérias produzidas foi comprovada através do crescimento de colônias em meio LB com ampicilina, visto que a resistência ao antibiótico indica fortemente que todas as colônias são positivas para o plasmídeo de interesse. Isso foi validado por PCR de colônia que comprovou a eficiência da transformação. Entretanto, devido ao maior número de colônias observadas nas placas com as bactérias produzidas pelo Método Inoue, decidiu-se utilizar estas bactérias quimiocompetentes para os experimentos posteriores.

4.2. **A qualidade dos plasmídeos foi verificada**

As sequências dos componentes CRISPR (proteína dCas9 e gRNA) estão contidas em plasmídeos. Comparado a outros sistemas, os plasmídeos se destacam pela sua estabilidade, seu custo-benefício e facilidade de amplificação (Cheng *et al*., 2021). Para assegurar a qualidade e a integridade dos mesmos, depois de purificados, os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição específicas e os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose.

Dessa forma, a digestão do plasmídeo lentiGuide-BFP2 (plasmídeo responsável pela expressão do componente gRNA) com a enzima de restrição SalI gerou os fragmentos esperados de 10796 pb e 595 pb (**FIGURA 7**). Os plasmídeos lenti-dCas9-KRAB e lenti-dCas9-VPR, que carregam as sequências que codificam a proteína dCas9, também foram digeridos com as enzimas de restrição SalI e EcoRI, respectivamente, gerando os fragmentos: 9626 pb, 2523 pb e 2188 pb, para lenti-dCas9-KRAB, e 13050 pb, 1974 pb e 678 pb, para lenti-dCas9-VPR (**FIGURA 8**).

Os plasmídeos responsáveis pelo empacotamento lentiviral também foram digeridos com enzima de restrição. Assim, a digestão dos plasmídeos REV, VSV-G e MDL com a enzima EcoRI gerou os fragmentos esperados de 3869 pb e 311pb (REV); 4791 pb, 1668 pb, e 2 fragmentos de 24 pb (VSVG); 4335 pb, 4154 pb e 401 pb (MDL) (**FIGURA 9**).

O uso de enzimas de restrição capazes de reconhecer e clivar sequências específicas do DNA assegura que a digestão ocorra de maneira seletiva e precisa, fornecendo, dessa forma, um padrão previsível de fragmentos. Assim, os ensaios de digestão realizados mostraram que todos os plasmídeos utilizados no estudo apresentam o padrão esperado de fragmentos, o que é um indicativo de que os plasmídeos estão com a estrutura adequada.

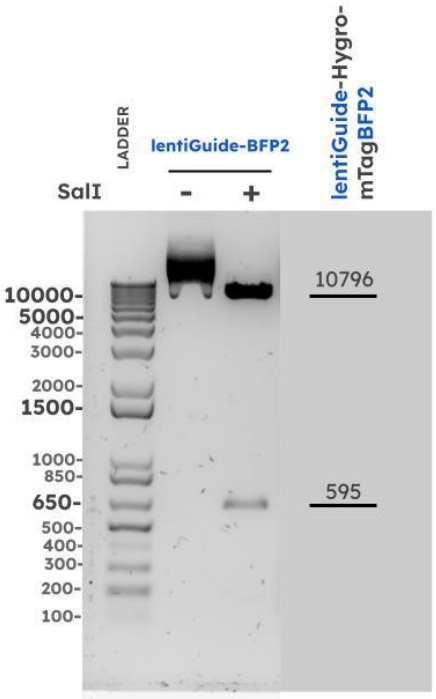


FIGURA 7: **Digestão com enzima de restrição do plasmídeo lentiGuide-BFP2.** A digestão do plasmídeo foi realizada na ausência (-) e presença (+) da enzima SalI e a eletroforese em gel de agarose 1%. O tamanho dos fragmentos esperados após a digestão estão no painel à direita. Ladder 1 kb Plus.

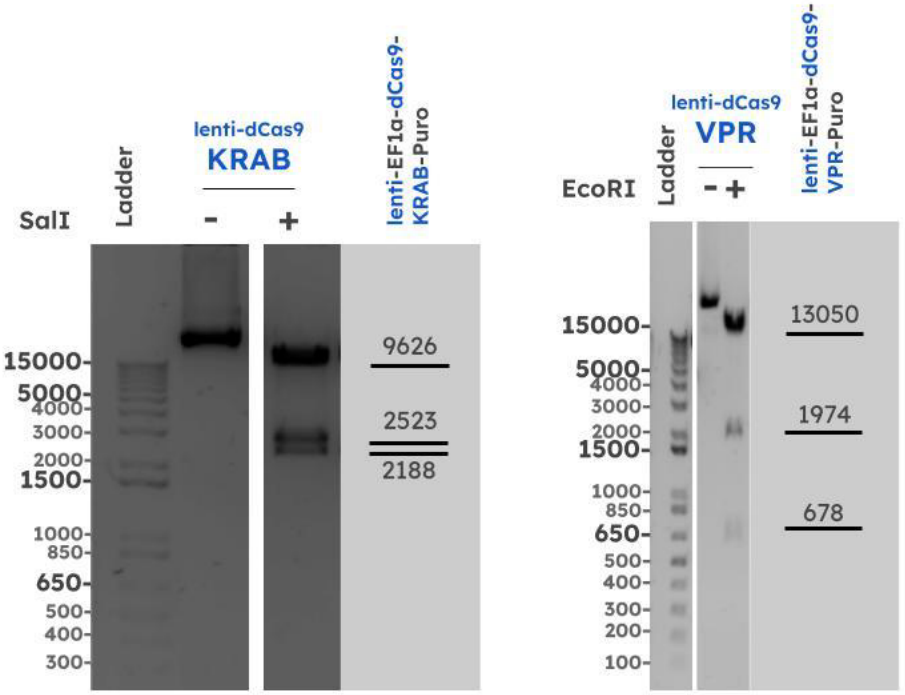


FIGURA 8: **Digestão com enzima de restrição dos plasmídeos lenti-dCas9-KRAB e lenti-dCas9-VPR.** A digestão dos plasmídeos foi realizada na ausência (-) e presença (+) das enzimas SalI (para lenti-dCas9-KRAB) e EcoRI (para lenti-dCas9-VPR) e a eletroforese em gel de agarose 1%. O tamanho dos fragmentos esperados após a digestão estão no painel à direita. Ladder 1 kb Plus.

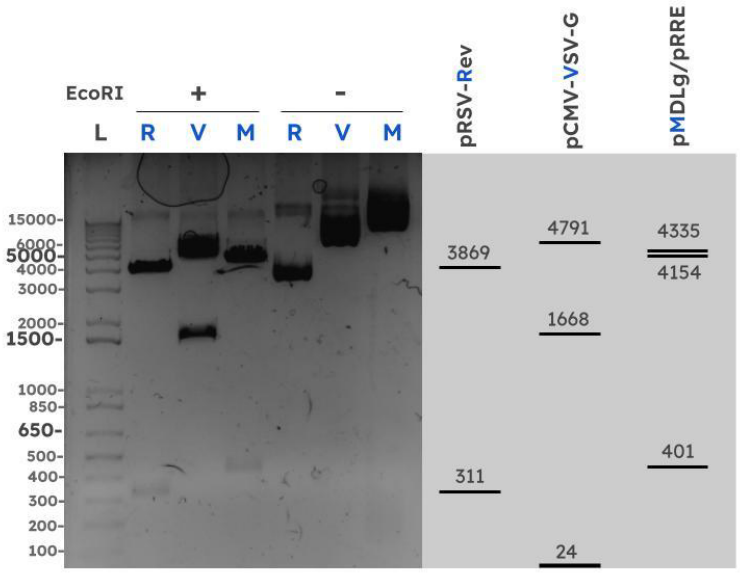


FIGURA 9: **Digestão com enzima de restrição dos plasmídeos REV, VSV-G e MDL.** A digestão dos plasmídeos foi realizada na ausência (-) e presença (+) da enzima EcoRI e a eletroforese em gel de agarose 1%. O tamanho dos fragmentos esperados após a digestão estão no painel à direita. Ladder 1 kb Plus.

4.3. As sequências dos gRNAs foram inseridas corretamente no plasmídeo lentiGuide-BFP2

O próximo passo foi o desenho da sequência do componente gRNA do sistema CRISPR que define o gene a ser modificado, bem como sua clonagem no vetor plasmidial lentiGuide-BFP2.

Assim, uma vez que a eficiência do gRNA pode ser imprevisível, três gRNAs diferentes foram desenhados visando a região promotora do gene *GRN* (identificados como GRN_V1, GRN_V2, GRN_V3), aumentando, assim, a probabilidade de termos sucesso em desenvolver um guide capaz de reconhecer o gene alvo e direcionar a dCas9. Foi também desenhado gRNA SCRAMBLE (possui a mesma composição de nucleotídeos do gRNA GRN_V3 porém ordenados de forma aleatória) que não é integralmente complementar a nenhuma região do genoma humano, sendo, dessa forma, incapaz de guiar a proteína dCas9 e atuando, assim, como um controle. As sequências podem ser visualizadas na **TABELA 1** no material suplementar.

Às sequências de gRNAs foram adicionados "*oligo overhangs*" importantes para o processo de clonagem. Assim, à extremidade 5' do oligonucleotídeo senso foi adicionado a sequência 'CACC' e à extremidade 5' do oligonucleotídeo antisensso foi adicionado a sequência 'AAAC'. Estas sequências garantem a compatibilidade com as *overhangs* do vetor lentiGuide-BFP2 quando digerido com a enzima Esp3I, facilitando, assim, a clonagem. Além disso, também foi adicionado à extremidade 5' do oligonucleotídeo senso um nucleotídeo de iniciação 'G' importante para a transcrição eficiente do gRNA. Consequentemente, foi adicionado 'C' à extremidade 3' do oligonucleotídeo antisensso garantindo a correta hibridização (Li *et al*., 2021).

Depois de desenhados, os oligonucleotídeos de gRNAs foram enviados para síntese, sendo depois clonados no vetor lentiGuide-BFP2 utilizando a enzima Esp3I, de tal forma que a sequência 'CACC' do gRNA compreenderá a extremidade 3' do promotor U6, que conduz a transcrição do gRNA, e a sequência 'AAAC' a extremidade 5' da sequência *gRNA scaffold*, importante para a ligação da proteína dCas9, conforme ilustrado no esquema da **FIGURA 10**.

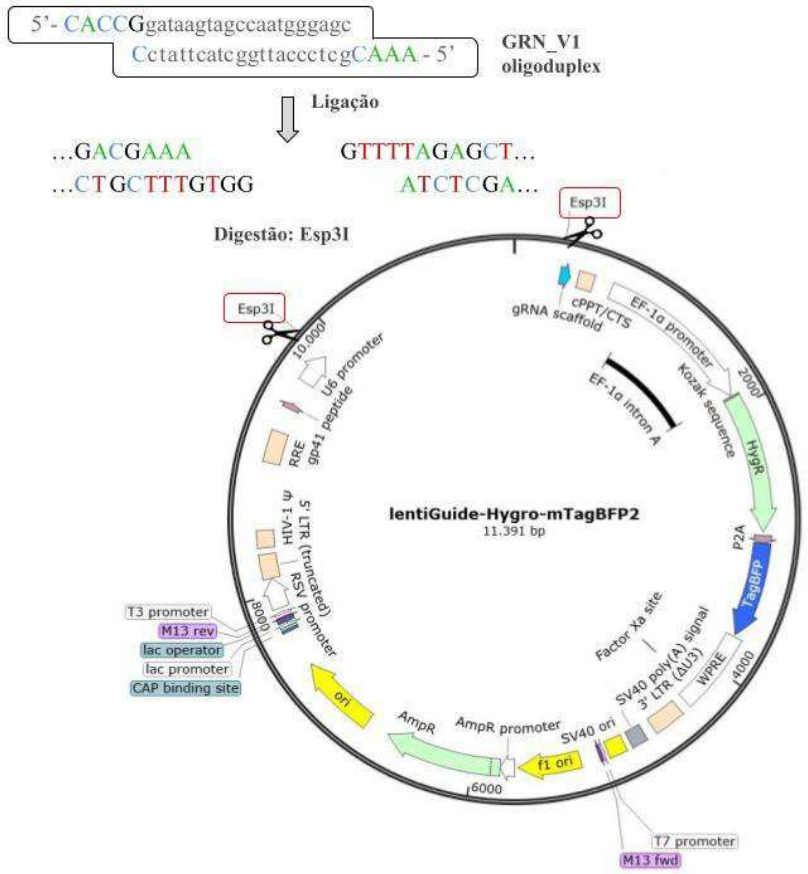


FIGURA 10: **Ilustração do processo de digestão do plasmídeo lentiGuide-BFP2 usando a enzima Esp3I para clonar gRNA.** Na figura, foi utilizado como exemplo a clonagem do gRNA 'GRN_V1' no vetor lentiGuide-BFP2. Em minúsculo a sequência do gRNA GRN_V1 e em maiúsculo as sequências *overhangs* do vetor plasmidial e as sequências *overhangs* adicionadas ao guide. Adaptado de Li *et al.* (2021).

