Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Isabela Gerdes Gyuricza

Análise do efeito do gene *Hspg2* na variabilidade dos fenótipos
esquelético e vascular da Síndrome de Marfan.

*Analysis of the role of Hspg2 gene in the variability of skeletal and vascular
phenotypes in Marfan Syndrome.*

São Paulo
2019

Isabela Gerdes Gyuricza

Análise do efeito do gene *Hspg2* na variabilidade dos fenótipos
esquelético e vascular da Síndrome de Marfan.

*Analysis of the role of Hspg2 gene in the variability of skeletal and vascular
phenotypes in Marfan Syndrome.*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para obtenção de título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração:
Biologia - Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Lygia da Veiga
Pereira Carramaschi

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Gyuricza, Isabela Gerdes

Análise do efeito do gene Hspg2 na variabilidade dos
fenótipos esquelético e vascular da Síndrome de Marfan /
Isabela Gerdes Gyuricza; orientadora Lygia da Veiga
Pereira Carramaschi. -- São Paulo, 2019.

95 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Síndrome de Marfan. 2. Fundo genético. 3.
Variabilidade fenotípica. 4. Genes modificadores. 5.
Hspg2. I. Carramaschi, Lygia da Veiga Pereira, orient.
II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Nome: GYURICZA, Isabela Gerdes

Título: Análise do efeito do gene *Hspg2* na variabilidade dos fenótipos esquelético e vascular da Síndrome de Marfan.

Title: Analysis of the role of *Hspg2* gene in the variability of skeletal and vascular phenotypes in Marfan Syndrome.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências (Biologia – Genética).

Data da aprovação:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Eu nasci em Jerusalém com grande influência religiosa e um pai rabino... nós éramos pobres, mas se tínhamos alguma coisa, o que tínhamos eram livros.”

Ada Yonath

Aos meus pais, Tânia e Laszlo, e minhas irmãs,
Camila e Giulia, pelo incentivo,
companheirismo e amor.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Lygia Pereira, por ter me cedido a oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório. Obrigada por todo o suporte e por toda a confiança depositada em mim. Sou muito feliz e grata por ter feito parte do seu grupo!

Aos meus colegas de laboratório e co-orientadores informais, Rodrigo, Luis e Gustavo, por terem realizado este projeto comigo. Sem o auxílio intelectual, laborial e, até mesmo filosófico, de vocês esse trabalho não teria acontecido.

Ao Prof. Ivan Koh, da Escola Paulista de Medicina (Unifesp) e toda a sua equipe. Obrigada por terem me auxiliado de todas as formas possíveis, não apenas fornecendo o espaço físico para realizarmos uma parte deste trabalho, mas também por me apoiarem e estarem sempre dispostos a discutir comigo.

À Prof.^a Cecília, do ICB-USP e o seu laboratório por ceder alguns dos equipamentos relacionados a análise óssea deste trabalho.

Ao Biotério da Faculdade de Medicina e todos os seus funcionários, principalmente Jacque, Gabriel, Christian e Juliana, pela geração e manutenção de parte dos camundongos e, principalmente, pelo trabalho maravilhoso no descongelamento dos embriões. Obrigada por sempre terem sido atenciosos e zelosos com esse trabalho.

Ao Biotério da Imunologia do ICB e, principalmente, a Silvia Massironi, pelo auxílio na geração e manutenção dos camundongos.

Ao Prof. Gary Churchill e à toda a sua equipe da *Jackson Laboratory*, pela confiança e pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, onde tomei todo o conhecimento necessário para fazer as análises de bioinformática deste trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LaNCE): Luis, Mariana, Patrícia, Carol, Glauco, Gustavo, Larissa, Raquel, Rodrigo, Rayssa, Daniel, Yordanka, Alexandre, Bianca, Juliana, Fabiano e Ana Luíza. Obrigada por todo o suporte e companheirismo nestes anos. Agradeço, em especial, à Ju e Rachel, que se tornaram amigas tão especial que levarei para toda a vida. Obrigada por caminharem comigo, por todo o incentivo, apoio e companheirismo. Vocês fizeram destes anos melhores! Ainda, agradeço a todos os funcionários do departamento de Genética, sempre prontos a ajudar.

Ao Instituto de Biociências e ao departamento de Genética pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2016/18255-3), pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço à toda a minha família, pelo suporte e carinho. Em especial, agradeço a meus pais, Tania e Laszlo, por terem feito parte dessa trajetória. Obrigada por me apoiarem em cada decisão e confiarem em mim. Agradeço as minhas irmãs, Camila e Giulia, por estarem sempre ao meu lado. Sem vocês nunca teria chegado até aqui.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítios de ligação à fibrilina-1	17
Figura 2 – Processo de formação de microfibrilas	18
Figura 3 – Comparação dos fenótipos de camundongos SMF em diferentes fundos genéticos	21
Figura 4 – Histogramas dos QTLs encontrados na análise de ligação da linhagem F2 B6/129	22
Figura 5 – Estrutura da molécula do perlecan	25
Figura 6 – Papel dos proteoglicanos heparano-sulfato na formação das microfibrilas	28
Figura 7 – Geração da linhagem F2 B6/129	32
Figura 8 – Geração da linhagem duplo-heterozigota <i>Hspg2</i> (+/-) <i>Fbn1</i> (+/mgΔ ^{loxPneo})	37
Figura 9 – Obtenção de medida para o fenótipo esquelético	40
Figura 10 – Obtenção de medida da espessura das túnica aórticas	42
Figura 11 – Obtenção de medida de fragmentações elásticas	43
Figura 12 – Obtenção de medida da quantidade de células da musculatura lisa vascular	43
Figura 13 – Genotipagem da linhagem F2 B6/129	49
Figura 14 – Gráfico do KI da linhagem F2 B6/129	50
Figura 15 – Histograma da distribuição do KI de animais F2 B6/129 mgΔ ^{loxPneo}	51
Figura 16 – Fotomicrografias de cortes transversal da aorta da linhagem F2 B6/129	52
Figura 17 – Gráfico da PCA para as medidas do fenótipo vascular da linhagem F2 B6/129	54
Figura 18 – Gráfico para valores de integridade de fibras elásticas da linhagem F2 B6/129	56
Figura 19 – Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagens	57
Figura 20 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagens	57
Figura 21 – Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas mgΔ ^{loxPneo}	59
Figura 22 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas mgΔ ^{loxPneo}	59
Figura 23 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagem e mgΔ ^{loxPneo}	60
Figura 24 – Gráfico correlacionando a expressão dos genes <i>Hspg2</i> e <i>Fbn1</i> no fêmur de animais das linhagens isogênicas mgΔ ^{loxPneo}	61
Figura 25 – Gráfico da expressão do gene <i>Fbn1</i> na coluna de animais F2 B6/129 mgΔ ^{loxPneo}	62
Figura 26 – Gráfico da expressão do gene <i>Hspg2</i> na coluna de animais F2 B6/129 mgΔ ^{loxPneo}	62
Figura 27 – Gráfico correlacionando a expressão dos genes <i>Hspg2</i> e <i>Fbn1</i> na coluna de animais F2 B6/129 mgΔ ^{loxPneo}	63
Figura 28 – Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas selvagens	64
Figura 29 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas selvagens	64
Figura 30 – Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas mgΔ ^{loxPneo}	65
Figura 31 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas mgΔ ^{loxPneo}	66

Figura 32 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$	66
Figura 33 – Gráfico correlacionando a expressão dos genes <i>Hspg2</i> e <i>Fbn1</i> na aorta de animais das linhagens isogênicas $mg\Delta^{loxPneo}$	67
Figura 34 – Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> na aorta de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$	68
Figura 35 – Gráfico de expressão do gene <i>Hspg2</i> na aorta de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$	69
Figura 36 – Gráfico correlacionando a expressão dos genes <i>Hspg2</i> e <i>Fbn1</i> na aorta de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$	69
Figura 37 – Gráfico da PCA dos valores de expressão gênica da coluna de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$	73
Figura 38 – Histograma de p-valores da análise de expressão gênica diferencial	74
Figura 39 – Esquema do vetor utilizado para geração dos camundongos <i>Hspg2</i> (+/-)	76
Figura 40 – Genotipagem de camundongos <i>Hspg2</i> (+/Fl)	76
Figura 41 – Análise em gel de agarose de plasmídeos pós-digestão com <i>EcoR1</i>	77
Figura 42 – Resultado do sequenciamento do alelo <i>Hspg2</i> Fl	78
Figura 43 – Genotipagem de animais <i>Hspg2</i> (+/Fl) após cruzamento com animais B6 <i>Cre</i>	79
Figura 44 – Genotipagem de animais <i>Hspg2</i> (+/-) após cruzamento com animais B6 $mg\Delta^{loxPneo}$	80

LISTA DE PRINCIPAIS ABREVIações E NOMENCLATURAS

SMF – Síndrome de Marfan

DN – Dominante negativo

HI – Haploinsuficiente

MEC – Matriz extracelular

CMLV – Células da musculatura lisa vascular

Neo – Cassete do gene de resistência à Neomicina

129 – Camundongos da linhagem 129/Sv

B6 – Camundongos da linhagem C57BL/6

B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ – Camundongos da linhagem C57BL/6 heterozigotos para o alelo *Fbn1* modificado $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$

129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ – Camundongos da linhagem 129/Sv heterozigotos para o alelo *Fbn1* modificado $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$

F1 – Linhagem filial 1

F2 – Linhagem filial 2

F2 B6/129 – Camundongos da linhagem F2 gerada pelo cruzamento de animais B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ com animais 129 selvagens

F2 B6/129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ - Camundongos da linhagem F2 B6/129 heterozigotos para o alelo *Fbn1* modificado $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*)

QTL – Loci de características quantitativas (do inglês, *Quantitative Trait Loci*)

SSJ – Síndrome de Schwartz-Jampel

CEV – células endoteliais vasculares

HS – Heparano-sulfato

B6 *Cre* – Camundongos da linhagem C57BL/6 transgênicos para o gene *Cre*

Hspg2 (+/Fl) – Camundongos heterozigotos para sequências LoxP flanqueando o exon 6 do gene *Hspg2*

Hspg2 (+/-) – Camundongos heterozigotos para a excisão do exon 6 do gene *Hspg2*

Hspg2 (+/-) *Fbn1* (+/ $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$) – Camundongos duplo-heterozigotos, heterozigotos para o alelo $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ e *Hspg2* (+/-)

TA – Temperatura ambiente

KI – Índice da cifose (do inglês, *Kyphosis Index*)

VCFs – arquivos de variantes genéticas (do inglês, *Variant Call Format*)

$\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ _A – Camundongos F2 B6/129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ nos quais foram encontrados aneurimas pela análise histológica

PCA – Análise de componente principal (do inglês, *Principal Component Analysis*)

Resumo

A Síndrome de Marfan (SMF) é uma doença que afeta o tecido conjuntivo, de caráter autossômico dominante. Acomete cerca de 1 em 5.000 indivíduos e é causada por mutações no gene *FBN1*, que codifica a proteína de matriz extracelular fibrilina-1. As principais manifestações clínicas incluem aneurismas e dissecções da aorta, e deformidades esqueléticas, como crescimento excessivo dos ossos longos e escoliose. Apesar de ter penetrância completa, a SMF apresenta uma grande variabilidade clínica, inclusive entre indivíduos com a mesma mutação, sugerindo a existência de genes modificadores do fenótipo. Recentemente nosso grupo identificou loci associados a variabilidade fenotípica esquelética e vascular em um modelo murino da SMF. Dentre os genes localizados em um dos loci associado ao fenótipo vascular, identificamos o gene *Hspg2*, que codifica a proteína perlecan. O perlecan é um proteoglicano heparano-sulfato associado ao controle da composição da matriz extracelular, regulação da proliferação de células vasculares e da cartilagem, e que interage fisicamente com a fibrilina-1 na formação das microfibrilas e fibras elásticas. Assim, neste trabalho testamos a hipótese de que *Hspg2* pode atuar como gene modificador da SMF. Para isso, foi analisada a expressão de *Hspg2* em camundongos SMF em diferentes fundos genéticos, avaliando a associação entre níveis de expressão do gene e gravidade dos fenótipos; foi realizado RNA-seq de coluna espinal de camundongos graves e leves com o intuito de analisar a expressão diferencial de outros possíveis genes modificadores, bem como as vias moleculares envolvidas na doença. Além disso, nós geramos um modelo de camundongo SMF haploinsuficiente para o gene *Hspg2* como ferramenta para investigações futuras mais aprofundadas do papel deste gene na fisiopatologia da SMF. Nós observamos que animais considerados graves para o fenótipo esquelético e vascular expressam menores quantidades de *Hspg2* e que esta expressão é correlacionada a expressão de *Fbn1*. Isto sugere que *Hspg2* pode apresentar uma função protetora dos fenótipos esquelético e vascular e evidencia a importante relação entre *Fbn1* e *Hspg2* na manutenção destes tecidos. A função de *Hspg2* na modulação dos fenótipos da SMF poderá ser mais bem estudada no novo modelo de camundongo gerado neste trabalho, o que aumentará o conhecimento sobre a fisiopatologia da doença. Isso por sua vez, poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a SMF e outras doenças que envolvam os mesmos sistemas.

Palavras-chave: Síndrome de Marfan, fundo genético, variabilidade fenotípica, genes modificadores, *Hspg2*.

Abstract

Marfan syndrome (MFS) is an autosomal dominant disease of the connective tissue which affects about 1 in 5,000 individuals, and is caused by mutations in *FBN1* gene, which encodes the extracellular matrix protein fibrillin-1. The main clinical manifestations include aneurysms and aortic rupture and skeletal phenotypes, such as excessive growth of bones and scoliosis. Despite complete penetrance, MFS has a large clinical variability, even between individuals with the same mutation, indicating the existence of modifier genes. Recently, our group has identified loci associated with skeletal and vascular variability in a murine model of the syndrome. Among the genes within one of the loci associated with the vascular phenotype, we identified the *Hspg2* gene that encodes perlecan protein. Perlecan is a proteoglycan heparan sulfate associated with the control of the composition of the extracellular matrix, proliferation of vascular and cartilage cells, and that physically interacts with fibrillin-1 during microfibril and elastic fibers assembly. Thus, in this project we tested the hypothesis that *Hspg2* can play a role as a modifier gene of MFS. To this, we measured *Hspg2* expression in MFS mice with different genetic backgrounds, evaluating the association between gene expression levels and severity of phenotypes; we obtained RNA-seq data from spinal column from mildly and severely affected mice to analyze the differential expression of other candidate modifier genes, as well as the molecular pathways involved in the disease. Besides that, we generate a SMF mouse model carrying a haploinsufficient mutation in *Hspg2* gene as a tool for future investigations about the role of this gene in the SMF physiopathology. We found that animals severely affected for both skeletal and vascular phenotypes showed lower *Hspg2* levels and that *Hspg2* expression is positively correlated to *Fbn1* expression. This suggests that *Hspg2* gene can play a protective role in skeletal and vascular phenotypes and highlights the important relation between *Fbn1* and *Hspg2* in the maintenance of these tissues. The function of *Hspg2* in the modulation of MFS phenotypes will be further studied in the new mouse model generated in this work, which will increase our knowledge about the physiopathology of the disease. This in turn may lead to the development of new therapeutic strategies for MFS and other diseases involving the same systems.

Keywords: Marfan Syndrome, genetic background, phenotypic variability, modifier genes, *Hspg2*.

Sumário

INTRODUÇÃO	14
1 – A Síndrome de Marfan	14
1.1 – Aspectos clínicos	14
1.2 – Aspectos genéticos e moleculares	16
1.3 – SMF e modelos murinos	18
1.4 – Variabilidade fenotípica e genes modificadores	20
2 – O gene <i>Hspg2</i>	24
OBJETIVOS	30
2.1 – Objetivo Geral	30
2.2 – Objetivos Específicos	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 – Linhagens utilizadas	31
3.2 – Camundongos gerados	31
3.2.1 – Geração da linhagem híbrida F2 B6/129	31
3.2.2 – Geração da linhagem duplo-heterozigota <i>Hspg2</i> (+/-) <i>Fbn1</i> (+/mgΔ ^{loxPneo})	32
3.2.2.1 – Descongelamento e expansão de camundongos <i>Hspg2</i> (+/Fl)	32
3.2.2.2 – Confirmação da sequência dos alelos <i>Hspg2</i> selvagem e mutante	33
3.2.2.3 – Geração e expansão dos camundongos <i>Hspg2</i> (+/-)	35
3.2.2.4 – Geração e expansão dos camundongos duplo-heterozigotos [<i>Hspg2</i> (+/-) <i>Fbn1</i> (+/mgΔ ^{loxPneo})]	36
3.3 – Extração de DNA da cauda	37
3.4 – Genotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129	38
3.5 – Fenotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129	39
3.5.1 – Fenótipo esquelético	39
3.5.2 – Fenótipo vascular	40
3.6 – Extração e maceração de tecidos	43
3.6.1 – Ossos	44
3.6.2 – Aortas	44
3.7 – Extração de RNA	44
3.8 – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	45
3.9 – Quantitative Real Time PCR (qPCR)	46
3.10 – RNA-seq	46
3.10.1 – Análise de expressão gênica diferencial	47
3.10.2 – Análise de variantes exônicas no gene <i>Hspg2</i>	48
3.11 – Análises estatísticas	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

4.1 – Geração e genotipagem da linhagem F2 B6/129	49
4.2 – Fenotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129	49
4.2.1 – Fenótipo esquelético	49
4.2.2 – Fenótipo vascular	51
4.3 – Quantificação da expressão dos genes <i>Hspg2</i> e <i>Fbn1</i>	56
4.3.1 – Fenótipo esquelético	56
4.3.2 – Fenótipo vascular	63
4.4 – RNA-seq	72
4.4.1 – Análise de expressão gênica diferencial	72
4.4.2 – Análise de variantes exônicas no gene <i>Hspg2</i>	74
4.5 – Geração da linhagem duplo-heterozigota <i>Hspg2</i> (+/-) <i>Fbn1</i> (+/mg $\Delta^{loxPneo}$)	75
4.5.1 – Descongelamento e expansão de camundongos <i>Hspg2</i> (+/FI)	76
4.5.2 – Confirmação da sequência dos alelos <i>Hspg2</i> selvagem e mutante	77
4.5.3 – Geração e expansão dos camundongos <i>Hspg2</i> (+/-)	78
4.5.4 – Geração e expansão dos camundongos duplo-heterozigotos [<i>Hspg2</i> (+/-) <i>Fbn1</i> (+/mg $\Delta^{loxPneo}$)]	79
CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	90
ANEXOS	96

INTRODUÇÃO

1. A Síndrome de Marfan

1.1. Aspectos clínicos

A síndrome de Marfan (SMF) (OMIM 154700) foi primeiramente descrita em 1896, pelo pediatra francês Antoine Marfan, que caracterizou a síndrome em um de seus pacientes como “um caso de deformação congênita dos quatro membros, mais pronunciada nas extremidades, caracterizada pelo alongamento dos ossos com algum grau de desbaste” (MARFAN, 1896). Essa deformação é consequência da deficiência da proteína fibrilina 1 no tecido conjuntivo que afeta 1 a cada 5000 pessoas, e tem como consequência uma série de manifestações que variam tanto de tipos de tecidos afetados quanto de grau de gravidade.

As manifestações mais visíveis são as que envolvem o sistema esquelético. Os pacientes apresentam altura acima da média, membros longos e com alta mobilidade, escoliose e malformações do esterno e do palato. Essas alterações causam dores musculares, nos ossos e nas juntas. Além disso, alguns pacientes apresentam dificuldade na fala devido a malformações do palato. As malformações e fragilidade da coluna espinhal podem acarretar graves danos, e alguns casos de óbito já foram relatados em pacientes que sofreram subluxação espontânea atlanto-axial (AMMASH; SUNDT; CONNOLLY, 2008)

As alterações oculares também são comuns em pacientes afetados pela SMF. Cerca de 60% dos pacientes diagnosticados apresentam deslocamento do cristalino. Isto ocorre devido à fragilidade do tecido conectivo onde o cristalino encontra-se imerso. Essas alterações ainda podem acarretar miopia precoce severa, deslocamento de retina, glaucoma e catarata (AMMASH; SUNDT; CONNOLLY, 2008).

Alterações pulmonares, apesar de não serem consideradas no diagnóstico específico da SMF, também estão presentes em alguns pacientes (DE PAEPE et al., 1996; DYHDALO; FARVER, 2011; LOEYS et al., 2010), que apresentam alterações na via respiratória, fazendo com o que o ar seja desviado para o espaço pleural e os pulmões sejam desacoplados da caixa torácica (DWYER, 1965). Esse fenômeno chama-se pneumotórax e causa dificuldade respiratória devido à compressão dos pulmões. Além disso, já foram descritos pacientes com enfisema pulmonar,

pneumonia, bronquiectasia, fibrose apical e malformações pneumáticas (BOLANDE; TUCKER, 1964; SHARMA; TALUKDAR; KAPOOR, 1989; TEOH, 1977).

