Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Elisa Ito Kawahara

Caracterização do fenótipo ósseo do modelo mgΔ^{loxPneo} da síndrome de Marfan e análise dos mecanismos de patogênese.

Characterization of the skeletal phenotype of the mgΔ^{loxPneo} mouse model of Marfan syndrome and analysis of the mechanisms of pathogenesis.

São Paulo
2016

Elisa Ito Kawahara

Caracterização do fenótipo ósseo do modelo mgΔ^{loxPneo} da síndrome de Marfan e análise dos mecanismos de patogênese.

Characterization of the skeletal phenotype of the mgΔ^{loxPneo} mouse model of Marfan syndrome and analysis of the mechanisms of pathogenesis.

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: Profª Drª Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

Co-orientador: Dr. Luis Ernesto Farinha Arcieri

São Paulo
2016

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.

Kawahara, Elisa Ito

Caracterização do fenótipo ósseo do modelo mgΔ^{loxPneo} da síndrome de Marfan e análise dos mecanismos de patogênese / Elisa Ito Kawahara; orientadora Lygia da Veiga Pereira Carramaschi. – São Paulo, 2014.

103 f. ; il.

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

1. Síndrome de Marfan. 2. Fenótipo ósseo. 3. Ramipril. 4. ACEi. 5. Brandicina. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. II. Título.

Nome: KAWAHARA, Elisa Ito

Título: Caracterização do fenótipo ósseo do modelo mgΔ^{loxPneo} da síndrome de Marfan e análise dos mecanismos de patogênese.

Title: Characterization of the skeletal phenotype of the mgΔ^{loxPneo} mouse model of Marfan syndrome and analysis of the mechanisms of pathogenesis.

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: _____

“Que todo o mundo tenha o direito de aprender a ler, eis o que com o tempo vos desgosta; não só de escrever, mas de pensar. ”

(Friedrich Nietzsche)

Aos meus pais, Milton e Alice, por todo apoio,
dedicação e amor.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.ª Lygia Pereira, pela confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, além de todo conhecimento que me foi passado.

Ao meu co-orientador Luis Farinha, por me ensinar tudo no laboratório, pela compreensão e por sempre acreditar em mim.

À Prof.ª Cecília, do ICB-USP, por ceder muito gentilmente os equipamentos necessários realização de análises presentes neste trabalho e seu tempo para discutirmos resultados. Sou muito grata também à sua equipe, sempre muito receptiva, em especial à Marilia, Manuela e Bianca.

Ao Prof. Houtan da USP de Ribeirão e aos seus alunos Felipe e Tathi pela ajuda e colaboração com a análise de bioinformática.

Ao Prof. Paulo Otto pela paciência e generosidade durante as análises estatísticas.

Aos meus colegas do grupo “Marfan”, Juliana, Giovana, Carolina, Rodrigo e Isabela por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Também ao Gustavo pela ajuda na bioinformática. Agradeço à toda equipe do LaNCE, Mariana, Fabiano, Patrícia, Raquel, Lucas, Karla, Wellington, Gisele, Simone, Sofia, Yordanka, Leo, Yasmin, Joana e Amanda. Acredito que além de ter aprendido um pouco com cada um, ganhei amigos. Agradeço aos 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, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, Milton e Alice, por sempre me apoiarem em cada decisão. Sem todo o suporte que eles têm me dado, isso não seria possível. Agradeço aos meus irmãos, Fábio e Rafael, e a todos os meus familiares que sempre estiveram torcendo por mim. E agradeço ao meu namorado Júlio, pelo companheirismo, compreensão e carinho que me deu para enfrentar todo esse caminho.

Resumo

A Síndrome de Marfan (SMF) é uma doença de caráter autossômico dominante que acomete o tecido conjuntivo. As principais manifestações clínicas afetam o sistema cardiovascular, ótico e ósseo. A SMF é causada por mutações no gene *FBN1*, que codifica a proteína extracelular fibrilina-1, componente principal das microfibrilas, que formam as fibras elásticas. Estudos mostraram que mutações no gene da fibrilina-1 levam a um aumento indiscriminado do TGF-β ativo na matriz, que resulta nos principais fenótipos da doença. O Sistema Renina Angiotensina (RAS) tem como produto principal a Angiotensina II (Ang-II), envolvida na regulação da massa óssea e da atividade do TGF-β. Estratégias terapêuticas para a SMF utilizando fármacos que agem no RAS têm sido alvos de estudos em modelos animais. Em camundongos, Ramipril, inibidor da ACE (*Angiotensin-converting enzyme inhibitor,* ACEi), aumenta a transcrição do gene *Fbn1* em 35% e melhora a cifose, característica do fenótipo ósseo no modelo animal mgΔ^{loxPneo}. O mecanismo de ação do Ramipril no sistema ósseo ainda não está totalmente elucidado, sendo que pode agir por diminuição na produção de Ang-II e consequente diminuição nos níveis de TGF-β, ou pela inibição de degradação da bradicinina (BK) pela Ang-II. A bradicinina ativa diretamente seu receptor B2R, que induz ações fisiológicas opostas às da Ang-II. O objetivo deste trabalho foi avaliar e compreender os mecanismos gerais da patogênese óssea do modelo murino mgΔ^{loxPneo} para a SMF. Para tanto, foi analisado o fenótipo ósseo dos animais mgΔ^{loxPneo} e selvagens controle e tratados com Ramipril. Foi verificado que, além da cifose, os animais mutantes apresentaram pior estrutura óssea. O tratamento melhorou a cifose, porém não alterou a qualidade óssea dos animais mutantes. Portanto, o efeito benéfico do Ramipril na cifose dos animais mgΔ^{loxPneo} não se deve a uma melhora da estrutura óssea, e pode estar relacionado à integridade do ligamento que sustenta a coluna vertebral. Com o intuito de testar a hipótese de que a sinalização pelo receptor B2R da BK possa estar envolvida no desenvolvimento do fenótipo ósseo dos animais mgΔ^{loxPneo}, foram gerados animais mgΔ^{loxPneo} e *knockout* para o receptor B2R. Os resultados mostram que o receptor B2R não interfere no desenvolvimento da cifose, sendo apenas o genótipo para *Fbn1* o fator determinante para a manifestação desse fenótipo. Foi realizada a análise de RNA-seq para verificar genes e vias diferencialmente expressas que possam explicar o mecanismo de desenvolvimento do fenótipo ósseo dos animais mgΔ^{loxPneo}. Foram encontradas vias como da adesão focal, interação receptor-meio extracelular (MEC), junção ocludente, reparação por excisão de nucleotídeo e de reparação missmatch, que podem explicar alterações no metabolismo de células ósseas. Além disso, foram encontradas diferenças de expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular esquelético, o que está de acordo com a hipótese de regulação parácrina entre o tecido muscular e ósseo, levando a uma pior estrutura óssea.

Palavras-chave: Síndrome de Marfan, fenótipo ósseo, Ramipril, ACEi, Bradicinina.

Abstract

Marfan syndrome (MFS) is an autosomal dominant disease that affects the connective tissue. The main clinical manifestations affect the cardiovascular, optical and bone systems. MFS is caused by mutations in the *FBN1* gene, that encodes the extracellular protein fibrillin-1, a major component of microfibrils, which form elastic fibers. Studies have shown that mutations in the fibrillin-1 gene lead to an indiscriminate increase in active TGF-β in the matrix, which results in the major phenotypes of the disease. The Renin Angiotensin System (RAS) has as its main product Angiotensin II (Ang-II), involved in bone mass regulation and TGF-β activity. Therapeutic strategies using drugs targeting the RAS have been studied in animal models. Ramipril, an ACE inhibitor (Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEi), increase *Fbn1* gene expression in 35% and improve kyphosis index in the mgΔ^{loxPneo} mouse model for SMF. Its mechanism of action in bone tissue is not completely elucidated, and it may act by decreasing Ang-II production and consequent reduction in TGF-β levels, or by inhibiting degradation of bradykinin (BK) by Ang II. BK directly activates its B2R receptor, which induces opposite physiological actions to Ang-II. This study aims to evaluate and understand the general mechanisms of bone pathogenesis in the mgΔ^{loxPneo} mouse model. We analyzed the bone phenotype of mgΔ^{loxPneo} and wildtype animals treated, or not, with Ramipril by measuring the kyphosis index (KI), micro computed tomography (μCT) and Real-time PCR (RT-PCR). We found that mutant animals showed a greater degree of kyphosis and an altered bone structure. Ramipril improved kyphosis but did not alter bone quality of mutant animals, while in wild type animals Ramipril decreased bone structure without altering KI. Therefore, the beneficial effect of Ramipril on mgΔ^{loxPneo} animals' kyphosis is not due to an improvement in bone structure. In order to test the hypothesis where signaling through BK B2R receptor may be involved in the development of bone phenotype of mgΔ^{loxPneo} animals, a mouse model with the mgΔ^{loxPneo} mutation and knockout for B2R receptor was generated. The analysis of these animals show that the B2R receptor does not interfere with the development of kyphosis, with *Fbn1* genotype as sole determinant for this phenotype manifestation. RNA-seq analysis was performed to verify differential expression of genes and altered cellular pathways, which could reveal mechanisms of bone phenotype development in mgΔ^{loxPneo} animals. Altered pathways found included focal adhesion, receptor- extracellular matrix (ECM) interaction, tight junction, nucleotide excision repair and missmatch repair, which may explain changes in bone cells metabolism. In addition, there were differences in gene expression related to skeletal muscle metabolism, which is in agreement with the paracrine regulation of bone and muscle tissue, leading to worst bone structure.

Key-words: Marfan Syndrome, bone phenotype, Ramipril, ACEi, bradykinin.