Os plasmídeos com os insertos foram então transformados em bactérias *E.coli* DH5α quimiocompetentes e as amostras de colônias resultantes submetidas à PCR para a validação da clonagem. Assim, para a visualização do inserto foi utilizada uma abordagem utilizando os primers *gRNA_insert*, projetado para a região do plasmídeo lentiGuide-BFP2 onde se localiza a sequência do gRNA, e os próprios oligonucleotídeos de gRNAs desenhados. Assim, para cada plasmídeo, foi feita uma PCR utilizando dois *mixes* diferentes, um contendo como *Primer Forward,* o oligonucleotídeo senso do gRNA desenhado (oligo senso GRN_V1, por exemplo), e como *Primer Reverse,* o oligonucleotídeo antissenso do primer *gRNA_insert* (Mix 1). Além disso, um segundo mix foi preparado, contendo o *Primer Forward* da PCR sendo o oligonucleotídeo senso do primer *gRNA_insert*, e o *Primer Reverse* o oligonucleotídeo antissenso do gRNA desenhado (oligo antissenso GRN_V1, como exemplo) (Mix 2) (sequências dos primers podem ser visualizadas nas **TABELA 1** e **TABELA 2**, do

material suplementar). A utilização dessa abordagem que emprega o próprio gRNA desenhado como um dos primers garante que a visualização de banda (amplicon) implique na presença do inserto no plasmídeo.

Assim, foi possível visualizar a presença de amplicons para a maioria das colônias selecionadas transformadas com os plasmídeos contendo os insertos: gRNA GRN_V1, GRN_V2, GRN_V3 e SCRAMBLE (**FIGURA 11**), indicando que o processo de clonagem dos gRNAs no vetor lentiGuide-BFP2 ocorreu de maneira correta.

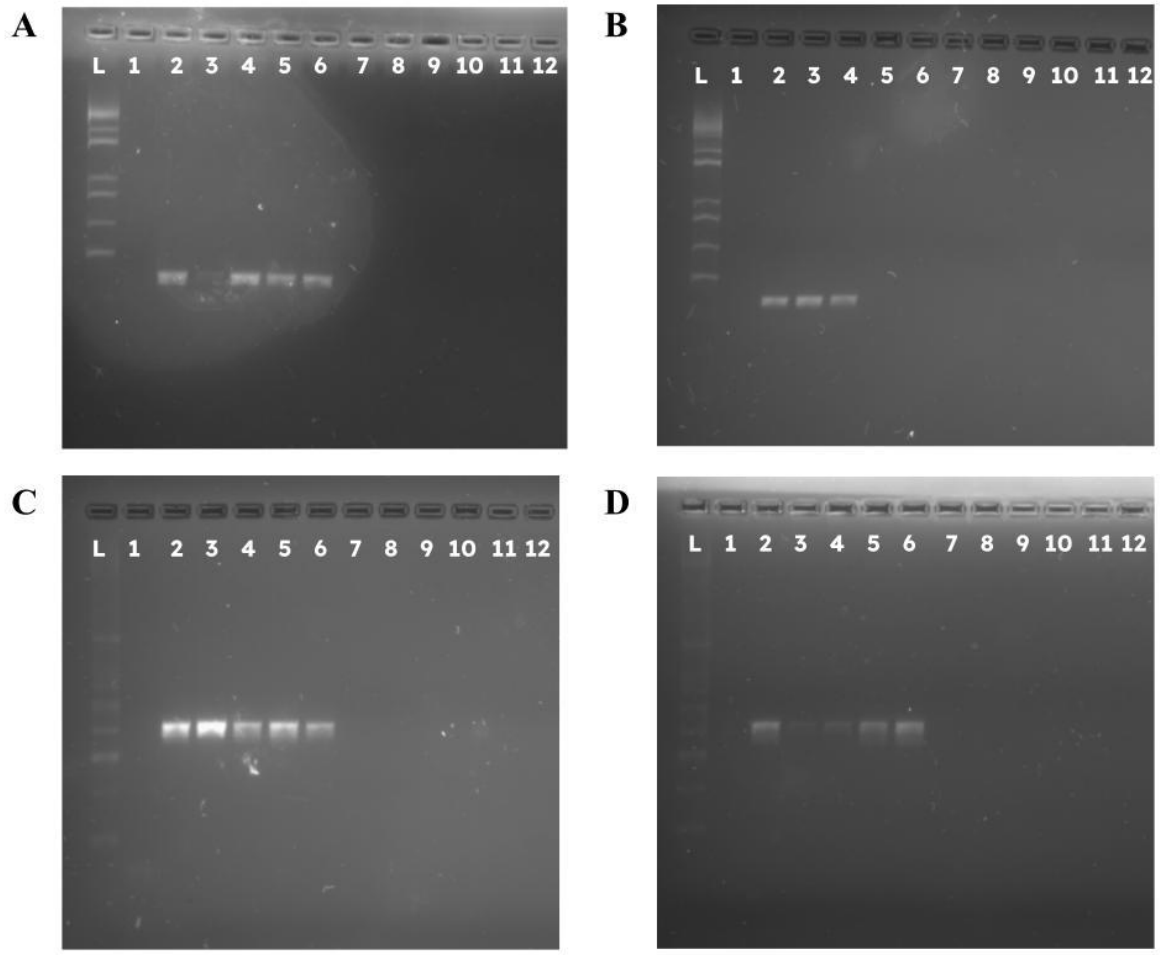


FIGURA 11: **Eletroforese em gel de agarose (3%) de produtos de PCR de colônia de bactérias *E.coli* DH5a transformadas com o plasmídeo lentiGuide-BFP2 com os gRNAs clonados.** A visualização das bandas (amplicons) indica a presença do plasmídeo com os insertos GRN_V1 (**A**), GRN_V2 (**B**), GRN_V3 (**C**) e SCRAMBLE (**D**) clonados. L: Ladder 1 kb Plus; poço 1 (água) e poços 2-6 (amostras de colônias) com amostras da PCR usando Mix 1 (Primer Forward: oligo senso GRN_V1 (**A**), GRN_V2 (**B**), GRN_V3 (**C**), SCRAMBLE (**D**) e Primer Reverse: oligo antissenso *gRNA_insert*); poço 7 (água) e poços 8-12 (amostras de colônias) com amostras da PCR usando Mix 2 (Primer Forward: oligo senso *gRNA_insert* e Primer Reverse: oligo antissenso GRN_V1 (**A**), GRN_V2 (**B**), GRN_V3 (**C**), SCRAMBLE (**D**)).

Uma colônia de cada plasmídeo que mostrou conter a inserção foi propagada em 6 mL meio LB com 100 µg/mL de ampicilina e o plasmídeo purificado por Mini Prep para Sequenciamento de Sanger. O resultado do sequenciamento mostrou mais uma vez a presença dos gRNAs no plasmídeo lentiGuide-BFP2 e a validação do processo de clonagem (**FIGURA 12**).

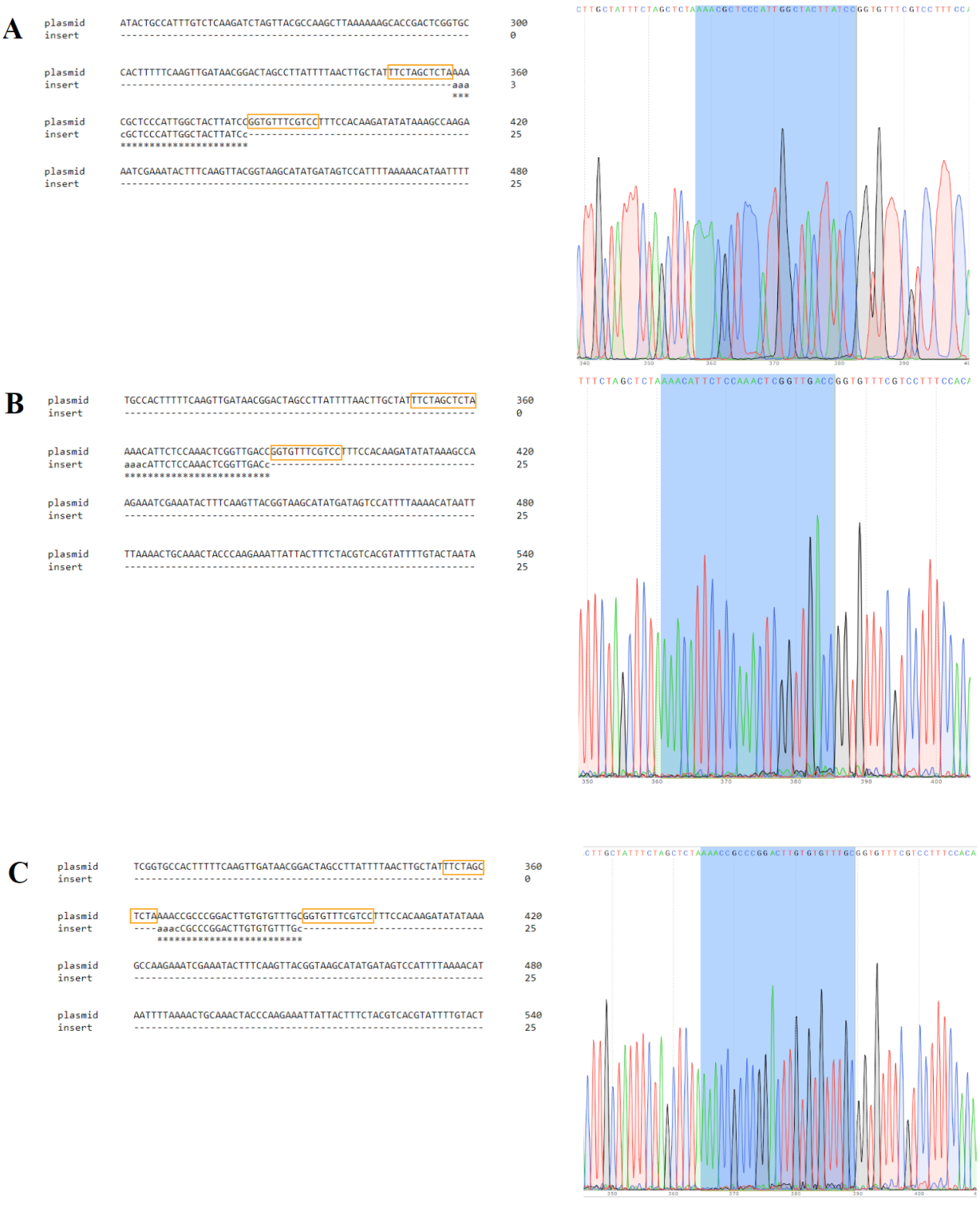


FIGURA 12: **Validação da clonagem por Sequenciamento de Sanger.** O resultado do sequenciamento confirma que os gRNAs GRN_V1 (**A**), GRN_V2 (**B**), GRN_V3 (**C**), SCRAMBLE (**D**) foram inseridos corretamente no plasmídeo LentiGuide-BFP2. A **esquerda** o alinhamento com a sequência do inserto destacada com asteriscos (*) e a **direita** a análise representativa do resultado do sequenciamento de Sanger com a sequência do inserto destacada em azul. As sequências a montante e a jusante do inserto foram destacadas em amarelo.

A enzima de restrição Esp3I reconhece o sítio ‘CGTCTC’ no plasmídeo, clivando a jusante de seu sítio de reconhecimento. No vetor lentiGuide-BFP2, essa enzima possui dois locais de clivagem (**FIGURA 13**) próximos às sequências do promotor U6 e do gRNA *scaffold* (sequências destacadas em amarelo nas **FIGURA 12** e **FIGURA 13**). Assim, o resultado do sequenciamento mostrou não só que os gRNAs foram inseridos de forma íntegra no vetor como também no local exato.

Sendo assim, podemos concluir que os três gRNAs que visam a região promotora do gene *GRN* e o gRNA SCRAMBLE foram clonados com sucesso no vetor plasmidial lentiGuide-BFP2.

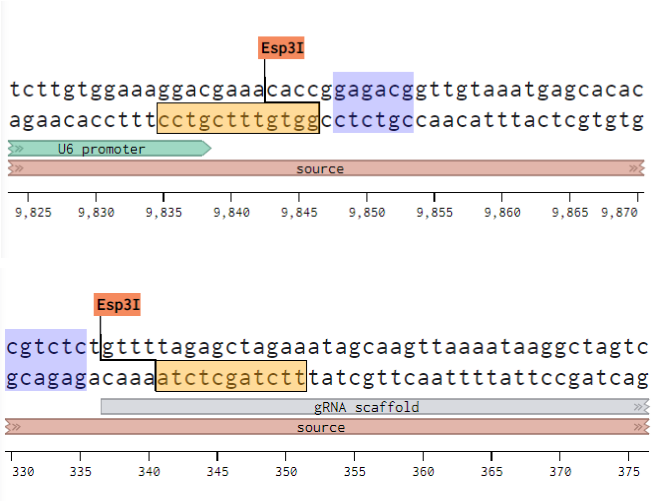


FIGURA 13: **Sítio de restrição da enzima Esp3I no plasmídeo lentiGuide-BFP2.** Os sítios de reconhecimento da enzima Esp3I no plasmídeo lentiGuide-BFP2 estão destacados em roxo. Em amarelo, as sequências esperadas a encontrar a jusante e a montante do inserto. Figura criada utilizando Benchling.

4.4. As células HEK 293T foram transfectadas com sucesso e os lentivírus produzidos

Para a produção de vetores lentivirais, células HEK 293T foram transfectadas com os plasmídeos de empacotamento viral, REV, VSV-G e MDL, e os plasmídeos lentiGuide-BFP2 com os insertos clonados. A **FIGURA 14** mostra células HEK 293T expressando a proteína fluorescente azul (BFP), o que indica que as células foram transfectadas com sucesso com os plasmídeos lentiGuide-BFP2 com os insertos GRN _V1 (**FIGURA 14-A e 14-B**), GRN_V2 (**FIGURA 14-C e 14-D**), GRN_V3 (**FIGURA 14-E e 14-F**) e SCRAMBLE (**FIGURA 14-G e 14-H**) clonados.