Alguns pacientes também apresentam ectasia dural, ou seja, enfraquecimento do tecido conectivo da dura-mater que recobre a coluna espinhal. Essa alteração causa aumento no volume do fluido cerebroespinal, levando a dores nas extremidades dos membros e na cabeça, entre outros problemas neurológicos (MCNEILLY et al., 2013).

Apesar de todas essas manifestações da doença, a maior causa de mortalidade em pacientes com SMF está relacionada a alterações cardiovasculares, incluindo alterações na aorta, na artéria pulmonar, nos septos, nas válvulas e defeitos na condução sanguínea (MCKUSICK, 1955). A grande maioria dos sintomas envolve dor no peito, palpitações e fadiga, e são causadas pelo enfraquecimento do tecido conjuntivo que sustenta o sistema vascular. Os pacientes SMF comumente apresentam prolapso da válvula mitral, acarretando refluxo sanguíneo (DE BACKER et al., 2006).

Porém, o maior risco de mortalidade precoce nos pacientes envolve os processos de dilatação e dissecação da aorta, que podem ocasionar a formação de aneurismas. Com a fragilidade do sistema conjuntivo e vascular, a aorta perde resistência e torna-se mais suscetível à dilatação e perfurações em suas camadas. Caso haja a ruptura das três camadas, o paciente pode vir a óbito por hemorragia. Esse evento resulta em morte em torno dos 40 anos de até 50% dos pacientes SMF que não são devidamente tratados (AMMASH; SUNDT; CONNOLLY, 2008). No entanto, o gerenciamento dos pacientes tem melhorado no decorrer dos anos, o que fez aumentar a expectativa de vida de 47 para 75 anos de idade. As análises de ecocardiograma permitem que os médicos possam avaliar a evolução do processo de dilatação da aorta e, então, estabelecer terapias cirúrgicas e melhores combinações de tratamentos com fármacos, como bloqueadores dos receptores de angiotensina e β -bloqueadores (BETHEA et al., 2004; BITTERMAN; SPONSELLER, 2017).

Uma dificuldade encontrada, ainda, refere-se ao diagnóstico da SMF. Isso ocorre devido ao fato de a SMF apresentar sintomas semelhantes aos de outras doenças e, principalmente, grande variabilidade clínica. Hoje, o método de diagnóstico mais aceito é o descrito por Loeys et al. (2010), que incorpora critérios estabelecidos por De Paepe et al. (1996) com análises moleculares. O diagnóstico é feito com base em um sistema de scores que enfatiza, por exemplo, deformações no esterno, deformações faciais, prolapso da valva mitral, miopia, protusão acetabular, entre

outros. O diagnóstico final é realizado por meio desse sistema de *scores* associado com a presença ou ausência de um histórico familiar da doença (BITTERMAN; SPONSELLER, 2017).

1.2. Aspecto genéticos e moleculares

A SMF é uma doença de herança autossômica dominante causada por mutações no gene *FBN1*, que codifica a glicoproteína de matriz extracelular (MEC) fibrilina-1. A primeira relação da SMF com a proteína fibrilina-1 ocorreu em 1990, quando cultura de células da pele de pacientes SMF apresentaram defeitos na produção, secreção e incorporação de fibrilina-1 quando comparadas a células de indivíduos normais (MCGOOKEY; PYERITZ; BYERS, 1990; MILEWICZ et al., 1992). Ainda, foi observado que células de pacientes SMF aparentados compartilhavam do mesmo defeito de produção e secreção da fibrilina-1, sugerindo que mutações no gene codificador desta proteína estariam relacionadas a doença (MILEWICZ et al., 1992). No mesmo período, o gene responsável pela SMF foi mapeado ao cromossomo 15, em humanos (KAINULAINEN et al., 1990) e, posteriormente, uma mutação *de novo* sem sentido no gene *FBN1* foi encontrada em dois pacientes esporádicos não relacionados, consolidando, assim, a relação deste gene com a SMF (DIETZ et al., 1991). Atualmente, mutações no gene *FBN1* são encontradas em mais de 90% dos pacientes com diagnóstico clínico de SMF (LOEYS, 2016).

O gene *FBN1* localiza-se na região 15q21.1, e possui 66 exons e 230 kb. Já foram reportadas mais de 2900 mutações no gene *FBN1*, as quais podem ser de efeito dominante negativo (DN) ou haploinsuficiente (HI). Mutações HI, cujo alelo mutante não leva à produção de uma proteína mutante ativa, levam à redução dos níveis de fibrilina-1 e redução de microfibrilas. Já mutações DN levam à produção de uma proteína com alterações conformacionais que, quando liberada na matriz, interage com os outros monômeros de fibrilina-1, causando anomalias nas microfibrilas (AUBART et al., 2015).

A fibrilina-1 é o principal constituinte das microfibrilas e apresenta sítios de ligação a uma grande diversidade de componentes, o que a torna um importante regulador da homeostase da MEC (BALDWIN et al., 2013; SAKAI; KEENE; ENGVALL, 1986) (Figura 1). Essas microfibrilas compõem a membrana basal e são responsáveis por ligá-la ao tecido conjuntivo, juntamente com o colágeno tipo IV (PAULSSON, 1992).

Além disso, as microfibrilas têm um importante papel na biogênese das fibras elásticas que conferem elasticidade e flexibilidade a tecidos como pulmão, pele e artérias (JENSEN; HANDFORD, 2016).

Figura 1. Sítios de ligação à fibrilina-1. Esquema representando a molécula de fibrilina-1 e os diferentes sítios de ligação e domínios presentes em sua extensão. A molécula é formada pelos seguintes domínios: semelhantes a fatores de crescimento epidermais ligantes de cálcio (domínio *cbEGF-like*), semelhantes a fatores de crescimento epidermais (domínio *EGF-like*), domínios constituídos de 8 cisteínas (domínio *TB*) e domínios híbridos, constituídos de domínios *TB* e *cbEGF-like*. A molécula de fibrilina-1 também possui regiões ricas em prolina. Além disso, por toda a extensão da molécula é possível encontrar sítios de ligação a uma grande diversidade de componentes da matriz extracelular, representados como retângulos de diferentes cores na figura, tais como, heparano-sulfato, versican, MAGPs, tropoelastina e fibulinas (adaptado de BALDWIN et al., 2013).

A membrana basal é constituída por uma combinação de fibras, glicosaminoglicanos e proteoglicanos que conferem propriedades relacionadas a função e homeostase tecido-específica (JENSEN; HANDFORD, 2016). A fibrilina-1 interage com uma série de moléculas, incluindo proteínas de ligação ao TGF- β latente, também conhecidas como LTBP (do inglês, *Latent TGF- β Binding Proteins*) (Figura 2). O TGF- β é uma molécula sinalizadora envolvida em diversos processos celulares, incluindo modificações de MEC (NEPTUNE et al., 2003). Essas moléculas ficam ligadas aos LTBP associados a fibrilina-1 até que haja algum evento celular que sinalize sua liberação (BYERS, 2004).

Já foi visto que mutações no gene *FBN1* podem causar defeitos na ligação de TGF- β latente, acarretando aumento na sinalização para genes relacionados às vias canônicas e não canônicas de ativação do TGF- β . Estes genes atuam em processos de síntese de componentes da matriz e causam, então, a liberação excessiva de proteoglicanos e colágeno, fatores relacionados às manifestações clínicas da síndrome (NEPTUNE et al., 2003; VERSTRAETEN et al., 2016).

Figura 2. Processo de formação de microfibrilas. Esquema representando o processo de formação de microfibrilas a partir da fibrilina-1 e o mecanismo de ligação da molécula de TGF- β à fibrilina-1 via LTBP-1. A fibrilina-1 é traduzida a partir de um mRNA codificado pelo gene *FBN1* no cromossomo 15, em humanos. A proteína é processada e secretada, formando microfibrilas ao associar-se a outros componentes na matriz extracelular. As microfibrilas juntamente com a elastina formam as fibras elásticas. O LTBP-1 é uma molécula associada à fibrilina-1, que tem como função a captura de TGF- β latente. (Adaptado de BYERS, 2004).

É importante notar que, mais recentemente, alguns trabalhos vêm sendo publicados nos quais refuta-se a ideia de que a sinalização por TGF- β é a principal responsável pela patofisiologia da doença. Em experimentos com camundongos, foi possível observar desenvolvimento de aortopatias mesmo na ausência de receptores de TGF- β em células da musculatura lisa vascular (CMLV) e, inclusive, a sinalização por TGF- β mostrou-se protetora no início do desenvolvimento da doença (WEI et al., 2017). Além disso, a sinalização promíscua de TGF- β não se mostrou proeminente na patogênese de cardiomiopatia dilatada em camundongos SMF (COOK et al., 2014).

1.3. SMF e modelos murinos

Diferentes modelos murinos já foram gerados para estudar os mecanismos fisiopatológicos da SMF (Tabela 1). O primeiro modelo foi gerado em 1997, pela substituição dos exons 19 a 24 por um cassete de expressão do gene de resistência à neomicina (neo), o alelo *mgΔ* (PEREIRA et al., 1997). Esse modelo apresentou fenótipos cardiovasculares neonatais, porém, apenas em homozigose, devido à baixa

expressão do alelo mutado. Além disso, os animais homozigotos morriam em até 14 dias de vida. Cerca de 2 anos depois, publicou-se um novo modelo no qual, em vez da deleção dos exons, o cassete neo foi introduzido entre os exons 18 e 19, sem promover a deleção de nenhum exon, produzindo uma proteína normal, com baixa expressão, mas, ainda assim, maior do que o modelo antigo. Assim, os animais homozigotos sobreviviam até 6 meses e apresentavam, além de fenótipos cardiovasculares, fenótipos esqueléticos, como hipercifose (PEREIRA et al., 1999).

Em 2010, foi realizada uma adaptação do alelo $mg\Delta$, na qual flanqueou-se o cassete neo por sequências LoxP (alelo $mg^{\Delta loxPneo}$), as quais permitem a posterior excisão de neo pela enzima Cre Recombinase (ORBAN; CHUI; MARTH, 1992; SAUER; HENDERSON, 1988). A adição das sequências LoxP, possivelmente, reduziram a interferência do cassete neo na expressão do alelo mutante, pois animais heterozigotos já manifestavam a doença. Os camundongos apresentaram enfisema pulmonar, hipercifose, e alterações vasculares, como espessamento da aorta média e degradação das fibras elásticas. Todos esses fenótipos foram observados mesmo em heterozigose, o que tornou esse modelo muito mais interessante na representação da doença SMF em humanos (LIMA et al., 2010).

Tabela 1. Modelos de camundongos para a SMF. Lista dos principais modelos de camundongo para SMF descritos na literatura e seus respectivos fenótipos. Adaptado da dissertação de KAWAHARA, 2016.

Modelo animal	Mutação	Fenótipo	Autor
mgΔ	Substituição dos exons 19 a 24 por um cassete de neomicina (<i>Neo</i>).	Heterozigotos são semelhantes aos selvagens. Homozigotos apresentam fenótipo cardiovascular e morrem antes do desmame. Expressão de 10% de <i>Fbn1</i> total.	PEREIRA et al., 1997.
mgR	Inserção do cassete <i>Neo</i> entre exons 18 e 19 no alelo selvagem.	Homozigotos apresentam cifose e anormalidades vasculares. Expressão de 20% de <i>Fbn1</i> total.	PEREIRA et al., 1999.
mgN	Alelo nulo.	Heterozigotos são viáveis e férteis. Homozigotos morrem em idade neonatal por complicações vasculares.	CARTA et al., 2006.
mg$\Delta^{loxPneo}$	Mesma mutação do $mg\Delta$ com a inserção de dois sítios loxP flanqueando o cassete <i>Neo</i> .	Heterozigotos apresentam cifose, complicações vasculares e pulmonares. Homozigotos são inviáveis.	LIMA et al., 2010.
C1039G	Mutação <i>missense</i> pela substituição de uma glicina por uma cisteína.	Heterozigotos apresentam dilatação da aorta e anormalidades do músculo e esqueleto, mas tem expectativa de vida normal. Homozigotos tem morte prematura. Reproduz a SMF clássica em humanos	JUDGE et al., 2004.

1.4. Variabilidade fenotípica e genes modificadores

Uma característica importante da SMF é a alta variabilidade das manifestações clínicas entre os pacientes, o que pode dificultar o diagnóstico e o gerenciamento dos mesmos. Uma parte dessa variabilidade está associada aos diferentes tipos de mutações existentes no gene *FBN1* (LOEYS et al., 2010).

Há evidências de que a grande maioria de mutações que envolvem os exóns 24 a 32 do gene *FBN1* estão associadas a fenótipos mais graves (TIECKE et al., 2001). Ainda, pacientes que apresentam subluxação do cristalino tendem a apresentar mutações com perda de sentido devido a substituição de cisteínas (SCHRIJVER et al., 2002). Mesmo assim, não existe uma correlação clara entre genótipo e fenótipo que explique a complexidade da variabilidade clínica na SMF.

Além disso, indivíduos de uma mesma família, ou seja, que apresentam a mesma mutação no gene *FBN1*, muitas vezes possuem fenótipos ou idades de aparecimento de sintomas distintos (LOEYS et al., 2010). Essa variabilidade clínica intrafamiliar sugere a existência de genes modificadores, os quais seriam polimórficos entre os pacientes (HUTCHINSON et al., 2003). Esses polimorfismos genéticos atuam modificando os fenótipos por epistasia, levando ao agravamento ou melhora do estado da doença pela interferência na penetrância, expressividade, dominância ou pleiotropia (Revisado por RIORDAN; NADEAU, 2017). Sendo assim, é hipotetizado que polimorfismos em determinados genes podem explicar parte da variabilidade clínica na SMF por meio da interação com a mutação em *FBN1*, ora agravando ora atenuando determinados fenótipos (HUTCHINSON et al., 2003).

O modelo $mg^{\Delta loxPneo}$, além de apresentar os fenótipos marfanoides citados, apresentou variabilidade fenotípica de acordo com o fundo genético dos animais. Camundongos heterozigotos $mg^{\Delta loxPneo}$ de fundo 129/Sv ($129\ mg^{\Delta loxPneo}$) apresentaram fenótipos mais graves aos 3 meses de idade do que quando comparados a camundongos C57BL/6 ($B6\ mg^{\Delta loxPneo}$) com a mesma mutação (Figura 3). Esse fato, além de recapitular a variabilidade intrafamiliar da síndrome em humanos, sugere a existência de polimorfismos genéticos entre as duas linhagens que, possivelmente, modulam as diferenças fenotípicas entre elas. Além disso, foi possível observar uma alta variabilidade fenotípica entre os animais SMF de fundo 129/Sv, o que sugere o

envolvimento de fatores epigenéticos na modulação dos fenótipos da doença (LIMA et al., 2010).

Figura 3. Comparação dos fenótipos de camundongos SMF em diferentes fundos genéticos. Microfotografias de cortes transversais da aorta e do pulmão e imagens de Raio-X comparando os fenótipos pulmonar, aórtico e esquelético de animais selvagens, B6 $mg^{\Delta loxPneo}$ e 129 $mg^{\Delta loxPneo}$. As imagens mostram que, aos 3 meses, os animais de fundo 129/Sv apresentam fenótipos mais graves. As setas vermelhas indicam locais de fragmentação das fibras elásticas. Adaptado de LIMA et al., 2010.

Baseado nisso, foi realizado um trabalho por nosso grupo na tentativa de identificar regiões do genoma que modulam a variabilidade fenotípica observada entre os camundongos SMF de linhagens diferentes (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016). Para isso, foram utilizados animais de fundo misto, gerados pelo cruzamento de animais B6 $mg^{\Delta loxPneo}$ com animais selvagens de fundo 129/Sv. Esses animais produziram a linhagem filial 1 (F1), a qual foi inter cruzada para produzir os animais da linhagem 2 (F2), de alta variabilidade genética e fenotípica (linhagem F2 B6/129). A variabilidade fenotípica obtida foi ainda maior do que a observada em animais 129 $mg^{\Delta loxPneo}$, sugerindo um efeito da mistura de fundos genéticos e não apenas da linhagem 129/Sv. Cerca de 82 animais F2 B6/129 foram categorizados em graves, moderados e leves de acordo à densidade alveolar (fenótipo pulmonar), nível de hipercifose (fenótipo esquelético) e espessura da túnica média da aorta (fenótipo vascular). Destes, foram selecionados 10 animais graves e 10 animais leves para cada fenótipo, os quais foram genotipados para cerca de 7851 SNPs (do inglês, *Single*

Nucleotide Polymorphisms) para realização da análise de ligação em busca de QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Loci*) (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016).

Foi possível observar que, diferentemente dos animais das linhagens isogênicas B6 $\Delta\text{loxPneo}$ e 129 $\Delta\text{loxPneo}$, os fenótipos esquelético, vascular e pulmonar de animais F2 B6/129 $\Delta\text{loxPneo}$ não são correlacionados, ou seja, animais mais graves para um sistema não são necessariamente mais grave para um outro (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016; LIMA et al., 2010). Este observado fez com que a análise de ligação fosse realizada para os três sistemas separadamente e foi possível encontrar picos de associação com o fenótipo esquelético nos cromossomos 3, 6 e X, e, para o fenótipo vascular, foi possível identificar picos nos cromossomos 4 e 13. Para o fenótipo pulmonar, não foram encontrados picos sugestivos ou significativos em nenhum cromossomo (Figura 4) (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016).

Figura 4. Histogramas dos QTLs encontrados na análise de ligação da linhagem F2 B6/129. Histogramas dos QTLs encontrados na análise de ligação realizada para os animais da linhagem F2 $\Delta\text{loxPneo}$, evidenciando pico significativo no cromossomo 6 e picos sugestivos nos cromossomos 3 e X para o fenótipo esquelético. Enquanto, para o fenótipo vascular é possível observar picos sugestivos nos cromossomos 4 e 13. Já, para o fenótipo pulmonar, houve ausência de picos significativos e/ou sugestivos. Adaptado de FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016.

A partir destes dados, foi feita uma busca na literatura com o intuito de identificar possível genes, em cada um dos QTLs identificados, que tivessem

envolvimento com os fenótipos da SMF. Sendo assim, foram selecionados genes associados à via de sinalização de TGF- β , processamento de proteínas e matriz extracelular, os quais estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Genes candidatos selecionados em cada QTL. Tabela mostrando os genes modificadores candidatos para cada fenótipo estudado. Krq1-3: loci associados ao fenótipo esquelético; Awtq1-2: loci associados ao fenótipo vascular (adaptado de FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016).

	Krq1	Krq2	Krq3	Awtq1	Awtq2
Via de TGF-β	<i>Foxp1</i>	<i>Bmpr1b</i>	<i>Bmp15</i> <i>Foxp3</i>		<i>Foxd1</i> <i>Zfyve16</i>
Processamento de proteínas	<i>Ube3</i> <i>Adamst9</i>	<i>Dnajb14</i>	<i>Usp27x</i> <i>Uba1</i> <i>Porcn</i>		<i>Tbca</i>
Matriz extracelular		<i>Col25a1</i> <i>Npnt</i>		<i>Hspg2</i>	

O trabalho explorou também as regiões sintênicas no genoma humano, e foi possível notar que o locus Krq2 (associado ao fenótipo esquelético) está dividido entre os cromossomos 1 e 4, e que o locus Awtq1 (fenótipo vascular) é contíguo à região Krq2 no cromossomo 1 humano (Tabela 3). Isso sugere que, em humanos, possa existir um gene modificador comum para os sistemas esquelético e vascular.

Tabela 3. Genes candidatos nas regiões de sintenia em humanos. Tabela mostrando as regiões sintênicas, genes modificadores candidatos no genoma humano e doenças e fenótipos já associados a cada um deles. Adaptado de FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016.

QTL	Posição de blocos de sintenia no genoma humano (bp)	Gene	Doença humana	Fenótipo*
Krq1	chr3:238279-1291341; chr3:64079543-7457029	<i>EOGT</i>	Síndrome Adams-Oliver	Desenvolvimento anormal da pele; má formação dos membros
		<i>LMOD3</i>	Miopatia nemalínica 10	Miopatia; dificuldade de alimentação e deglutição; deformação dos pés; escoliose; deformação nas juntas
Krq2	chr1:68564156-89458636; chr4:95373037-120550146	<i>LARP7</i>	Síndrome Alazami	Achados esqueléticos inconstantes (escoliose)
Krq3	chrX:48316920-51151687	<i>CLCN5</i>	Doença de Dent	Defeitos ósseos causados pela falha na reabsorção de cálcio
		<i>PORCN</i>	Hipoplasia dérmica focal	Defeitos na pele, esqueleto, olhos e rosto
Awtq1	chr1:895967-59012474	<i>ALPL</i>	Hipofosfatasia	Má formação óssea e dentária (falha na mineralização)
		<i>ECE1</i>	Doença de Hirschsprung, defeitos cardíacos e disfunção autonômica	Defeitos cardíacos; hipertensão
		<i>FUCA1</i>	Fucosidose	Disostose multiplex (defeitos esqueléticos); infecções respiratórias
		<i>HSPG2</i>	Síndrome de Schwartz-Jampel	Defeitos esqueléticos (cifoescoliose)
Awtq2	chr5:43444354-96143803	<i>RASA1</i>	Síndrome de Parles-Weber	Malformações capilares, fistulas arteriovenosas; crescimento excessivo dos membros
		<i>VCAN</i>	Síndrome de Wagner	Descolamento de retina e catarata

- * Fenótipos em sistemas afetados na SMF.