Sumário

1 – INTRODUÇÃO..... 9

1.1 – Síndrome de Marfan..... 9

1.2 – O gene Fbn1 e a SMF..... 10

1.3 – O modelo murino mgΔ^{loxPneo} para a SMF..... 13

1.4 – Fibrilina-1 na regulação de TGF-β e metabolismo ósseo..... 14

1.5 – O Sistema Renina-Angiotensina..... 17

1.6 – O RAS e o fenótipo ósseo..... 18

1.7 – Utilização de fármacos no tratamento da SMF..... 20

1.8 – Ramipril e o modelo murino mgΔ^{loxPneo}..... 22

2 – OBJETIVOS..... 28

2.1 – Objetivo Geral..... 28

2.2 – Objetivos Específicos..... 28

3 – MATERIAIS E MÉTODOS..... 29

3.1 – Animais..... 29

3.2 – Extração de DNA de cauda..... 29

3.3 – Genotipagem dos animais..... 29

3.4 – Administração do Ramipril..... 31

3.5 – Análises histopatológicas..... 32

3.6 – Análise radiográfica..... 33

3.7 – Microtomografia computadorizada..... 33

3.8 – Extração de RNA de osso..... 36

3.9 – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* …….. 37

3.10 – *Real Time PCR* (RT-PCR)……. 38

3.11 – RNA-seq……. 38

3.12 – Análises Estatísticas…….. 40

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 41

4.1 – Efeito do Ramipril no Fenótipo Ósseo do modelo murino mgΔ^{loxPneo}..... 41

4.2 – Geração e análise dos animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} e knockout para o receptor B2R de bradicinina..... 51

4.3 – RNA-seq de amostras de RNA de osso obtidas dos animais mgΔ^{loxPneo}..... 57

5 – CONCLUSÕES..... 72

Referências..... 74

Apêndices..... 79

Anexo..... 103

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Síndrome de Marfan

A Síndrome de Marfan (SMF) (OMIM 154700) é uma doença genética, com caráter autossômico dominante que acomete o tecido conjuntivo. O indivíduo afetado pode apresentar manifestações, principalmente, nos sistemas esquelético, ocular e cardiovascular. As manifestações esqueléticas são caracterizadas pelo crescimento excessivo dos membros, aracnodactilia, *pectus excavatus* e deformações na coluna. Já no sintoma ocular a principal manifestação é a *ectopia lentis*. As complicações cardiovasculares, como os aneurismas que podem progredir para a ruptura da parede da aorta, são as principais causas de morte nos indivíduos afetados, diminuindo a expectativa de vida dos pacientes numa média de 40 anos (Silverman et al., 1995; Pyeritz, 2000). Porém, intervenções cirúrgicas com o intuito de corrigir tais problemas e tratamentos medicamentosos têm aumentado a expectativa de vida dos portadores da SMF (Silverman et al., 1995; Erbel et al., 2014)

Desde que foi descrita por Antoine-Bernard Marfan em 1896, a SMF tem sido amplamente estudada. Dessa forma, diversos estudos sobre a prevalência da doença já foram realizados em diversas populações, utilizando diferentes métodos de diagnósticos existentes para a doença, como a nosologia de Berlin (Beighton et al., 1986), de Ghent (De Paepe et al., 1996) e a revisão do critério de Ghent (Loeys et al., 2010). Assim, pode-se considerar que a SMF tem uma incidência que varia de 1 para 3.000 a 1 para 5.000 na população, sem distinção de gênero e etnia (von Kodolitsch et al., 2015, Loeys, 2016).

Uma grande dificuldade encontrada pelos estudos de prevalência é o correto diagnóstico da SMF, por ser uma doença que apresenta pleiotropismo e grande variabilidade clínica intra e interfamiliar, além de possuir sintomas que se sobrepõem aos de outras doenças. Manifestações como prolapso da válvula mitral, escoliose, deslocamento do cristalino podem levar a um diagnóstico incerto por estarem presentes não só na SMF como em outros quadros clínicos (Robinson et al., 2000; Pyeritz, 2012). Dessa forma, hoje o método de diagnóstico mais aceito é o descrito por Loeys et al. (2010) onde revisam os critérios de Ghent (De Paepe et al., 1996) e utiliza análises moleculares do gene envolvido na SMF em conjunto com o parecer clínico para obter o diagnóstico mais acurado possível.

Em 1991 foi descrita a relação de uma mutação *de novo* sem sentido no gene *FBN1* e o desenvolvimento das manifestações fenotípicas da SMF em dois pacientes, o que levou o grupo a concluir que a proteína fibrilina-1 defeituosa poderia ser a causa do desenvolvimento da doença (Dietz et al., 1991). Desde então, com o avanço da tecnologia em genética molecular, a detecção de mutações nesse gene é possível em mais de 90-95% dos pacientes com SMF (Loyes, 2016).

1.2 – O gene *FBN1* e a SMF

Desde que mutações no gene *FBN1* (OMIM 134797), que codifica a proteína de matriz extracelular (MEC) fibrilina-1, foram relacionadas à SMF, a doença pôde ser classificada no grupo das fibrilinopatias (Dietz et al., 1991; Lee et al., 1991; Kainulainen et al., 1991). Diversos estudos para entender a estrutura do gene e da proteína foram realizados com o intuito de investigar a patogênese molecular da SMF. Assim, o gene, considerado relativamente grande, localiza-se na região 15q21.1, e possui aproximadamente 230 kb e 65 exons, codificando uma proteína de 2871 aminoácidos (Pereira et al., 1993; Ramachandra et al., 2015). O gene já possui mais de 3.000 mutações reportadas, sendo elas desde mutações de ponto até grandes rearranjos (revisto por Ramachandra et al., 2015).

A fibrilina-1 faz parte de uma família de proteínas que conta ainda com as fibrilinas 2 e 3. Cada molécula de fibrilina-1 é composta por 47 domínios EGF-*like* (Epidermal Growth Factor, ou fator de crescimento epidermal), dos quais 43 se ligam ao cálcio (cbEGF), 7 domínios contendo 8-cisteína (8-cys), 2 domínios híbridos que compartilham características de ambos os domínios 8-cys e EGF-*like*, um domínio rico em prolina e os domínios amino- e carboxi- terminais (Figura 1) (revisto por Sakai et al., 2016). A fibrilina-1 é uma macromolécula estrutural que compõe as microfibrilas e contribui para a integridade e função de todos os tecidos conjuntivos. As microfibrilas se encontram em estruturas individuais ou como um manto envolvendo a elastina nas fibras elásticas. Assim, essas estruturas se organizam da melhor forma para se adequar à integridade funcional de cada tecido conjuntivo. Por exemplo, nas artérias musculares as fibras elásticas envolvem o lúmen dos vasos, enquanto nos tendões, pericôndrio e periósteo as fibras elásticas estão paralelas ao eixo longo dos tecidos (Sakai et al., 2016).

Sabe-se ainda que a fibrilina-1 se associa a diversas moléculas como as quatro LTBPs (*Latent Transforming Growth Factor β-binding Proteins*). Essas

proteínas possuem 18 domínios EGF-*like* e 4 repetições 8-cys, semelhantes aos encontrados nas fibrilinas, sendo o módulo 8-cys exclusivo dessas duas famílias (Figura 1) (Sakai et al., 2016). Estudos mostraram que a fibrilina-1 e as LTBP-1 colocalizam em cultura celular e tecidos como pele e osso, o que levou à hipótese de que essas proteínas poderiam interagir fisicamente na MEC (Raghunath et al., 1998; Dallas et al., 2000). Assim, Isogai et al. (2003) mostraram que a LTBP-1 não era um componente estrutural das microfibrilas, mas que estava presente na MEC através da interação com a fibrilina-1.

Neptune et al. (2003) mostraram que um modelo animal para SMF, deficiente em fibrilina-1, apresentou um aumento na ativação e sinalização de TGF-β (Transforming Growth Factor-β, ou Fator de Crescimento Transformante-β), sugerindo que a MEC pode estar envolvida na regulação da atividade de citocinas, e que a perturbação desse processo pode contribuir para a patogênese da doença. Além disso, o mesmo grupo mostrou que a neutralização do TGF-β levou à reversão do fenótipo pulmonar presente no modelo animal.

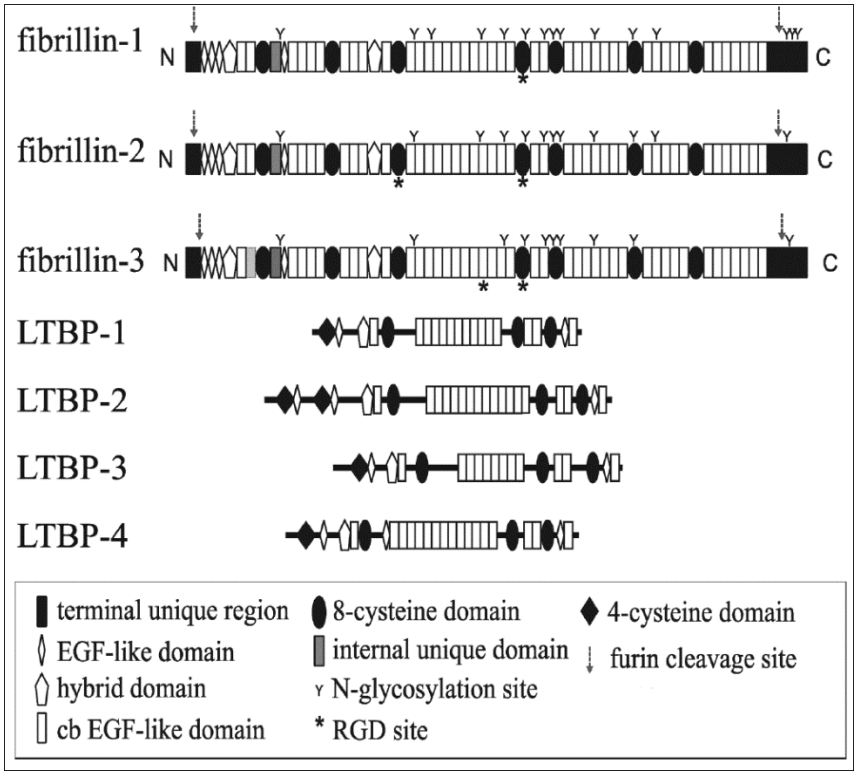

Figura 1 – Estrutura molecular das fibrilinas e LTBPs. Os domínios EGF-*like* e 8-cys são semelhantes entre essas duas famílias de proteínas, sugerindo uma interação estrutural entre elas. O domínio 8-cys é exclusivo dessas famílias (Sakai et al., 2016).

O TGF-β é uma citocina que está envolvida em diversos processos celulares como proliferação, controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose (Kaartinen et al., 2003). Esse fator é liberado das células como um complexo inativo (LLC, *Large Latent Complex,*) que consiste em dímeros de TGF-β associados a um propéptido de TGF-β (LAP, *Latency-Associated protein*) pelo domínio 8-cys, formando o complexo menor de latência (SLC, *Small Latent Complex*), o qual se liga covalentemente a uma LTBP (Saharinen et al., 1996; Annes et al., 2003; Kaartinen et al., 2003; Rifkin, 2005). A liberação e/ou ativação de TGF-β do LLC permite a sua ligação com seu receptor (Annes et al., 2003). As BMPs (Bone Morphogenetic Proteins, ou Proteínas Morfogênicas Ósseas), que são membros da família do TGF-β e que estão envolvidas na modelagem e remodelagem do tecido conectivo também se associam não covalentemente com as fibrilinas (Sengle et al., 2008). As fibrilinas ainda interagem com outras proteínas como as integrinas e HSPGs (Heparan Sulfate Proteoglycans, ou Proteoglicanos de Sulfato de Heparina) (revisto por Sakai et al., 2016).

Assim, mutações no gene *FBN1* poderiam levar a alterações estruturais na fibrilina-1, prejudicando sua interação com a LTBP-1 e, consequentemente, alterar a ativação de TGF- β. Mutações no gene da fibrilina-2 também levam à ativação do TGF-β, produzindo uma condição semelhante à SMF mas clinicamente distinta, a aracnodactilia congênita contractural (CCA, OMIM-121050; Putnam et al., 1995). Os fenótipos da SMF e da CCA, com suas sinalizações via TGF-β e BMP alteradas, mostram que as fibrilinas têm propriedades regulatórias diferentes apesar de formarem parte do mesmo agregado da MEC e de ambas se ligarem ao TGF-β e à BMP (Rifkin et al., 2010).