Além disso, células HEK 293T também foram transfectadas com os plasmídeos REV, VSV-G, MDL e os plasmídeos lenti-dCas9-KRAB e lenti-dCas9-VPR, para a produção dos lentivírus KRAB e VPR, respectivamente.

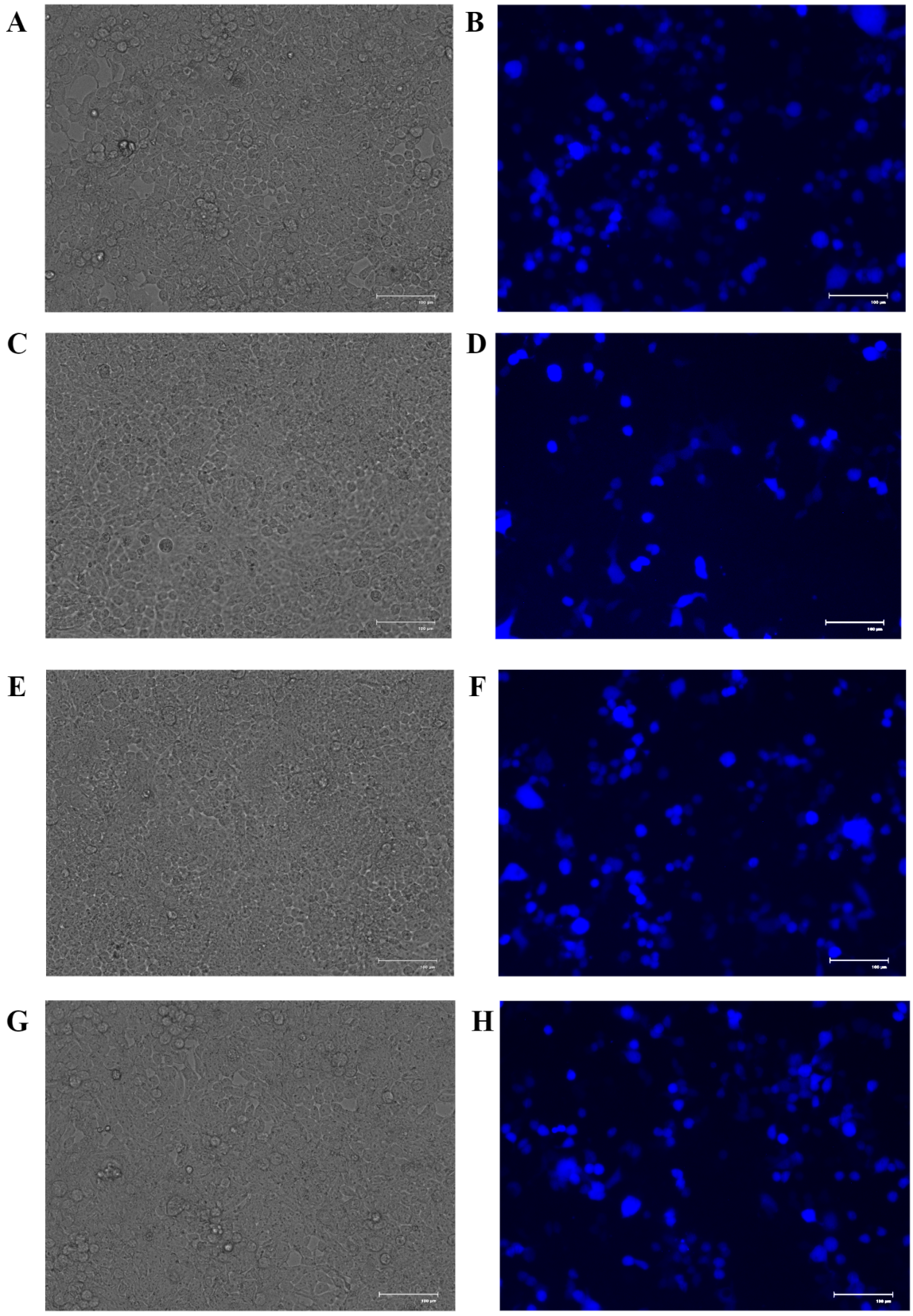


FIGURA 14: **Células HEK 293T transfectadas expressando a proteína fluorescente BFP.** Células HEKs 293T transfectadas com os plasmídeos lentiGuide-BFP2 com os insertos GRN_V1 (**A**, **B**), GRN_V2 (**C**, **D**), GRN_V3 (**E**, **F**) e *SCRAMBLE* (**G**, **H**). Barra de escala = 100 μm.

Após a transfecção das células HEK293T, foi realizada a titulação dos lentivírus produzidos para validar o processo de produção das partículas virais. Os resultados da titulação feita por RT-qPCR dos lentivírus produzidos podem ser visualizados na **TABELA 4**.

Plasmídeo	Título viral (cópias/mL)
lentiGuide-BFP2-GRN_V1	$1,36x10^{9}$
lentiGuide-BFP2-GRN_V2	$5,69x10^{9}$
lentiGuide-BFP2-GRN_V3	$4,82x10^{8}$
lentiGuide-BFP2-SCRAMBLE	$5,55x10^{9}$
lenti-dCas9-KRAB	$5,07x10^{10}$
lenti-dCas9-VPR	$2,68x10^{8}$

TABELA 4: **Resultado da titulação feita através de RT-qPCR dos lentivírus produzidos após transfecção das células HEK 293T.** Título dos lentivírus em cópias/mL.

Dessa forma, os resultados das titulações indicam que as partículas lentivirais foram produzidas com sucesso.

4.5. hiPSCs VPR superexpressam GRN quando transduzidas com o lentivírus GRN_V1

Para validar se o sistema CRISPR/dCas9 está funcional, foram utilizadas células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) que foram previamente modificadas para expressar constitutivamente a proteína dCas9-VPR. Essa abordagem torna o processo de validação mais simples e eficiente por permitir a utilização de um único vetor viral contendo o RNA guia (gRNA).

As **FIGURAS 15** e **16** mostram células hiPSCs transduzidas com os lentivírus expressando a proteína fluorescente BFP, antes e após a seleção com o antibiótico

Higromicina, indicando que o processo de transdução com os lentivírus contendo os gRNAs ocorreu de maneira eficiente.

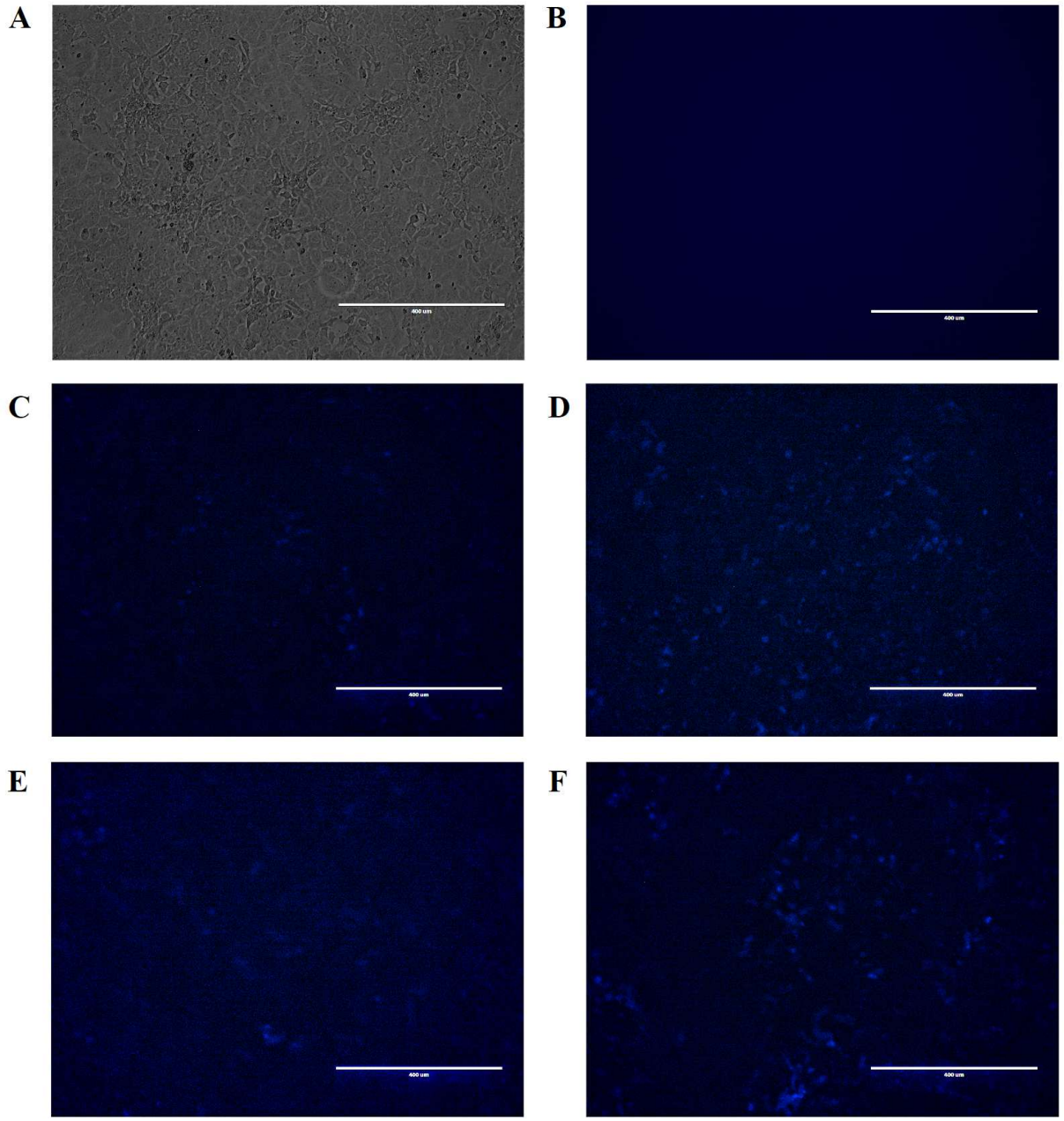


FIGURA 15: **hiPSCs-VPR expressando a proteína fluorescente BFP.** Células hiPSCs-VPR em campo claro (**A**); hiPSCs-VPR não transduzidas (**B**); hiPSCs-VPR transduzidas com lentivírus contendo gRNA GRN_V1 (**C**), GRN_V2 (**D**), GRN_V3 (**E**), SCRAMBLE (**F**). Barra de escala = 400 µm.

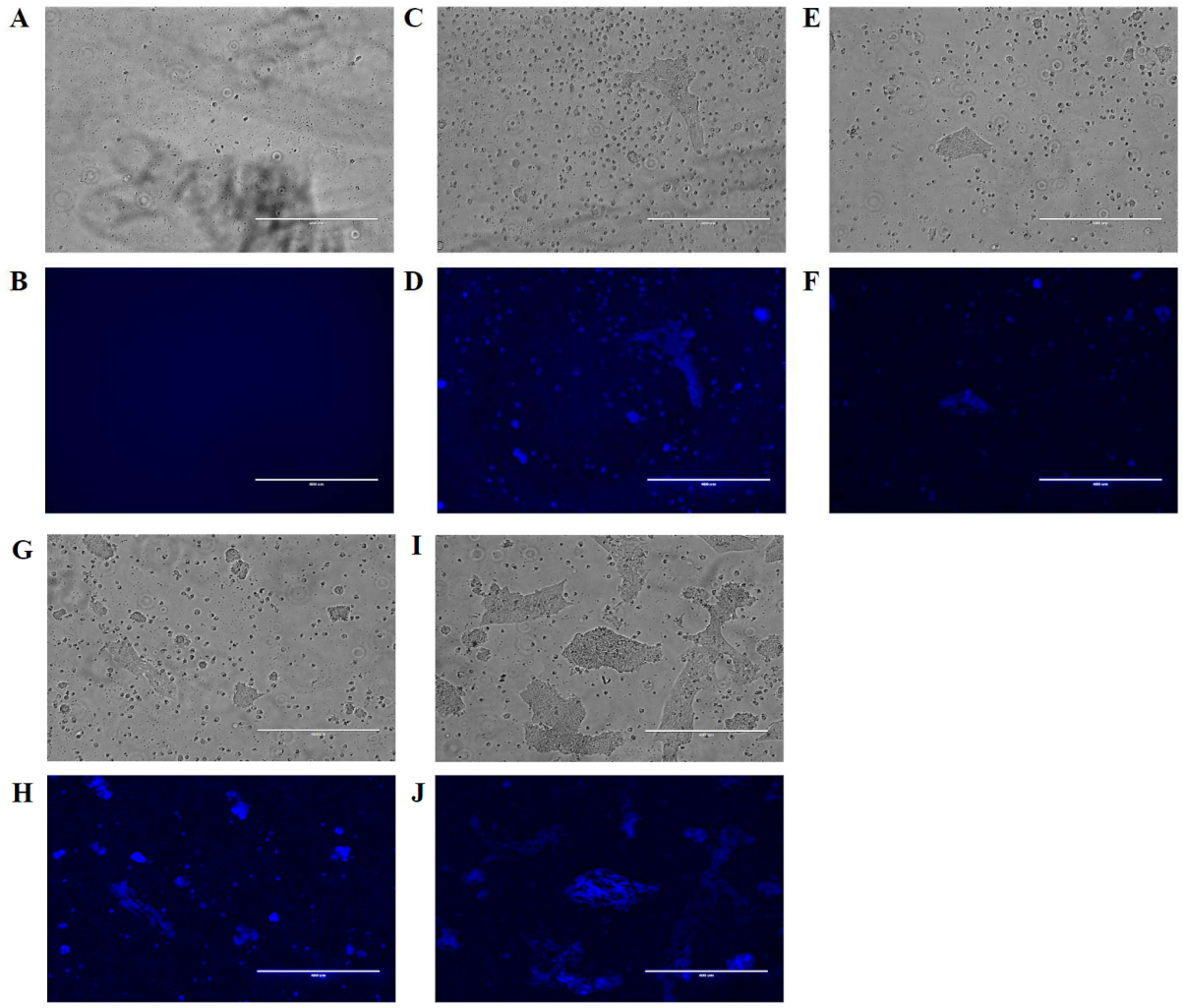


FIGURA 16: **hiPSCs-VPR expressando a proteína fluorescente BFP após a seleção.** Células hiPSCs-VPR não transduzidas (**A**, **B**); hiPSCs-VPR transduzidas com lentivírus contendo gRNA GRN_V1 (**C, D**), GRN_V2 (**E, F**), GRN_V3 (**G, H**) e SCRAMBLE (**I, J**) após a seleção com o antibiótico Higromicina B. Barra de escala = 400 μm.