- Informações obtidas no Online Mendelian Inheritance in Man database (www.omim.org).

2. O gene Hspg2

Entre os genes candidatos descritos, está o *Hspg2* (proteoglicano heparano-sulfato do tipo 2), que codifica a proteína perlecan. Esse gene é composto por 97 exons e localiza-se no cromossomo 1 em humanos (cromossomo 4 em camundongos). Mutações neste gene estão associadas à Síndrome de Schwartz-Jampel (SSJ), uma doença de herança autossômica dominante caracterizada por deformações osteoarticulares, como nanismo, cifoescoliose e miotonia (ARIKAWA-HIRASAWA et al., 2002; NICOLE et al., 1995, 2000; SCHWARTZ; JAMPEL, 1962; STUM et al., 2006).

A proteína perlecan foi isolada pela primeira vez da membrana basal de células de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm, em 1980 (HASSELL et al., 1980). Ela apresenta 5 domínios, sendo o primeiro um sítio exclusivo, responsável pela ligação a glicosaminoglicanos. Esses podem ser condroitina-sulfato e/ou querato-sulfato, como observado em células epiteliais e de músculo liso, ou, heparano-sulfato, como é o caso de células endoteliais (CHUANG et al., 2010; KNOX et al., 2005; LORD et al., 2014, 2018). Além disso, perlecan possui sítios de clivagem para uma série de proteínas presentes na matriz como plasmina, trombina e collagenases (Figura 5).

Figura 5. Estrutura da molécula do perlecan. Figura ilustrando a estrutura proteica de perlecan, evidenciando seus *motifs* e as moléculas ligadas a proteína. Perlecan é composto por 5 domínios. O domínio I contém sequências para ligação a glicosaminoglicanos (GAG) e SEA (*Sperm protein, Enterokinase, Agrin*), sendo este último de função pouco conhecida. O domínio II contém módulos semelhantes a receptores de lipoproteínas de densidade baixa (Domínio receptores LDL classe A). O domínio III é formado por módulos homólogos ao braço curto de cadeias-alfa de laminina (Laminina B) e lamininas de fatores de crescimento epidermal (Laminina EGF). O domínio IV contém módulos homólogos a imunoglobulinas (imunoglobulina, I-set e V-set). Já, o domínio V contém sequências homólogas a domínios globulares de cadeias-alfa de laminina (Domínio laminina G) e repetições semelhantes a fatores de crescimento epidermal (Domínio *EGF-like*). Além disso, perlecan possui sítios de clivagem por diversos componentes da matriz, tais como trombinas, plasminas, collagenase, estromelina, entre outros. Figura adaptada de <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HSPG2ID40890ch1p36.html>.

Apesar da literatura não reportar fenótipos cardiovasculares em pacientes SSJ, sabe-se que perlecan é uma proteína envolvida na manutenção da homeostase do tecido vascular. Essa proteína é sintetizada pelas células endoteliais vasculares (CEV) e pelas células da musculatura lisa vascular (CMLV), e é liberada na matriz extracelular, onde controla uma grande variedade de processos celulares (HASSELL et al., 1980; MURDOCH et al., 1994).

Já é conhecido, por exemplo, o papel de perlecan no processo inicial de aterosclerose. Por meio de suas cadeias de heparano-sulfato, perlecan sequestra lipoproteínas, como por exemplo, lipoproteínas de baixa densidade, moléculas-chave na aterogênese (PILLARISSETTI et al., 1997; XU et al., 2015). Apesar dos efeitos pró-aterogênicos de perlecan, é a falta da expressão de perlecan nos estágios iniciais da doença que permite a ativação e proliferação das CMLV, bem como o processo de síntese de MEC (KINSELLA et al., 2003; LORD et al., 2018; TRAN-LUNDMARK et al., 2008). Isso ocorre porque os níveis de perlecan em CMLVs senescentes e diferenciadas é maior em comparação ao encontrado em células proliferativas, indicando que esta proteína atua como um potente inibidor de proliferação de CMLVs. Esse processo relaciona-se com a inibição da atividade parácrina das células endoteliais, que, por meio de FGF2 e OCT1, aumentam a proliferação das CMLVs. Perlecan inibe a expressão dessas duas proteínas e, consequentemente, os mecanismos de proliferação celular (WEISER et al., 1996).

A relação de perlecan com CMLV é muito interessante, uma vez que já foi observado na aorta de camundongos SMF a perda da capacidade contráctil destas células o que leva a um estado mais indiferenciado e proliferativo (BUNTON et al., 2001). Além disso, processos de hiperplasia e apoptose das CMLV são fenômenos já descritos no desenvolvimento de doenças vasculares, como o aneurisma dissecante da aorta torácica, muito prevalente em pacientes com SMF (MILEWICZ et al., 2008).

Além disso, perlecan participa do remodelamento vascular frente a injúria, visto que se localiza na membrana basal do endotélio e armazena fatores de crescimento em suas cadeias de heparano-sulfato (KINSELLA et al., 2003). Já foi demonstrada, por exemplo, a expressão aumentada de perlecan em CEV induzidas a estresse mecânico patológico. Isso deve-se, possivelmente, ao fato de que perlecan é estimulado durante a degradação do endotélio, liberando fatores de crescimento que participam da manutenção da homeostase da MEC e angiogênese. (LORD et al.,

2014; RUSSO et al., 2018; SEGEV; NILI; STRAUSS, 2004). Além disso, foram observadas anomalias cardiovasculares em modelos de camundongos *knockout* para *Hspg2* causadas devido à perda de integridade da membrana basal em regiões de alto estresse mecânico, evidenciando a função de perlecan na manutenção desses tecidos (COSTELL et al., 1999; YAMADA et al., 1999).

Na SMF, a desregulação da via de TGF- β induz mudanças fenotípicas nas CVML para um estado de alta síntese de componentes da matriz, como metaloproteinases e enzimas elastolíticas, o que influencia na dissecação da aorta e em outras manifestações cardiovasculares (BUNTON et al., 2001; ISSELBACHER; LINO CARDENAS; LINDSAY, 2016). O promotor do gene *Hspg2* apresenta um sítio de resposta ao TGF- β e já foi observado que, em determinados tipos celulares, a superexpressão da via de TGF- β causa o aumento dos níveis transcricionais de *Hspg2* (DODGE et al., 1990; MORRIS; GAZA; POTTER, 1994), o que pode ter relação com a patogênese da SMF.

Além de sua importância na regulação do sistema vascular, perlecan apresenta um importante papel na formação/manutenção do sistema esquelético (GUSTAFSSON et al., 2003). Em experimentos utilizando-se camundongos haploinsuficientes para o gene *Hspg2* foi observada deficiência no desenvolvimento esquelético em decorrência da desintegração da MEC endocondral (COSTELL et al., 1999). Nesse mesmo modelo de camundongo foi verificado que a baixa quantidade de perlecan na matriz óssea causa aumento na sinalização das vias de BMP2 em células progenitoras ósseas, acelerando a diferenciação terminal e mineralização (LOWE et al., 2014). Esse evento é responsável pela baixa qualidade óssea encontrada nos camundongos, bem como pela baixa estatura e condrodisplasias, que podem ser explicados pelo fechamento acelerado das placas de crescimento (LOWE et al., 2014). Esses eventos decorrem do fato de a proteína perlecan regular a biodisponibilidade de fatores da matriz, como FGF-2 e BMP2, por meio de duas cadeias de heparano-sulfato. A regulação da sinalização dessas vias tem efeito na taxa de diferenciação e proliferação de condrócitos e, conseqüentemente, na manutenção das placas de crescimento dos ossos (ARIKAWA-HIRASAWA et al., 2001; SADATSUKI et al., 2017; SMITH et al., 2007). Perlecan também participa na vascularização das cartilagens, durante o desenvolvimento das placas de crescimento, via regulação da sinalização de VEGF

pelas células endoteliais dos vasos, evidenciando seu papel na manutenção da matriz cartilaginosa (ISHIJIMA et al., 2012).

A deleção do gene em modelos zebrafish também demonstrou deficiência no desenvolvimento esquelético-muscular, indicando o papel de perlecan na manutenção destes tecidos (ZOELLER et al., 2008). Finalmente, um estudo recente identificou o gene *HSPG2* como possível candidato associado a degeneração de discos lombares em humanos (KRAATARI et al., 2017).

Além disso, perlecan possui uma relação física com a proteína fibrilina-1. Foi observado em um modelo *in vitro* de formação de microfibrilas que a adição de heparina/heparano-sulfatos (HS) livres inibe a formação das estruturas de microfibrilas. Esta inibição ocorre porque os HS da superfície celular ligam-se preferencialmente às regiões C-terminal da fibrilina-1, impedindo a interação N-C-terminal e, consequentemente, a multimerização e formação de microfibrilas. A fibrilina-1 interage fisicamente com as moléculas HSPGs na membrana celular, devido a presença de sítios de ligação específicos para estas proteínas. Este processo é essencial para o posicionamento e fixação dos multímeros de fibrilina para a formação das microfibrilas e posterior inserção na rede de fibronectina (Figura 6) (SABATIER et al., 2014).

Figura 6. Papel dos proteoglicanos heparano-sulfato na formação das microfibrilas. Figura ilustrando o papel de perlecan (Proteoglicano heparano-sulfato) na formação das microfibrilas. Os monômeros de fibrilina produzidos pela célula são secretados por meio de vesículas secretoras na membrana plasmática e clivados pela proteína furina. Os monômeros unem-se por meio da região C-terminal, formando os multímeros de fibrilina. Esses multímeros são posicionados de acordo com a orientação C-N terminal com o auxílio de proteoglicanos heparano-sulfatos e do citoesqueleto celular por meio dos filamentos de actina. É formada, então, a estrutura "colar de pérolas" de microfibrilas, a qual interage com a rede de fibronectina na matriz extracelular. Adaptado de Sabatier et al., 2014.

Somado a isso, foi verificado em estudo *in vitro* que perlecan e fibrilina-1 interagem fisicamente na membrana basal, via moléculas de heparano-sulfato, em diferentes tecidos humanos, como na junção epidermal-dermal de pele, no endotélio vascular e no epitélio ciliar (TIEDEMANN et al., 2005). Perlecan e fibrilina-1 também já foram co-localizados nos discos intervertebrais de humanos e camundongos, o que suporta a hipótese de que haja função conjunta dessas proteínas na manutenção desse sistema (HAYES; SMITH; MELROSE, 2013).

Esse mesmo estudo observou que modelos de camundongo *knockout* para *Hspg2* apresentaram redução da deposição de microfibrilas na junção dermal-epidermal, sugerindo que perlecan desempenha um papel na biogênese ou na ancoragem das microfibrilas próximas a membrana basal (TIEDEMANN et al., 2005).

Tendo em vista a co-função da proteína perlecan e fibrilina-1 na formação das microfibrilas, somado aos achados na literatura que descrevem o papel de *Hspg2* na manutenção e formação do sistema artro-esquelético e cardiovascular, variações na expressão gênica deste gene em camundongos F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$ podem estar associadas à variabilidade fenotípica esquelética e vascular observada neste modelo.

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Testar a hipótese de que *Hspg2* é um gene modificador dos fenótipos vascular e esquelético no modelo murino $mg\Delta^{loxPneo}$ para a Síndrome de Marfan.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Gerar camundongos da linhagem híbrida F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e separá-los em graves e leves para os fenótipos vascular e esquelético.
2. Medir a expressão do gene *Hspg2* em aorta e fragmentos de coluna dos animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e testar a associação com a gravidade dos fenótipos;
3. Identificar genes diferencialmente expressos entre animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ com fenótipos graves e leves dos dois sistemas através de RNAseq, triando aqueles localizados nos loci modificadores já identificados (Tabela 2).
4. Gerar camundongos duplo-heterozigotos [*Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/ $mg\Delta^{loxPneo}$)] para verificar o efeito de baixas quantidades de *Hspg2* nos fenótipos da SMF.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

Para este trabalho foram utilizados camundongos de diferentes linhagens:

- Camundongos das linhagens isogênicas selvagens C57BL/6 (B6) e 129/Sv (129) gerados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (5 machos e 5 fêmeas B6, e 5 machos e 5 fêmeas 129). Também foram utilizados 3 machos e 3 fêmeas da linhagem selvagem B6 para a geração da linhagem duplo-heterozigota;

- Camundongos heterozigotos C57BL/6 (B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$) e 129/Sv (129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$) gerados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (5 machos e 5 fêmeas B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$, e 5 machos e 5 fêmeas 129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$). Também foram utilizados 3 machos e 3 fêmeas da linhagem B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ para geração da linhagem duplo-heterozigota;

- Camundongos mutantes para o gene *Hspg2*, cujos embriões foram cedidos pela Universidade de Lun (Suécia) pelo Prof. Reinhard Fässler. Os embriões foram descongelados e gerados no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP;

- Camundongos da linhagem C57BL/6 transgênicos para o gene *Cre* (B6 *Cre*), gerados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Foram utilizadas 3 fêmeas B6 *Cre* para a geração da linhagem duplo-heterozigota;

Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de luz e temperatura, e em ambiente livre de agentes potencialmente patogênicos. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP, com protocolo 272/2016 (Anexo A). A geração da linhagem híbrida F2 B6/129, bem como da linhagem duplo-heterozigota estão detalhadas no item 3.2.

3.2. Camundongos gerados

3.2.1. Geração da linhagem híbrida F2 B6/129

Camundongos machos da linhagem B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ foram cruzados com fêmeas da linhagem selvagem 129, gerando a linhagem filial 1 (F1). A linhagem F1 foi genotipada para alelos selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$ e camundongos machos F1 $mg\Delta^{loxPneo}$ foram selecionados para intercruzamento com fêmeas selvagens da F1, gerando a F2 de alta variabilidade fenotípica (F2 B6/129), objeto principal de estudo desse trabalho (Figura 7). No total, foram utilizados, neste trabalho, 70 animais F2 B6/129, sendo 19 selvagens (F2 B6/129 selvagens) e 51 heterozigotos $mg\Delta^{loxPneo}$ (F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$).

Figura 7. Geração da linhagem F2 B6/129. Esquema ilustrando o cruzamento de camundongos para a geração dos animais da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. P: Linhagem parental formada por fêmeas selvagens da linhagem 129 e machos da linhagem B6 $mg\Delta^{loxPneo}$. F1: Linhagem filial 1 formada por animais de fundo misto F2 B6/129. Fêmeas F2 B6/129 selvagens foram utilizadas para cruzamento com machos F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. F2: Linhagem filial 2 formada por animais de fundo F2 B6/129 selvagens e $mg\Delta^{loxPneo}$, de ambos sexos.

3.2.2. Geração da linhagem duplo-heterozigota *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/mg $\Delta^{loxPneo}$)

Com o objetivo de testar o efeito da haploinsuficiência de *Hspg2* para os fenótipos da SMF nos camundongos heterozigotos $mg\Delta^{loxPneo}$, foram gerados camundongos duplo-heterozigotos *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/mg $\Delta^{loxPneo}$).

3.2.2.1. Descongelamento e expansão de camundongos *Hspg2* (+/F1)

Embriões de camundongos modificados para o gene *Hspg2* foram cedidos pelo Prof. Reinhard Fässler, da Universidade de Lun (Suécia). Estes embriões portavam a modificação do exon 6 do gene *Hspg2*, em heterozigose, pelo flaqueamento com sequências LoxP (aqui denominados, *Hspg2* (+/Fl)).

Cerca de 12 embriões foram descongelados em meio de revitalização constituído de 500uL de sucrose 1M e 500uL de meio de cultura comercial M2 com HEPES (Merck, M7167). Os embriões foram transferidos para placas contendo meio M2, onde permaneceram incubados até serem transferidos a duas fêmeas pseudoprenhas da linhagem B6. A transferência foi realizada por meio da aspiração dos embriões e expirando no oviduto das fêmeas com o auxílio de uma agulha de vidro. Dos embriões transferidos nasceram apenas 2 filhotes fêmeas. Essas fêmeas foram cruzadas com machos da linhagem B6 para a expansão da linhagem.

Os filhotes deste cruzamento tiveram o DNA das caudas extraído, como descrito no item 3.3, e foram genotipados para a modificação no exon 6 por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Os animais *Hspg2* (+/Fl) foram identificados pela presença de duas bandas no gel de eletroforese, utilizando-se *primers* que se anelam nos exons 5 (*forward*) e 6 (*reverse*). Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do fragmento do gene *Hspg2* foram:

- *Hspg2* 5F: 5' – CCC GGA GAC CAG ATT GTC AG – 3'
- *Hspg2* 6R: 5' – TTC CCT TCG GAG CCA ACA TC – 3'

A PCR foi montada de acordo com as instruções do kit taq DNA polimerase (Invitrogen) e as condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 3 minutos. Etapa 2 (40 ciclos) – 94°C x 15 segundos; 62°C x 20 segundos; 72°C x 30 segundos. Etapa 3 (1 ciclo) – 72°C x 4 minutos. Após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 3%. Os fragmentos esperados foram de 321 pb para o alelo selvagem e de 500 pb para o alelo Fl.

3.2.2.2. Confirmação da sequência dos alelos *Hspg2* selvagem e mutante

A presença das duas sequências LoxP entre os exons 5 e 7 em um dos alelos do gene *Hspg2*, foi confirmada por sequenciamento. Para tal, foram utilizados os alelos selvagem [*Hspg2* (+)] e mutante [*Hspg2* (Fl)] do gene, a partir do DNA de um dos animais gerados a partir dos embriões descongelados.

Primeiramente, foi feita a PCR com os *primers* *Hspg2* 5F e *Hspg2* 7R, sendo que este último se anela no exon 7 (*Hspg2* 7R 5' – CTC CGG TCA CAG CGA TAC TC - 3'), utilizando a enzima de alta fidelidade e processamento Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermofisher, 11304011). As condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 1 minuto. Etapa 2 (35 ciclos) – 94°C x 15 segundos; 62°C x 30 segundos; 68°C x 3 minutos e 10 segundos (fragmento esperado para os animais *Hspg2* (+/Fl) ~ 2000 pb). As reações foram montadas de acordo com as instruções do kit e após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 1%.

Após a verificação no gel, a banda correspondente a região dos exon 5 ao 7 do gene *Hspg2* foi purificada utilizando-se o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, 28903470).

Os DNAs purificados foram clonados em plasmídeos pGEM®-T Easy (Promega, A1360) (anexo B), utilizando-se o volume máximo permitido de DNA de acordo com o kit. O conteúdo total dos DNAs clonados foi utilizado para transformação de bactérias quimiocompetentes, de acordo com as instruções do fabricante. As colônias de bactérias brancas, selecionadas pelo método X-Gal, foram coletadas para expansão e posterior extração do DNA plasmidial. O DNA plasmidial foi extraído pelo kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, 27106), de acordo com as instruções do fabricante.

Devido ao tamanho do fragmento correspondente ao exon 5 a 7, não é possível fazer a distinção dos alelos selvagem e mutante em gel de eletroforese. Para isso, foi feita a digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição *EcoR1*, já que apenas o alelo mutante possui um sítio para *EcoR1* entre os exons 5 e 7 do gene. Para isso foram utilizados 1,5ug de cada plasmídeo digeridos com a enzima *EcoR1* (New England BioLabs, R3101), seguindo as instruções do fabricante. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 2% para identificação de alelos selvagem

e mutante por meio da verificação de bandas de 100pb e 200pb nos plasmídeos que incorporaram o alelo mutante.

Os DNAs plasmidiais que incorporaram os alelos selvagem e mutante foram sequenciados pelo método de Sanger, utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher, 4337455). Para o sequenciamento foram utilizados os *primers* *Hspg2* 5F, *Hspg2* 7R e *Hspg2* Int2 (5' – CTG GAC TGA CTG ACG CTG AG – 3'), visando cobrir a região do genoma onde haveria as sequências LoxP.

3.2.2.3 Geração e expansão dos camundongos *Hspg2* (+/-)

Com o objetivo de deletar o exon 6 do gene *Hspg2*, os camundongos machos identificados como *Hspg2* (+/F1) foram cruzados com camundongos fêmeas B6 *Cre*. Esses animais expressam a enzima Cre Recombinase, capaz de promover a excisão de sequências de DNA flanqueadas por sequências LoxP.