Embora ainda não seja possível fazer uma correlação precisa entre genótipo e fenótipo, mutações em determinadas regiões do gene parecem estar relacionadas com a gravidade da doença. Mutações descritas na região entre os exons 24 e 32 foram associadas à forma mais grave da doença, a forma neonatal de SMF (Robinson et al., 2000). Mutações descritas na região entre os exons 59 e 65 foram associadas à forma intermediária da doença (Palz et al., 2000). Porém essas associações não possuem valor preditivo da gravidade do fenótipo.

1.3 – O modelo murino mgΔ^{loxPneo} para a SMF

A utilização de modelos murinos (camundongos mutantes) tornou-se uma ferramenta essencial para o estudo de doenças genéticas e avaliação de possíveis terapias. No caso da SMF, diversos modelos já foram criados visando o estudo do mecanismo de patogênese da doença e como os diversos sistemas são afetados. Além disso, estudos também visam elucidar a função da proteína fibrilina-1 durante o desenvolvimento embrionário e a vida pós-natal (Tabela 1). Outros modelos animais com mutações no gene da *Fbn1* também foram desenvolvidos para estudar doenças como a síndrome de Weill-Marchesani, a síndrome da pele dura (Stiff Skin) e a escleroderma (Sengle et al., 2012; Gerber et al., 2013), mostrando que nem todas as mutações descritas no gene *Fbn1* estão associadas somente à SMF.

Tabela 1 - Modelos animais para a Síndrome de Marfan já descritos na literatura. Mutações no gene *Fbn1* levam a manifestações semelhantes às verificadas em humanos.

Modelo animal	Mutação	Fenótipo	Autor
mgΔ	Substituição dos exons 19 a 24 por um cassete de neomicina (*Neo*).	Heterozigotos são semelhantes aos selvagens. Homozigotos morrem antes do desmame. Expressão de 10% de *Fbn1* total.	Pereira et al., 1997.
mgR	Inserção do cassete *Neo* entre exons 18 e 19 no alelo selvagem.	Homozigotos apresentam cifose e anormalidades vasculares. Expressão de 20% de *Fbn1* 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.
mgΔ^{loxPneo}	Mesma mutação do mgΔ com a inserção de dois sítios loxP flanqueando o cassete *Neo*.	Heterozigotos apresentam cifose, complicações cardiovasculares e pulmonares. Homozigotos são inviáveis.	Lima et al., 2010.
C1039G	Mutação *missense* 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.
Tsk	Duplicação de grande região do gene *Fbn1* (região entre cbEGF7-cbEGF24 é duplicada depois de cbEGF24).	Heterozigotos apresentam manifestações cutâneas, ósseas, cardiovasculares e pulmonares. Homozigotos têm morte prematura.	Siracusa et al., 1996.

GT-8	Mutação gera proteína truncada ligada a GFP, que permite identificar direcionamento da proteína mutada.	Heterozigotos apresentam dilatação da aorta, mas expectativa de vida normal. Homozigotos têm morte prematura.	Charbonneau et al., 2010.
H1Δ	Deleção *in-frame* do exon 7, que codifica o primeiro domínio híbrido.	Heterozigotos e homozigotos têm expectativa de vida normal e não apresentam anormalidades na aorta e nas microfibrilas.	Charbonneau et al., 2010

Animais heterozigotos do modelo mgΔ^{loxPneo}, além de recapitular alguns dos sinais mais importantes da doença em humanos, apresentam a variabilidade fenotípica característica da SMF (Lima et al., 2010). O alelo *Fbn1* mgΔ^{loxPneo} caracteriza-se por uma deleção em fase dos exons 19 a 24, o que resulta na síntese de uma fibrilina-1 de tamanho reduzido (Lima et al., 2010).

O estudo do modelo mgΔ^{loxPneo} em duas linhagens de camundongos isogênicos diferentes, C57BL/6 (B6) e 129/Sv, mostrou que os animais mutantes de ambas as linhagens apresentaram deficiência na deposição de microfibrilas, cifose de coluna, enfisema pulmonar e degeneração da parede aórtica. Contudo, a idade de início dos sinais fenotípicos mostrou-se mais tardia em animais da linhagem B6 em comparação com os animais 129/Sv, indicando a presença de genes modificadores do fenótipo da SMF entre as duas linhagens. Além disso, ainda foi caracterizada uma grande variabilidade fenotípica entre os animais mutantes da linhagem 129/Sv, o que é sugestivo do envolvimento de fatores epigenéticos na gravidade da doença (Lima et al., 2010).

A análise detalhada da transcrição do gene *Fbn1* destes animais revelou que os animais B6, os quais não mostram variabilidade fenotípica, também são bastante homogêneos no que se refere aos níveis de transcrição do gene *Fbn1.* Esses animais apresentaram uma expressão de *Fbn1* total de 78% em relação aos animais selvagens. (Lima et al., 2010).

1.4 – Fibrilina-1 na regulação de TGF-β e metabolismo ósseo

Como apresentado anteriormente, as fibrilinas desenvolvem papel importante na regulação da ativação do TGF-β. Dentre todos os processos celulares que essa citocina está envolvida, o TGF-β é ainda um dos fatores de crescimento mais abundantes na matriz óssea, onde é produzido pelos osteoblastos na sua forma

latente, e é liberado durante a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Yang et al., 2013; Fournier et al., 2015).

Nistala et al. (2010 a e b) mostraram que as microfibrilas de fibrilina estão diretamente envolvidas na regulação da sinalização por TGF-β e BMP durante a diferenciação óssea, conduzindo à produção apropriada de osteoblastos e osteoclastos. As duas citocinas são abundantes na matriz óssea, exercendo efeitos opostos na maturação dos osteoblastos: enquanto a sinalização por BMP favorece a osteoblastogênese e a formação óssea, a sinalização por TGF-β favorece a reabsorção óssea ao promover a osteoclastogênese dependente de osteoblastos pela expressão de RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), fator que induz a formação de osteoclastos (Figura 2). Perturbações na fibrilina-1 aumentam as concentrações de TGF-β e BMP ativos. Nesta situação, apesar do aumento de BMP ativo acelerar levemente a maturação de osteoblastos, o aumento da sinalização por TGF-β aumenta a degradação da matriz óssea pelo aumento na produção de osteoclastos. Desta forma, acaba sendo favorecida a reabsorção óssea. Já perturbações na fibrilina-2 aumenta apenas os níveis de TGF-β ativo, levando a uma diminuição na maturação de osteoblastos e à produção elevada de osteoclastos, aumentando também a reabsorção óssea. Assim, a sinalização por BMP e TGF-β estão envolvidas diretamente no catabolismo e anabolismo ósseo (Rifkin et al., 2010).

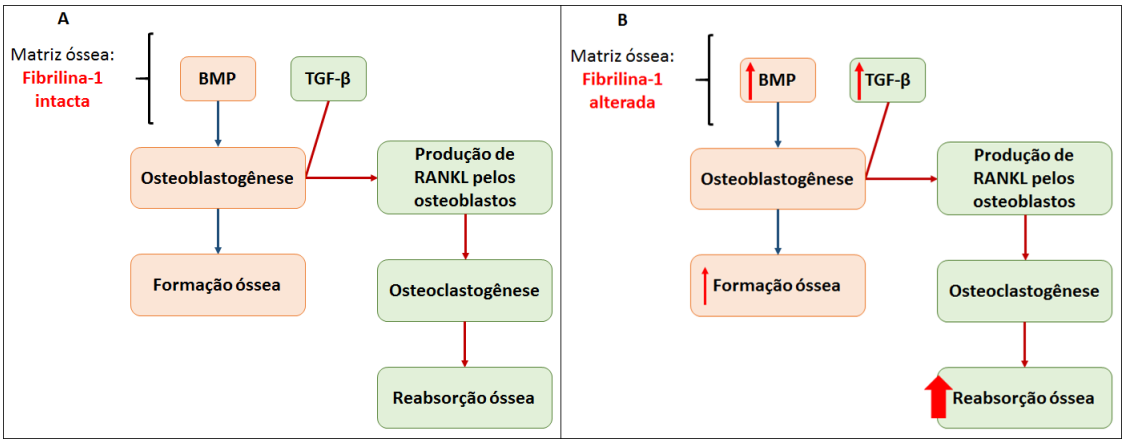

Figura 2 – Regulação do metabolismo ósseo controlada pelas BMPs e pelo TGF-β. (A) Matriz óssea contendo fibrilina-1 intacta, os níveis de BMP e TGF-β são normais, mantendo a formação e reabsorção óssea em equilíbrio. (B) Matriz óssea contendo fibrilina-1 alterada, a ativação de BMP e TGF-β se eleva, aumentando levemente a formação óssea e em maior proporção a reabsorção óssea.

Outras evidências do papel de TGF-β na fisiologia óssea foram descritas em modelos animais. A osteogênese imperfeita é uma doença genética de caráter autossômico dominante, causada por mutações no gene do colágeno tipo 1 (*COL1A1* ou *COL1A2*), ou recessivo, causada por mutação em genes envolvidos no maquinário de modificação pós-traducional do colágeno, como o gene *CRTAP* (Rauch et al., 2004; Morello et al., 2006). Essa proteína também é um componente da matriz extracelular de tecido conjuntivo e pode regular a função da matriz óssea e a atividade de TGF-β. Quando comparados com animais selvagens, o modelo murino com a mutação recessiva no gene *Crtap* apresentou expressão mais elevada de alvos de TGF-β, *Cdkn1a* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a) e *Serpine 1* (plasminogen activator inhibitor-1, ou PAI-1), consistente com a elevada sinalização do fator de crescimento. Além disso, essa sinalização encontra-se elevada nos ossos desses animais, gerando uma redução da massa óssea e anormalidades no osso trabecular (Grafe et al., 2014).

Mohammad et al. (2009) realizaram experimentos bloqueando farmacologicamente a sinalização do TGF-β com a droga SD-208, inibidor do receptor tipo 1 de TGF-β (TβRI) quinase, em modelo animal. O grupo relatou que essa inibição aumenta a densidade mineral óssea (BMD, do inglês, *bone mineral density*) através de um aumento do volume de osso trabecular de fêmur e tíbia. Além disso, relataram que houve um aumento do número de osteoblastos e uma diminuição do número de osteoclastos, sugerindo que a inibição de TGF-β aumenta a massa óssea através do aumento da formação de osso e diminuição da reabsorção do mesmo.

Outro estudo utilizando modelo animal para mieloma múltiplo, tipo de câncer onde pacientes frequentemente apresentam tumores induzidos pela degeneração óssea, verificou que a sinalização por TGF-β pode contribuir para o desenvolvimento desses tumores (Nyman et al., 2016). Os pesquisadores inibiram essa sinalização de TGF-β com anticorpos na presença ou ausência de droga anti-mieloma, Bortezomid. O resultado da inibição do TGF-β somente foi favorável para os parâmetros trabeculares ósseos pelo aumento no número de osteoblastos, porém não conseguiu diminuir a progressão do tumor. Já o tratamento com inibidor de TGF-β e Bortezomid conseguiu diminuir a força tumoral (Nyman et al., 2016).