O nível de expressão de mRNA de Progranulina foi então analisado por RT-qPCR para as células selecionadas com antibiótico.

Como pode ser observado na **FIGURA 17-A**, hiPSCs transduzidas com os lentivírus contendo a sequência do gRNA GRN_V1 apresentaram níveis maiores de mRNA de GRN quando comparado às hiPSCs infectadas com os lentivírus SCRAMBLE. O nível de expressão de mRNA de dCas9-VPR foi também analisado por RT-qPCR, não sendo observada diferença nos níveis de expressão entre os grupos, indicando que todos os grupos de hiPSCs estão expressando níveis semelhantes de dCas9-VPR (**FIGURA 17-B**).

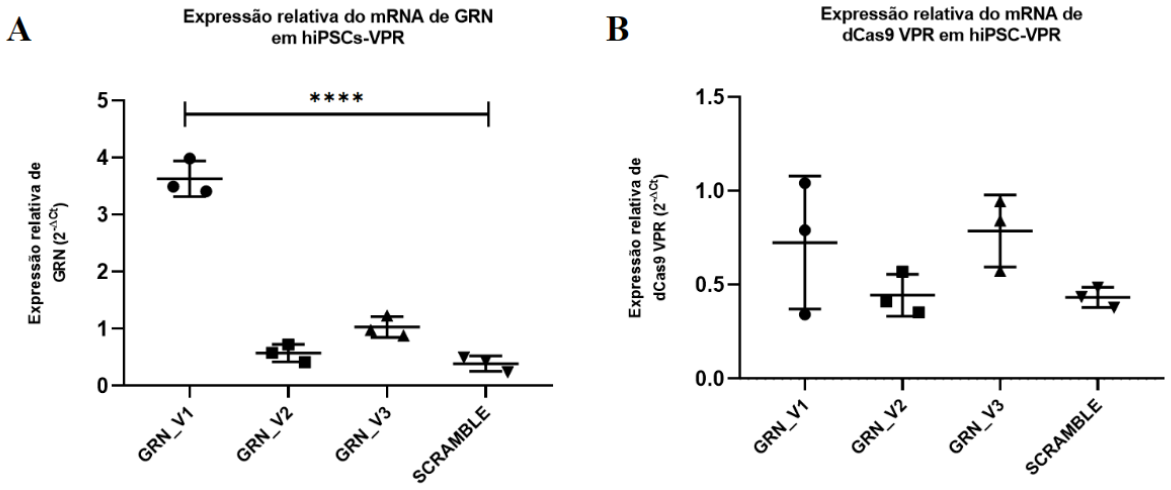


FIGURA 17: Expressão de Progranulina e dCas9-VPR em hiPSCs-VPR. O gráfico mostra os níveis de mRNA de Progranulina (GRN) (**A**) e dCas9-VPR (**B**) em hiPSCs que expressam constitutivamente a proteína dCas9-VPR transduzidas com os lentivírus que carregam as sequências dos gRNAs GRN_V1, GRN_V2, GRN_V3 e SCRAMBLE. Os níveis de mRNA foram avaliados através de RT-PCR quantitativo, o qual foi realizado em triplicata e normalizado pela média dos níveis de mRNA de IPO8 e RPLP0. Os dados representam as médias ± SEM, n = 3. *One-way ANOVA*, seguido do teste de Sidak: **** p <0,0001.

Esses resultados mostraram que os lentivírus produzidos foram capazes de infectar corretamente as hiPSCs-VPR e que o RNA guia GRN_V1 é capaz de levar à superexpressão do gene da Progranulina. Isso indica que o experimento de modulação da expressão gênica utilizando o sistema CRISPR/dCas9-VPR foi bem sucedido e que o sistema está funcional.

4.6. Os lentivírus foram capazes de transduzir iMGs

Como foi observado que iMGs derivadas de indivíduos esquizofrênicos expressam níveis menores de Progranulina quando comparados àquelas derivadas de indivíduos saudáveis, decidiu-se testar se o sistema CRISPR/dCas9-VPR funcionaria também nesse tipo celular.

Assim, iMGs derivadas de um indivíduo saudável foram transduzidas simultaneamente com o vetor viral contendo dCas9-VPR e os vetores virais GRN_V1 e SCRAMBLE. Essas células foram transduzidas no 8º dia de diferenciação.

As **FIGURA 18-A** e **18-B** mostram que não houve diferença nos níveis de mRNA de GRN e dCas9 VPR nas iMGs transduzidas com os lentivírus quando comparadas ao controle negativo, o qual não recebeu nenhum vetor viral. Entretanto, houve aumento de expressão de LV2 (um indicador de infecção viral) nas células transduzidas com o lentivírus SCRAMBLE e dCas9-VPR (**FIGURA 18-C**). Não foi observado fluorescência para BFP em nenhuma das células transduzidas com os vetores virais.

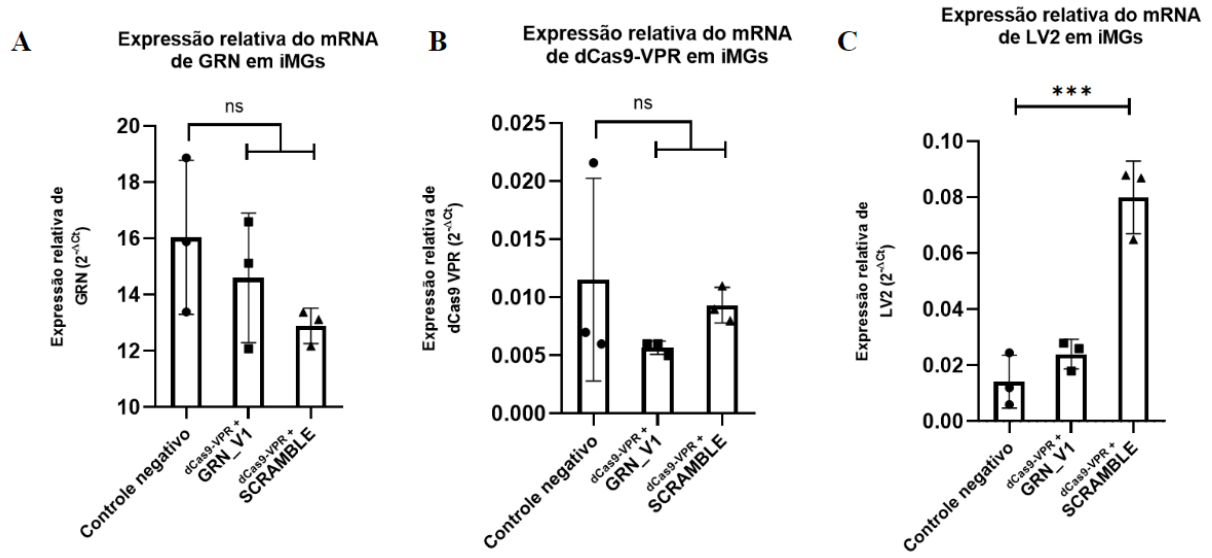


FIGURA 18: Expressão de Progranulina, dCas9-VPR, e LV2 em iMGs. O gráfico mostra os níveis de mRNA de Progranulina (GRN) (**A**), dCas9-VPR (**B**) e LV2 (**C**) em iMGs que não foram transduzidas (controle negativo) ou que foram transduzidas com os lentivírus dCas9-VPR e GRN_V1 ou SCRAMBLE. Os níveis de mRNA foram avaliados através de RT-PCR quantitativo, o qual foi realizado em triplicata e normalizado pela média dos níveis de mRNA de IPO8 e RPLP0. Os dados representam as médias ± SEM, n = 3. *One-way ANOVA*, seguido do teste de Sidak: *** p <0,001.

O experimento foi repetido, mas dessa vez as iMGs foram transduzidas no dia de seu plaqueamento. Isso porque com as iMGs ainda em suspensão, a infecção pelo lentivírus pode ser facilitada. No 6° dia de infecção, as iMGs mostraram-se muito ativadas, assim decidiu-se não prosseguir com o experimento. Entretanto, foi possível observar que as células foram transduzidas com os vetores lentivirais contendo o RNA guia, uma vez que apresentaram fluorescência para BFP (**FIGURA 19)**.

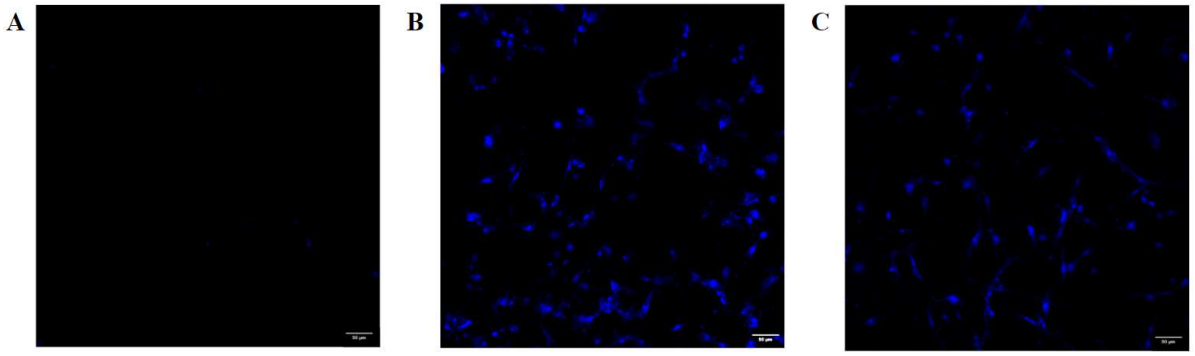


FIGURA 19: **iMGs expressando a proteína fluorescente BFP.** iMGs não transduzidas (**A**); iMGs transduzidas com lentivírus dCas9-VPR e lentivírus contendo gRNA SCRAMBLE (**B**); iMGs transduzidas com lentivírus dCas9-VPR e lentivírus contendo gRNA GRN_V1 (**C**). Barra de escala = 50 μm.

4.7. Células HEK 293T transduzidas com os respectivos lentivírus expressam dCas9-KRAB mas não dCas9-VPR

Tendo em vista que o sistema CRISPR/dCas9 não funcionou para superexpressar GRN em iMGs, decidiu-se testar se os lentivírus produzidos contendo as sequências para dCas9 são capazes de induzir a expressão dessas proteínas em um tipo celular sabidamente passível de transdução pelos vetores utilizados.

Assim, células HEK 293T foram transduzidas com os vetores virais dCas9-VPR e dCas9-KRAB. A **FIGURA 20-A** mostra que, como esperado, células HEK 293T que foram transduzidas com o lentivírus dCas9-KRAB expressaram o mRNA dessa proteína, enquanto que células que foram transduzidas com dCas9-VPR (controle negativo) não expressaram este mRNA. Já as células que foram transduzidas com o vetor viral para dCas9-VPR não foram capazes de expressar o mRNA de dCas9-VPR, uma vez que o nível de expressão não foi diferente quando comparado às células que nem mesmo receberam o vetor para essa proteína (células transduzidas com o lentivírus dCas9-KRAB) (**FIGURA 20-B**). Isso é um indicativo de que o lentivírus dCas9-VPR possa não estar sendo empacotado de maneira correta ou que pode haver problemas na sequência do plasmídeo lenti-dCas9-VPR, o que poderia explicar porque as iMGs transduzidas com os lentivírus dCas9-VPR e GRN_V1 não apresentaram um aumento na expressão de GRN.

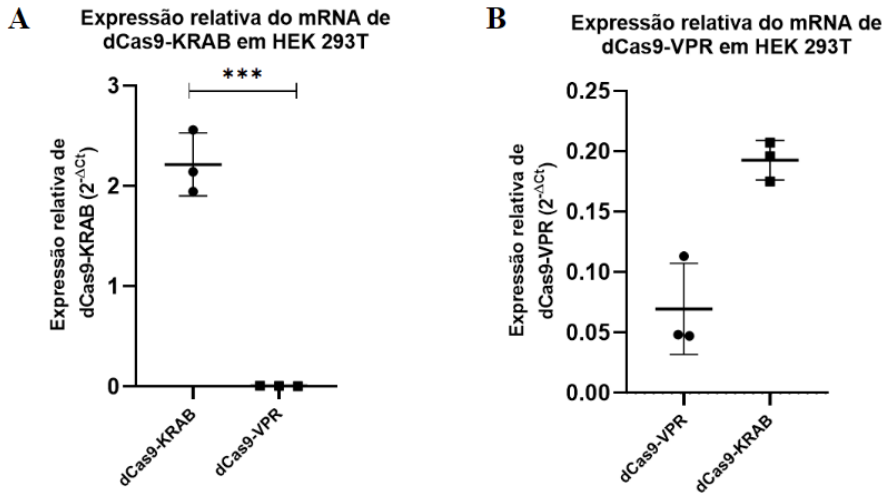


FIGURA 20: Expressão de dCas9-KRAB e dCas9-VPR em HEK 293T. O gráfico mostra os níveis de mRNA de dCas9-KRAB (**A**) e dCas9-VPR (**B**) em HEK 293T transduzidas com os lentivírus contendo as sequências dessas proteínas. Os níveis de mRNA foram avaliados através de RT-PCR quantitativo, o qual foi realizado em triplicata e normalizado pela média dos níveis de mRNA de IPO8 e RPLP0. Os dados representam as médias ± SEM, n = 3. Teste t não-pareado: *** p <0,001.