Após o cruzamento, os camundongos *Hspg2* (+/-) (após a excisão do exon 6) foram identificados por PCR, utilizando-se os *primers* *Hspg2* 5F e *Hspg2* Int2 e o kit Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity. A PCR foi montada de acordo com o kit e as condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 1 minuto. Etapa 2 (35 ciclos) – 94°C x 15 segundos; 62°C x 30 segundos; 68°C x 2 minutos. Após a PCR, foi feita a corrida em gel de eletroforese 1% agarose, para identificação dos animais *Hspg2* +/+ e *Hspg2* (+/-).

Os animais *Hspg2* (+/-) foram utilizados para cruzamento com animais B6 selvagens, visando retirar o gene *Cre*. Os filhotes desse cruzamento foram genotipados para a heterozigose do gene *Hspg2*, como descrito acima, mas também para a presença ou ausência do gene *Cre*.

- Cre F: 5' - GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC – 3'
- Cre R: 5' - GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT – 3'

A PCR foi montada de acordo com as instruções do kit taq DNA polimerase (Invitrogen) e as condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 3 minutos. Etapa 2 (35 ciclos) – 94°C x 30 segundos; 52°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto.

Etapa 3 (1 ciclo) – 72°C x 2 minutos. Após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 3%.

3.2.2.4. Geração e expansão dos camundongos duplo-heterozigotos [*Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/mgΔ^{loxPneo})]

Os animais heterozigotos para o gene *Hspg2* [*Hspg2* (+/-)] e sem o gene Cre foram utilizados para cruzamento com camundongos da linhagem B6 mgΔ^{loxPneo} [*Fbn1* (+/-)]. Os filhotes desse cruzamento foram genotipados de acordo com as PCRs *Hspg2* 5F e *Hspg2* Int2 (para verificação de genótipo selvagem ou heterozigoto para o gene *Hspg2*) e para a PCR Neo F e Neo R (para verificação do genótipo selvagem ou heterozigoto para o alelo mgΔ^{loxPneo}). As PCRs foram montadas e avaliadas como descrito anteriormente.

Um esquema ilustrando o resumo do procedimento para a geração da linhagem duplo-heterozigota *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/mgΔ^{loxPneo}) encontra-se abaixo, na figura 8.

Figura 8. Geração da linhagem duplo-heterozigota $Hspg2 +/- +/mg\Delta^{loxPneo}$. Esquema ilustrando o cruzamento de camundongos para a geração dos animais da linhagem duplo-heterozigota $Hspg2 (+/-) Fbn1 (+/mg\Delta^{loxPneo})$. P: Linhagem parental formada por camundongos heterozigotos para as sequências LoxP flanqueando o exon 6 do gene $Hspg2$ [$Hspg2 (+/Fl)$], e camundongos B6 Cre (Cre/Cre). F1: Da F1 foram selecionados animais de genótipo $Hspg2 (+/Fl)$ e heterozigotos para o gene Cre ($+/Cre$), os quais foram cruzados com animais selvagens. F2: F2 formada por animais de diferentes genótipos, incluindo: heterozigotos para a deleção do exon 6 [$Hspg2 (+/-)$] e sem o gene Cre ($+/+$) e animais $mg\Delta^{loxPneo}$ [$Fbn1 (+/-)$]. F3: Linhagem filial 3 formada por animais com diferentes genótipos: duplo-heterozigotos $Hspg2 (+/-) Fbn1 (+/mg\Delta^{loxPneo})$ [$Hspg2 (+/-) Fbn1 (+/-)$], heterozigotos para o gene $Hspg2$ [$Hspg2 (+/-)$], $mg\Delta^{loxPneo}$ [$Fbn1 (+/-)$] e selvagens.

3.3. Extração de DNA da cauda

Para realização da genotipagem dos animais, foi realizada a extração de DNA, utilizando amostras das caudas dos animais, mantidas a $-20^{\circ}C$ até que fossem processadas. A dissociação das caudas foi feita por meio de um tampão de lise (100

mM Tris-HCl pH 8.5, 5mM EDTA pH 8.0, 0,2% SDS, 200mM NaCl) suplementado com 0,2 µg/ml de proteinase-K, adicionados no momento do procedimento. Um volume de 500 µl dessa solução foram adicionados a cada amostra, as quais foram incubadas a 55°C por 16 horas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente (TA), e 400 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado 1 volume de isopropanol, homogeneizando as amostras por inversão. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 30 minutos a TA. O sobrenadante foi descartado por inversão. As amostras foram incubadas a 55°C até que o *pellet* estivesse totalmente seco. Finalmente, o DNA obtido foi ressuspensionado em 50 µl de H₂O milliQ e conservado a -20°C.

3.4. Genotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129

Para a seleção de animais heterozigotos $mg\Delta^{loxPneo}$, os camundongos foram genotipados através da realização de duas PCRs para a identificação da presença do alelo *Fbn1* $mg\Delta^{loxPneo}$ e do alelo *Fbn1* selvagem.

Oligonucleotídeos para amplificação do alelo *Fbn1* $mg\Delta^{loxPneo}$ (433bp; T_m 57°C):

- Neo F: 5' – GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT – 3'
- Neo R: 5' – CTC TTC GTC CAG ATC ATC CT – 3'

Condições de amplificação: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 2,5 minutos. Etapa 2 (30 ciclos) – 94°C x 1 minuto; 55°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto. Etapa 3 (1 ciclo) – 72°C x 10 minutos.

Oligonucleotídeos para a amplificação do alelo *Fbn1* selvagem (600bp; T_m 55°C):

- 20F: 5' – AAA CCA TCA AGG GCA CTT GC – 3'
- CC-R: 5' – CAC ATT GCG TGC CTT TAA TTC – 3'

Condições de amplificação: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 2,5 minutos. Etapa 2 (30 ciclos) – 94°C x 1 minuto; 55°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto. Etapa 3 (1 ciclo) – 72°C x 10 minutos.

As reações foram montadas adicionando-se 10 ng de cada oligonucleotídeo, 2 µl de solução tampão 10x (Invitrogen), 1,6 mM de dNTP, 1 unidade da enzima *taq DNA polimerase* (Invitrogen) e água para um volume final de 20 µl. Após o termino da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 2%.

3.5. Fenotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129

Os animais da linhagem F2 B6/129 foram analisados aos 3 meses de idade quanto ao fenótipo esquelético, por meio da obtenção de análise radiográfica, e quanto ao fenótipo vascular, por meio da análise de microfotografias da aorta. Essas análises tiveram por objetivo separar os animais entre graves e leves quanto a estes sistemas.

3.5.1. Fenótipo esquelético

Para análise radiográfico, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (0,6% e 0,08% respectivamente em PBS (NaCl 136,9 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM e KH₂PO₄ 1,47 mM) e posteriormente fixados em cassetes próprios do sistema de obtenção de imagens digitais de raio-x *In-Vivo Imaging System FX PRO (Carestream Molecular Imaging)*, localizado no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os membros posteriores e anteriores dos animais foram distendidos e fixados para que a imagem fosse tirada em decúbito lateral. A obtenção das imagens com os camundongos nessa posição permitiu avaliar o grau de hipercifose dos animais.

Para quantificar o desvio de coluna, foi utilizado o software Zen 2.3 – Blue Edition (Zeiss) para calcular-se o KI (Índice da cifose, do inglês *Kyphosis Index*) descrito por (LAWS; HOEY, 2004) (Figura 9). O KI mede a razão entre a distância linear da vértebra C7 até a vértebra L6 (AB) e a distância linear do ponto dorsal mais alto até a primeira reta (CD), formando um ângulo de 90°. Portanto, quanto menor for o índice KI, maior a gravidade da hipercifose.

Figura 9. Obtenção de medida para o fenótipo esquelético. Foto da radiografia de camundongo F2 B6/129 ilustrando o método KI de medição da hiper-cifose dos animais (razão AB/CD).

Foram selecionados como graves, 5 machos e 5 fêmeas com os menores valores de KI e, como leves, os 5 machos e 5 fêmeas com os maiores valores de KI.

3.5.2. Fenótipo vascular

Após a radiografia, os animais foram submetidos a eutanásia por meio da secção da aorta abdominal e subsequente choque hipovolêmico sob anestesia geral. Os fragmentos de tecidos utilizados para extração de RNA foram retirados imediatamente e armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente freezer a -80°C. Além disso, fragmentos de aorta compreendendo as vértebras T11 a T13 foram retirados para análise histológica. Os fragmentos para histologia foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS, pH 7,4.

Após a fixação, os materiais foram submetidos a lavagens em tampão de fixação contendo paraformaldeído 4% e PBS por um período de 10 minutos. Um

fragmento de cada tecido foi utilizado para inclusão na resina para análise morfológica. Para isso, seguiu-se desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 10% a 100%, durante 10 minutos a cada passagem. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas por 16 horas em solução de etanol absoluto e historesina (Thecnovit 7100®) em partes iguais (1:1). Em seguida, as amostras foram imersas em resina pura por um período de 4 horas e posteriormente, incluídas em resina e polimerizador em moldes plásticos apropriados. Foram realizados cortes em micrótomo American Optical model 820® de 5 µm de espessura, os quais foram posteriormente corados pela técnica de Azul de Toluidina Boratada 1%.

Para a análise histológica foram utilizados 3 cortes transversais da aorta para cada animal. Cada corte foi analisado sob microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1® (Zeiss) e foram obtidas fotografias utilizando-se o software Zen® (Zeiss).

As aortas foram analisadas quanto a cinco parâmetros: presença ou ausência de aneurismas, espessura da túnica média, espessura da túnica adventícia, número de núcleos de CMLV e integridade das fibras elásticas.

- Espessura túnicas média e adventícia: Para cada animal, foram analisados 3 cortes histológicos. Foram tiradas 4 fotografias de cada um dos cortes analisados, no aumento de 400X. Nessas imagens, a mensuração das túnicas foi feita por meio do equipamento Zen, traçando-se 10 retas (5 na túnica adventícia e 5 na túnica média). A distância dessas retas foi quantificada e, então, inferiu-se a espessura das túnicas em micrometros, como ilustrado na figura 10. Foi atribuído um valor para cada animal a partir da média de todas as retas das 4 fotografias e de cada corte.

Figura 10. Obtenção de medida da espessura das tûnicas aórticas. Corte histológico de aorta de camundongo F2 B6/129 selvagem corado com Azul de Toluidina ilustrando o método de quantificação da espessura das tûnicas adventícia (reta descontinua) e média (reta contínua) da parede vascular (aumento 400x).

- Índice de integridade das fibras elásticas: calculamos a integridade das fibras elásticas por meio da contagem de quantas vezes a fibra elástica é dividida em decorrência da fragmentação. Sendo assim, essa contagem foi feita utilizando as fotografias de aortas em aumento de 400x coradas com Azul de Toluidina (Figura 11). A partir do valor de fragmentações (N), determinou-se em quantas vezes cada fibra elástica foi dividida (N+1). O cálculo do índice por fibra elástica foi feito dividindo 1 por N+1. Foi feita a média, então, para todas as fibras elásticas e a média por animal, a partir das 4 fotos equidistantes de aumento 400x de cada corte. Dessa forma, quanto mais próximo de 1 o índice, mais íntegras as fibras elásticas estão, ao passo que, quanto menor o índice, mais fragmentadas.

$$\text{Índice de Integridade} = \text{Média} \left(\frac{1}{N+1} \right) \mid N = \text{partes de fibra elástica}$$

Figura 11. Obtenção de medida de fragmentações elásticas. Imagem exemplificando o método de quantificação das fragmentações das fibras elásticas utilizando o software Zen®. Os "X" vermelhos representam as fragmentações encontradas e quantificadas das fibras elásticas. Fotografia de corte transversal no aumento de 400x da aorta de um camundongo F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$.

- Quantificação de células da musculatura lisa vascular: a quantificação de CMLV foi feita contando os núcleos da túnica média utilizando o software Zen® nas 4 fotografias da parede da aorta em aumento de 400x coradas com Azul de Toluidina (Figura 12). Foi estabelecido um valor por animal, utilizando a média das 4 fotografias para cada corte.

Figura 12. Obtenção de medida da quantidade de células da musculatura lisa vascular. Imagem exemplificando o método de quantificação de células da musculatura lisa vascular utilizando o software Zen®. Fotografia de corte transversal no aumento de 400x da aorta de um camundongo F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Os "X" em vermelho na figura representam os núcleos observados e quantificados.

3.6. Extração e maceramento de tecidos

3.6.1. Ossos

Durante o sacrifício dos animais foram retirados fêmures direitos dos animais das linhagens isogênicas 129 e B6 selvagens e das linhagens 129 e B6 mg $\Delta^{loxPneo}$. Para os animais da linhagem F2 B6/129 foram retirados fragmentos da coluna (T2 – T10), apenas. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, para posterior extração de RNA.

Para o maceramento dos ossos foi utilizado um mortar de ferro congelado em gelo seco para martelar os ossos até que virasse pó. Foram padronizadas 12 marteladas, sem impor força excessiva para que as amostras não degradassem. O pó decorrente do osso martelado foi transferido para um cadinho esterilizado, contendo 1 ml de TRIzol® Reagent, onde foi feita a homogeneização, seguida da transferência para um tubo de 2 ml. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C até o dia da extração do RNA.

3.6.2. Aortas

Fragmentos de aorta correspondente as vértebras T2 a T10 foram retirados durante o sacrifício dos animais, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, para posterior extração de RNA. As aortas foram, então, maceradas em cadinhos contendo nitrogênio líquido até que virassem pó. Volume equivalente a 1mL de TRIzol foi adicionado ao cadinho e homogeneizado com o auxílio de pistilo. O conteúdo dos cadinhos foi transferido para tubos de 2mL e, com o objetivo de desfazer possíveis restos de tecido, o conteúdo passou cerca de 12 vezes por seringa de 1mL com agulha de 21 Gauges. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até que fosse feita a extração de RNA.

3.7. Extração de RNA

Seguiu-se o mesmo protocolo de extração de RNA, tanto para os ossos quanto para as aortas. As amostras foram incubadas no gelo por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio a cada amostra, agitando vigorosamente. As amostras foram incubadas por 2 minutos no gelo e centrifugadas a 12000 g a 4°C por

15 minutos, para a separação de três fases onde a fase superior continha o RNA de interesse. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 1 volume de etanol 70%, diluído em dietil pirocarbonato, homogeneizando as amostras por inversão. Em seguida, o RNA das amostras foi purificado utilizando colunas *RNeasy MiniSpin* do kit de extração de RNA, *RNeasy MiniKit* (Qiagen, 74106), seguindo instruções do fabricante. Durante a purificação de RNA nas colunas, foi feita também a depleção de DNA por meio da digestão com DNase utilizando-se RNase-Free DNase Set (Qiagen, 79254), de acordo com as instruções do fabricante.

Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas e foi feita uma PCR para β -actina para confirmar a ausência de contaminação por DNA. Para isso utilizamos os seguintes oligonucleotídeos, que amplificam um fragmento de 154pb (T_m 60°C):

ActbF: 5' – GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG – 3'

ActbR: 5' – CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T – 3'

As condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 3 minutos; etapa 2 (40 ciclos) – 94°C x 30 segundos; 60°C x 20 segundos; 72°C x 15 segundos; etapa 3 (1 ciclo) – 72°C x 4 minutos.

As reações foram montadas adicionando-se 1 μ l de cada oligonucleotídeo (concentração final de 200 nM), 2 μ l de solução tampão 10x (Invitrogen), 0,8 μ l de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen), 0,32 μ l de dNTPs (5 mM; Invitrogen), 0,2 μ l da enzima *taq DNA polimerase* (Invitrogen), 1 μ l do RNA e água deionizada para um volume final de 20 μ l para cada reação. Após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 3%.

3.8. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Foi feita a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA utilizando-se SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo fisher, 18080044), a partir de 500ng de RNA total, seguindo instruções fornecidas pelo fabricante. Primeiramente foram adicionados 1 μ l de oligo(dT)(50 μ M), 500ng de RNA total de cada amostra e 1 μ l de 10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP).

Essa mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos. A próxima etapa consistiu na adição de 4 µl do tampão 5X First-Strand Buffer, 1 µl de 0.1 M DTT, 1 µl de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Thermofischer, 10777-019) e 1 µl da enzima SuperScript™ III RT, em cada amostra. As amostras foram incubadas a 50°C por 60 minutos e a reação foi inativada aquecendo as amostras a 70°C por 15 minutos.

Para confirmar que a síntese de cDNA foi bem-sucedida, foi realizada uma PCR para β -actina, como descrito anteriormente no item 3.7.

3.9. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

A partir das amostras de cDNA obtidas como descrito no item 3.8, foram realizadas as análises de expressão gênica dos genes *Hspg2* e *Fbn1*, o último, utilizando sondas/*primers* responsáveis por amplificar *Fbn1* selvagem e mutante. Para isso, foram utilizados 40 ng de cDNA para cada reação, onde cada amostra foi analisada em triplicata. Para a realização desta análise foram utilizados os kits TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4304437). As sondas utilizadas foram TaqMan® Gene Expression Assay para o gene *Fbn1* (Thermofisher, Mm01334119_m1), para o gene *Hspg2* (Thermofisher, Mm01181173_g1) e *Actb* (Thermofisher, Mm00607939_s1), como controle endógeno. O experimento foi realizado com o auxílio do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

3.10. RNA-seq

Amostras de animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$ definidos como graves e leves para o fenótipo esquelético foram enviados para a empresa MacroGen, Coreia, para realização do sequenciamento de nova geração de RNA pelo método *TruSeq RNA*. Esse sequenciamento seleciona somente os RNAs que contém a cauda poli-A, sendo utilizado para quantificar a expressão de mRNAs. Para cada animal, 2,4 ug de RNA total, numa concentração de 40 ng/µl, foram utilizados para gerar a biblioteca de cDNA apropriadas para a plataforma de sequenciamento *Illumina Novaseq6000*.

Foi utilizado o *Illumina® TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Kit* para gerar a biblioteca de cDNA. O procedimento inicia-se com o teste de qualidade para a construção das bibliotecas, as quais só são feitas para amostras contendo RNA total

>1ug e RIN >7. A biblioteca de sequenciamento é construída pela fragmentação aleatória do cDNA, seguida pela ligação de adaptadores nas regiões 5' e 3'. Os fragmentos contendo os adaptadores são amplificados por PCR e purificados do gel de eletroforese.

As sequências adaptadoras permitem a ancoragem dos fragmentos à superfície de sequenciamento, ou *flow cell*. Cada fragmento é, então, amplificado em *clusters* distintos por processos de amplificação “em ponte”. Quando a geração do *cluster* está completa, as cadeias estão prontas para serem sequenciadas. O sequenciamento é feito por meio da tecnologia *Illumina Sequencing By Synthesis* pelo método reversível por terminação de cadeia. O sequenciador gera imagens do arquivo bruto e as chamadas de bases são feitas por meio do software RTA (*Real Time Analysis*). O arquivo binário é, então, convertido em arquivos FASTQ utilizando o pacote *Illumina bcl2fastq*. Neste sequenciamento foram geradas bibliotecas *paired-end*, com *reads* de aproximadamente 150 nucleotídeos com média de 50 milhões de *reads* por amostra.

3.10.1. Análise de expressão gênica diferencial

Os arquivos FASTQ obtidos foram analisados durante estágio no laboratório de estatística e biologia computacional, na empresa *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, EUA), sob orientação do professor Gary Churchill. Cada biblioteca foi alinhada contra o transcriptoma construído das linhagens 129 e B6, utilizando o software Bowtie1 (LANGMEAD et al., 2009). Os arquivos SAM (*Sequence Alignment Map*) obtidos do alinhamento foram convertidos em arquivos BAM (*Binary Alignment Map*) usando a função samtools (LI et al., 2009). Esses arquivos foram, então, transformados em uma matrix 3D (haplótipos x genes x *reads*) usando a função alntools desenvolvida pelo grupo do Prof. Churchill (CHOI, 2017). Os *counts* totais para cada gene foram gerados utilizando o algoritmo EMASE-zero, desenvolvido pelo laboratório do Prof. Churchill (RAGHUPATHY et al., 2018), o qual considera a relação hierárquica de isoformas e alelos quando os *reads* se alinham em múltiplas regiões do transcriptoma. A tabela de *counts* foi importada para o ambiente R e foi aplicado um filtro, mantendo apenas genes que tivessem pelo menos 10 *counts* para pelo menos metade das amostras. A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando a biblioteca DESeq2 e foi

aplicado o teste estatístico de Wald, testando para grupos graves e leves e utilizando sexo como covariável (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Estatisticamente, foram considerados diferencialmente expressos os genes que obtiveram um significado estatístico (p-valor), corrigido por múltiplos testes, inferior a 0.1 (10%).

3.10.2. Análise de variantes exônicas no gene *Hspg2*

Os arquivos BAM provenientes do alinhamento também foram utilizados para a busca de variantes no gene *Hspg2*. Para isso, os arquivos BAM foram ordenados de acordo com as coordenadas genômicas utilizando a função *Samtools* e arquivos *mpileup*, necessários para a chamada de variantes, foram criados utilizando também a função *Samtools*. A chamada de variantes foi feita utilizando a função VarScan (KOBOLDT et al., 2012) para regiões genômicas com ao menos 10 reads alinhados. Foram criados arquivos VCFs (*Variant Call Format*) incluindo SNPS, deleções e inserções. Esses arquivos foram transformados em tabelas utilizando-se a função GATK (MCKENNA et al., 2010). As tabelas foram transferidas para o ambiente R, no qual foram filtradas a partir da região genômica do gene *Hspg2*, no cromossomo 1 para a análise de variantes.