Sabe-se ainda que o TGF-β também está envolvido no desenvolvimento do câncer de próstata e na progressão de metástase para os ossos. Na análise *in vitro*

realizada em células humanas de câncer de próstata, o inibidor de TGF-β, SD-208, foi capaz de controlar a expressão de genes alvos de TGF-β que promovem a metástase óssea. Já no modelo animal, o SD-208 diminuiu a área de osteólise em 47% quando comparado ao animal selvagem (Fournier et al., 2015).

Assim, pode-se considerar que o TGF-β tem um papel crucial no metabolismo ósseo e que a sua desregulação, como vista na SMF, pode levar a alterações no desenvolvimento e remodelamento dos ossos. Assim, tratamentos e estratégias terapêuticas que envolvam a inibição dessa citocina podem ser efetivos na melhora das manifestações esqueléticas encontradas em pacientes de doenças caracterizadas pela fragilidade e baixa massa óssea, como é frequentemente verificado em portadores da SMF.

1.5 – O Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (RAS) é uma cascata hormonal e tem como produto principal a Angiotensina II (Ang-II) circulante, que está envolvida na regulação global da atividade simpática, da pressão sanguínea e também do balanço de fluidos e eletrólitos no organismo (Fleming, 2006; revisto por Namazi et al., 2011).

No RAS endócrino clássico, o angiotensinogênio produzido no fígado é sequencialmente clivado por peptidases para formar o octapeptídeo biologicamente ativo Ang-II. A Renina, produzida pelo sistema justaglomerular do rim e secretada na circulação, cliva o angiotensinogênio para angiotensina I (Ang-I), e assim este é clivado pela ACE (*Angiotensin-converting enzyme*) para gerar Ang-II (Asaba et al., 2009; Gu et al, 2012) (Figura 3).

A Ang-II age pela sua ligação com seus receptores específicos AT-1 e AT-2 (Figura 3), classificados pelas suas diferentes afinidades a vários antagonistas não-peptídicos. Ambos os receptores são de superfície celular e pertencem à mesma família dos receptores acoplados à proteína-G, apesar de suas vias de atuação serem completamente diferentes e terem sinais aparentemente opostos. A sinalização pelo receptor AT-1 está envolvida nas respostas vasoconstritoras, retenção de sódio e água e ação pró-inflamatória. Enquanto isso, a sinalização pelo receptor AT-2 parece estar envolvida na vasodilatação, excreção de sódio e ação anti-inflamatória (Lavoie et al., 2003; revisado por Ramalingan et al., 2016).

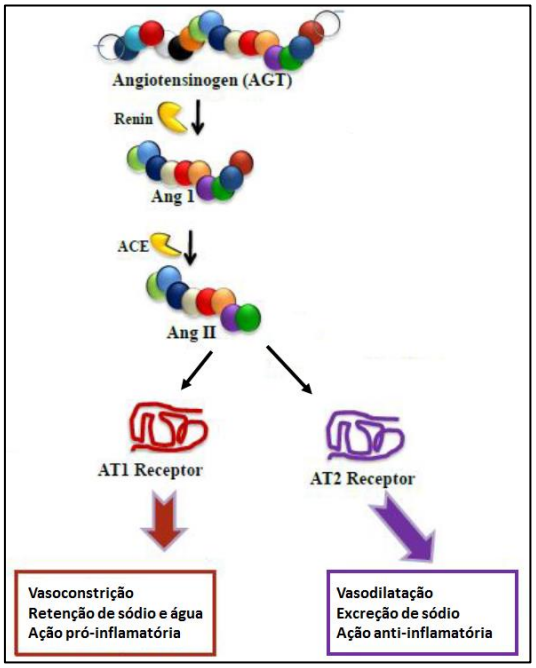

Figura 3 – O Sistema Renina Angiotensina (RAS). A renina cliva o angiotensinogênio em Ang-I e, em seguida, este é clivado em Ang-II, que age pelos seus receptores AT-1 e AT-2. A sinalização por AT-1 é oposta à sinalização por AT-2 (modificado de Ramalingam et al, 2016).

Estudos mostram que existe também um RAS que age localmente em tecidos que têm a capacidade de geração e ação da Ang-II. Esse RAS parácrino é fisiologicamente ativo em muitos tecidos, o que indica uma grande importância do tecido e da via parácrina para geração e ação da Ang-II. O funcionamento do RAS endócrino e parácrino simultaneamente é que cria a extrema complexidade do sistema e mostra que apesar de muitos anos de estudo, ainda há muito a se descobrir (revisto por Lavoie et al., 2003).

1.6– O RAS e o Fenótipo ósseo

A manutenção da massa óssea e do cálcio sanguíneo é mantida por sinais sistêmicos como o hormônio paratireóide (PTH) e a vitamina C. Além desses sinais, os níveis de massa óssea também são determinados pelo controle nervoso das atividades simpáticas na formação e reabsorção óssea (Izu et al., 2009). Estudos *in vivo* mostram que componentes do RAS como renina, ACE e receptores de Ang-II são expressos no osso, enquanto estudos *in vitro* mostram que osteoblastos primários apresentam receptores de angiotensina (Izu et al., 2009; Asaba et al.,

2009; Gu et al., 2012), que relaciona o RAS local às atividades simpáticas na regulação da massa óssea.

Hagiwara et al. (1998) mostraram que a Ang-II diminui o nível de mRNA para osteocalcina, um marcador bem conhecido para diferenciação osteoblástica. Os autores mostraram que a Ang-II diminui a taxa de formação de nódulos mineralizados e a precipitação de cálcio pelos osteoblastos em um modelo de formação óssea *in vitro*. Tais resultados fornecem evidências de que a Ang-II desacelera a diferenciação e mineralização de células osteoblásticas. Izu et al. (2009) demonstraram que o bloqueio de receptor AT2 da Ang-II aumenta a massa óssea em ratos adultos, baseado nos efeitos dos bloqueadores do receptor AT2 de aumentar a formação óssea e suprimir a sua reabsorção.

Outro estudo utilizando o modelo animal THM (*Tsukuba hypertensive mouse*), que apresenta uma produção elevada de Ang-II e consequente hipertensão, verificou que esses animais desenvolvem osteopenia devido a uma elevada reabsorção óssea (Asaba et al., 2009). Foi verificada também uma maior atividade dos osteoblastos, sem alteração no número dessas células, indicando que essas células são alvos da Ang-II no osso. Pela análise *in vitro*, essa maior atividade demonstrou ter influência na diferenciação de osteclastos através do aumento da expressão de RANKL, que induz a osteoclastogênese (Asaba et al., 2009).

Gu et al. (2012) compararam animais de 2 e 12 meses para verificar se o RAS ósseo estaria envolvido com a osteoporose ocasionada pelo envelhecimento. O grupo verificou que os animais de 12 meses apresentam uma pior qualidade óssea quando comparados aos animais mais jovens. Essa piora é acompanhada por um aumento da expressão de catepsina K (marcador de atividade de osteoclastos), renina, angiotensinogênio e Ang-II em fêmur e tíbia. Além disso, verificaram que a expressão de Runx2 e Fosfatase Alcalina, marcadores de osteoblastos, não estavam diferentes entre os animais de 2 e 12 meses. Assim, pode-se sugerir que o aumento da atividade do RAS está envolvido com a deterioração óssea ocasionada pelo envelhecimento, indicando que tratamentos que inibam esse sistema podem ser efetivos contra osteoporose em idosos.

Já que o RAS também tem um papel importante na regulação da pressão sanguínea, ele é alvo de estudos com drogas anti-hipertensivas que podem ter consequente influência no metabolismo ósseo (Liu et al., 2011). Assim, desordens

na ativação do RAS não só induzem a hipertensão como também a osteopenia com deterioração microestrutural, reminiscente de osteoporose, sugerindo que a ativação anormal do RAS pode contribuir com a ocorrência simultânea de doenças hipertensivas e ósseas. Dessa forma, terapias que inibam componentes dessa via podem ser efetivas para a melhora de ambas as manifestações cardíacas e esqueléticas na SMF e doenças relacionadas.

1.7 – Utilização de fármacos no tratamento da SMF

Baseados na função moduladora dos níveis de TGF-β ativo na MEC da fibrilina-1, novas estratégias terapêuticas para a SMF foram testadas visando diminuir a atividade desta citosina *in vivo*. Em diferentes doenças e processos celulares, a angiotensina II tem um papel regulatório sobre a expressão de TGF-β, o qual pode mediar algumas respostas à Ang-II. Drogas inibidoras da ACE (ACEi) e antagonistas de AT-1 (*Angiotensin II receptor blockers*, ou ARBs) diminuem a expressão de TGF-β, assim como o bloqueio de TGF-β diminui a produção de Ang-II na matriz extracelular (Border et al., 1998; Ruiz-Ortega et al., 2003; Rodriguez-Vita et al., 2005). A administração de uma droga antagonista de AT-1, Losartan, em um modelo murino para SMF foi capaz de diminuir a atividade de TGF-β (Figura 4), resultando em reversão dos fenótipos pulmonar e aórtico desses animais (Habashi et al., 2006; Habashi et al., 2011). Ainda assim, essa droga não mostrou efeito na melhora do fenótipo ósseo em um modelo animal da SMF (Nistala et al., 2010 c).

Porém, outros estudos mostraram que a utilização do Losartan pode afetar o metabolismo ósseo. No trabalho de Chen et al. (2015) animais selvagens foram tratados com a droga desde o nascimento até 6 semanas de idade, com o intuito de analisar o efeito dessa droga no desenvolvimento da estrutura óssea. Foi verificado que os animais tratados apresentaram um aumento da massa óssea, tanto cortical quanto trabecular, ocasionado pela diminuição no número de osteoclastos e consequente menor reabsorção óssea.

Devido aos problemas vasculares agudos presentes em pacientes portadores da SMF, como principalmente o rompimento da artéria aorta, um dos tratamentos mais utilizados para a síndrome baseia-se na administração de drogas anti-hipertensivas. Em geral tais drogas reduzem a rigidez das paredes arteriais por ação passiva, diminuindo a pressão arterial. Pesquisas recentes vêm demonstrando que algumas das drogas mais utilizadas, em particular as ACEi (Figura 4), podem ter um

efeito adicional sobre a constituição da parede arterial, o que pode contribuir na redução da sua rigidez (Ahimastos et al., 2005). Dentre essas drogas, encontramos o Ramipril.

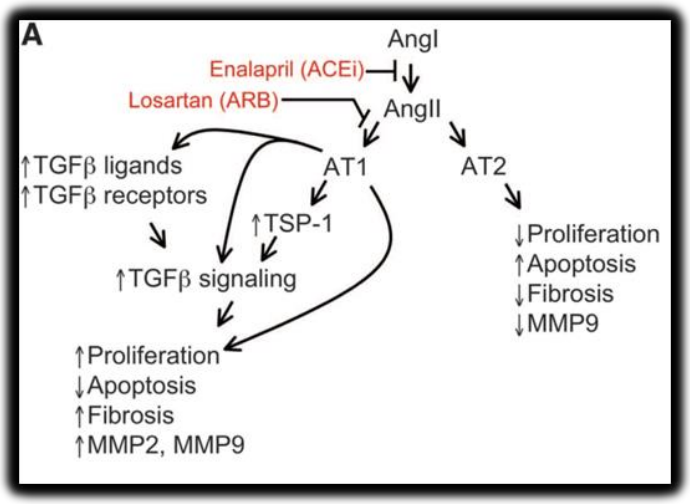

Figura 4 - O Sistema Renina Angiotensina e os locais de ação do Enalapril (Ramipril) e do Losartan. O Ramipril é um inibidor da ECA, enquanto o Losartan é um antagonista do receptor AT1 (Habashi et al., 2011).