4.8. Astrócitos SCZ produzem níveis elevados de GRN quando estimulados com TNF-α

Considerando a possível relação da Progranulina com a esquizofrenia (Martens *et al*., 2012; Momeni *et al*., 2010; Velakoulis *et al*., 2009), avaliou-se a expressão de Progranulina em astrócitos derivados de hiPSCs humanas de indivíduos saudáveis (HC) e de indivíduos esquizofrênicos (SCZ). Para tal, astrócitos HC e SCZ com pelo menos 5 semanas pós-diferenciação foram estimulados ou não com TNF-α (10 ng/mL) por 24 h, a fim de mimetizar uma resposta pró-inflamatória induzida por fatores de risco ambientais. O nível de expressão de mRNA de Progranulina foi então analisado por RT-qPCR.

Como pode ser observado na **FIGURA 21**, astrócitos SCZ, quando estimulados com TNF-α, apresentam níveis maiores de mRNA de GRN quando comparados àqueles de astrócitos HC. Entretanto, quando não estimulados, não se observou diferença significativa nos níveis de mRNA de GRN entre os astrócitos HC e SCZ.

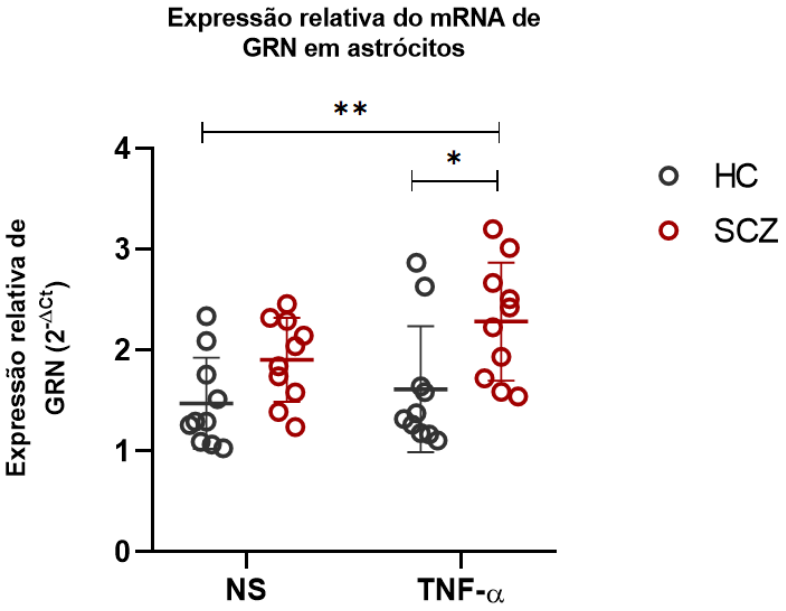
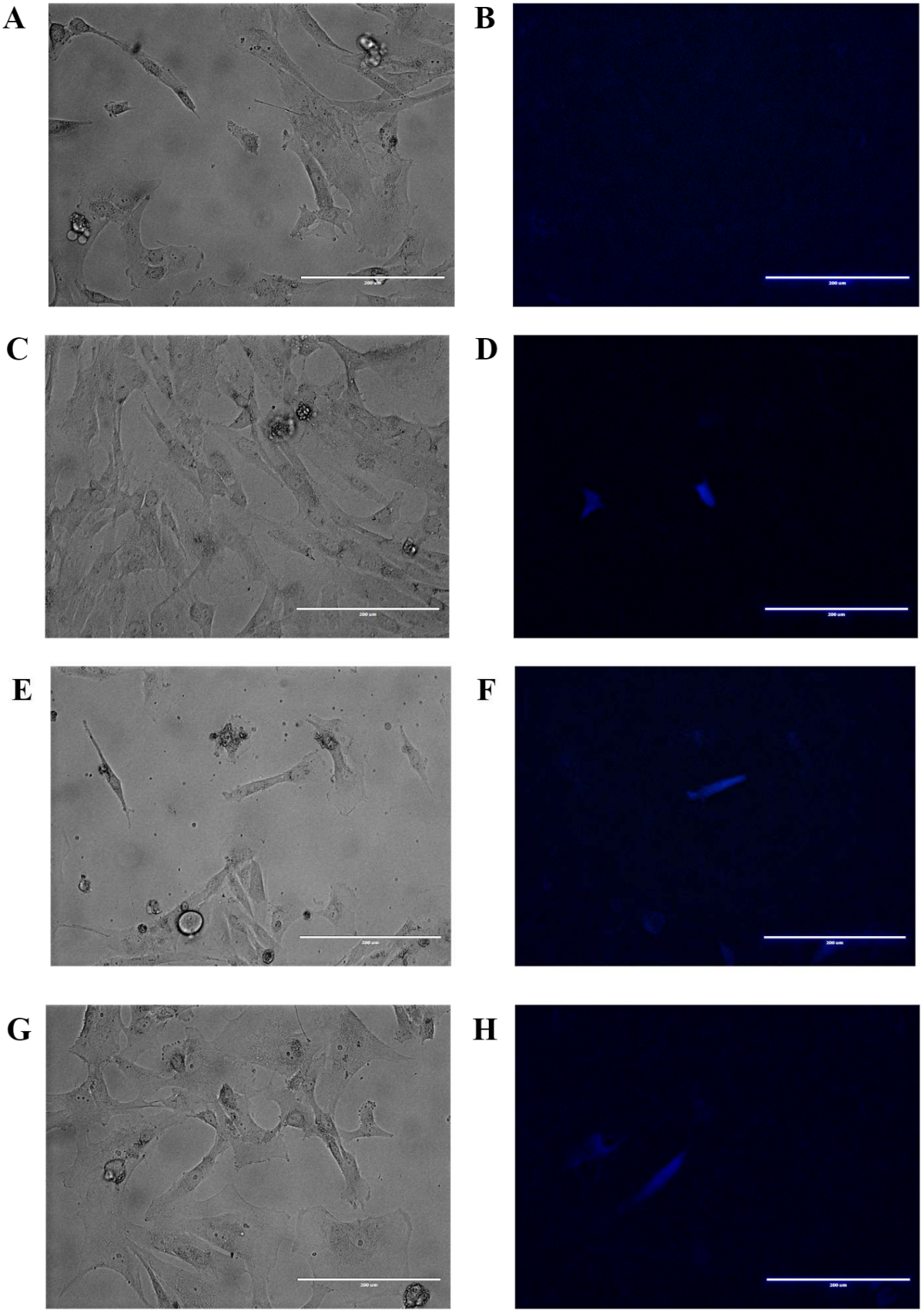


FIGURA 21: Expressão de Progranulina em astrócitos HC e SCZ estimulados com TNF-α. O gráfico mostra os níveis de mRNA de Progranulina (GRN) em astrócitos derivados de hiPSCs de pacientes esquizofrênicos (SCZ) e controle (HC) estimulados com TNF-α. Os níveis de mRNA foram avaliados através de RT-PCR quantitativo, o qual foi realizado em triplicata e normalizado pela média dos níveis de mRNA de IPO8 e RPLP0. Os dados representam as médias ± SEM, n=10. *Two-way ANOVA*, seguido do teste de Sidak: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.9. Astrócitos que expressam constitutivamente dCas9-KRAB e dCas9-VPR foram transduzidos com os lentivírus

Como foi observado que astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos apresentaram uma desregulação nos níveis de Progranulina, decidiu-se testar o sistema CRISPR/dCas9 também nesse tipo celular. Assim, hiPSCs que expressam constitutivamente as proteínas dCas9-VPR e dCas9-KRAB foram diferenciadas em astrócitos. Os astrócitos foram então transduzidos com os lentivírus GRN_V1, GRN_V2, GRN_V3 e SCRAMBLE.

As **FIGURAS 22** e **23** mostram, respectivamente, astrócitos-VPR e astrócitos-KRAB transduzidos com os lentivírus antes da seleção com o antibiótico Higromicina. Foi possível observar poucas células expressando a proteína fluorescente BFP. Consistente com isso, após a seleção com o antibiótico, poucas células sobreviveram, e assim, decidiu-se não prosseguir com o experimento.


A
B
C
D
E
F
G
H

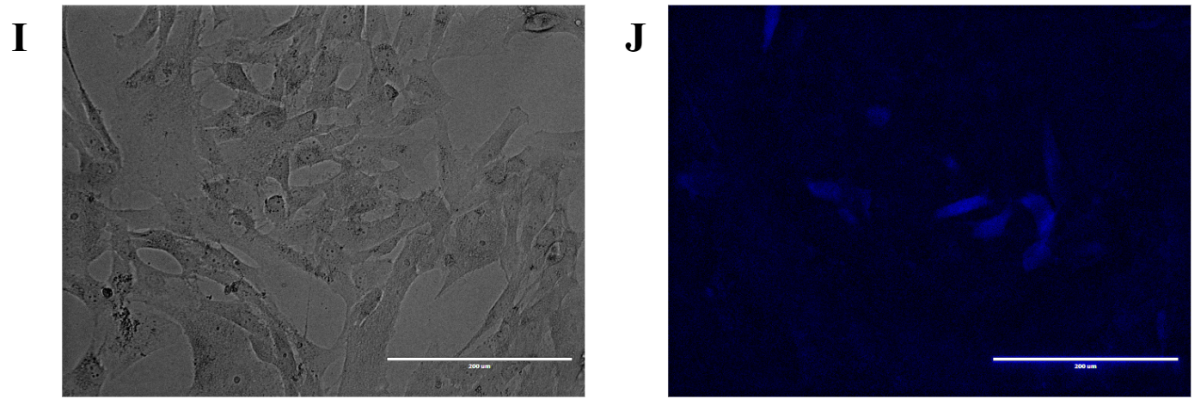
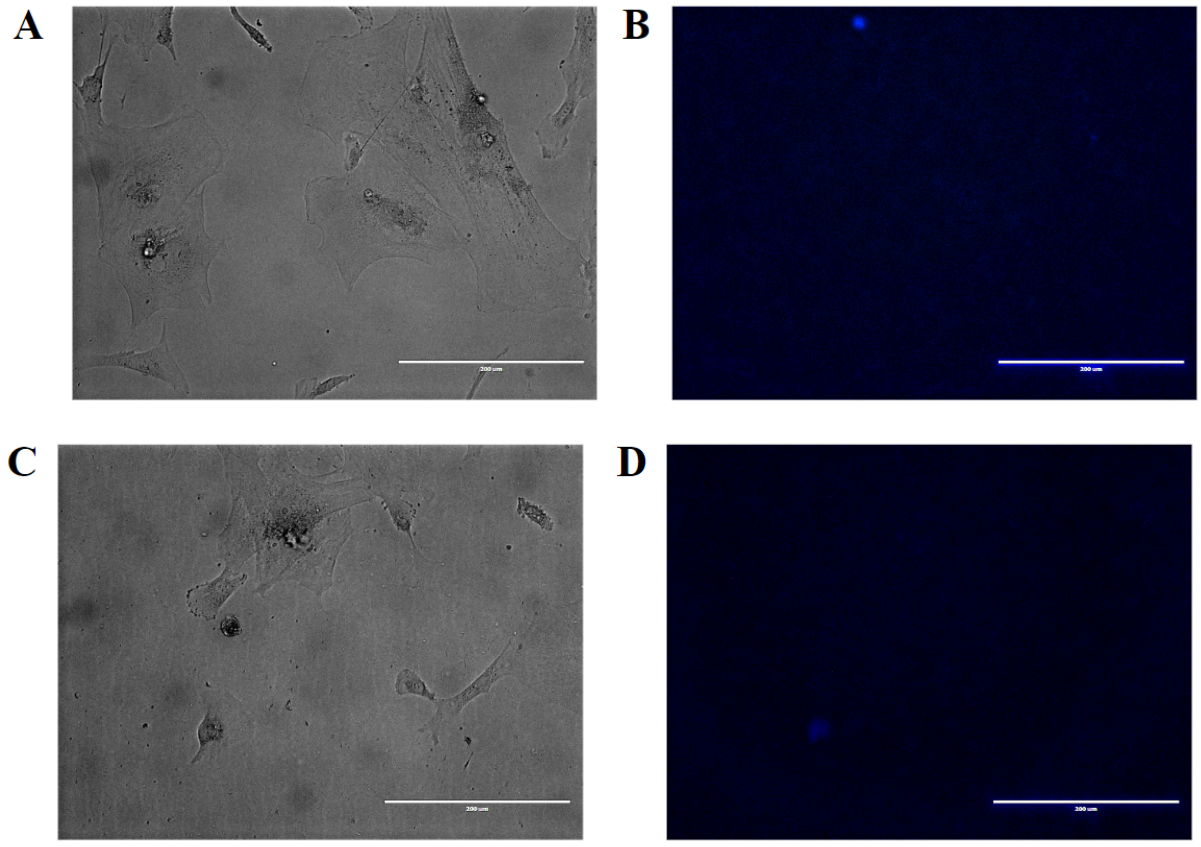


FIGURA 22: **Astrócitos-VPR expressando a proteína fluorescente BFP.** Astrócitos-VPR não transduzidos (**A**, **B**); astrócitos-VPR transduzidos com lentivírus contendo gRNA GRN_V1 (**C, D**), GRN_V2 (**E, F**), GRN_V3 (**G, H**) e SCRAMBLE (**I, J**). Barra de escala = 200 μm.