Os detalhamentos dos códigos utilizados para a análise de expressão gênica diferencial e chamada de variantes encontram-se no Apêndice A.

3.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas para os experimentos de qPCR foram realizadas utilizando testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. Os testes que obtiveram um nível de significância inferior a 0.05 foram considerados estatisticamente significativos e rejeitaram a hipótese nula. Todos os gráficos e testes estatísticos foram realizados no ambiente R. As comparações nas quais foi possível observar diferença estatística significativa estão evidenciadas nos gráficos por barras indicando cada valor de p.

Os valores de expressão gênica foram representados graficamente por meio de *boxplots* (diagramas de caixa), os quais evidenciam a mediana dos valores, os quartis e os valores discrepantes de cada grupo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Geração e genotipagem da linhagem F2 B6/129

Os animais foram genotipados por meio de PCR para os alelos selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$ do gene *Fbn1*, como exemplificado na figura 13. No total, foram utilizados 75 animais da linhagem F2 B6/129, sendo que 23 foram de genótipo selvagem (11 machos e 12 fêmeas) e 52 foram do genótipo $mg\Delta^{loxPneo}$ (34 machos e 18 fêmeas).

Figura 13. Genotipagem da linhagem F2 B6/129. Análise em gel de agarose ilustrando a genotipagem dos camundongos F2 B6/129, amostras 32 a 34. A) Gel correspondente à amplificação do alelo *Fbn1* selvagem mostrando a presença da banda esperada de 600 pb em todas as amostras analisadas; B) Gel correspondente à amplificação de Neo (433pb), revelando a presença de 1 animal da linhagem $mg\Delta^{loxPneo}$ (Amostra 33). CTRL -: controle negativo. CTRL+: controle positivo. Marcador = 1kb plus (Thermofisher).

4.2. Fenotipagem dos animais da linhagem F2 B6/129

4.2.1. Fenótipo esquelético

Os animais foram fenotipados aos 3 meses de idade pela obtenção de imagens de raio-x e subsequente cálculo do KI.

Como já esperado, a análise do KI mostrou que os animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ apresentaram um fenótipo mais grave (menor valor de KI) quando comparados aos F2 B6/129 selvagens (média $mg\Delta^{loxPneo}$ 3.9 e desvio padrão 0.52,

média selvagens 5 e desvio padrão 0.64) (Figura 14A). Quando separados por sexo, observamos tanto para machos quanto para fêmeas que animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ possuem menores valores de KI quando comparados a animais F2 B6/129 selvagens (Figura 14B). Além disso, foi observado que os animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ apresentaram uma distribuição de valores de KI variando de 3.1 a 5.2, demonstrando a variabilidade fenotípica já descrita. As fêmeas apresentaram valor mínimo de 3.1 e valor máximo de 4.4. Os machos, apresentaram valor mínimo de 3.1 e máximo de 5.2 (Figura 15).

Figura 14. Gráfico do KI da linhagem F2 B6/129. Medida do KI dos grupos F2 B6/129 selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$. Animais de 3 meses foram utilizados para obtenção de imagens de raio-x para análise do grau de cifose. (A) Animais $mg\Delta^{loxPneo}$ (n = 51) versus animais selvagens (n = 19). Animais $mg\Delta^{loxPneo}$ apresentaram fenótipo mais grave quando comparados aos grupos selvagens. *P-valor = 6.6×10^{-8} . (B) Animais $mg\Delta^{loxPneo}$ (n fêmeas = 19 e n machos = 32) versus animais selvagens (n fêmeas = 7 e n machos = 12) separados por sexo, evidenciando que tanto para machos quanto para fêmeas, os animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ tem menor valor de KI do que os animais F2 B6/129 selvagens. *P-valor fêmeas = 3×10^{-6} . P-valor machos = 6.7×10^{-5} .

Figura 15. Histograma da distribuição do KI de animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Distribuição das frequências do KI do grupo F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$, evidenciando os valores extremos para o fenótipo esquelético. Tanto para machos quanto para fêmeas, os valores variam de 3 a 5, sendo que é possível observar maior frequência de valores próximos a 3.5 para as fêmeas e 4 para os machos.

A partir desses resultados, foram selecionados 5 fêmeas e 5 machos com os menores valores de KI para comporem o grupo grave para o fenótipo esquelético (média KI 3.3, desvio padrão 0.14). Também foram selecionados 5 fêmeas e 5 machos com os maiores valores de KI para comporem o grupo leve para o fenótipo esquelético (média KI 4.6, desvio padrão 0.46).

4.2.2. Fenótipo vascular

A primeira análise realizada nas aortas dos animais F2 B6/129 foi a verificação da presença ou ausência de aneurismas (Figura 16). Na região da aorta analisada, foi possível encontrar aneurismas em 8 animais do grupo mg $\Delta^{loxPneo}$ dos 72 analisados no total (selvagens e mg $\Delta^{loxPneo}$). Os aneurismas foram identificados a partir de dilatações e/ou rupturas na parede da aorta, como observado na figura 16C. Os

animais nos quais estes eventos foram encontrados, foram considerados de fenótipo grave e classificados como $mg\Delta^{loxPneo}$ com aneurisma ($mg\Delta^{loxPneo_A}$).

Figura 16. Fotomicrografias de cortes transversal da aorta da linhagem F2 B6/129. Fotomicrografias de cortes transversais de aortas coradas com Azul de Toluidina obtidas sob microscópio óptico no aumento de 100x. A) camundongo F2 B6/129 selvagem, B) camundongo F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ sem aneurisma e C) camundongo F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ com aneurisma ($mg\Delta^{loxPneo_A}$) (seta).

As fotomicrografias da aorta foram utilizadas para a obtenção de medidas da espessura das túnicas média e adventícia, quantidade de CMLV e cálculo do índice de integridade de fibras elásticas. Com forma de unir todas as análises realizadas nas seções histológicas da aorta foi feita uma análise de componente principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), utilizando como variáveis a média por animal de cada uma das medidas realizadas. Além disso, os animais foram rotulados de acordo com o genótipo (selvagem ou $mg\Delta^{loxPneo}$) e, caso o animal $mg\Delta^{loxPneo}$ apresentasse aneurisma, foi rotulado como $mg\Delta^{loxPneo_A}$. O objetivo da PCA foi verificar se os animais $mg\Delta^{loxPneo_A}$ compartilhariam um conjunto de características específicas e se haveriam animais $mg\Delta^{loxPneo}$ que agrupariam junto ao grupo, já sabidamente grave, $mg\Delta^{loxPneo_A}$. Assim, seriam selecionados os animais graves. Já, os animais que agrupassem com o grupo selvagem, seriam considerados leves.

A partir dessa análise foi verificada uma grande variabilidade dos 3 grupos analisados (Figura 17) e não foi possível verificar separação dos grupos. Porém foi verificado que o parâmetro integridade de fibras elásticas teve mais influência na separação dos grupos selvagens e $mg\Delta^{loxPneo}$, indicando que essa característica seria a mais adequada na definição da doença. Sendo assim, foram obtidos os valores de distribuição da integridade de fibras elásticas para os animais $mg\Delta^{loxPneo}$ (primeiro quartil, segundo quartil, mediana, terceiro quartil e quarto quartil). A partir daí, foram selecionados como graves fêmeas e machos da linhagem $mg\Delta^{loxPneo}$ com integridade de fibras elásticas menor do que o segundo quartil da distribuição. Já, como leves, foram selecionados fêmeas e machos da linhagem $mg\Delta^{loxPneo}$ com integridade de fibras elásticas maior do que o terceiro quartil da distribuição.

Figura 17. Gráfico da PCA para as medidas do fenótipo vascular da linhagem F2 B6/129. Distribuição das amostras analisadas nas componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) (A), PC1 e componente principal 3 (PC3) (B), e PC2 e PC3 (C). O gráfico demonstra o agrupamento dos animais da linhagem F2 B6/129 para os parâmetros cardiovasculares analisados. Integridade_FE = medida de integridade de fibras elásticas. Espessura_TA = medida da espessura da túnica adventícia. Quantidade_CMLV = medida da quantidade de células da musculatura lisa vascular. Espessura_TM = medida da espessura da túnica média. Selvagens: n fêmeas = 7; n machos = 11. $Mg\Delta^{loxPneo}$: n fêmeas = 18; n machos = 25. $Mg\Delta^{loxPneo_A}$: n fêmeas = 2; n machos = 6.

A componente principal 1 (PC1) do modelo conteve 51,5% da variação das amostras, enquanto a componente principal 2 (PC2) conteve 34,2% e a componente principal 3 (PC3), cerca de 12%. O objetivo dessa análise foi verificar se haveria separação dos grupos $mg\Delta^{loxPneo}$ e $mg\Delta^{loxPneo_A}$ e, principalmente, se haveriam alguns animais $mg\Delta^{loxPneo}$ nos quais não encontramos aneurismas, que se agrupassem com os animais com aneurisma, se encaixando, assim, em um grupo de

alto risco (grave). Da mesma forma, era esperado que alguns animais $mg\Delta^{loxPneo}$ aproximassem-se dos animais do grupo selvagem, o que os classificaria como leves. No entanto, não foi possível verificar separação dos grupos como esperávamos devido à alta variação intra-grupo, em especial no grupo $mg\Delta^{loxPneo}_A$.

A partir dessa análise, foi possível verificar que as variáveis *espessura_TM* e *espessura_TA* são extremamente correlacionadas, enquanto as variáveis *quantidade_CMLV* e *integridade_FE* são opostas, indicando que os animais que possuem baixa integridade de fibras elásticas, em geral possuem maior quantidade de CMLV, sugerindo um mecanismo de adaptação vascular. Foi possível observar também que, apesar da grande variabilidade, os animais $mg\Delta^{loxPneo}_A$, com exceção do animal 556, tendem a apresentar maiores valores de *espessura_TM* e *espessura_TA*, e menores valores de *integridade_FE*. Além disso, o parâmetro integridade de fibras elásticas apresentou-se como o principal fator na separação dos grupos selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$, indicando que essa característica seria a mais adequada na definição da doença (Figuras 17 e 18).

Já que a PCA não se mostrou adequada para a separação de animais graves e leves, optamos por utilizar a integridade de fibras elásticas como variável principal para a separação dos grupos. Sendo assim, foram selecionados como graves animais $mg\Delta^{loxPneo}$ cuja integridade de fibras elásticas fosse menor que o primeiro quartil da distribuição (Fêmeas < 0.56 e machos < 0.61), totalizando 4 fêmeas e 5 machos. Selecionamos como leves aqueles cuja integridade fosse maior que o terceiro quartil da distribuição (Fêmeas > 0.63 e machos > 0.68), totalizando 4 fêmeas e 5 machos. Além disso, mantivemos todos os animais nos quais foram encontrados aneurismas na análise histológica no grupo separado $mg\Delta^{loxPneo}_A$. Os animais selecionados como graves e leves para o fenótipo vascular não foram os mesmos selecionados como graves e leves para o fenótipo esquelético, sugerindo independência dos sistemas, como já observado em FERNANDES et al., 2016.

Figura 18. Gráfico para valores de integridade de fibras elásticas da linhagem F2 B6/129. Valores de integridade de fibras elásticas (Índice integridade_FE) entre os animais dos grupos selvagem, $mg^{\Delta loxPneo}$ e $mg^{\Delta loxPneo_A}$. A) Valores de integridade para todos os animais, evidenciando a variação entre os valores de integridade intra-grupo e a tendência de animais $mg^{\Delta loxPneo}$ e $mg^{\Delta loxPneo_A}$ possuírem valores de integridade menor do que o grupo selvagem. B) Valores de integridade separados por sexo.

4.3. Quantificação da expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1*

4.3.1. Fenótipo esquelético

Dado que nossa hipótese é que variantes genéticas entre as linhagens B6 e 129 induzem expressão gênica diferencial entre essas duas linhagens, o primeiro passo foi verificar se já haveria alguma diferença de expressão para o gene *Hspg2* e *Fbn1* intrínseca entre as linhagens isogênicas selvagens. Sendo assim, utilizamos fêmures de 5 fêmeas e 5 machos de cada linhagem para comparar a expressão destes genes. No entanto, não foi possível observar diferença significativa de expressão de *Hspg2* e *Fbn1* (Figura 19 e 20).

Figura 19. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagens. Expressão de *Fbn1* no fêmur das linhagens 129 e B6 selvagens. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6, evidenciando alta variação de expressão intra-linhagem. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo, mostrando que a variação na expressão é, em grande parte, causada pela expressão diferencial entre fêmeas e machos. Mesmo após a separação por sexo não foi possível identificar expressão diferencial significativa entre as linhagens.

Figura 20. Gráfico de expressão do gene *Hspg2* no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagens. Expressão de *Hspg2* no fêmur das linhagens 129 e B6 selvagens. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo, evidenciando a variação por sexo. Não foi possível identificar expressão diferencial significativa entre as linhagens.

Dada a ausência de expressão diferencial em animais selvagens das linhagens 129 e B6, verificamos se haveria diferença de expressão entre as linhagens 129 e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$. Para isso, analisamos fêmures de 5 machos e 5 fêmeas de cada linhagem. Para o gene *Fbn1*, não foi possível observar diferença de expressão entre as linhagens e foi possível observar grande variação, principalmente entre animais da linhagem 129 (Figura 21). Para o gene *Hspg2*, também não foi possível observar diferença ao analisarmos animais de ambos sexos juntamente, mas pudemos observar que as fêmeas 129 expressam de 1 a 2 vezes mais este gene quando comparadas às fêmeas da linhagem B6, mesmo levando em conta a grande variação dos animais 129 (Figura 22). A expressão diferencial do *Hspg2* entre fêmeas das linhagens 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ pode influenciar na variabilidade do fenótipo da SMF nestes animais, fortalecendo a hipótese de que este gene pode atuar como modificador.

Além disso, ao fazermos a comparação de todos os animais (129 e B6, de genótipos selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$) verificamos que fêmeas 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ expressam maiores níveis de *Hspg2* quando comparadas a fêmeas 129 selvagens (Figura 23). Este fato, somado à ausência de expressão diferencial entre linhagens isogênicas selvagens, sugere um mecanismo compensatório de *Hspg2* frente a mutação no gene *Fbn1*. Este mecanismo sugerido aparenta ser exclusivo da linhagem 129 $mg\Delta^{loxPneo}$, já que não é observada diferença de expressão entre animais B6 selvagens e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$, nem mesmo ao separarmos por sexo.

Figura 21. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* no fêmur de animais das linhagens isogênicas $mg\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Fbn1* no fêmur das linhagens 129 e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6, evidenciando alta variação de expressão intra-linhagem. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo, mostrando que a variação na expressão é, em grande parte, causada pela expressão diferencial entre fêmeas e machos. Mesmo após a separação por sexo não foi possível identificar expressão diferencial significativa entre as linhagens.

Figura 22. Gráfico de expressão do gene *Hspg2* no fêmur de animais das linhagens isogênicas $mg\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Hspg2* no fêmur das linhagens 129 e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6, evidenciando alta variação de expressão principalmente da linhagem 129. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo, evidenciando que fêmeas 129 apresentam expressão maior em comparação a fêmeas da linhagem B6 (p-valor = 0.01).

Figura 23. Gráfico de expressão do gene *Hspg2* no fêmur de animais das linhagens isogênicas selvagem e $mg\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Hspg2* no fêmur das linhagens 129 selvagem, B6 selvagem, 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ separados por sexo. É possível observar que fêmeas da linhagem 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ expressam cerca de 2x mais *Hspg2* do que fêmeas da linhagem 129 selvagem (p-valor = 0.016). Também observamos que fêmeas da linhagem 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ expressam maiores níveis do gene quando comparadas a fêmeas C56BL/6 (p-valor = 0.008), como já observado na figura 21.

Tendo em vista a função conjunta dos genes *Fbn1* e *Hspg2* na manutenção da MEC e a colocação de ambos no disco intervertebral (HAYES; SMITH; MELROSE, [s.d.]) a expressão correlacionada desses dois genes pode dar indícios de co-função no tecido ósseo e esquelético. Testamos a correlação da expressão de *Fbn1* e *Hspg2* nos fêmures dos animais 129 e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ e observamos uma correlação de aproximadamente 0.9. (Figura 24).

Figura 24. Gráfico correlacionando a expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1* no fêmur de animais das linhagens isogênicas *mgΔ^{loxPneo}*. Expressão de *Hspg2* e *Fbn1* no fêmur das linhagens 129 e B6 *mgΔ^{loxPneo}*, indicando a correlação entre a expressão destes genes (Correlação de Pearson, $r^2=0.87$ e p-valor = 2×10^{-7}).

Para as comparações descritas acima, o tecido utilizado para extração de RNA e cálculo do nível de expressão gênica foram fêmures, visto que esse era o tecido disponível. No entanto, para a comparação de expressão gênica entre animais da linhagem F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}* graves e leves para o fenótipo esquelético, foram utilizados fragmentos de coluna. Ao comparar a expressão do gene *Fbn1* na coluna entre animais graves e leves, não foi possível observar diferença de expressão entre os grupos, mesmo quando separando os animais por sexo (Figura 25). Já, para o gene *Hspg2*, observamos que os animais leves expressam cerca de 2x mais este gene do que os animais graves (Figura 26), sugerindo que esse gene pode estar relacionado com a variabilidade fenotípica do fenótipo esquelético. No entanto, ao separarmos os animais por sexo, não vemos diferença de expressão de *Hspg2*, provavelmente devido ao baixo número amostral e a alta variação.

Figura 25. Gráfico da expressão do gene *Fbn1* na coluna de animais F2 F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Fbn1* em fragmentos de coluna dos grupos grave e leve para o fenótipo esquelético da linhagem F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. A) Todos os animais dos grupos grave e leve. Apesar dos animais do grupo leve aparentarem ter maior expressão do gene *Fbn1*, não existe diferença estatística significativa. B) Animais dos grupos grave e leve separados por sexo.

Figura 26. Gráfico da expressão do gene *Hspg2* na coluna de animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Hspg2* em fragmentos de coluna dos grupos grave e leve para o fenótipo esquelético da linhagem F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. A) Todos os animais dos grupos grave e leve, mostrando que animais do grupo leve expressam cerca de 2x mais *Hspg2* que animais do grupo grave. B) Animais dos grupos grave e leve separados por sexo, cuja expressão não é estatisticamente diferente.

Mesmo não havendo diferença significativa de expressão do gene *Fbn1* entre os animais graves e leves, vemos que a correlação positiva entre a expressão de *Fbn1* e *Hspg2* continua alta e ainda mais próxima de 1 ($r^2 = 0.91$) do que a correlação de animais 129 e B6 mg $\Delta^{loxPneo}$ observada nos fêmures (Figura 27).

Figura 27. Gráfico correlacionando a expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1* na coluna de animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Hspg2* e *Fbn1* em fragmentos de coluna de animais graves e leves para o fenótipo esquelético da linhagem F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$, indicando a correlação positiva entre a expressão destes genes (Correlação de Pearson, $r^2=0.91$ e p-valor = 1.89×10^{-8}).

4.3.2. Fenótipo vascular

Realizamos as mesmas análises para o fenótipo vascular. Primeiramente, buscamos por diferenças entre as linhagens selvagens 129 e B6, tanto para o gene *Hspg2* quanto para *Fbn1* e, para isso, utilizamos RNA de aortas de 4 machos e 4 fêmeas da linhagem 129 (devido a baixa quantidade de RNA isolado para 2 animais dos 10 eutanasiados) e 5 machos e 5 fêmeas da linhagem B6. Não foi possível observar diferenças significativas entre as linhagens para o gene *Fbn1*, nem mesmo separando os animais por sexo (Figura 28), evidenciando que a expressão não apresenta um efeito de sexo tão expressivo. Já, para o gene *Hspg2*, observamos que, ao separar os animais por sexo, as fêmeas da linhagem B6 apresentam, em geral, maior expressão deste gene, mesmo com alta variação (Figura 29).

Figura 28. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* na aorta de animais das linhagens isogênicas selvagens. Expressão de *Fbn1* na aorta das linhagens 129 e B6 selvagens. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo. Não foi possível identificar expressão diferencial significativa entre as linhagens.

Figura 29. Gráfico de expressão do gene *Hspg2* na aorta de animais das linhagens isogênicas selvagens. Expressão do *Hspg2* na aorta das linhagens 129 e B6 selvagens. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6. B) Animais das linhagens 129 e B6 separados por sexo, evidenciando a variação por sexo e que fêmeas da linhagem 129 expressam menores níveis de *Hspg2* quando comparadas a fêmeas B6 (p-valor = 0.022).