Ahimastos et al. (2005) descreveram que a droga Ramipril parece ter grande influência na estrutura das paredes arteriais. Nesse estudo os pesquisadores demonstraram que células humanas de músculo liso tratadas em cultura com Ramipril apresentam um decréscimo na deposição de colágeno da ordem de 50%, assim como um aumento na deposição de elastina e fibrilina-1 da ordem de três vezes e quatro vezes, respectivamente. Além disso, a droga leva a uma redução da transcrição dos genes MMP-2 e MMP-3, que codificam as metaloproteinases 2 e 3, envolvidas na degradação de proteínas da MEC (Booms et al., 2000). Os mecanismos relacionados com essas variações de expressão permanecem desconhecidos.

Enquanto isso, em pesquisa clínica, Choi et al. (2016) realizaram um estudo de longo prazo em humanos tratados com inibidores do RAS com o intuito de analisar os efeitos dessas drogas em pacientes com espasmos da artéria coronária. Eles relataram que após 5 anos de tratamento, o grupo que teve o RAS inibido apresentou menor incidência de acidentes cardiovasculares, além de ter diminuído o

risco de maiores complicações do sistema cardiovascular em grupos de risco como idosos, mulheres, hipertensos, diabéticos, entre outros.

Pacientes com doença crônica dos rins, principalmente aqueles que necessitam de diálise, têm baixa taxa de sobrevivência e um alto risco de desenvolver doenças cardiovasculares por consequência da hipertensão. Assim, para controlar a pressão sanguínea, esses pacientes fazem uso de ACEi e ARBs. É comum que esses pacientes também apresentem desordens metabólicas ósseas e de minerais, que contribuem para o aumento de risco de fraturas de osso. O tratamento com ACEi e ARBs mostrou diminuir em 35% o risco de hospitalização devido a fraturas em pacientes com hiperparatiroidismo secundário e em hemodiálise (Yamamoto et al., 2015). Além disso, Nakagami et al. (2013) mostraram que ACEi é capaz de aumentar a densidade óssea e diminuir o risco de fraturas em pacientes hipertensivos com osteoporose.

1.8 – Ramipril e o modelo murino mgΔ^{loxPneo}

Em um experimento piloto realizado pelo grupo da Profª Lygia Pereira, foram avaliados os efeitos do Ramipril sobre o fenótipo da SMF no modelo mgΔ^{loxPneo}. Animais mutantes de 2 meses de idade pertencentes à linhagem B6 foram tratados com Ramipril durante 16 semanas, por via oral, numa dose equivalente à administrada em humanos. Após esse período, os efeitos da droga sobre a transcrição do gene *Fbn1* foram avaliados mediante PCR em tempo real.

Os animais mutantes tratados com a droga apresentaram um aumento significativo de aproximadamente 35% da expressão do alelo selvagem de *Fbn1*, quando comparados ao grupo controle não tratado (Figura 5).

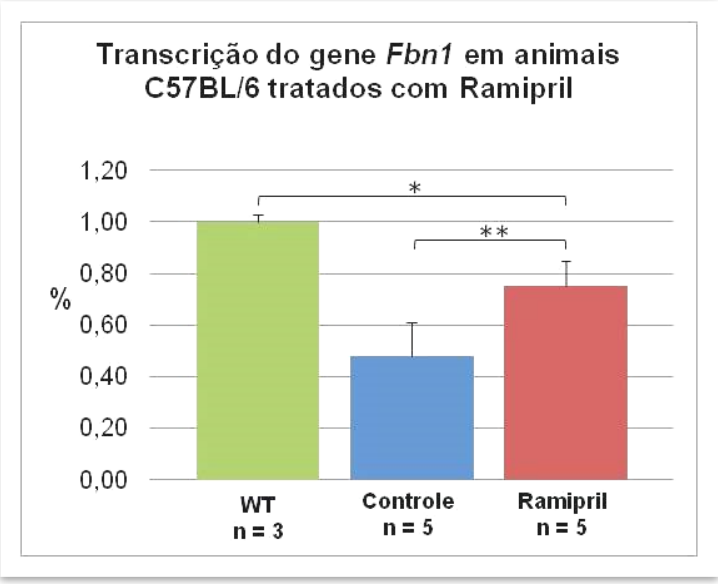

Figura 5 - Efeito de Ramipril na expressão de *Fbn1* selvagem no modelo animal da SMF. Gráfico comparativo da transcrição do gene *Fbn1* em animais C57/B6 selvagens (WT), heterozigotos sem tratamento (Controle) e heterozigotos tratados com a droga Ramipril (*p > 0,05; **p=0,016). (n) Número de animais por grupo.

Os animais tratados com Ramipril apresentaram ainda uma melhora do quadro de enfisema pulmonar e da espessura da aorta quando tratados com esse medicamento, porém seu efeito no sistema pulmonar foi menor do que aquele obtido pelo tratamento com Losartan (Figura 6).

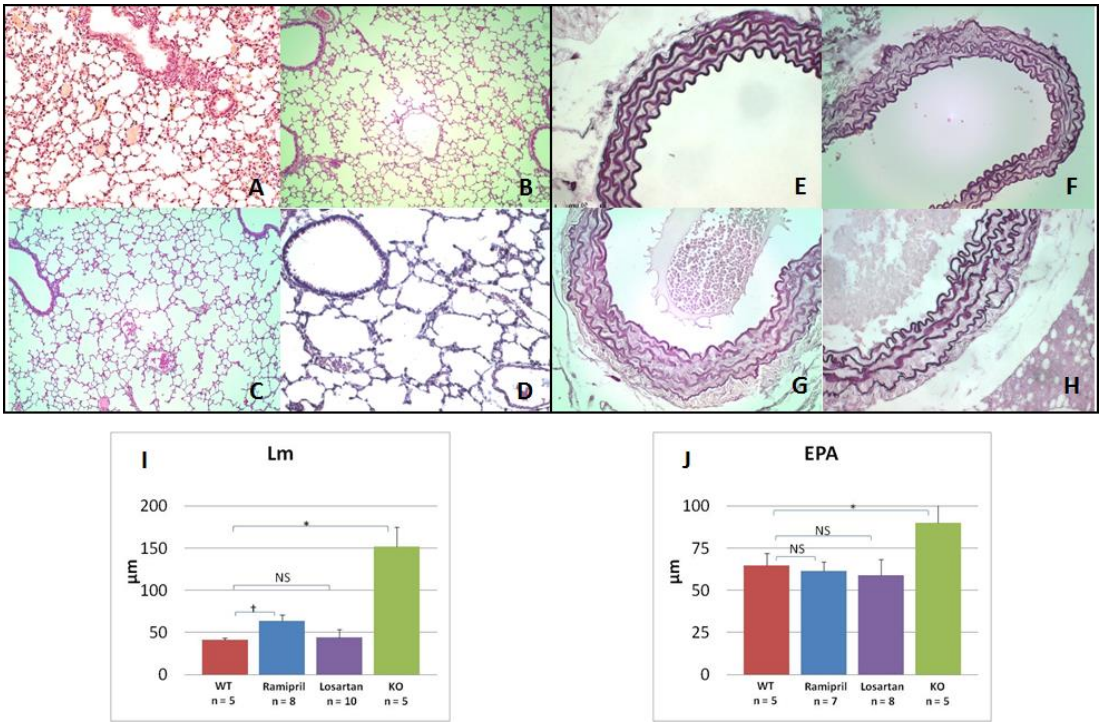

Figura 6 – Comparação histopatológica do tecido pulmonar (A-D) e da espessura da aorta (E-H) em animais C57/B6. (A e E) Animais selvagens controles. (B e F) Animais mgΔ^{loxPneo} tratados com Losartan. (C e G) Animais mgΔ^{loxPneo} tratados com Ramipril. (D e H) Animais mgΔ^{loxPneo} sem tratamento. (I e J) Análise estatística dos resultados histopatológicos de animais selvagens (WT), mutantes tradados com Ramipril, mutantes tratados com Losartan e mutantes não tratados (KO). (I) Comparação do diâmetro alveolar médio (Lm) (*= 0,0061,†= 0,0029). (J) Comparação da espessura da parede da aorta (EPA) (*= 0,018). NS= Não Significativo.

Além disso, o tratamento com Ramipril foi capaz de melhorar o grau de cifose dos animais mgΔ^{loxPneo}, enquanto que o tratamento com Losartan não mostrou ser efetivo para esse fenótipo (Figura 7). O fato das alterações dos sistemas ósseo, pulmonar e cardiovascular não terem apresentado a mesma resposta, mostra que diferentes mecanismos patogênicos devem atuar nos sistemas afetados e, apesar do Ramipril e o Losartan atuarem na mesma via do RAS, possuem mecanismos de ação diferentes no sistema ósseo.