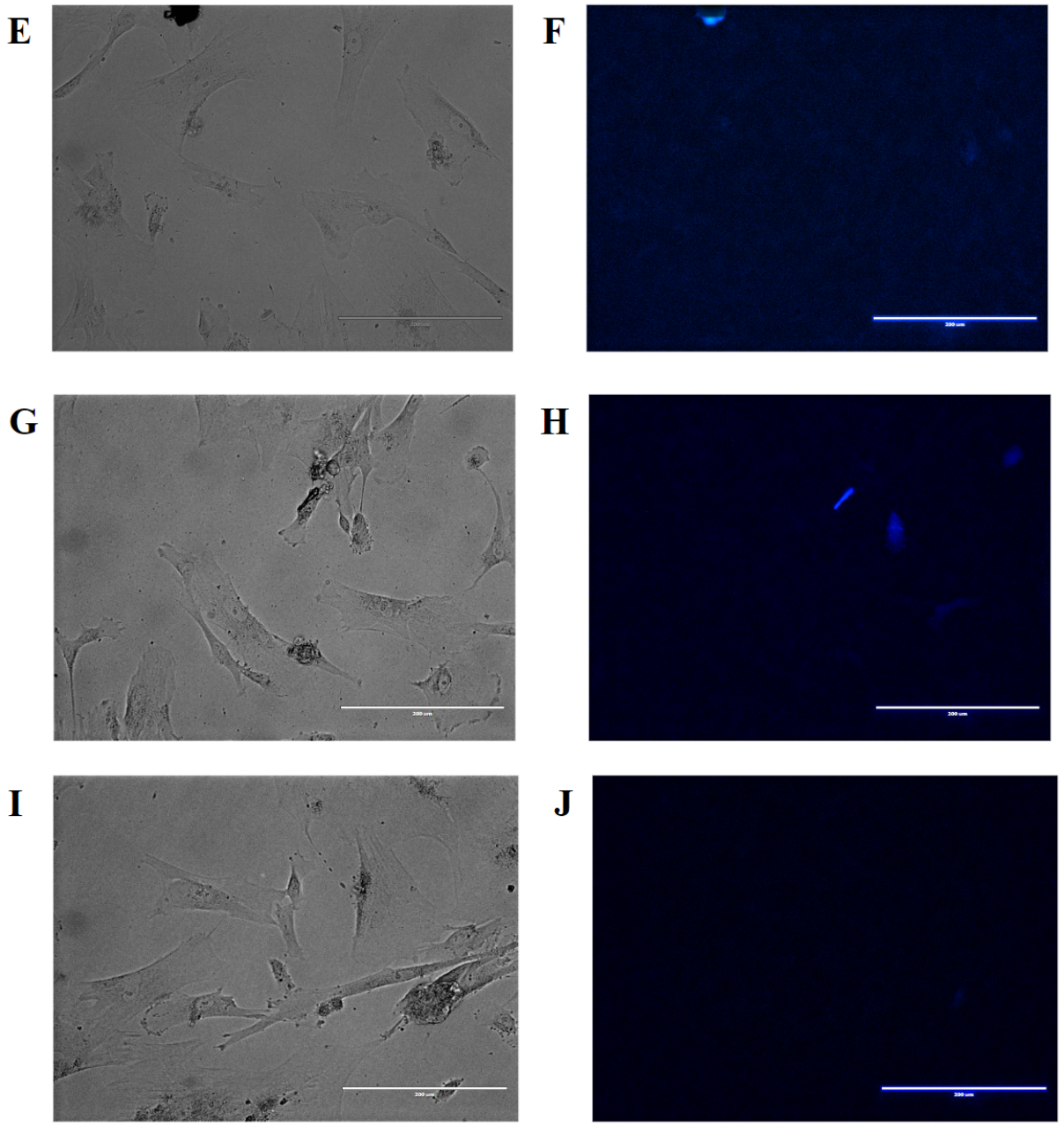


FIGURA 23: **Astrócitos-KRAB expressando a proteína fluorescente BFP.** Astrócitos-KRAB não transduzidos (**A**, **B**); astrócitos-KRAB transduzidos com lentivírus contendo gRNA GRN_V1 (**C, D**), GRN_V2 (**E, F**), GRN_V3 (**G, H**) e SCRAMBLE (**I, J**). Barra de escala = 200 μm.

5. DISCUSSÃO

Mutações no gene *GRN* e alterações nos níveis de expressão de Progranulina têm sido observadas em várias doenças cerebrais, sustentando a hipótese do seu envolvimento no

funcionamento do sistema nervoso central. Mutações heterozigóticas no gene *GRN*, por exemplo, são a principal causa da demência frontotemporal (Baker *et al*., 2006; Cruts *et al*., 2006). Essas mutações levam a um quadro de haploinsuficiência de Progranulina, resultando em uma redução severa dos níveis dessa proteína em vários fluidos biológicos, como líquido cefalorraquidiano, plasma e soro (Almeida *et al*., 2014). Já mutações de perda de função homozigóticas, que resultam em uma perda completa de Progranulina, levam ao desenvolvimento de lipofuscinose ceróide neuronal (NCL), uma doença associada à disfunção lisossomal (Smith *et al*., 2012). Também foi relatado a desregulação da Progranulina em pacientes com doença de Alzheimer. Pacientes com esse distúrbio exibiram maiores níveis de mRNA de *GRN* em seu sangue (Coppola *et al*., 2008). Neste estudo, astrócitos derivados de hiPSCs de indivíduos saudáveis e pacientes com esquizofrenia foram utilizados com o intuito de analisar a expressão da proteína Progranulina. Os resultados deste trabalho demonstram que astrócitos SCZ produzem níveis maiores do mRNA de Progranulina, quando estimulados com TNF-α. Alguns estudos publicados sugerem que há uma relação entre o gene *GRN* e a esquizofrenia (Momeni *et al*., 2010; Velakoulis *et al*., 2009). Entretanto, esta é a primeira evidência sugerindo que astrócitos de indivíduos com esquizofrenia possam apresentar alterações na expressão desse gene. Dados não publicados do nosso grupo também demonstraram uma desregulação em iMGs (**FIGURA 3**). Mas de forma contrária aos astrócitos, foi observada uma diminuição nos níveis de mRNA de Progranulina em células derivadas de indivíduos com esquizofrenia. Suh e colaboradores (2012) demonstraram que, sob condições inflamatórias, essas células respondem de forma contrária, com o aumento da produção de Progranulina em astrócitos e a diminuição em micróglias. Assim, é possível que astrócitos e micróglias de indivíduos esquizofrênicos apresentam alterações opostas quanto à expressão de Progranulina. Estudos futuros serão importantes para avaliar as consequências dessas alterações da expressão de Progranulina observadas neste estudo.

Pouco se sabe sobre a influência da Progranulina em astrócitos. Assim, é necessário mais experimentos visando investigar a função e contribuição dessa proteína, principalmente no contexto da esquizofrenia. Entretanto, algumas hipóteses podem ser formuladas. É possível que parte da Progranulina produzida seja clivada em granulinas por meio da ação de proteases. Enquanto a Progranulina exibe efeitos anti-inflamatórios, foi demonstrado que algumas granulinas apresentam funções pró-inflamatórias, induzindo a expressão de citocinas como IL-8, por exemplo (Zhu *et al*., 2002). Muitas citocinas inflamatórias encontram-se com níveis alterados na esquizofrenia, possivelmente em virtude da sensibilização de células gliais

fetais provocada por estímulos pró-inflamatórios liberados durante infecções que tenham ocorrido no período pré-natal, tornando-as, assim, mais responsivas à um segundo estímulo, como o estresse, apresentado no desenvolvimento pós natal do indivíduo (Muller *et al*., 2015; Kunz *et al*., 2011; Potvin *et al*., 2008). Assim, uma vez que tanto a Progranulina quanto as granulinas estão envolvidas em processos inflamatórios, seria interessante estudar como a alteração da expressão da Progranulina poderia afetar tais processos.

Estudos indicam que a Progranulina pode exercer influência sobre o processo de poda sináptica, fenômeno caracterizado pela remoção das sinapses mais fracas e fortalecimento das mais fortes. Interessantemente, Feinberg (1983) sugere que esse processo de eliminação de sinapses ocorre de forma excessiva na esquizofrenia. Lui e colaboradores (2016) descreveram que a perda de Progranulina desencadeia a poda sináptica mediada pela microglia de sinapses inibitórias no tálamo ventral de camundongos idosos, podendo esta ser evitada pelo bloqueio da ativação do complemento. Uesaka *et al*. (2018) também mostraram o envolvimento da Progranulina na poda sináptica no cerebelo de camundongos em desenvolvimento. Esses autores revelaram que a Progranulina derivada de células de Purkinje é capaz de fortalecer seletivamente as entradas sinápticas das fibras trepadeiras, evitando a sua eliminação, podendo constituir um fator protetor contra a eliminação exagerada de sinapses. Ademais, Sellgren *et al*. (2019) demonstraram que iMGs derivadas de indivíduos esquizofrênicos apresentam atividade de fagocitose de material sináptico significativamente superior em comparação às células derivadas de indivíduos saudáveis. Assim, é possível que a redução de Progranulina observada em iMGs esteja vinculada à patogênese da esquizofrenia, sendo um dos fatores capazes de influenciar o processo de poda sináptica. Esta é uma hipótese que pretendemos testar futuramente.

A entrega dos plasmídeos contendo os componentes do sistema CRISPR/dCas9 para as células alvo foi realizada, neste trabalho, através de vetores lentivirais derivados do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Dentre as vantagens de utilizar esse sistema de entrega estão a alta capacidade de empacotamento do lentivírus (8 kb) e a sua excelente eficiência de infecção, mesmo em células que não se dividem. Além disso, devido à capacidade de integração do DNA no genoma do hospedeiro, a entrega através de lentivírus leva a uma expressão estável e de longo prazo do DNA (Cheng *et al*., 2021). O sistema de lentivírus de 3ª geração possui uma série de características de segurança. Uma delas é o fato de os componentes necessários para a produção dos vírus serem divididos em 4 plasmídeos diferentes: o plasmídeo de transferência com a sequência de interesse, o plasmídeo que

codifica a proteína de envelope VSV-G, e dois plasmídeos responsáveis pelo empacotamento viral, um que codifica Rev e outro que codifica Gag e Pol. Além disso, devido à presença no plasmídeo de transferência da sequência 5'LTR fundida ao promotor RSV (um promotor constitutivamente ativo) esse sistema dispensa a presença do gene Tat, importante para a replicação lentiviral. Há também uma deleção na sequência 3'LTR, o que torna o vetor "auto inativado", evitando que genes integrados sejam re-empacotados (Srinivasakumar, 2021). Em conjunto, estes fatores tornam os vírus produzidos incompetentes para replicação, garantindo a segurança do sistema.

Neste trabalho nós propomos uma plataforma para modular a expressão do gene *GRN* através do sistema CRISPR/dCas9. Apesar de essa tecnologia já ser bem estabelecida e estudos de prova de conceito utilizando dCas9-VPR e dCas9-KRAB para modular a transcrição de genes já tenham sido realizados, Ho e colaboradores (2017) sugerem a necessidade de testar a eficiência de gRNAs entre diferentes genes, tipos de células e dCas9. Assim, diversos fatores podem afetar a eficácia do gRNA, tornando-se, dessa forma, extremamente importante o seu processo de validação. Isso pode ser observado neste trabalho, visto que, dos três gRNAs testados, apenas um se mostrou eficiente em aumentar a expressão de Progranulina em hiPSCs capazes de expressar dCas9-VPR.

Para a validação do sistema em iMGs e astrócitos, observamos certa dificuldade em infectar essas células com os vetores lentivirais contendo os componentes CRISPR. Como parte do sistema imunológico do cérebro, microglias possuem mecanismos de defesa para proteger o sistema nervoso central contra possíveis invasões patogênicas (Chen *et al*., 2015). Estudos sugerem também o papel dos astrócitos na imunidade cerebral, e a sua capacidade de desencadear respostas imunes específicas diante de ameaças virais (Jensen *et al*., 2013). Diante disso, é possível que estas células possuam mecanismos intrínsecos de defesa que estejam dificultando a entrada dos lentivírus. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que as iMGs foram infectadas com o lentivírus GRN_V1 e SCRAMBLE, uma vez que apresentaram fluorescência referente à BFP. Assim, nesse caso, é possível que o problema esteja relacionado ao lentivírus dCas9-VPR, o qual também não foi capaz de infectar células HEK 293T. Os resultados obtidos demonstraram também que astrócitos foram infectados com os lentivírus, uma vez que é possível detectar fluorescência para BFP nestas células, mas em uma escala menor. Assim, a aplicação de estratégias para aumentar a eficiência de transdução nestas células pode ser vantajosa. Nesse sentido, experimentos podem ser realizados a fim de determinar as condições ideais para realizar uma boa transdução destas células, como por

exemplo, a densidade celular mais adequada e o momento ideal de transduzi-las, a fim de evitar morte celular ou ativação excessiva. O uso de intensificadores de transdução, como polibreno e sulfato de protamina (polímeros catiônicos), assim como a produção de um novo lote viral, mais puro e mais concentrado, e a realização do método de spin-infecção, que consiste em uma rápida centrifugação das células após adição dos vírus ao meio celular, também podem ser alternativas interessantes para aumentar a eficiência desse processo (Davis *et al*., 2002; Balak *et al*., 2019; O'Doherty *et al*., 2000). Entretanto, uma vez que o lentivírus GRN_V1 foi capaz de aumentar a expressão de Progranulina em hiPSCs que expressam dCas9-VPR, podemos concluir que os resultados obtidos até o momento são promissores.