Prosseguimos para a comparação dos valores de expressão gênica para animais das linhagens 129 e B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$. Para tal, utilizamos 5 machos e 5 fêmeas de cada linhagem. Não foi possível observar diferença de expressão de *Fbn1* entre as linhagens, nem mesmo quando separados por sexo (Figura 30). Porém foi possível observar que fêmeas 129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ parecem expressar maiores valores de *Hspg2* na aorta quando comparadas a fêmeas da linhagem B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ (Figura 31). Esse resultado não coincide com o encontrado nas aortas de fêmeas 129 selvagens, as quais possuem menor expressão se comparadas a fêmeas B6 selvagens. Além disso, não é possível inferir um mecanismo de compensação frente a mutação do gene *Fbn1*, porque não vemos diferença entre a expressão de *Hspg2* na comparação fêmeas 129 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ e 129 selvagens (Figura 32). Observamos apenas que fêmeas B6 selvagens expressam mais *Hspg2* tanto quando comparadas a animais 129 selvagens, quanto a B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$.

Figura 30. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* na aorta de animais das linhagens isogênicas $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$. Expressão de *Fbn1* na aorta das linhagens 129 e B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$. A) Todos os animais das linhagens 129 e B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$. B) Animais das linhagens 129 e B6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ separados por sexo. Não foi possível encontrar diferença estatística significativa entre as linhagens.

Realizamos também o teste de correlação entre a expressão de *Fbn1* e *Hspg2* na aorta destes animais e, assim como no fêmur, verificamos correlação positiva ($r^2 = 0.7$) entre a expressão destes dois genes (Figura 33), sugerindo que, como no fêmur e coluna, esses genes podem apresentar co-função na manutenção do tecido vascular.

Figura 33. Gráfico correlacionando a expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1* na aorta de animais das linhagens isogênicas mgΔ^{loxPneo}. Expressão do gene *Hspg2* e *Fbn1* na aorta das linhagens 129 e B6 mgΔ^{loxPneo}, indicando a correlação entre a expressão destes genes (Correlação de Pearson, $r^2=0.7$ e p-valor = 2.8×10^{-4}).

Foi possível verificar que existe expressão diferencial do *Hspg2* na aorta de fêmeas das linhagens 129 e B6 selvagens, e 129 e B6 mgΔ^{loxPneo}. O próximo passo foi verificar se haveria expressão diferencial entre animais F2 B6/129 mgΔ^{loxPneo} graves e leves para o fenótipo vascular. Para isso, testamos a expressão diferencial de *Fbn1* e *Hspg2* para os grupos descritos no item 4.2.2. Utilizamos 4 fêmeas e 5 machos classificados como graves para o fenótipo vascular e 4 fêmeas e 5 machos classificados como leves. Em adição, mantivemos em um grupo separado todos os animais nos quais foi observada presença de aneurismas pela análise histológica (mgΔ^{loxPneo}_A).

Ao analisarmos a expressão do gene *Fbn1*, não encontramos diferença significativa entre nenhum dos grupos, sendo que os animais do grupo leve

apresentaram uma grande variação (Figura 34). A expressão diferencial significativa não foi observada, nem mesmo separando os animais por sexo. Já, para o gene *Hspg2*, observamos que existe uma relação significativa entre a expressão do gene e o grupo ao qual os animais pertencem (Kruskal-Wallis, p-valor = 0.024). Verificamos que animais nos quais encontramos aneurisma ($mg\Delta^{loxPneo_A}$) expressam menos *Hspg2* (média = 0.4) do que comparado aos animais leves (média = 0.63). Da mesma forma que animais graves também expressam menos (média = 0.43) do que os animais leves. Já, ao compararmos os grupos $mg\Delta^{loxPneo_A}$ e graves, não observamos diferença significativa. Nós também não observamos diferença significativa entre os grupos quando separamos os animais pelo sexo, muito provavelmente devido à grande variação, principalmente, dos animais do grupo leve (Figura 35).

Figura 34. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* na aorta de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. Expressão de *Fbn1* na aorta de animais da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$, comparando os grupos $mg\Delta^{loxPneo_A}$, $mg\Delta^{loxPneo}$ leve e $mg\Delta^{loxPneo}$ grave para o fenótipo vascular. A) Todos os animais da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. B) Animais da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ separados por sexo. Não foi possível observar diferença significativa entre nenhum dos grupos.

Figura 35. Gráfico de expressão do gene *Hspg2* na aorta de animais F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}*. Expressão de *Hspg2* na aorta de animais da linhagem F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}*, comparando os grupos *mgΔ^{loxPneo}_A*, *mgΔ^{loxPneo}* leve e *mgΔ^{loxPneo}* grave para o fenótipo vascular. A) Todos os animais da linhagem F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}*, evidenciando que animais leves expressam maiores quantidades do gene *Hspg2* quando comparados a animais do grupo *mgΔ^{loxPneo}_A* (p-valor = 0.016) e a animais do grupo grave (p-valor = 0.031). B) Animais da linhagem F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}* separados por sexo, mostrando que não foi possível observar diferença significativa entre nenhum dos grupos.

Figura 36. Gráfico correlacionando a expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1* na aorta de animais F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}*. Expressão de *Hspg2* e *Fbn1* na aorta de animais graves e leves da linhagem F2 B6/129 *mgΔ^{loxPneo}*, indicando a correlação entre a expressão destes genes (Correlação de Pearson, $r^2=0.66$ e $p\text{-valor} = 6.4 \times 10^{-4}$).

A partir destes resultados podemos verificar que existe grande variação entre os valores de expressão gênica para o fêmur, coluna e aortas dos camundongos, mesmo dentro de cada grupo das linhagens isogênicas, como 129 e B6 selvagens e 129 e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$. Esse fato reduz o poder do teste estatístico de detectar diferenças significativas de expressão, principalmente, utilizando 5 machos e 5 fêmeas de cada uma das linhagens teste.

Mesmo assim, foi possível observar diferença de expressão de *Hspg2* nas linhagens 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ para a análise dos fêmures, sendo que as fêmeas da linhagem 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ demonstram maior expressão de *Hspg2* do que fêmeas 129 selvagens, o que leva à sugestão de modulação da expressão deste gene, frente a mutação em *Fbn1*. Para a análise das aortas, foi encontrada diferença tanto para as linhagens isogênicas, quanto para as linhagens $mg\Delta^{loxPneo}$ 129 e B6. Curiosamente, essas diferenças entre linhagens só foram observadas entre as fêmeas, tanto nos fêmures, quanto nas aortas, possivelmente devido à maior variação intra-linhagem encontrada nos machos. Este resultado ressalta a importância de análises que levam em conta o sexo, principalmente devido à já sabida diferença nos metabolismos ósseo e vascular de fêmeas e machos, bem como diferenças na susceptibilidade a doenças de cada sexo (BOESE et al., 2017; SEEMAN, 2001). Outros fatores que revelam a importância do sexo no estudo da variabilidade fenotípica em camundongos $mg\Delta^{loxPneo}$ decorrem de achados do nosso grupo. No estudo de ligação realizado por Fernandes e colaboradores (2016) foi encontrado QTL sugestivo na região do cromossomo X para modulação do fenótipo esquelético (FERNANDES; MASSIRONI; PEREIRA, 2016). Além disso, foi verificado em camundongos machos B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ uma pior qualidade do osso trabecular em relação a animais B6 selvagens, o que não foi observado em fêmeas, ressaltando a relevância dos sexos ao estudar este modelo (KAWAHARA et al., em fase de elaboração).

Ao comparar o fenótipo esquelético de animais graves e leves da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$, verificamos que animais com fenótipos mais brandos expressam maiores quantidades do gene *Hspg2*, o que sugere a relação deste gene com a variabilidade do fenótipo da hipercifose nestes. No entanto, não é possível saber se a expressão reduzida de *Hspg2* é causa ou consequência dos fenótipos esqueléticos

mais graves da doença e mais estudos são necessários para investigar se *Hspg2* tem ou não um papel protetor do fenótipo esquelético neste modelo.

Observamos uma relação significativa dos níveis de expressão do gene *Hspg2* também com o fenótipo vascular, de forma que animais que consideramos graves ou nos quais encontramos aneurismas expressam menor quantidade do gene quando comparados a animais que consideramos leves. Já que a classificação de graves e leves para o fenótipo vascular foi baseada na integridade de fibras elásticas, pode-se concluir que a expressão de *Hspg2* tem relação com o nível de integridade de fibras elásticas nesses animais. Esse achado destaca o papel do *Hspg2* na manutenção das fibras elásticas e, principalmente, na associação do perlecan com a fibrilina-1. Esses resultados são sustentados por achados que descrevem a co-localização tanto de perlecan e fibrilina-1, quanto de perlecan e elastina na coluna espinhal fetal e vasos paraespinais de humanos (HAYES et al., 2011; HAYES; SMITH; MELROSE, 2013), sugerindo que perlecan desempenha um papel, juntamente com a fibrilina-1, na integridade das fibras elásticas das aortas.

A relação de fibrilina-1 e perlecan recebe ainda mais destaque ao analisarmos os valores de correlação entre as expressões de *Fbn1* e *Hspg2*, tanto nos fêmures e coluna, quanto nas aortas. Expressão gênica correlacionada é sugestivo de funções biológicas em comum, as quais, muitas vezes são controladas pelo mesmo sistema regulatório (DÉ RIC REYNIER et al., 2011; EISEN et al., 1998). Mesmo não observando diferenças de expressão do gene *Fbn1* em nenhuma das comparações, foi possível observar, em todos os tecidos analisados, alta correlação positiva entre a expressão destes genes, sugerindo o papel colaborativo de perlecan e fibrilina-1 na regulação da MEC em tecidos ósseos/osteoarticulares e vasculares.

Outro resultado interessante dessa análise aparece quando levamos em conta o papel do gene *Hspg2* na regulação do estado contrátil *versus* proliferativo de CMLV. Como foi possível observar na PCA (Figura 17), na quantificação dos fenótipos da aorta dos animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$, as variáveis índice de integridade de fibras elásticas e quantidade de CMLV aparecem relativamente opostas, de forma que, animais com maior índice de integridade de fibras elásticas tendem a possuir menos CMLV e vice-versa. Sabendo do papel de perlecan na inibição da proliferação das CMLV (KINSELLA et al., 2003; WEISER et al., 1996) e o fato de animais com menores

índices de integridade de fibras elásticas (Leves e $mg\Delta^{loxPneo_A}$) possuem expressão reduzida do gene *Hspg2*, levanta-se a hipótese de que a expressão reduzida do gene nestes animais pode ter relação com o mecanismo adaptativo tecidual de aumento de proliferação das CMLV em resposta à degradação das fibras.

4.4. RNA-seq

4.4.1. Análise de expressão gênica diferencial

Fragmentos de colunas de 5 machos e 5 fêmeas de cada um dos grupos grave (menor valor de KI) e leve (maior valor de KI) foram utilizados para sequenciamento dos transcritos. Cerca de 85% dos *reads* de cada uma das amostras alinharam contra o transcriptoma 129/B6. Esses *reads* foram, então, utilizados para geração de *counts* e análise de expressão gênica diferencial. A matriz de *counts* foi importada para o ambiente R e foi utilizada a PCA para observar a variação das amostras. Esse tipo de análise teve o intuito de observar possíveis efeitos de leva (*batch effects*) que podem induzir o agrupamento de amostras sem explicação biológica, ou seja, semelhança ou discrepância entre amostras causada apenas por fatores aleatórios experimentais. Além disso, essa análise também pode ser utilizada para observar agrupamentos com explicação biológica, ou seja, se animais de cada um dos grupos (graves e leves) distribuem-se com um padrão semelhante.

Com o intuito de mostrar a maior variação possível entre as amostras, o valor de cada componente principal foi calculado utilizando *counts* normalizados dos 500 genes de maior variação, para cada amostra. O gráfico foi desenhado utilizando apenas as componentes 1 e 2 para cada animal, pois explicam grande parte da variação entre as amostras (58%). Não foi possível observar nenhum efeito experimental, mas foi observada grande variação entre as amostras, especialmente intra-grupo, não havendo nenhum padrão de distribuição entre animais graves e leves (Figura 37).

Figura 37. Gráfico da PCA dos valores de expressão gênica da coluna de animais F2 B6/129 mg $\Delta^{loxPneo}$. Valores das componentes 1 (PC1) e 2 (PC2), explicando cerca de 38% e 20% da variância amostral, respectivamente. As componentes foram construídas utilizando os valores de expressão dos 500 genes de maior variação amostral. A partir destes gráficos é possível observar grande variância intra-grupo e ausência de agrupamento esperado entre: fêmeas graves, machos graves, fêmeas leves e machos leves.

As tabelas para a análise de expressão gênica diferencial foram geradas e foram plotados histogramas para análise dos p-valores do teste estatístico para a comparação entre grupos graves e leves. A análise do histograma mostrou alta frequência de p-valores próximos a 1, o que evidencia uma baixa frequência/ausência de p-valores que atingem o nível de significância estatístico esperado (Figura 38). A tabela de resultados do teste foi filtrada mantendo apenas genes cujo p-valor ajustado para múltiplos testes foi menor ou igual a 0.1, mas nenhum gene atingiu este nível de significância.

Figura 38. Histograma de p-valores da análise de expressão gênica diferencial. P-valores para o teste estatístico de expressão gênica diferencial entre grupos, evidenciando o formato aproximadamente uniforme da curva. Esse gráfico mostra uma baixa frequência de p-valores significativos (próximos de 0) e uma maior frequência de p-valores próximos a 1, sugerindo a ausência de genes que estatisticamente diferem entre os grupos analisados.

A falta de genes significativamente expressos de forma diferencial entre os grupos graves e leves pode se dever ao fato de que o número amostral foi pequeno (5 machos e 5 fêmeas de cada grupo), principalmente levando em conta que estes animais são animais provenientes de um fundo genético misto e assim, com maior variação na expressão gênica. Outro fator a se levar em conta foi a utilização de fragmentos de coluna para o experimento de RNA-seq, os quais são constituídos de uma grande variedade de tipos celulares (tecido cartilágneo, ósseo e medula óssea). Isso pode aumentar ainda mais a variação na expressão gênica, o que reduz o poder dos testes estatísticos de detectarem genes cuja expressão difere entre os grupos.

4.4.2. Análise de variantes exônicas no gene *Hspg2*

Os dados de sequenciamento foram utilizados também para procurar por variantes exônicas no gene *Hspg2*, com o intuito de verificar se os animais utilizados

neste trabalho conteriam alguma variante que explicasse diferenças de expressão gênica entre as linhagens.

Os arquivos VCF foram analisados e a região correspondente à região do gene *Hspg2* foi filtrada, mas nenhuma variante foi encontrada na região do gene.

Fizemos, ainda, uma análise no banco de dados (*Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory*), buscando por SNPs nas regiões intrônicas e exônicas do gene *Hspg2* já catalogados entre as linhagens B6 e 129, porém nenhum SNP foi encontrado.

Sendo assim, não encontramos fatos suficientes que corroborem a hipótese de que a expressão diferencial de *Hspg2* observada entre fêmeas 129 e B6 selvagens e da linhagem $mg\Delta^{loxPneo}$, descrita no item 4.3, é causada por variantes genéticas. Isto não exclui a possibilidade de que possam existir variantes intrônicas e/ou em regiões regulatórias nos animais utilizados neste trabalho, que não estão descritas nos bancos de dados e que não aparecem nos dados de RNA-seq. Esse fato é corroborado pela existência de desvios genéticos em populações de camundongos mantidas em inter-cruzamento por longos períodos (revisado por BREKKE; STEELE; MULLEY, 2018). Mutações espontâneas silenciosas podem surgir em regiões não codificantes do genoma, as quais causam alterações sutis na expressão gênica de um ou mais genes, cujos efeitos podem só aparecer em associação com mutações mais graves, como as em *Fbn1* (revisado por SOLOVIEFF et al., 2013). Além disso, a expressão diferencial do gene pode se mostrar como resultado das diferenças fenotípicas observadas entre animais 129 $mg\Delta^{loxPneo}$ e B6 $mg\Delta^{loxPneo}$ e não como causa, sendo provocada por efeitos epigenéticos, por exemplo.

4.5. Geração da linhagem duplo-heterozigota *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/ $mg\Delta^{loxPneo}$)

Com o objetivo de testar a hipótese de que o *Hspg2* pode atuar como um gene modificador do fenótipo, utilizamos uma linhagem de camundongo doada, na qual um dos alelos do gene é modificado pela inserção de sequências LoxP. A inserção de sequências LoxP flanqueando o exon 6 permite a deleção deste exon pelo sistema LoxP/Cre-Recombinase. Esta deleção gera uma alteração no quadro de leitura do

gene e posterior decaimento do RNA mensageiro, levando à não produção de proteína pelo alelo mutado. Essa mutação em homozigose é letal, mas em heterozigose reduz pela metade a quantidade de perlecan depositada na matriz (COSTELL et al., 1999).

Camundongos heterozigotos para sequências LoxP flanqueando o exon 6 [*Hspg2* (+/Fl)] foram utilizados para geração de animais haploinsuficientes para o gene *Hspg2* [*Hspg2* (+/-)], para que estes possam, futuramente, ser utilizados no teste do efeito deste gene nos fenótipos de animais $mg\Delta^{loxPneo}$ (Figura 39).

Figura 39. Esquema do vetor utilizado para geração dos camundongos *Hspg2* (+/-). As letras indicam sítios de restrição para diferentes enzimas. B: sítios de restrição para enzima *Bam*H1; H: sítio de restrição para enzima *Hind*III. A figura evidencia que apenas o alelo mutado contém sítio de restrição para enzima *Eco*R1 (E) entre os exons 5 (E5) e 7 (E7) do gene. Os triângulos entre E5 e E6 e E6 e E7 representam as sequências LoxP. Adaptado de COSTELL et al., 1999.

4.5.1. Descongelamento e expansão de camundongos *Hspg2* (+/Fl)

Cerca de 12 embriões *Hspg2* (+/Fl) doados pelo Prof. Reinhard Fässler da Universidade de Lunn (Suécia) foram descongelados e transferidos para animais pseudoprenhas da linhagem B6. As 2 fêmeas nascidas foram cruzadas com machos da linhagem B6 para a expansão da linhagem e os filhotes heterozigotos para modificação do gene *Hspg2* foram identificados por PCR como descrito no item 3.2.2.1 (Figura 40).

Figura 40. Genotipagem de camundongos *Hspg2* (+/Fl). Análise em gel de agarose ilustrando a genotipagem dos camundongos *Hspg2* (+/Fl) de 1 a 4. Os animais com apenas uma banda no gel, são animais de genótipo *Hspg2* (+/+), os quais possuem apenas o alelo selvagem (321 pb). Já, os animais com duas bandas são animais correspondentes ao genótipo *Hspg2* (+/Fl) que possuem o alelo selvagem e o alelo modificado do gene *Hspg2* (~500pb) (Marcador = 1kb plus (Thermofisher)).

4.5.2 Confirmação da sequência dos alelos *Hspg2* selvagem e mutante

A presença das duas sequências LoxP entre os exons 5 e 7 em um dos alelos do gene *Hspg2*, foi confirmada por sequenciamento dos alelos selvagem [*Hspg2* (+)] e mutante [*Hspg2* (Fl)]. Primeiramente, foi feita a amplificação da região compreendendo os exons 5 a 7 do gene *Hspg2* de dois animais *Hspg2* (+/Fl). As bandas correspondentes a esses produtos foram purificadas do gel de agarose para posterior clonagem em plasmídeos pGEM®-T Easy e transformação de bactérias quimiocompetentes. As colônias positivas foram coletadas para expansão e extração do DNA plasmidial. Após a extração, esses plasmídeos foram submetidos a digestão pela enzima de restrição *EcoR*I para distinção de alelos selvagem e mutante, já que, apenas o alelo mutado possui sítio de restrição para a enzima *EcoR*I entre os exons 5 ao 7 (Figura 39).

Os plasmídeos pós-digestão foram avaliados em gel de eletroforese, no qual foi possível identificar 4 plasmídeos que incorporaram o alelo mutante e 5 que incorporaram o alelo selvagem (Figura 41).

Figura 41. Análise em gel de agarose de plasmídeos pós-digestão com *EcoR*I. Os poços 1, 3, 5 e 7 mostram apenas bandas de cerca de 3000pb, referente à linearização do vetor. Esses plasmídeos incorporaram o alelo selvagem do gene *Hspg2*. Já, os poços 2, 4, 6, 8, 9 e 10 mostram as bandas referentes ao vetor linearizado e 2 bandas de 100pb e 200pb, referente digestão pela enzima, característico de alelo mutante (Marcador = 1kb plus (Thermofisher)).

As amostras de DNA plasmidial que incorporaram os alelos *Hspg2* (Fl) e *Hspg2* (+) foram sequenciadas pelo método Sanger, e foi possível confirmar a presença de duas sequências LoxP nas amostras referentes ao alelo *Hspg2* Fl, uma entre os exons

5 e 6 do gene *Hspg2* e outra entre os exons 6 e 7 (Figura 42). A sequência total sequenciada entre os exons 5 e 7 do gene encontra-se no Anexo C.