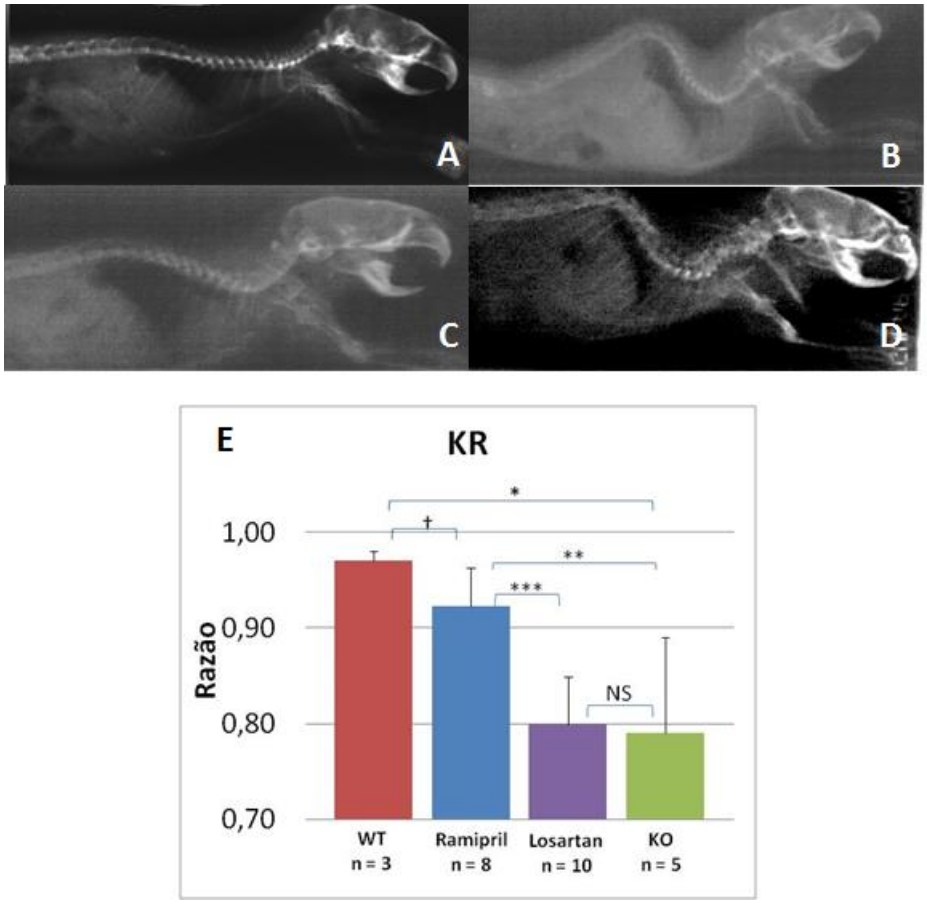

Figura 7 - Análise do efeito do tratamento com Ramipril e Losartan em animais C57/B6. (A-D) Análise radiográfica. (A) Animal selvagem. (B) Animal mgΔ^{loxPneo} tratado com Losartan. (C) Animal mgΔ^{loxPneo} tratado com Ramipril; (D) Animal mgΔ^{loxPneo} sem tratamento. (E) Análise estatística dos resultados radiográficos de animais selvagens (WT), mutantes tradados com Ramipril, mutantes tratados com Losartan e mutantes não tratados (KO) (*= 0,017, **= 0,0026, *= 0,0051, †= 0,0095, NC= não significativo). KR (Kyphosis Ratio) é a razão entre a distância linear das extremidades do segmento cervico-torácico e o comprimento deste mesmo segmento. (n) Número de animais por grupo.**

Assim, outros mecanismos podem estar envolvidos na melhora fenotípica obtida mediante o tratamento com Ramipril. Alguns autores sugerem outros mecanismos de ação para a Ang- II, além de promover a síntese do TGF-β. O efeito dos ACEi vai além do bloqueio da síntese da Ang-II: esses fármacos também inibem a degradação da bradicinina (BK) pela Ang-II. Como resultado, a biodisponibilidade da BK aumenta, permitindo a ativação de seus receptores (Buléon et al., 2008).

A BK faz parte de uma família de pequenos peptídeos, as cininas, que são derivados de cascatas metabólicas endógenas e têm ação na homeostase cardiovascular, inflamação e podem causar hiperalgesia. A BK é um nonapeptídeo que atua através de 2 receptores acoplados a proteína G, denominados B1R e B2R. Enquanto o receptor B2R é ativado diretamente pela BK ou pela kallidina, peptídeo

semelhante à BK contendo um aminoácido a mais (Lys1-BK), o receptor B1R se liga apenas a metabólitos da BK ou da kallidina que não possuem a arginina C-terminal. A ativação do B2R induz ações fisiológicas que se opõem às da Ang-II, assim a BK possui atividade hipotensiva, enquanto a Ang-II tem ações hipertensivas (Brechter et al., 2008; Buléon et al., 2008, Erdös et al., 2010).

Existe um debate sobre se o efeito terapêutico dos ACEi se deve ao bloqueio da liberação da Ang-II ou à prolongação da vida média da BK. Ainda, Erdös et al. (2010) propõem que os ACEi são também estimuladores alostéricos dos receptores B1R e B2R, por mecanismos diferentes. No caso do receptor B1R, os autores propõem ligação direta dos ACEi, como o Ramipril, ao receptor. Já para o receptor B2R, os autores propõem uma ligação indireta, através da associação com a ACE. Nas células, a ACE se associa ao receptor B2R formando um heterodímero na membrana celular. A ligação do ACEi à ACE induz uma mudança alostérica na ACE, que estimula o receptor B2R (Figura 8).

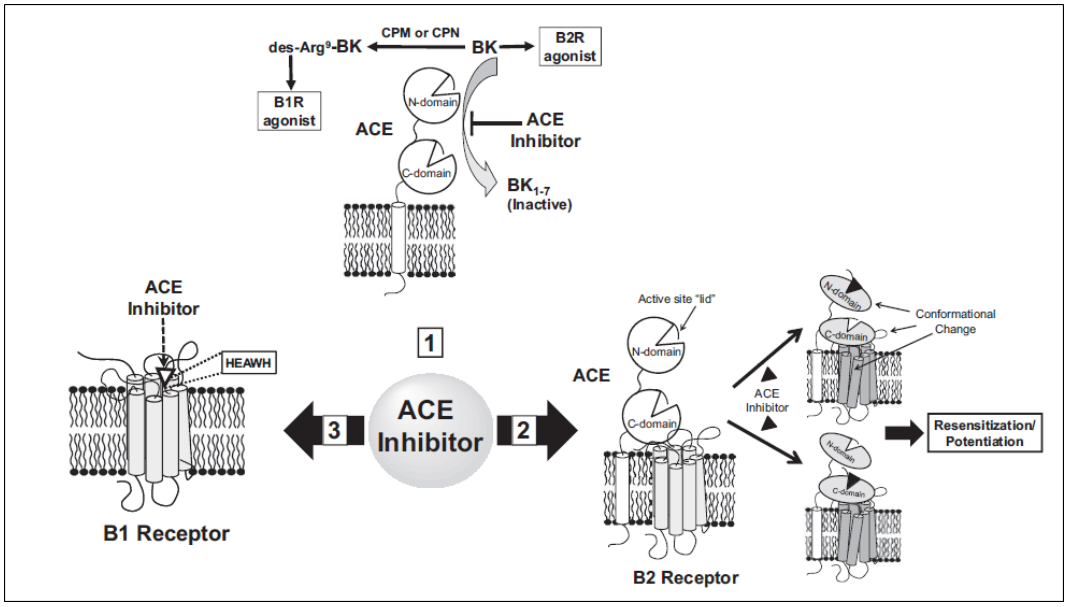

Figura 8 – Possíveis mecanismos de ação dos ACEi no aumento da sinalização de BK. (1) ACEi inibe a degradação de agonistas do receptor B2R, como a BK e a kallidina, aumentando a sinalização por esse receptor. Prolongando a meia-vida dessas cininas, aumenta a quantidade de substrato para ação de carboxipeptidases gerando metabólitos des-Arg-BK, agonistas do receptor B1R. (2) ACE e B2R formam heterodímeros nas membranas celulares. A ACEi pode se ligar tanto ao domínio N ou C da ACE, levando a mudança conformacional do outro domínio e vice-versa. A transmissão de mudança conformacional de ACE para o receptor B2R é via domínio C, o que faz o receptor potencializar sua sinalização ou se resensibilizar. (3) ACEi é um agonista alostérico direto do receptor B1R (Erdös et al., 2010).

Assim, o efeito terapêutico do Ramipril no fenótipo ósseo dos camundongos do modelo mgΔ^{loxPneo} pode ir além do aumento da expressão do gene *Fbn1*, e pode também estar vinculado ao aumento da sinalização pelos receptores de BK, tanto por aumento na biodisponibilidade da BK ou pela ação direta desse fármaco nesses receptores. A participação dos receptores da BK no metabolismo ósseo já foi mostrada em modelo murino, onde a falta de ambos os receptores de BK resulta numa severa redução da densidade óssea (Kakoki et al., 2010).

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Compreender os mecanismos da patogênese óssea dos animais do modelo mgΔ^{loxPneo} para a Síndrome de Marfan.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Avaliar a estrutura óssea dos animais mgΔ^{loxPneo} e verificar qual o efeito do tratamento com Ramipril nestses animais.

2. Testar a hipótese de que a sinalização pelo receptor B2R da Bradicinina possa estar envolvida no desenvolvimento do fenótipo ósseo dos animais mgΔ^{loxPneo}.

3. Identificar vias de sinalização alteradas no tecido ósseo no modelo murino para a SMF.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e mutantes pertencentes à linhagem mgΔ^{loxPneo}, gerados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, sob condições controladas de luz e temperatura, e em ambiente livre de agentes potencialmente patogênicos. Os animais do modelo mgΔ^{loxPneo} e knockout para o receptor B2R de bradicinina foram gerados em colaboração com o Prof. João Bosco Pesqueiro, do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP, com protocolo 203/2014 (Anexo A).

3.2 – Extração de DNA de cauda

Para realização da extração de DNA, foram utilizadas amostras das caudas dos animais, mantidas a -20ºC até que fossem processadas. Foi utilizado um tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5mM EDTA pH 8.0, 0,2% SDS, 200mM NaCl) que foi suplementado com 0,2 µg/ml de proteinase-K no volume de solução, adicionados no momento do procedimento. Foram adicionados 500 µl dessa solução de lise a cada amostra, e em seguida, as mesmas foram incubadas a 55ºC por 16 horas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (TA) e 450 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado 1 volume (450 µl) de isopropanol, homogeneizando as amostras por inversão. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi descartado por inversão. As amostras foram incubadas a 55ºC até que o pellet estivesse totalmente seco. Finalmente, o DNA obtido foi ressuspendido em 50 µl de H_2O milliQ e conservado a -20ºC.

3.3 – Genotipagem dos animais

Os animais do modelo mgΔ^{loxPneo} foram genotipados através da realização de duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação da presença do alelo *Fbn1 mgΔ^{loxPneo}* e do alelo selvagem do gene da Fibrilina-1.

Oligonucleotídeos para amplificação do alelo *Fbn1 mgΔ^{loxPneo}* (433bp; Tm 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; Tm 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 deionizada 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%.

No caso dos animais do modelo mgΔ^{loxPneo} *knockout* para o receptor B2R de bradicinina, a genotipagem foi realizada da seguinte maneira:

Para determinar o genótipo para o gene do receptor B2, os oligonucleotídeos utilizados foram:

- oIMR013: 5’ – CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC – 3’
- oIMR014: 5’ – AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC – 3’

Esses oligonucleotídeos detectam a presença do gene mutante do receptor B2R, ao amplificar um fragmento de 280 pb da sequência do gene de neomicina utilizado para modificar o alelo selvagem.

- oIMR434: 5’ – TGT CCT CAG CGT GTT CTT CC – 3’
- oIMR435: 5’ – GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG – 3’

Esses oligonucleotídeos amplificam uma banda de 361 pb correspondente ao gene selvagem do receptor B2R de bradicinina.

A reação com os oligonucleotídeos oIMR é realizada em formato multiplex, nas seguintes condições de amplificação: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 3 minutos. Etapa 2 (12 ciclos) – 94°C x 35 segundos; 64°C x 45 segundos (-0,5°C por ciclo); 72°C x 45 segundos. Etapa 3 (25 ciclos) – 94°C x 35 segundos; 58°C x 30 segundos; 72°C x 45 segundos. Etapa 4 (1 ciclo) – 72°C x 2 minutos.