O estudo da função de genes é extremamente importante para compreender como variantes influenciam no risco do desenvolvimento de doenças. Aqui, estabelecemos uma plataforma funcional utilizando o sistema CRISPR/dCas9 tornando possível a modulação transcricional do gene *GRN* em células do sistema nervoso central que expressam essa proteína. Essa tecnologia abrirá portas para a melhor compreensão dos mecanismos que sustentam o desenvolvimento da esquizofrenia, possibilitando a identificação de potenciais alvos terapêuticos e novas abordagens de tratamento, impactando, assim, positivamente a vida daqueles que a enfrentam.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, produzimos e verificamos a eficiência de elementos do sistema CRISPR/dCas9. Conseguimos demonstrar que um dos gRNAs projetados foi capaz de levar à superexpressão de Progranulina em hiPSCs que expressam constitutivamente a proteína dCas9-VPR e que iMGs e, em menor escala, astrócitos, foram infectados pelos lentivírus produzidos. Além disso, podemos concluir que astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos expressam níveis maiores de Progranulina quando comparado ao de indivíduos saudáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M. R. *et al*. “Progranulin peripheral levels as a screening tool for the identification of subjects with progranulin mutations in a Portuguese cohort”. *Neurodegenerative Diseases*, v. 13, n. 4, p. 214-223, 2014. <https://www.karger.com/Article/Abstract/352022>

Altmann, Christine, *et al*. "Progranulin promotes peripheral nerve regeneration and reinnervation: role of notch signaling." Molecular neurodegeneration 11 (2016): 1-22.

Bai, X-H. *et al. “*ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor”. *Mol Cell Biol***,** v. 29, p. 4201–4219*,* 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715794/>.

Baker, M. *et al*. “Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17”. *Nature*, v. 442, n. 7105, p. 916-919, 2006. <https://www.nature.com/articles/nature05016>.

Balak, Jeetindra R., *et al*. "Highly Efficient Ex Vivo Lentiviral Transduction of Primary Human Pancreatic Exocrine Cells." *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019, pp. 1-10, https://doi.org/10.1038/s41598-019-51763-z.

Bateman, A. *et al. “*Granulins, a novel class of peptide from leukocytes”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 173, n. 3, p. 1161-1168, 1990. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X05809088>.

Bergen, S. E. *et al*. “Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder”. *Mol Psychiatry*, v. 17, n. 9, p. 880-6, Sep 2012. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688191 >.

Bhandari, V., Bateman, A. “Structure and chromosomal location of the human granulin gene”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 188, n. 1, p. 57-63, 1992. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X92923493>.

Bhandari, V., Palfree, R.G., Bateman, A. “Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains”. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* v. 89, n. 5, p. 1715-1719, 1992. <https://www.pnas.org/content/89/5/1715>.

Boin, F., *et al*. "Association between− G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia." *Molecular psychiatry* 6.1 (2001): 79-82.

Brennand, Kristen J., *et al*. "Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells." *Nature* 473.7346 (2011): 221-225.

Brouns, Stan JJ, *et al*. "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." *Science* 321.5891 (2008): 960-964.

Brown, A.S. *et al. "*Maternal Exposure to Toxoplasmosis and Risk of Schizophrenia in Adult Offspring". *American Journal of Psychiatry***,** v. 162, n. 4, p. 767-773, 2005. <https://ajp.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.162.4.767>.

Brown, A.S. *et al*. "Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia". *Arch Gen Psychiatry*, v. 61, p. 774–780, 2004. <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/article-abstract/482040>.

Cannon, M., Jones, P.B., Murray, R.M. "Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review". *Am J Psychiatry*, v. 159, p. 1080–1092, 2002. <https://ajp.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.159.7.1080>.

Cannon, T. D. "How Schizophrenia Develops: Cognitive and Brain Mechanisms Underlying Onset of Psychosis". *Trends Cogn Sci*, v. 19, n. 12, p. 744-756, Dec 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493362 >.

Capell, A. *et al.* "Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase". *J Neurosci***,** v. 31, n. 5, p. 1885-94, 2011 Feb. <https://www.jneurosci.org/content/31/5/1885.short>.

Carter, Matt, and Jennifer Shieh. "Gene Delivery Strategies." *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*, 2015, pp. 239-252, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00011-3.

Chavez, Alejandro, *et al*. "Highly Efficient Cas9-mediated Transcriptional Programming." *Nature Methods*, vol. 12, no. 4, 2015, pp. 326-328, https://doi.org/10.1038/nmeth.3312.

Chavez, Alejandro, *et al*. "Comparison of Cas9 activators in multiple species." Nature methods 13.7 (2016): 563-567.

Chen, Zhihong, *et al*. "Microglia and Neuroprotection." Journal of Neurochemistry, vol. 136, pp. 10-17, 2015 https://doi.org/10.1111/jnc.13062.

Cheng, Hao, *et al*. "CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for Genome Editing in Therapeutic Applications." *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 10, 2021, p. 1649, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101649.

Cong, Le *et al*. "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science (New York, N.Y.) vol. 339,6121 (2013): 819-23. doi:10.1126/science.1231143

Coppola, Giovanni, *et al*. "Gene expression study on peripheral blood identifies progranulin mutations." *Annals of Neurology*: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society 64.1 (2008): 92-96.

Cordeiro, R. C. "Influência do sexo na resposta inflamatória ao LPS de células micróglia-símile derivadas de monócitos de pacientes com esquizofrenia". 2021. 96 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/65674.

Cruts, M. *et al*. “Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21”. *Nature*, v. 442, n. 7105, p. 920-924, 2006. <https://www.nature.com/articles/nature05017>.

Daniel, R., He, Z., Carmichael, K.P., Halper, J., Bateman, A. “Cellular localization of gene expression for progranulin”. *J Histochem Cytochem*, v. 48, n. 7, p. 999-1009, 2000 Jul. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540004800713>.

Davis, Howard E. *et al*. “Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes.” *Biophysical chemistry* vol. 97,2-3 (2002): 159-72. doi:10.1016/s0301-4622(02)00057-1

De Muynck, L., Van Damme, P. “Cellular effects of progranulin in health and disease”. *J Mol Neurosci*, v. 45, n. 3, p. 549-60, 2011. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12031-011-9553-z>.

Deltcheva, Elitza, *et al*. "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." *Nature* 471.7340 (2011): 602-607.

Dennison, Charlotte A., *et al*. "Genome-wide Association Studies in Schizophrenia: Recent Advances, Challenges and Future Perspective." *Schizophrenia Research*, vol. 217, 2020, pp. 4-12, https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.10.048.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. “A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system” . *J Virol. 1998 Nov . 72(11):8463-71.*

Ecco, Gabriela, Michael Imbeault, and Didier Trono. "KRAB zinc finger proteins." Development 144.15 (2017): 2719-2729.

Escamilla, M.D. *et al. “*A Schizophrenia Gene Locus on Chromosome 17q21 in a New Set of Families of Mexican and Central American Ancestry: Evidence From the NIMH Genetics of Schizophrenia in Latino Populations Study”. *American Journal of Psychiatry*, v. 166, n. 4, p. 442-449, 2009. < https://ajp.psychiatryonline.org/doi/10.1176/appi.ajp.2008.08040612?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed>.

Faris Rel, Dunham Warren, H. “Mental Disorders in Urban Areas. An Ecological Study of Schizophrenia and Other Psychoses”. *The University of Chicago Pres***s**, 2016. <https://psycnet.apa.org/record/1939-01453-000>.

Feinberg, I. “Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence?”. *J Psychiatr Res*, v. 17, n. 4, p. 319-34, 1982. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7187776 >.

Forti Di *et al. “*High-potency cannabis and the risk of psychosis”. *British Journal of Psychiatry*, v. 195, n. 6, p. 488-491, 2009. <https://www.cambridge.org/core/journals/the-british-journal-of-psychiatry/article/highpotency-cannabis-and-the-risk-of-psychosis/496BC36BD5837360498391D7143305EA>.

Functional Genomics Core. “4x Lentivirus Concentrator Solution (MD Anderson Cancer Center, Ed.)”. Houston, TX, EUA: MD Anderson Cancer Center, [s.d.]. Disponível em: <https://www.mdanderson.org/documents/core-facilities/Functional%20Genomics%20Core/Homemade%204fold%20lentivirus%20concentrator.pdf>.

Galimberti, Daniela, *et al*. "Progranulin Gene Variability and Plasma Levels in Bipolar Disorder and Schizophrenia." PLOS ONE, vol. 7, no. 4, 2012, p. e32164, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032164.

Ganguli, Sourav, and Pavithra L. Chavali. "Intrauterine viral infections: impact of inflammation on fetal neurodevelopment." *Frontiers in Neuroscience* 15 (2021): 771557.

Gasiunas, Giedrius, *et al*. "A catalogue of biochemically diverse CRISPR-Cas9 orthologs." Nature communications 11.1 (2020): 5512.

Gass, J. *et al*. “Progranulin: an emerging target for FTLD therapies”. *Brain research*, v. 1462, p. 118-128, 2012. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899312001291>.

Gejman, Pablo V., *et al*. "Genetics of Schizophrenia: New Findings and Challenges." 2011, https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082410-101459.

Gilbert, Luke A., *et al*. "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes." *Cell* 154.2 (2013): 442-451.

Green, M.R. *et al.* “The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent Escherichia coli: "Ultracompetent" Cells”. *Cold Spring Harb Protoc*. 2020;2020(6):101196. Published 2020 Jun 1. doi:10.1101/pdb.prot101196

Green, Michael F. "What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia?." *The American journal of psychiatry* 153.3 (1996): 321-330.

He, Yachao, *et al*. "Decreased Prosaposin and Progranulin in the Cingulate Cortex Are Associated with Schizophrenia Pathophysiology." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 19, 2022, p. 12056, https://doi.org/10.3390/ijms231912056.

He, Z., Bateman, A. “Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis”. *J Mol Med***,** v. 81, p. 600–612, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0474-3>.

Heller C, Foiani MS, Moore K, *et al. “*Plasma glial fibrillary acidic protein is raised in progranulin-associated frontotemporal dementia”. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry,* 2020;91:263-270.

Henquet, C. *et al.* “The Environment and Schizophrenia: The Role of Cannabis Use”. *Schizophrenia Bulletin*, v. 31, n. 3, p. 608–612, July 2005. <https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article/31/3/608/1894455?login=true>.

Hjorthøj, C. *et al*. “Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis”. *The Lancet Psychiatry*, 4(4), 295–301, 2017, doi: 10.1016/S2215-0366(17)30078-0

Ho, Seok-Man *et al*. “Evaluating synthetic activation and repression of neuropsychiatric-related genes in hiPSC-derived NPCs, neurons, and astrocytes”. *Stem cell reports*, v. 9, n. 2, p. 615-628, 2017.

Hu, F. *et al. “*Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin”. *Neuron*, v. 18, n. 68, p. 654-67, 2010 Nov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990962/>.

IHME, Global Burden of Disease Study, processed by Our World in Data. 2019, https://ourworldindata.org/grapher/mental-illness-estimated-cases.

Jayatilleke, N., *et al.* “Contributions of specific causes of death to lost life expectancy in severe mental illness”. *European Psychiatry,* 43, 109–115. 2017. doi: 10.1016/j.eurpsy.2017.02.487

Jensen, C.J., Massie, A. & De Keyser, J. Immune Players in the CNS: The Astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 824–839 (2013). https://doi.org/10.1007/s11481-013-9480-6

Jinek, Martin, *et al*. "A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* 337.6096 (2012): 816-821.

Kao, Aimee W. *et al.* “A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 11, p. 4441-4446, 2011.<https://www.pnas.org/content/108/11/4441/>.

Kessenbrock, K. *et al. “*Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin”. *J Clin Invest***,** v. 118, n.7, p. 2438–2447, 2008. <https://www.jci.org/articles/view/34694>.

Kirkbride, J.B., Fearon P., Morgan C. *et al*. “Heterogeneity in Incidence Rates of Schizophrenia and Other Psychotic Syndromes: Findings From the 3-Center ÆSOP Study”. *Arch Gen Psychiatry***,** v. 63, n. 3, p. 250–258, 2006. <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/209393 >.

Kunz, M. *et al*. “Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance”. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 33, n. 3, p. 268–274, 2011. <https://www.scielo.br/j/rbp/a/v4SKWBtrFWKMN4yV4RRcPPk/?lang=en&format=html>.

Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., *et al*. “Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia”. *Am J Hum Genet*, v. 73, n. 1, p. 34-48, 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180588/>

Li, Aiqun, *et al*. "Using the DCas9-KRAB System to Repress Gene Expression in HiPSC-derived NGN2 Neurons." *STAR Protocols*, vol. 2, no. 2, 2021, https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100580.