Figura 42. Resultado do sequenciamento do alelo *Hspg2* (FI). Partes do resultado do sequenciamento Sanger do alelo mutante da região do exon 5 ao 7 do gene *Hspg2*. O sequenciamento foi feito utilizando-se 3 *primers* que se anelam ao exon 5, exon 7 e íntron 6-7. A partir desse resultado é possível observar a presença de uma sequência LoxP no íntron 5-6 e outra no íntron 6-7.

4.5.3. Geração e expansão dos camundongos *Hspg2* (+/-)

Após a confirmação da sequência do alelo mutante, os camundongos machos identificados como *Hspg2* (+/FI) foram cruzados com camundongos fêmeas B6 *Cre*. Após o cruzamento, os camundongos *Hspg2* (+/-), com excisão do exon 6, foram identificados por PCR e cruzados com animais B6 selvagens para a expansão da linhagem.

Animais heterozigotos para a mutação no gene *Hspg2* e com a ausência do gene *Cre* foram identificados por PCR e selecionados para cruzamento com animais B6 mg Δ^{loxPneo} (Figura 43).

Figura 43. Genotipagem de animais *Hspg2* (+/F) após cruzamento com animais B6 *Cre*. Análise em gel de agarose para DNA dos animais do cruzamento *Hspg2* (+/-) *Cre* x B6 selvagens. A) Identificação dos animais heterozigotos para a deleção do exon 6 do gene *Hspg2* (poços 1 e 2) e animal selvagem (poço 4). B) Identificação de animais portadores do gene *Cre* (poço 4) e animais selvagens para esse gene (poços 1 a 3). (Marcador = 1kb plus (Thermofisher)).

4.5.4 Geração e expansão dos camundongos duplo-heterozigotos [*Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/mg Δ^{loxPneo})]

Os animais *Hspg2* (+/-) e sem o gene *Cre* foram cruzados com camundongos da linhagem B6 mg Δ^{loxPneo} [*Fbn1* (+/-)]. Até o momento, foram gerados 57 animais, dos quais serão selecionados 5 camundongos machos e 5 camundongos fêmeas para cada um dos genótipos do cruzamento *Hspg2* (+/-) x *Fbn1* (+/-) [*Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/-)], *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/+), *Hspg2* (+/+) *Fbn1* (+/-) e *Hspg2* (+/+) *Fbn1* (+/+)]. Esses animais foram identificados por géis de eletroforese para PCRs do gene *Hspg2* e *Fbn1*, como na figura 44.

Figura 44. Genotipagem de animais *Hspg2* (+/-) após cruzamento com animais B6 *mgΔ^{loxPneo}*. Análise em gel de agarose para DNA dos animais do cruzamento *Hspg2* (+/-) x B6 *mgΔ^{loxPneo}*. A) Gel referente à PCR para gene *Hspg2*. Animais heterozigotos *Hspg2* (+/-) possuem duas bandas (alelo selvagem de cerca de 1600 pb e mutante de 1100 pb) e animais selvagens possuem apenas a banda maior de cerca de 1600 pb, referente ao alelo selvagem. B) Gel referente a PCR para o gene *Fbn1*. Animais heterozigotos *Fbn1* (+/-) são positivos para a amplificação do neo de 433 pb (*mgΔ^{loxPneo}*), enquanto animais selvagens não apresentam banda. Por meio desses géis é possível estabelecer os genótipos dos animais da seguinte forma: *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/-) (poços 3 e 9), *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/+) (poços 2, 5, 7, 8 e 10), *Hspg2* (+/+) *Fbn1* (+/-) (poço 4) e *Hspg2* (+/+) *Fbn1* (+/+) (poços 1 e 6) (Marcador = 1kb plus (Thermofisher)).

Será feita a análise fenotípica de 10 animais de cada genótipo do cruzamento *Hspg2* (+/-) x *Fbn1* (+/-) (B6 *mgΔ^{loxPneo}*) aos 3 meses de idade. Esses animais serão avaliados quanto ao fenótipo da hipercifose por meio de radiografias e será realizada também a análise histológica de aorta torácica. Porém, devido a limitação presente na histologia de identificar aneurismas e dilatações em toda a extensão da aorta, esses animais também serão avaliados por meio de ecocardiografia, em parceria com o Instituto do Coração (Incor). Na ecocardiografia serão avaliados parâmetros como fluxo sanguíneo, volume ventricular e atrial, e morfologia do arco da aorta. Para confirmação da redução da expressão de *Hspg2* nos animais duplo-heterozigotos e *Hspg2* (+/-), fêmures e fragmentos de aorta de todos os animais serão retirados para análise comparativa de expressão gênica por qPCR. Esse estudo tem o intuito de

conduzir análises futuras na comparação da morfologia vascular e esquelética dos diferentes genótipos do cruzamento e avaliar se há piora destes fenótipos marfanoides frente à haploinsuficiência do gene *Hspg2*.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi analisada a expressão do gene *Hspg2* em tecido vascular e esquelético de camundongos $mg\Delta^{loxPneo}$, hipotetizando que diferenças genotípicas entre as linhagens 129 e B6 utilizadas neste trabalho poderiam causar diferenças na expressão do mesmo e, conseqüentemente, nos fenótipos destes animais.

Em relação aos fenótipos vascular e esquelético, verificamos que os animais gerados da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$ apresentam variabilidade, já observada em FERNANDES et al., 2016. Especialmente, para o fenótipo vascular, verificamos que os parâmetros espessuras das túnicas adventícia e média, quantidade de CMLV e integridade de fibras elásticas não foram capazes de separar os grupos $mg\Delta^{loxPneo}$ com aneurisma e $mg\Delta^{loxPneo}$ nos quais não observamos aneurisma. Além disso, estes parâmetros não mostraram animais cujas características fenotípicas aproximam-se mais do grupo selvagem (leve) ou $mg\Delta^{loxPneo}$ com aneurisma (grave). Essa análise reflete a complexidade do fenótipo vascular na SMF, principalmente devido à presença de eventos de compensação, adaptação e remodelamento tecidual. Verificamos também que a variável integridade de fibras elásticas explicou grande parte da variação, principalmente entre animais selvagens e $mg\Delta^{loxPneo}$, sendo esta a mais importante para a caracterização da doença neste modelo.

Verificamos grande variação de expressão dos genes *Hspg2* e *Fbn1* entre animais pertencentes tanto às linhagens selvagens 129 e B6, quanto às linhagens $mg\Delta^{loxPneo}$ 129 e B6. Parte dessa variação deve-se, principalmente, ao sexo. Sendo assim, só observamos diferença de expressão de *Hspg2* na aorta de fêmeas selvagens. Já para os animais das linhagens isogênicas $mg\Delta^{loxPneo}$, pudemos observar diferença de expressão de *Hspg2* na aorta e fêmur, ao comparar fêmeas 129 com fêmeas B6, ressaltando as diferenças entre sexo nos fenótipos dos animais $mg\Delta^{loxPneo}$.

Foi possível observar que os níveis transcricionais de *Hspg2* têm associação com a gravidade do fenótipo esquelético da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$, de forma que animais que possuem hipercifose mais agravada expressam menores

quantidades de *Hspg2* do que animais com fenótipos mais brandos. Observamos também uma associação dos níveis de *Hspg2* com a integridade de fibras elásticas na aorta de animais F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. Animais com fibras elásticas mais íntegras expressam mais *Hspg2* quando comparados a animais com fibras elásticas menos íntegras e animais nos quais encontramos aneurismas pela análise histológica.

Esses achados, associados à alta correlação observada entre a expressão de *Fbn1* e *Hspg2*, sugere que o *Hspg2* pode ter um papel compensatório na variabilidade fenotípica do modelo F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. A já descrita interação física entre perlecan e fibrilina-1 e a correlação na expressão gênica destes genes sugerem co-função entre essas duas proteínas, e que o aumento na expressão de *Hspg2* pode compensar o efeito da mutação em *Fbn1* e associar-se a fenótipos mais brandos. No entanto, ao analisar o RNA-seq, não encontramos variantes exônicas no *Hspg2*, nem variantes entre as linhagens B6 e 129 selvagens já catalogadas no banco de dados que pudessem explicar a variação de expressão de *Hspg2* entre as duas linhagens isogênicas. Com isso, torna-se difícil estabelecer uma causa para as diferenças de expressão observadas, mas não desconsideramos a hipótese da existência de variantes intrônicas/em regiões regulatórias no gene *Hspg2* dos animais utilizados neste trabalho.

A influência da expressão diferencial do gene *Hspg2* na variabilidade fenotípica do modelo $mg\Delta^{loxPneo}$ pode ser melhor estudada a partir de modelos de camundongos. Para isso, neste trabalho geramos o modelo duplo-heterozigoto *Hspg2* (+/-) *Fbn1* (+/ $mg\Delta^{loxPneo}$) que se apresenta como uma ótima ferramenta para a melhor caracterização da fisiopatologia associada à haploinsuficiência de *Hspg2* na SMF. Após confirmada a redução da expressão de *Hspg2* em animais *Hspg2* (+/-), este modelo será utilizado em estudos futuros para investigar mais a fundo o papel deste gene na variabilidade fenotípica de animais da linhagem $mg\Delta^{loxPneo}$.

Os primeiros indícios da participação de genes modificadores em doenças humanas estão sumarizados em Haldane, 1941, no qual ele destaca a presença de variabilidade clínica na idade de manifestações de doenças (HALDANE, 1941). Essa variabilidade, no entanto, apresenta-se com alta correlação entre indivíduos aparentados, o que enfraquece a hipótese de influência de fatores ambientais e aumenta a de fatores genéticos (HALDANE, 1941). O efeito da variabilidade genética no fenótipo de doenças tem sido mimetizado em laboratório pelo uso de camundongos

de diferentes fundos genéticos. Sendo assim, vários trabalhos vêm sendo publicados destacando diferenças no grau de severidade de doenças ao utilizar diferentes linhagens de camundongos carregando a mesma mutação, como foi visto em LIMA et al., 2010 para o modelo $mg\Delta^{loxPneo}$ da SMF (COLEY et al., 2016; LIMA et al., 2010; VIGNIER et al., 2019).

A utilização de camundongos de diferentes fundos genéticos torna-se ferramenta essencial para a representação de doenças genéticas de uma forma mais similar à população humana, e auxilia na busca por genes modificadores de fenótipo, como é o caso da linhagem F2 B6/129 $mg\Delta^{loxPneo}$. A identificação de polimorfismos genéticos que influenciam o quadro clínico de uma doença pode levar a definição mais eficaz do prognóstico quando aplicada a pacientes. Além disso, o entendimento dos mecanismos pelos quais genes modificadores atuam é relevante na compreensão da fisiopatologia de doenças complexas, como a SMF, e contribuem para o estabelecimento de novas terapias.

REFERÊNCIAS

- AMMASH, N. M.; SUNDT, T. M.; CONNOLLY, H. M. Marfan Syndrome-Diagnosis and Management. **Current Problems in Cardiology**, v. 33, n. 1, p. 7–39, 2008.
- ARIKAWA-HIRASAWA, E. et al. Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. **Nature Genetics**, v. 27, n. 4, p. 431–434, 1 abr. 2001.
- ARIKAWA-HIRASAWA, E. et al. Structural and Functional Mutations of the Perlecan Gene Cause Schwartz-Jampel Syndrome, with Myotonic Myopathy and Chondrodysplasia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 5, p. 1368–1375, maio 2002.
- AUBART, M. et al. The clinical presentation of Marfan syndrome is modulated by expression of wild-type FBN1 allele. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 10, p. 2764–2770, 15 maio 2015.
- BALDWIN, A. K. et al. Elastic fibres in health and disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 2–30, 2013.
- BETHEA, B. T. et al. Results of aortic valve-sparing operations: Experience with remodeling and reimplantation procedures in 65 patients. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 78, n. 3, p. 767–772, set. 2004.
- BITTERMAN, A. D.; SPONSELLER, P. D. Marfan Syndrome: A Clinical Update. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 25, n. 9, p. 603–609, set. 2017.
- BOESE, A. C. et al. Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 3, p. H524–H545, 1 set. 2017.
- BOLANDE, R.; TUCKER, A. Pulmonary emphysema and other cardiorespiratory lesions as part of the Marfan abiotrophy. **Pediatrics**, 1964.
- BREKKE, T. D.; STEELE, K. A.; MULLEY, J. F. Inbred or Outbred? Genetic Diversity in Laboratory Rodent Colonies. **Genes & Genomes Genetics**, v. 8, n. 2, p. 679–686, 2 fev. 2018.
- BUNTON, T. E. et al. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. **Circulation research**, v. 88, n. 1, p. 37–43, 19 jan. 2001.
- BYERS, P. H. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: A growth industry. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 161–163, 2004.
- CHOI, K. Preprocessing NGS read alignment files into a binary alignment incidence matrix. Disponível em: <https://churchill-lab.github.io/alntools/main/2017/03/21/welcome.html>. Acesso em: 29 de jul. 2019.
- CHUANG, C. Y. et al. Heparan sulfate-dependent signaling of fibroblast growth factor 18 by chondrocyte-derived perlecan. **Biochemistry**, v. 49, n. 26, p. 5524–32, 6 jul. 2010.
- COLEY, W. D. et al. Effect of genetic background on the dystrophic phenotype in mdx mice. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 1, p. 130, 1 jan. 2016.
- COOK, J. R. et al. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 3, p. 1329–39, mar. 2014.
- COSTELL, M. et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. **Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 5, p. 1109–1122, 1999.

- DE BACKER, J. et al. A critical analysis of minor cardiovascular criteria in the diagnostic evaluation of patients with Marfan syndrome. **Genet Med**, v. 8, n. 7, p. 401–408, 2006.
- DE PAEPE, A. et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 62, n. 4, p. 417–426, 1996.
- DÉ RIC REYNIER, F. et al. Importance of Correlation between Gene Expression Levels: Application to the Type I Interferon Signature in Rheumatoid Arthritis. **PLoS ONE**, 2011.
- DIETZ, H. C. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 337–339, 1991.
- DODGE, G. R. et al. Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, v. 265, n. 29, p. 18023–18029, 1990.
- DWYER, E. M. Spontaneous Pneumothorax and Pulmonary Disease in the Marfan Syndrome. **Annals of Internal Medicine**, v. 62, n. 6, p. 1285, 1965.
- DYHDALO, K.; FARVER, C. Pulmonary histologic changes in Marfan syndrome: A case series and literature review. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 136, n. 6, p. 857–863, 2011.
- EISEN, M. B. et al. **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns** *Genetics*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org>. Acesso em: 18 jun. 2019.
- FERNANDES, G. R.; MASSIRONI, S. M.; PEREIRA, L. V. Identification of Loci Modulating the Cardiovascular and Skeletal Phenotypes of Marfan Syndrome in Mice. **Sci Rep**, v. 6, n. November 2015, p. 22426, 2016.
- GUSTAFSSON, E. et al. Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. **Ann N Y Acad Sci**, v. 995, p. 140–150, 2003.
- HALDANE, J. B. S. The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. **Journal of Genetics**, v. 41, n. 2–3, p. 149–157, jan. 1941.
- HASSELL, J. R. et al. Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 8, p. 4494–4498, 1980.
- HAYES, A. J. et al. Colocalization in vivo and association in vitro of perlecan and elastin. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 136, n. 4, p. 437–454, 28 out. 2011.
- HAYES, A. J.; SMITH, S. M.; MELROSE, J. Comparative immunolocalisation of fibrillin-1 and perlecan in the human foetal, and HS-deficient hspg2 exon 3 null mutant mouse intervertebral disc. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 139, n. 1, p. 1–11, 2013.
- HUTCHINSON, S. et al. Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: A potential modifier of phenotype? **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2269–2276, 2003.
- ISHIJIMA, M. et al. Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 31, n. 4, p. 234–45, maio 2012.
- ISSELBACHER, E. M.; LINO CARDENAS, C. L.; LINDSAY, M. E. Hereditary Influence in Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. **Circulation**, v. 133, n. 24, p. 2516–28, 2016.
- JENSEN, S. A.; HANDFORD, P. A. New insights into the structure, assembly and biological roles of 10–12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 7, p. 827–838, 2016.

KAINULAINEN, K. et al. Location on Chromosome 15 of the Gene Defect Causing Marfan Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 14, p. 935–939, 4 out. 1990.

KAWAHARA, E.; SOUZA, R.B.; FARINHA-ARCIERI, L.E.; FERNANDES, G.R; GOUVEIA, C.H.A.; PEREIRA, L.V. Ramipril improves kyphosis in a mouse model of Marfan syndrome via remodeling of the spinal ligament. Em fase de elaboração.

KINSELLA, M. G. et al. Changes in Perlecan Expression During Vascular Injury Role in the Inhibition of Smooth Muscle Cell Proliferation in the Late Lesion. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2003.

KNOX, S. et al. Perlecan from human epithelial cells is a hybrid heparan/chondroitin/keratan sulfate proteoglycan. **FEBS Letters**, v. 579, n. 22, p. 5019–5023, 12 set. 2005.

KOBOLDT, D. C. et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. **Genome Research**, v. 22, n. 3, p. 568–576, 1 mar. 2012.

KRAATARI, M. et al. A Whole Exome Study Identifies Novel Candidate Genes for Vertebral Bone Marrow Signal Changes (Modic Changes). **SPINE**, v. 42, n. 16, p. 1201–1206, ago. 2017.

LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.

LAWS, N.; HOEY, A. Progression of kyphosis in mdx mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 5, p. 1970–1977, 1 nov. 2004.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 16, p. 2078–9, 15 ago. 2009.

LIMA, B. L. et al. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

LOEYS, B. The search for genotype / phenotype correlation in Marfan syndrome : to be or not to be ? **European Heart Journal**, p. 10–12, 2016.

LOEYS, B. L. et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 7, p. 476–485, 2010.

LORD, M. S. et al. The role of vascular-derived perlecan in modulating cell adhesion, proliferation and growth factor signaling. **Matrix Biology**, v. 35, p. 112–122, abr. 2014.

LORD, M. S. et al. The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 150–166, ago. 2018.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

LOWE, D. A. et al. Deficiency in Perlecan/HSPG2 during Bone Development Enhances Osteogenesis and Decreases Quality of Adult Bone in Mice. **Calcif Tissue Int**, v. 95, n. 1, p. 29–38, 2014.

MARFAN, A. **Bulletins et memoires de la Société medicale des hôpitaux de Paris**, v.13, n.3, p. 220–226, 1896.

MCGOOKEY, D.; PYERITZ, R.; BYERS, P. Marfan syndrome: altered synthesis, secretion or extracellular matrix incorporation of fibrillin. (Abstract). **American journal of human genetics**, v. 47(suppl.), p. A67 only, 1990.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297, set. 2010.

- MCKUSICK, V. A. The Cardiovascular Aspects of Marfan's Syndrome: A Heritable Disorder of Connective Tissue. **Circulation**, v. 11, n. 3, p. 321–342, 1955.
- MCNEILLY, G. et al. Dural ectasia in Marfan's syndrome: Magnetic resonance imaging appearances and anaesthetic experience of three deliveries. **International Journal of Obstetric Anesthesia**, v. 22, n. 4, p. 337–348, 2013.
- MILEWICZ, D. M. et al. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 1, p. 79–86, 1 jan. 1992.
- MILEWICZ, D. M. et al. Genetic Basis of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections: Focus on Smooth Muscle Cell Contractile Dysfunction. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 283–302, 2008.
- MORRIS, J. E.; GAZA, G.; POTTER, S. W. Specific stimulation of basal lamina heparan sulfate proteoglycan in mouse uterine epithelium by Matrigel and by transforming growth factor-beta 1. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 30A, n. 2, p. 120–128, 1994.
- MURDOCH, A. D. et al. Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 42, n. 2, p. 239–249, 1994.
- NEPTUNE, E. R. et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 407–11, 2003.
- NICOLE, S. et al. Localization of the Schwartz–Jampel syndrome (SJS) locus to chromosome 1p34–p36.1 by homozygosity mapping. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 9, p. 1633–1636, set. 1995.
- NICOLE, S. et al. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). **Nature genetics**, v. 26, n. 4, p. 480–483, 2000.
- ORBAN, P. C.; CHUI, D.; MARTH, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 6861–5, 1 ago. 1992.
- PAULSSON, M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 27, n. 1–2, p. 93–127, 1992.
- PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin–1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nature Genetics**, v. 17, n. 2, p. 218–222, 1 out. 1997.
- PEREIRA, L. et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. **Genetics**, v. 96, p. 3819–3823, 1999.
- PILLARISSETTI, S. et al. Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 4, p. 867, 15 ago. 1997.
- RAGHUPATHY, N. et al. Hierarchical analysis of RNA-seq reads improves the accuracy of allele-specific expression. **Bioinformatics**, v. 34, n. 13, p. 2177–2184, 1 jul. 2018.
- RIORDAN, J. D.; NADEAU, J. H. From Peas to Disease: Modifier Genes, Network Resilience, and the Genetics of Health. **The American Journal of Human Genetics**, n. 101, p. 177–191, 2017.
- RUSSO, T. A. et al. Mechanical stretch implications for vascular endothelial cells: Altered

extracellular matrix synthesis and remodeling in pathological conditions. **Life Sciences**, v. 213, p. 214–225, nov. 2018.