Para a determinação do genótipo para *Fbn1*, no caso do alelo selvagem foram utilizados os oligonucleotídeos 20F e CC-R como descrito acima. A detecção do alelo mgΔ^{loxPneo} foi realizada com os oligonucleotídeos LOX (771 pb, Tm 62°C):

- LOX5: 5’ – ACA ACC TTT AAT GAA GGA AGA ATC C – 3’
- LOX6: 5’ – TAA TCA TGG TCA TAG CTG TTT CCT G – 3’

Condições de amplificação: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C x 3 minutos. Etapa 2 (40 ciclos) – 94°C x 1 minuto; 62°C x 30 segundos; 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 deionizada 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%.

3.4 – Administração de Ramipril

Animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} e selvagens receberam a droga Ramipril por via oral, durante um período de 24 semanas. A droga foi diluída em uma razão de 5

mg/litro em água e diariamente oferecida aos animais de forma livre. Grupos de animais da linhagem mg$\Delta^{loxPneo}$ e selvagens sem tratamento foram usados como controle e utilizados para comparação de efeitos da droga.

Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados, e amostras teciduais de pulmão, aorta e osso foram coletadas para análise.

3.5 – Análises histológicas

Amostras de pulmão e aorta dos animais foram submetidas às técnicas rotineiras de fixação, desidratação, diafanização, inclusão em parafina e microtomia (Andrikopoulos et al., 1995). Cortes medindo 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (HE), e cortes adjacentes passaram por coloração de Weigert, específica para a visualização de fibras elásticas. Em seguida, os cortes foram examinados utilizando-se o microscópio *Nikon Eclipse E200* e fotografados pela câmera de microscópio *Lumenera INFINITY 1* com auxílio do *software INFINITY ANALYZE* (Lumenera, versão 6.4).

Para análise do fenótipo cardiovascular, as amostras de aorta foram fotografadas em ampliações de 20x, para medição, e 40x, para caracterização. Foram realizadas 10 mensurações da espessura da parede da aorta de cada animal, com o auxílio do *software NIS-Elements* (Nikon, versão 3.22.00). A medida se deu entre a lâmina interna e a lâmina externa da parede. Em seguida, foi obtida a média das medidas para cada animal e, assim, a média por grupo. A espessura da aorta tende a ser maior quando há fragmentação das lâminas da parede do vaso, indicando maior fragilidade a rupturas.

Já para o fenótipo pulmonar, foram obtidas 7 fotos no aumento de 40x representando toda a superfície do corte. Para o cálculo, foram selecionadas as 3 fotos com confluência alveolar medianas, excluindo-se as duas mais confluentes e as duas menos confluentes. O tamanho dos espaços aéreos alveolares foi avaliado pela mensuração do diâmetro alveolar médio pulmonar (Lm) como previamente descrito (Dunnill, 1962), de cada uma das 3 fotos, também utilizando o *software NIS-Elements*. Assim, quanto maior o Lm, menor a capacidade de trocas gasosas. Ao fim, foi obtida a média de Lm por animal e, em seguida, a média por grupo.

3.6 – Análise radiográfica

Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (0,6% e 0,08% respectivamente em PBS) 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 unidos e distendidos para que a imagem fosse tirada na posição lateral. A obtenção das imagens com os camundongos nessa posição permitiu avaliar o grau de cifose dos animais. Posteriormente foram expostos a 4,0 Kv de raio-x durante o período de 60 segundos.

Para quantificar o desvio de coluna, foi utilizado o software *NIS-Elements* (Nikon, versão 3.22.00) e calculado o índice KI descrito por Laws et al. (2004) (Figura 9), que 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 90º. Portanto, quanto menor for o índice KI, maior a gravidade da cifose. Os animais foram separados em grupos genotípicos e por sexo, foram calculadas as respectivas médias e desvios padrões para serem plotados em gráficos e comparados.

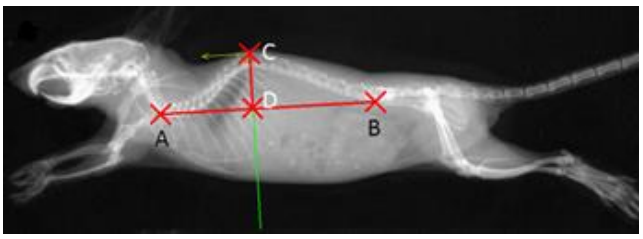

Figura 9 – Medição da cifose dos animais utilizando o índice KI. Esquema da medição KI, mostrando as medidas utilizadas no cálculo do índice, através da razão AB/CD.

3.7 – Microtomografia computadorizada (µCT)

Após a obtenção das imagens radiográficas, os animais foram sacrificados e, durante o procedimento, retirados os fêmures direitos e vértebras L4 para análise por microtomografia computadorizada (µCT). Para tanto foi utilizado o aparelho *SkyScan 1174v2, SkyScan, Aartselaar, Belgium*, onde os ossos sofreram rotação de

180º. Os parâmetros de raio-x foram normalizados a 100 kV com exposição de 4500 ms. Um filtro de alumínio com espessura de 0,5 mm foi utilizado para minimizar o aparecimento de ruído nas imagens. O *software* CTNrecon versão 1.6.8 (SkyScan) foi utilizado para reconstrução das imagens, o CTAn versão 1.12 (SkyScan) para análise das imagens e o CT-Vol versão 2.2.2.2 (SkyScan), para obtenção das imagens em 3D.

A região de interesse dos fêmures foi padronizada de acordo com o comprimento do osso, que foi medido três vezes com o auxílio de um paquímetro e o valor utilizado foi a média dessas medidas. Para análise de osso trabecular, inicialmente, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais. Em seguida, o comprimento do quarto distal foi dividido por 1,5, em que a parte proximal desta divisão foi selecionada para análise (Figura 10A). Esse procedimento teve o intuito de excluir a lâmina epifisial das análises, uma vez que a ossificação longitudinal é feita nesta região e o objetivo principal desta etapa foi avaliar o volume de tecido já ossificado.

Já para o osso cortical, o comprimento dos fêmures foi dividido em metades proximal e distal, esta última sendo subdividida em quatro partes iguais. O segundo quarto proximal foi selecionado para análise (ROI, região de interesse), e obtenção de parâmetros 2D desejados (Figura 10B). A Figura 10C mostra os cortes transversais das imagens de µCT utilizados para a seleção de regiões trabeculares e corticais dos fêmures.

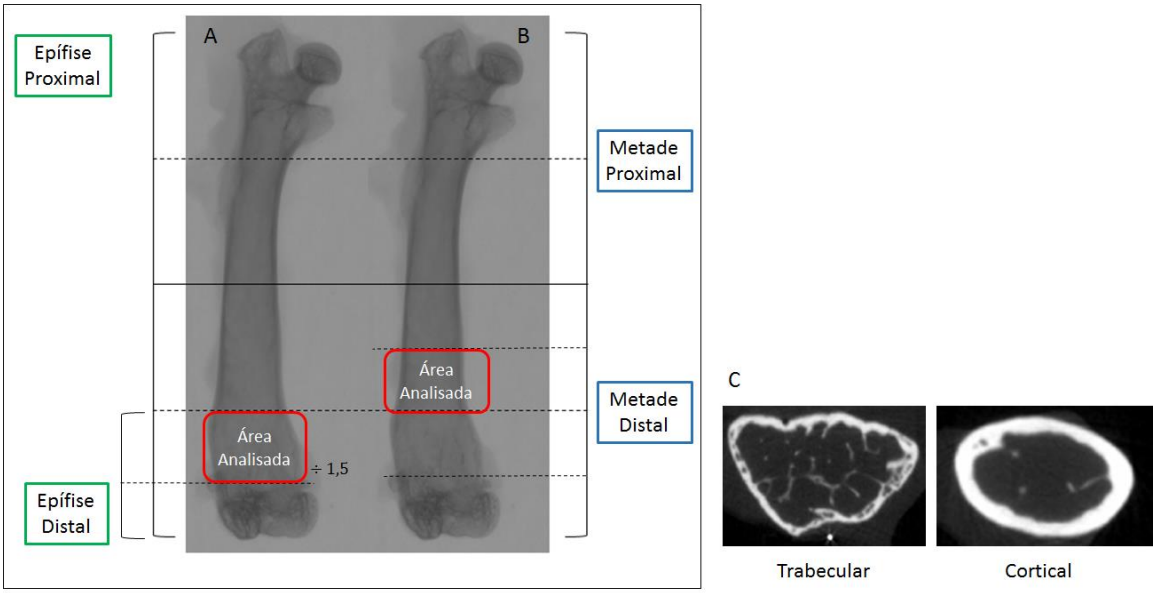

Figura 10 – Regiões analisadas para obtenção de parâmetros trabeculares (A) e corticais (B) nos fêmures de camundongos. (C) Imagem transversal das regiões analisadas para osso trabecular e cortical de fêmures.

Nas vértebras a região analisada foi o corpo da vértebra. Para análise da estrutura trabecular, foi desenhada uma elipse de tamanho específico para cada amostra, obtida através de cálculo baseado nas medidas ântero-posterior e latero-lateral do osso. Em seguida, foi analisado todo o conteúdo trabecular da região interna da elipse, considerando todos os cortes transversais de uma ROI delimitada pelas lâminas epifisiais superior e inferior (Figura 11A-1).

Já a região de interesse analisada para a estrutura cortical das vértebras foi determinada tomando-se a lâmina epifisial como limite inferior. Em seguida, foi calculada uma ROI específica para cada amostra, onde o número de cortes analisados foi determinado comparando a altura de cada vértebra à de uma vértebra padrão com uma ROI de 45 cortes transversais, efetuando-se uma regra de três. Assim, o limite superior foi delimitado acrescentando-se a ROI calculada ao limite inferior (Figura 11A-2). A Figura 11B mostra os cortes transversais das imagens de µCT utilizados para a seleção de regiões trabeculares e corticais das vértebras.

As análises de µCT foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Morfofisiologia Óssea coordenado pela Profª Cecília Gouveia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

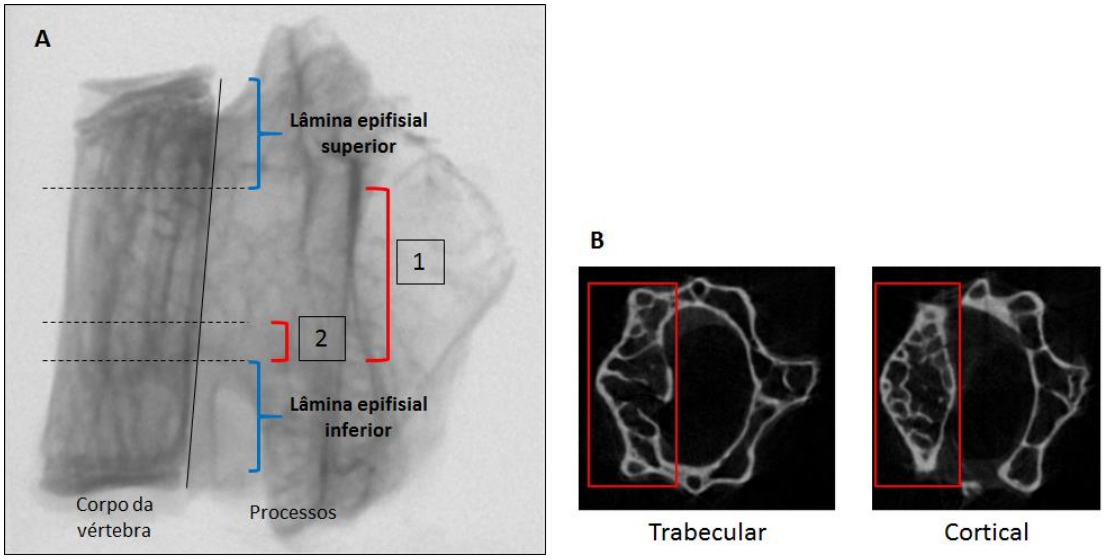

Figura 11 – Regiões de interesse para análise de vértebras. (A-1) Região trabecular. (A-2) Região cortical. (B) Imagem transversal das regiões analisadas para osso trabecular e cortical de vértebras, onde o corpo da vértebra encontra-se em destaque.