Lin, S.; Ewen-Campen, B.; Ni, X.; Housden, B.E.; Perrimon, N. “In vivo transcriptional activation using CRISPR-Cas9 in Drosophila”. *Genetics*. 2015, 201, 433–442

Lui, H. *et al*. “Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation”. *Cell***,** v. 165, n. 4, p. 921-35., 2016. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416303920>.

Luther, Lauren, *et al*. "Negative Symptoms in Schizophrenia Differ across Environmental Contexts in Daily Life." *Journal of Psychiatric Research*, vol. 161, 2023, pp. 10-18, https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.02.037.

Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, *et al*. “Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. Nucleic Acids Research. 2022 Jul;50(W1):W276-W279”. DOI: 10.1093/nar/gkac240. PMID: 35412617; PMCID: PMC9252731.

Malaspina, D. *et al*. “Advancing Paternal Age and the Risk of Schizophrenia”. *Arch Gen Psychiatry*, v. 58, n. 4, p. 361–367, 2001. <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/481752>.

Mali, Prashant, *et al*. "RNA-guided human genome engineering via Cas9." *Science* 339.6121 (2013): 823-826.

Mandel, M. and Higa, A. “Calcium-dependent bacteriophage DNA infection”. *J. Mol. Biol*. (1970) 53, 159–162.

Margolin, J F., *et al*. "KrüPpel-associated Boxes Are Potent Transcriptional Repression Domains." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 10, 1994, pp. 4509-4513, https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4509.

Martens, L.H. *et al*. “Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury”. *The Journal of clinical investigation***,** v. 122, n. 11, p. 3955-9, 2012. <https://www.jci.org/articles/view/63113>.

Matos, G, *et al*. “Schizophrenia, the forgotten disorder: the scenario in Brazil.” *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2015, 37(4), 269–270, https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1827.

Menzel, Lutz, *et al*. "Progranulin Protects against Exaggerated Axonal Injury and Astrogliosis following Traumatic Brain Injury." *Glia*, vol. 65, no. 2, 2017, pp. 278-292, https://doi.org/10.1002/glia.23091.

Momeni, P. *et al*. “Progranulin (GRN) in two siblings of a Latino family and in other patients with schizophrenia”. *Neurocase,* v. 16, n. 3, p. 273-279, 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895558/#R16>.

Muller, Norbert *et al*. “The role of inflammation in schizophrenia.” *Frontiers in neuroscience*

vol. 9 372. 21 Oct. 2015, doi:10.3389/fnins.2015.00372

Neill, Thomas, *et al*. "EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin." *Journal of Cell Biology* 215.5 (2016): 687-703.

Nimgaonkar, V. L., *et al*. “The complement system: a gateway to gene-environment interactions in schizophrenia pathogenesis.” *Molecular psychiatry* vol. 22,11 (2017): 1554-1561. doi:10.1038/mp.2017.151

O'Doherty, U. *et al*. “Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding.” *Journal of virology* vol. 74,21 (2000): 10074-80. doi:10.1128/jvi.74.21.10074-10080.2000

Ohgidani, M. *et al*. “Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease”. *Sci Rep***,** v. 4, p. 4957, May 14 2014. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825127 >.

Pedersen, C.B., Mortensen P.B. “Evidence of a Dose-Response Relationship Between Urbanicity During Upbringing and Schizophrenia Risk”. *Arch Gen Psychiatry*, v. 58, n. 11, p.1039–1046, 2001. <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/481853>.

Perez, Stephanie M., and Daniel J. Lodge. "New Approaches to the Management of Schizophrenia: Focus on Aberrant Hippocampal Drive of Dopamine Pathways." *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 8, 2014, pp. 887-896, https://doi.org/10.2147/DDDT.S42708.

Presumey, Jessy, Allison R. Bialas, and Michael C. Carroll. "Complement system in neural synapse elimination in development and disease." *Advances in immunology* 135 (2017): 53-79.

Petersen, L. *et al. “*Paternal Age at Birth of First Child and Risk of Schizophrenia”. *American Journal of Psychiatry***,** v. 168, n. 1, p. 82-88, 2011. <https://ajp.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.2010.10020252>.

Potvin, S. *et al*. “Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review”. *Biological psychiatry*, v. 63, n. 8, p. 801-808, 2008. <https://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(07)00948-1/fulltext>.

Qi, Lei S., *et al*. "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression." *Cell* 152.5 (2013): 1173-1183.

Riley, B.; Kendler, K. S. “Molecular genetic studies of schizophrenia”. *Eur J Hum Genet*, v. 14, n. 6, p. 669-80, Jun 2006. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16721403 >.

Sakurai, Takeshi *et al*. “Converging models of schizophrenia--Network alterations of prefrontal cortex underlying cognitive impairments.” *Progress in neurobiology* vol. 134 (2015): 178-201. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.09.010

Salazar, D.A. *et al.* “The Progranulin Cleavage Products, Granulins, Exacerbate TDP-43 Toxicity and Increase TDP-43 Levels”. *J Neurosci***,** v. 24, n. 35, p. 9315-28, 2015 Jun. <https://www.jneurosci.org/content/35/25/9315.abstract>.

Schafer, Dorothy P., *et al.* "Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner." *Neuron* 74.4 (2012): 691-705.

Sekar, A. *et al*. “Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4”. *Nature*, v. 530, n. 7589, p. 177-83, Feb 11 2016. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814963 >.

Sellgren, C. M. *et al*. “Patient-specific models of microglia-mediated engulfment of synapses and neural progenitors”. *Mol Psychiatry***,** v. 22, n. 2, p. 170-177, Feb 2017. ISSN 1476-5578 (Electronic) 1359-4184 (Linking). < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27956744 >.

Sellgren, Carl M., *et al*. "Increased Synapse Elimination by Microglia in Schizophrenia Patient-derived Models of Synaptic Pruning." *Nature Neuroscience*, vol. 22, no. 3, 2019, pp. 374-385, https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7..

Sigurdsson, T. “Neural circuit dysfunction in schizophrenia: Insights from animal models.” *Neuroscience* vol. 321 (2016): 42-65. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.059

Smith, K.R. *et al*. “Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage”. *The American Journal of Human Genetics*, v. 90, n. 6, p. 1102-1107, 2012. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929712002546>.

Solmi, Marco, *et al*. "Incidence, Prevalence, and Global Burden of Schizophrenia - Data, with Critical Appraisal, from the Global Burden of Disease (GBD) 2019." *Molecular Psychiatry*, 2023, pp. 1-9, https://doi.org/10.1038/s41380-023-02138-4.

Sonawane, N. D., Francis C. Szoka, and A. S. Verkman. "Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes." *Journal of Biological Chemistry* 278.45 (2003): 44826-44831

Songsrirote, K., *et al. “*Development and application of mass spectrometric methods for the analysis of progranulin N-glycosylation”. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 8, p. 1479-1490, 2010. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391910000631>.

Stevens, Beth, *et al*. "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." *Cell* 131.6 (2007): 1164-1178.

Srinivasakumar, N. “HIV-1 Vector Systems”. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 51–81 (2001). https://doi.org/10.1023/A:1021074613196

Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. “Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells”. *RNA 2003 Apr;9(4):493-501.* 10.1261/rna.2192803

Stewart, Sheila A. *et al*. “Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells”. *Rna,* v. 9, n. 4, p. 493-501, 2003.

Suh, Sook, *et al*. "Regulation of Progranulin Expression in Human Microglia and Proteolysis of Progranulin by Matrix Metalloproteinase-12 (MMP-12)." *PLOS ONE*, vol. 7, no. 4, p. e35115, 2012, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035115.

Sullivan, Patrick F., Kenneth S. Kendler, and Michael C. Neale. "Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies." *Archives of general psychiatry* 60.12 (2003): 1187-1192.

Tan, Evan, *et al*. "HEK293 Cell Line As a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, 2021, https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991.

Tanaka, Y., *et al*. "Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice." Neuroscience 250 (2013): 8-19.

Tang, Wei, *et a*l. "The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice." *Science* 332.6028 (2011): 478-484.

Thakore, Pratiksha I., *et al*. "Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements." *Nature methods* 12.12 (2015): 1143-1149.

Trindade, P. *et al*. “Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes”. *Glia,* Jan 31 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32003513 >.

Trubetskoy, Vassily, *et al*. "Mapping Genomic Loci Implicates Genes and Synaptic Biology in Schizophrenia." Nature, vol. 604, no. 7906, 2022, pp. 502-508, https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5.

Uesaka, N. *et al*. “Retrograde Signaling from Progranulin to Sort1 Counteracts Synapse Elimination in the Developing Cerebellum”. *Neuron*, v. 97, n. 4, p. 796-805, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627318300217>.

Velakoulis, D., Walterfang, M., Mocellin, R., Pantelis, C., Mclean, C. “Frontotemporal dementia presenting as schizophrenia-like psychosis in young people: clinicopathological series and review of cases”. *Br J Psychiatry,* v.194, n.4, p.298-305, 2009. <https://www.cambridge.org/core/journals/the-british-journal-of-psychiatry/article/frontotemporal-dementia-presenting-as-schizophrenialike-psychosis-in-young-people-clinicopathological-series-and-review-of-cases/AAD15B0E3A8E818D494203FB9A4A346B>.

Wang, C.; Aleksic, B.; Ozaki, N. “Glia-related genes and their contribution to schizophrenia”. *Psychiatry Clin Neurosci*, v. 69, n. 8, p. 448-61, Aug 2015. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759284 >.

Wang C, Yue H, Hu Z, *et al*. “Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination”. *Science*. 2020; 367(6478):688–694. doi:10.1126/science.aaz2288

Yan Y, Shin S, Jha BS, *et al*. “Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells”. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(11):862-870. doi:10.5966/sctm.2013-0080

Yan, Y. *et al*. “Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells”. *Stem Cells Transl Med*, v. 2, n. 11, p. 862-70, Nov 2013. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113065 >.

Yang, Albert C., and Shih-Jen Tsai. "New targets for schizophrenia treatment beyond the dopamine hypothesis." *International journal of molecular sciences* 18.8 (2017): 1689.

Yin, F. *et al*. “Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice”. *The Journal of experimental medicine***,** v. 207, n.1, p. 117-28, 2010. <https://rupress.org/jem/article/207/1/117/40542/Exaggerated-inflammation-impaired-host-defense-and>.

Zhang *et al*. “Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse”. Neuron 89(1):37-53, 2016. PMID: 26687838.

Zhou, X. *et al.* “Prosaposin facilitates sortilin-independent lysosomal trafficking of progranulin”. *J Cell Biol*, v. 210, n. 6, p. 991-1002, 2015. <https://rupress.org/jcb/article/210/6/991/38242/Prosaposin-facilitates-sortilin-independent>.

Zhu, J. *et al*. “Conversion of proepithelin to epithelins: Roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair”. *Cell*, v. 111, p. 867–878, 2002. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867402011418>.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1: Sequências gRNA							
gRNA	**PAM**	**Fita**	**Sequência senso**	**Sequência Antissenso**	**Pontuação "on-target"**	**Pontuação "off-target"**	**Distância relativa ao TSS (pb)**
GRN_V1	GGG	Positiva	caccgGATAAGTAGCCAATGGGAGC	aaacGCTCCCATTGGCTACTTATCc	78	52	-101 a -82
GRN_V2	AGG	Positiva	caccgGTCAACCGAGTTTGGAGAAT	aaacATTCTCCAAACTCGGTTGACc	62	51	-904 a -885
GRN_V3	CGG	Positiva	caccgCAAACACACAAGTCCGGGCG	aaacCGCCCGGACTTGTGTGTTTGc	59.2	91.3	-690 a -671
SCRAMBLE	-	-	caccgGTGTGTCTAGCCGTGTGCCT	aaacAGGCACACGGCTAGACACACc	48	0	-

Tabela 1: Sequências gRNA. Em maiúsculo está a sequência dos gRNA projetados e em minúsculo as sequências *overhangs* adicionadas aos gRNAs.

TABELA 2: Primers utilizados		
Alvo	**Sequência senso**	**Sequência antissenso**
GRN	GGCCACTCCTGCATCTTTAC	GGAGCCATCGACCATAACAC
IPO8	TCCGAACTATTATCGACAGGACC	GTTCAAAGAGCCGAGCTACAA
RPLP0	TTAAACCCTGCGTGGCAATC	ATCTGCTTGGAGCCCACATT
LV2	ACTTGAAAGCGAAAGGGAAAC	CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC
dCas9-KRAB	ACGACGAGAATGACAAGCTG	TGCACCTCGGTCTTTTTCAC
dCas9-VPR	ATTGACGGCGGAGCAAGCCA	ATAGCGTGCAGTTCGCCCAG
gRNA_insert	TGTTCCATTAACTGCGCTAAAA	GAGCCAATTCCCACTCCTTT

Tabela 2: Sequências dos primers utilizados no trabalho

Tabela 3: Linhagens utilizadas e dados dos indivíduos a partir dos quais as hiPSCs foram geradas			
Linhagem	**Diagnóstico**	**Idade**	**Sexo**
79A	Saudável	36	Feminino
CF1	Saudável	37	Masculino
CF2	Saudável	31	Masculino
ADHD2	Saudável	31	Masculino
C15	Saudável	16	Feminino
60B	Esquizofrenia (paranoide)	26	Masculino
61B	Desordem esquizoafetiva	27	Feminino
EZQ4	Esquizofrenia (paranoide)	45	Masculino
62B	Esquizofrenia (paranoide)	23	Masculino
EZQ3	Esquizofrenia	45	Masculino

Tabela 3: Linhagens utilizadas e dados dos indivíduos a partir dos quais as hiPSCs foram geradas