SABATIER, L. et al. Heparin/heparan sulfate controls fibrillin-1, -2 and -3 self-interactions in microfibril assembly. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 2890–2897, 2014.

SADATSUKI, R. et al. Perlecan Is Required for the Chondrogenic Differentiation of Synovial Mesenchymal Cells Through Regulation of Sox9 Gene Expression. **J Orthop Res**, v. 35, p. 837–846, 2017.

SAKAI, L. Y.; KEENE, D. R.; ENGVALL, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. **Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 6 I, p. 2499–2509, 1986.

SAUER, B.; HENDERSON, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5166–70, jul. 1988.

SCHRIJVER, I. et al. Premature termination mutations in FBN1: distinct effects on differential allelic expression and on protein and clinical phenotypes. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 2, p. 223–37, 2002.

SCHWARTZ, O.; JAMPEL, R. S. Congenital blepharophimosis associated with a unique generalized myopathy. **Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 68, p. 52–7, jul. 1962.

SEEMAN, E. Sexual Dimorphism in Skeletal Size, Density, and Strength. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4576–4584, out. 2001.

SEGEV, A.; NILI, N.; STRAUSS, B. H. The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 4, p. 603–610, 2004.

SHARMA, B. K.; TALUKDAR, B.; KAPOOR, R. Cystic lung in Marfan's syndrome. **Thorax**, v. 44, n. 11, p. 978–979, 1989.

SMITH, S. M.-L. et al. Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF-2 to FGF receptors. **Matrix Biology**, v. 26, n. 3, p. 175–184, abr. 2007.

SOLOVIEFF, N. et al. Pleiotropy in complex traits: challenges and strategies. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 7, p. 483–95, jul. 2013.

STUM, M. et al. Spectrum of *HSPG2* (Perlecan) mutations in patients with Schwartz-Jampel syndrome. **Human Mutation**, v. 27, n. 11, p. 1082–1091, nov. 2006.

TEOH, P. C. Bronchiectasis and spontaneous pneumothorax in Marfan's syndrome. **Chest**, v. 72, n. 5, p. 672–673, 1977.

TIECKE, F. et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 9, n. 1, p. 13–21, 2001.

TIEDEMANN, K. et al. Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11404–11412, 2005.

TRAN-LUNDMARK, K. et al. Heparan Sulfate in Perlecan Promotes Mouse Atherosclerosis: Roles in Lipid Permeability, Lipid Retention, and Smooth Muscle Cell Proliferation. **Circulation Research**, v. 103, n. 1, p. 43–52, 3 jul. 2008.

VERSTRAETEN, A. et al. Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery. **Human Mutation**, v. 37, n. 6, p. 524–531, 2016.

VIGNIER, N. et al. Effect of genetic background on the cardiac phenotype in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 19, p. 100664, set. 2019.

WEI, H. et al. Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor β Signaling. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 1, 11 jan. 2017.

WEISER, M. C. et al. Developmental regulation of perlecan gene expression in aortic smooth muscle cells. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 15, n. 5, p. 331–340, 1996.

XU, Y.-X. et al. The glycosylation-dependent interaction of perlecan core protein with LDL: implications for atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 2, p. 266–276, fev. 2015.

YAMADA, Y. et al. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. **Nature Genetics**, v. 23, n. 3, p. 354–358, 1 nov. 1999.

ZOELLER, J. J. et al. A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. **Journal of Cell Biology**, v. 181, n. 2, p. 381–394, 2008.

<http://www.informatics.jax.org/snp>. Acesso em 09 de Nov. 2017.

APÊNDICES

Apêndice A – Código utilizado para análise do RNA-seq

1. Alinhamento de arquivos fastq ao transcriptoma B6x129 e geração de arquivos BAM:

```
#!/bin/bash
#PBS -N bowtie
#PBS -q short
#PBS -t
35,38,40,95,179,180,187,226,227,230,407,410,415,520,530,546,550,553,563,567
#PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -l nodes=1:ppn=8
#PBS -l mem=16gb
#PBS -j oe
#PBS -o bowtieindex-o.log
#PBS -e bowtieindex-e.log

bowtie -q --trim3 50 --allow-contain --maxins 1000 -a --sam -m 100 -v 3 --fr -p 8
/home/isabelagerdes/run_bowtie/transcriptome/transcriptome -1
/home/isabelagerdes/RNAseq_MFS/V"$PBS_ARRAYID"_1.fastq -2
/home/isabelagerdes/RNAseq_MFS/V"$PBS_ARRAYID"_2.fastq | samtools view -bS
- > /home/isabelagerdes/run_bowtie/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".bam
```

1.2. Análise de expressão gênica diferencial

1.2.1. Transformação de arquivos BAM em H5 e bin:

```
#!/bin/bash
#PBS -N alntools
#PBS -q short
#PBS -t
35,38,40,95,179,180,187,226,227,230,407,410,415,520,530,546,550,553,563,567
#PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -l nodes=1:ppn=8
#PBS -l mem=16gb
#PBS -j oe
#PBS -o alnindex-o.log
#PBS -e alnindex-e.log

/home/isabelagerdes/tools/alntools bam2both -c 8 -p 8
/home/isabelagerdes/run_bowtie/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".bam
```

```
/home/isabelagerdes/run_alntools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".bin
/home/isabelagerdes/run_bowtie/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".h5 -v
```

1.2.2. Gerando *counts* utilizando arquivos bin para EMASE-zero:

```
#!/bin/bash
#PBS -N emazero
#PBS -q short
#PBS -t
35,38,40,95,179,180,187,226,227,230,407,410,415,520,530,546,550,553,563,567
#PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -l nodes=1:ppn=8
#PBS -l mem=16gb
#PBS -j oe
#PBS -o emazeroindex-o.log
#PBS -e emazeroindex-e.log
```

```
/home/isabelagerdes/tools/emase-zero -m 2 -o
/home/isabelagerdes/run_emase/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID" -l
emase.pooled.transcriptomes.info -g emase.gene2transcripts.tsv
/home/isabelagerdes/run_alntools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".bin -v
```

1.2.3. Utilização de arquivos “*gene.counts*” para análise de expressão diferencial utilizando pacote DESeq2 no ambiente R:

```
library(dplyr)
library(DESeq2)
library(stringr)
library(ggplot2)
library("gplots")
library("RColorBrewer")
library("genefilter")

# Listando todos os arquivos “.gene.counts”:

file_list <- list.files("Data_EMASE/", pattern="*.gene.counts")

list_counts <- list()
for (i in file_list){
  x <- read.table(paste("Data_EMASE/", i, sep=""), sep = "\t")
  colnames(x) <- c("Target_ID", "B", "C", "Total")
  list_counts[[i]] <- x
}; rm(x,i)

# Criando tabela com todos os counts para todas as amostras:
```

```

df_counts <- data.frame(row.names=list_counts[[1]]$Target_ID,
                        stringsAsFactors = FALSE)

for (i in names(list_counts)){
  x <- str_split(i,pattern = "[[:punct:]]",simplify = TRUE)
  x <- x[1]
  df_counts[[x]] <- list_counts[[i]]$Total
}

df_counts <- apply(df_counts, 2, floor)

rownames(df_counts) <- list_counts[[1]]$Target_ID

# Checando número de counts total para cada amostra:

s <- apply(df_counts, 2, sum)

write.csv(df_counts,"Data_EMASE/df_counts_total.csv")

# Arquivos de entrada:

df_counts <- read.csv("Data/df_counts_total.csv",header = TRUE,row.names = 1)

df_samples <- read.csv("Data/separated_groups.csv",header = TRUE)

# Filtrando matriz de counts para pelo menos 10 reads para pelo menos metade das amostras:

genes_names <- list()
for (i in 1:ncol(df_counts)) {
  genes_names[[i]] <- rownames(df_counts[df_counts[,i]>=10,])
}

genes_names <- table(unlist(genes_names))

filtered_genes_names <- genes_names[genes_names>=10]

df_counts_filtered <- df_counts[rownames(df_counts) %in%
names(filtered_genes_names),]

write.csv(df_counts_filtered,"Data/df_counts_filtered.csv")

# Criando objeto de análise filtrado:

ddsFullCountTable_filtered <- DESeqDataSetFromMatrix(
  countData = as.matrix(df_counts_filtered),

```

```

colData = df_samples,
design = ~ Sex + Group)

dds_filtered <- DESeq(ddsFullCountTable_filtered)

save(dds_filtered,file = "Results/dds_filtered.RData")

result_filtered <- results(dds_filtered)

save(result_filtered,file = "Results/result_filtered.RData")

# Plotando gráfico para análise de variação:

dds_filtered_vst <- vst(dds_filtered)

# Plotando PCA:

pdf("Results/Plots/plotPCA_onlyfilt.pdf",width = 10)

plotPCA(dds_filtered_vst,intgroup=c("Group","Sex"))+
  geom_point(size=4)+
  theme(axis.text = element_text(size = 13,colour = "black"))+
  theme(axis.title = element_text(size = 14,colour = "black"))+
  theme(legend.text = element_text(size = 15,colour = "black"),
        legend.title = element_text(size = 18,colour = "black"))+
  labs(colour="Grupo")

dev.off()

# Plotando histograma:

pdf("Results/Plots/hist_onlyfilt.pdf")

#x11()
as.data.frame(result_filtered) %>%
  ggplot()+
  geom_histogram(aes(x=pvalue),
                 fill=l("blue"),
                 col=l("red"),
                 alpha=l(.2),
                 binwidth = 0.03)+
  labs(title="Histograma de p-valores",x = "p-valor",y="Frequência")+
  theme(axis.text = element_text(size = 13,colour = "black"))+
  theme(axis.title = element_text(size = 14,colour = "black"))

dev.off()

```

Filtrando genes com p-valor ajustado significativo para tabela filtrada por método 1:

```
result_signif <- result_filtered[which(result_filtered$padj < 0.1),]
```

1.3. Análise de variantes exônicas para o gene *Hspg2*

1.3.1. Ordenando os arquivos BAM e criando arquivos mpileup

```
#!/bin/bash
#PBS -N samtools
#PBS -q short
#PBS -t
35,38,40,95,179,180,187,226,227,230,407,410,415,520,530,546,550,553,563,567
#PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -l nodes=1:ppn=2
#PBS -l mem=64gb
#PBS -j oe
#PBS -o samindex-o.log
#PBS -e samindex-e.log

samtools sort
/home/isabelagerdes/run_samtools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".bam -o
/home/isabelagerdes/run_samtools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID"_sorted.
bam
samtools mpileup -f
/home/isabelagerdes/run_STAR/fasta_mm/Mus_musculus.GRCm38.dna.primary_as
sembly.fa
/home/isabelagerdes/run_samtools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID"_sorted.
bam >
/home/isabelagerdes/run_samtools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID"_mpileu
p
```

1.3.2. Chamando variantes genômicas e transformando arquivos vcf em tabelas

```
#!/bin/bash
#PBS -N vcf
#PBS -q short
#PBS -t
35,38,40,95,179,180,187,226,227,230,407,410,415,520,530,546,550,553,563,567
#PBS -l walltime=24:00:00
#PBS -l nodes=1:ppn=2
#PBS -l mem=64gb
#PBS -j oe
```

```
#PBS -o vcfindex-o.log
#PBS -e vcfindex-e.log
```

```
java -jar /home/isabelagerdes/tools/VarScan.v2.3.9.jar mpileup2cns
/home/isabelagerdes/run_samtools/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID"_mpileu
p --min-coverage 10 --variants --output-vcf >
/home/isabelagerdes/run_vcf/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".vcf
```

```
gatk VariantsToTable -V
/home/isabelagerdes/run_vcf/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".vcf -F
CHROM -F POS -F REF -F ALT -GF RD -GF AD -GF DP -GF FREQ -O
/home/isabelagerdes/run_vcf/V"$PBS_ARRAYID"/V"$PBS_ARRAYID".table
```

1.3.3. Importando tabelas de variantes para ambiente R e filtrando apenas a região do gene *Hspg2*

```
library(refGenome)

gtf <- ensemblGenome()
read.gtf(gtf, filename="gtf_filtered.gtf")

file_list <- c()

for (i in c("V35", "V38", "V40", "V95", "V179", "V180", "V187",
            "V226", "V227", "V230", "V407", "V410", "V415", "V520",
            "V530", "V546", "V550", "V553", "V563", "V567")){

file_list[[i]] <- read.table(paste(i, "/", i, ".table", sep=""), header = TRUE) }

filt_ Hspg2 <- function(x){
  x <- x[x$CHROM==1,]
  x <- x[x$POS >= 137468769 & x$POS <= 137570630,]
  return(x)}

file_list_filt <- lapply(file_list, filt_ Hspg2)
```


ANEXOS

Anexo A – Protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais do IB aprovado para este trabalho.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização do papel do gene Hspg2 na modulação dos fenótipos, da dinâmica circulatória e da MEC no modelo $mg\Delta^{loxPNeo}$ na Síndrome de Marfan sob a terapêutica de Losartan”, registrada com o nº 272/2016 (Proc. 16.1.636.41.7), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi e com a participação dos colaboradores Gustavo Ribeiro Fernandes (IB/USP), Rodrigo Barbosa de Souza (IB/USP) e Isabela Gerdes Cyuricza (IB/USP), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

Vigência da autorização: 13/12/2016 a 12/12/2020

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécies/linhagens: camundongos isogênico (*Mus musculus*)/129/sv e B6 e camundongos Knockout: Fbn1KO129/sv; Hspg2KO129/sv; Fbn1KOB6; Hspg2KOB6

Nº de animais: 180

Peso/Idade: 3 e 6 meses/30g

Sexo: (M+F)

Origem: Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

OBS.: Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.

Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B – Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega, A1360) utilizados neste trabalho para clonagem de fragmentos do gene *Hspg2* para sequenciamento.

5.D. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Note: Inserts can be sequenced using the pUC/M13 Forward Primer (Cat. # Q5601) or pUC/M13 Reverse Primer (Cat. # Q5421).

! **Note:** A single digest with BstZI, EcoRI (Cat. # R6011) or NotI (Cat. # R6431) will release inserts cloned into the pGEM®-T Easy Vector. Double digests can also be used to release inserts. Isoschizomers of BstZI include EagI and Eco52I.

Anexo C – Sequência completa dos exons 5 a 7 do alelo mutante Hspg2 FI obtida por sequenciamento Sanger.

Exon 5 Primer *Hspg2_5F* Íntron 5-6 Sequência LoxP Exon 6 Primer *Hspg2_6R* Íntron 6-7 Primer *Hspg2_7R*

CCCGGAGACCAGATTGTCAGTGTGGTGTTTCATCAAGTGAGATGGATTCTGGGGATGGGAAGGG
 CGGGGGCAACCAGAAGGGGTGGCAAGAACAGGTCAGGGAGGGTCCTGAGGAGTGGATTATTTT
 TGATGGGGATTTCAGAAAGCATAGGTGGGGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTTCGATATCAAGCTT
 ATCGATAAGCTTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATAATAAGGGT
 TATTGAATATGATCGGAATTCCTGCAGCCCCGGGGATCCATTACCAGAAGTGGCCSTACCTTAGG
 CCCAGGCTGCCCAGGTAGAGGGGTCTGGGTGTGCGCAGGAACTTGACAGAGGCGTGCAGATT
 CCAGGCCTTTtCCTtCCCAGGGAAGTGGATGGCTGGGTCTTTGTTGAGCTGGATGTTGGCTCCGA
 AGGGAAATGCGGACGGATCTCAGATTCAAGAGGTGCTGCATACAGTGGTCTCCAGTGGCTCCATC
 GGCCCCATATGTCACCTCCCCCTGGGGGTTCAGTTCCGACGCCTGGGCACAGGTGAGCCTGTC
 CTCCAGACCCACTCAGGTCATTCTCCCCTCCAGTTCCTCAGACTCTGGCCCACTTCGGTGTCTC
 TACCTTGGGCCATCCTAACCTGGACAAGCACACCCCTGGAGATACGGAGCTCATTCCATCCTGA
 GCCTGACCATCAGTCTTTTTTATAGTCTCTACTTGGGTAGAGCCAGACTGCTTCTCTAACTAGCA
 CCTCGGAAGCTGTCTCCTTGTAGACCTCTGTATTTTGACAGGAGATTTCATCTCCTTTATACGCACT
 TTATAAACACTTTTATACAGTGTCCGAAGACACCAGCATCCAGTGTTGTTGGAAGTGGGCAATTTTTTA
 AAAAGCTAGCTTGGCTGGACGTAACTCCTCTTCAGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACATTATA
 CGAAGTTATAATAAGGGTTATTGAATATGATCGGAATTAGCTTATGCTGAGCCAGGGGGTAGGGG
 CCACACACTTATGATCTCAGCGTTCAGGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAGGGTGAGTTCCA
 CAACAGCTAGGGCTACACAGAGAAACCCTGTCTCGAAACCACCCCCCATGCCCAACCCCAAG
 GGAGAACTTTTTTTCAGGGAGAACTTGGAGACTAGAGGTGAGATCCCTAGCCTCCATGCAAATACC
 AGGAGAGTGTGAAACTGCCTGTAATCCACCCAGCTGTGAGGAGCCAGAGACGGCCTCCCCAGG
 GCAAGCTAGCCGGCTAGACTATAGAGTCAGCAAGCTCTGACTCAGGAGAGAGACTCTGCCTCAG
 TATAAAAGGTAAAGACAGATCAAGGAAGACAACCCAGTGTGAGCCTCAGGCCTCCATACCCACAC
 ACATCACATACATGTGCATCTTCATGGTGTGCGGCTATACAGGCAAAGACACACTGCACACACAC
 CACACACACACACACCCATCTCATTGTGTGTGTTTGGTGAAGTCTGTCCATCTTTTCCCA
 AGCACCAAGTGAATGCAGGCAGGCCCTATGCATAAGGCCCAATCCGGCATCCACCCGGGGCC
 TCCCAAGTTCATAAAGTATTCTCTCGTGTTCCTCAAGATGAGGGAACTAAGGCTCAGGAAGGAAAA
 GCAGCCACTCACAGCAATGGGGATGCAAACCAGACCCCATTTGTGTGCTGCTCTCCCCGAAGCC
 ATGTTGGATGGGAAACGGAAGACAAACAGGCCAGAAAGGACAGGAAACGGGCCCAAGTCACA
 CAGCTgTTAGATGCAGAAGCCAGGCCCGGGTGGCTCAGCGTCAGTCAAGGCTTCCGGTCAC
 TCTGCCCGCTGCCCTGTCTTTcCAcCAAGTCTTTcCTgGAcCAGTTCTGGTTTATTTCTCATAGGCT
 GTGCTACTCGgcCCCTCATTgGtTCCtTCCCACCTCAGTGTCTTACAGAGTAGACTCTCATTGTGTC
 ATGTCATGTGCCTCTGACTCACTGAAGCTCCAGACAGGACCAGTTCTATCCCTACATGGTATCAA
 GTCTACAAGGCTAAAAAGCAAAGCAAAGCAACTAACCAAATAAACAACTTAGTGAGCGCtTTGt
 TCtaTATGCACCCGAGTCTCTGTCAACGCACCCCCAACTAACTTGTCTGTGGGTCTTCAGAC
 CCAGGTCTGAAGTTTGCTGGAAGCCTAGCCATCTGTCCCCACCTCAGTGAGTTCTGACTGGGG
 GGAGAGGGGACAGGCTTGGTAGTATAGTTGCTGACTACGGCTTCCTTTCCAGCACAGACCCCC
 CGCCACCCCAAGCTGCTGTGGGGGTACAGTGACACCAGGTGAGTGTGTGAGCCTGGCTGAGG
 TCCAGGGGGTTCCTAGTGAACCTGACAGATGGAGGGAGAAAAGAAGGGCAAAGGCCACTTGGCT
 GCCTCCTTCTCTCTGGGCCAGGCCACGGTCTGCACGTGTATGGCATGGTGGCTGCATGCGTGT
 GGCATGTACCTGTGTGAAAAAGGTCCATGTGAGGGGTTCTGCACTGCATTCCACGCGTGCCAG
 GAGTGTGTATGCCACGTGCTTCTTGTCTTGTGCTGTCTGCCACAGTGGTCCGACTCGGGTGTTCAG
 AGCCACTCATAGCCATGCCTTGCCTGTGCCATCTGTATGGCGCTAGCTTCCTCAGGCTGCTGC
 CTGACTCTCCCCTCCCCACACCCACAGTGCCCCAGTTCCCAAGAGTCTGCACGGAGACGGAG
 TTtGctTGCCACAGCTAtAATGAGTGTGTGGCTCTGAGTATCGCTGTGACCGGAG