3.8 – Extração de RNA de osso

No sacrifício dos animais foram retirados também fêmures esquerdos e vértebras L5, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80ºC, para posterior extração de RNA. Na etapa inicial, foi utilizado um mortar de ferro congelado em gelo seco para martelar o osso, que foi sempre mantido em nitrogênio líquido. Foram padronizadas 12 marteladas, sem impor força excessiva para que as amostras não degradassem. O osso martelado foi transferido para um cadinho, devidamente esterilizado, contendo 1 ml de TRIzol® Reagent, assim, a amostra foi macerada e transferida para um tubo de 2 ml. As amostras ficaram no gelo por 5 minutos, podendo ser armazenadas a -80ºC ou passar imediatamente para a extração de RNA.

Para a extração de RNA, as amostras foram descongeladas, quando necessário, e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio a cada amostra e agitadas vigorosamente. As amostras foram incubadas por 2 minutos no gelo e centrifugadas a 12000 g a 4ºC por 15 minutos, para a separação de três fases onde a fase superior contém o RNA de interesse. Portanto, esse sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo, onde foi adicionado 1 volume de etanol 70%, diluído em DEPC, homogeneizando as amostras por inversão. Em seguida, o RNA das amostras foi purificado utilizando

colunas *RNeasy Mini Spin* do kit de extração de RNA, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, 74106), seguindo instruções do fabricante. Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas e congeladas a -80ºC, para posterior seguimento do protocolo. A integridade do RNA foi testada analisando as amostras em gel de agarose 1% em TAE 1x, utilizando 1 µg de RNA total, por no máximo 20 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 10 minutos.

Confirmada a integridade do RNA, as amostras foram tratadas com DNase utilizando *DNA-free™ DNA Removal Kit* (Ambion, AM1906), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. Após o tratamento, as amostras foram quantificadas e testada novamente a integridade do RNA.

3.9 – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

A síntese de cDNA a partir das amostras de RNA de osso foi realizada utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, 4368814), a partir de 1 µg de RNA total, seguindo instruções fornecidas pelo fabricante. Para cada amostra foi realizado um controle negativo da reação onde foi adicionado 1 µl de água DEPC separadamente em cada tubo, ao invés da transcriptase reversa.

As condições utilizadas para a síntese de cDNA foram: Etapa 1 – 25ºC x 10 minutos; etapa 2 – 37ºC x 2 horas; etapa 3 – 85ºC x 5 minutos.

Para confirmar que o cDNA foi gerado com sucesso, foi realizada uma PCR para β-actina. Para isso utilizamos os seguintes oligonucleotídeos, que amplificam um fragmento de 154pb (Tm 60ºC):

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) – 94ºC x 3 minutos; etapa 2 (40 ciclos) – 94ºC x 30 segundos; 60ºC x 20 segundos; 72ºC x 15 segundos; etapa 3 (1 ciclo) – 72ºC x 4 minutos.

As reações foram montadas adicionando-se 1 µl de cada oligonucleotídeo (concentração final de 200 nM), 2 µl de solução tampão 10x (Invitrogen), 0,8 µl de 50

mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,32 µl de dNTPs (5 mM; Invitrogen), 0,2 µl da enzima *taq DNA polimerase* (Invitrogen), 1 µl do cDNA e água deionizada para um volume final de 20 µl para cada reação. Após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 3%.

3.10 – *Real Time PCR* (RT-PCR)

A partir das amostras de cDNA obtidas como descrito no item 2.8, foram realizadas as análises de expressão gênica de marcadores ósseos por Real Time PCR. Para isso, foram utilizados 100 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) e TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) para cada marcador. O experimento foi realizado com o auxílio do aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

Os marcadores ósseos foram analisados utilizando as sondas para os genes RANKL (Mm00441906_m1), Colágeno tipo 1 (Mm00801666_g1), PAI-1 (Mm00435860_m1), Runx2 (Mm00501584_m1), Osterix (Mm04209856_m1), Osteocalcina (Mm00649782_gH) e Fosfatase Alcalina (Mm00475834_m1). Como controle endógeno e normalizador foi utilizado o gene β-actina (Mm00607939_s1).

3.11 – RNA-seq

RNA total de fêmur de três animais C57/BL6 selvagens e três animais C57/BL6 mg$\Delta^{loxPneo}$, obtidos como descrito no item 2.7, foram enviados para o *Epigenomics Core Facility of Weill Cornell Medicine*, Nova Iorque, para realização do sequenciamento de nova geração de RNA, onde selecionamos a metodologia *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, 250 ng de RNA total, numa concentração de 50 ng/µl e A260/280 > 2, foram utilizados para gerar a biblioteca de cDNA apropriadas para a plataforma de sequenciamento *Illumina HiSeq*.

Dessa forma, foi utilizado o *Illumina® TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Kit* para gerar a biblioteca de cDNA. O protocolo se iniciou com a purificação das amostras de mRNA que contém cauda poli-A, utilizando oligos poli-T

ligados a *beads* magnéticos. Paralelamente ao processo de purificação, o RNA também foi fragmentado e houve a ligação de *random hexamers* para a síntese de cDNA. Após esse processo, a primeira fita de cDNA foi sintetizada, utilizando transcriptase reversa. Em seguida, a segunda fita de cDNA foi sintetizada, onde o RNA molde foi removido e a fita complementar foi polimerizada, pela incorporação de dUTP ao invés de dTTP, gerando *double strand* (ds) cDNA. Com a incorporação de dUTPs, não houve amplificação das segundas fitas de cDNA, pois a DNA polimerase não age se houver esse nucleotídeo.

O próximo passo foi adicionar um único dATP à extremidade 3' dos fragmentos, para impedir que se ligassem uns aos outros durante a reação de ligação dos adaptadores. Um único dTTP ligado à extremidade 3' dos adaptadores leva a uma complementaridade entre o fragmento e seu adaptador, o que assegura um baixo índice de formação de quimeras. A seguir, as sequências adaptadoras foram ligadas às extremidades 3' e 5' dos ds cDNAs, o que permite a ancoragem dos fragmentos à superfície de sequenciamento, ou *flow cell*. Esse processo foi seguido pelo enriquecimento das amostras por PCR, onde os fragmentos que possuíam adaptadores em ambas as extremidades foram amplificados, utilizando um PCR *Primer Cocktail* que se anela às extremidades dos adaptadores.

As bibliotecas foram validadas para controle de qualidade da análise e quantificação das bibliotecas do DNA molde. Assim, as amostras foram quantificadas por RT-PCR de acordo com o *Illumina Sequencing Library qPCR Quantification Guide*. Já o controle de qualidade foi realizado utilizando o *Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer* onde foram analisados o tamanho dos fragmentos e a pureza da amostra. Por fim, as bibliotecas foram normalizadas para 10 nM na placa DCT (*Diluted Cluster Template*) e assim preparados os moldes de DNA para a geração dos *clusters*.

Assim, no sequenciamento realizado pelo sistema *NextSeq® Series*, foram geradas bibliotecas *single-end*, com *reads* de aproximadamente 75 nucleotídeos com média de 100 milhões de *reads* por biblioteca.

Após o sequenciamento, os dados brutos foram processados usando o software FastQC (Andrews) para averiguar a qualidade das sequências obtidas. Assim, foram efetuados trimming de qualidade para excluir as bases da região 3' dos

reads. Em seguida, cada biblioteca foi alinhada contra a versão GRCm38.p3 (M3) do genoma murino, disponibilizada pelo GENCODE, utilizando o software *Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (STAR). O nível de expressão (quantidade de *reads* pertencentes a cada gene) foi determinado utilizando o pacote *Rsubread*. Esta etapa de processamento dos dados foi realizada em colaboração o com laboratório OMICs coordenado pelo professor Houtan Noushmehr, em Ribeirão Preto. A análise de expressão diferencial foi realizada pelo nosso grupo utilizando a biblioteca DESeq2. Estatisticamente, foram considerados diferencialmente expressos os genes que obtiveram um significado estatístico (p-valor), corrigido por múltiplos testes estimando a taxa de falso positivo (FDR*, False Discovery Rate*), inferior a 0,05 (5%) e um significado biológico (*fold-change* ou FC) com um valor absoluto de log2FC superior a 0,13.

A partir da lista de genes diferencialmente expressos, foi realizado uma análise de *Gene Set Analysis* para se identificar vias de sinalização (KEGG) que possam estar alteradas entre as duas condições estudadas. Para isso, tanto a lista de genes diferencialmente expressos quanto a lista de todos os genes observados foram fornecidas para a plataforma online WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (Webgestalt).

Para a obtenção da tabela de *counts* e análises posteriores foram utilizadas bibliotecas Rsubread, biomaRt, DESeq2, pathview e ggpolt2 do ambiente de programação R (versão 3.1).

3.12 – Análises estatísticas

As análises estatísticas para os experimentos de µCT, histologia, RT-qPCR e medições do grau de curvatura das colunas, foram realizadas utilizando testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (KW). Os testes que obtiveram um nível de significância, ajustado para múltiplos testes por FDR, inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e rejeitaram a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Efeito do Ramipril no Fenótipo Ósseo do modelo murino mgΔ^{loxPneo}

Para analisar o efeito do Ramipril no fenótipo ósseo do modelo murino para a SMF, os animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} e selvagens foram tratados com o medicamento a partir de um mês de vida durante 6 meses, de acordo com o protocolo estabelecido previamente. Também foram produzidos os grupos controles sem tratamento de ambas as linhagens, pareados por idade e sexo.

4.1.1 – Análise histológica de pulmão

Além da análise do fenótipo ósseo dos animais mgΔ^{loxPneo}, foram analisados a histopatologia de pulmão desses animais, órgão que apresenta características de enfisema pulmonar nesse modelo, e o efeito do Ramipril nesse fenótipo.

A análise do pulmão foi realizada para obter os índices Lm dos grupos estudados, como descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. Foi possível observar que os animais mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com a droga apresentaram um maior diâmetro alveolar médio quando comparados com os animais selvagens de ambos os grupos (Figura 12). Portanto, os resultados mostram que o Ramipril não apresentou efeito benéfico para o fenótipo pulmonar.

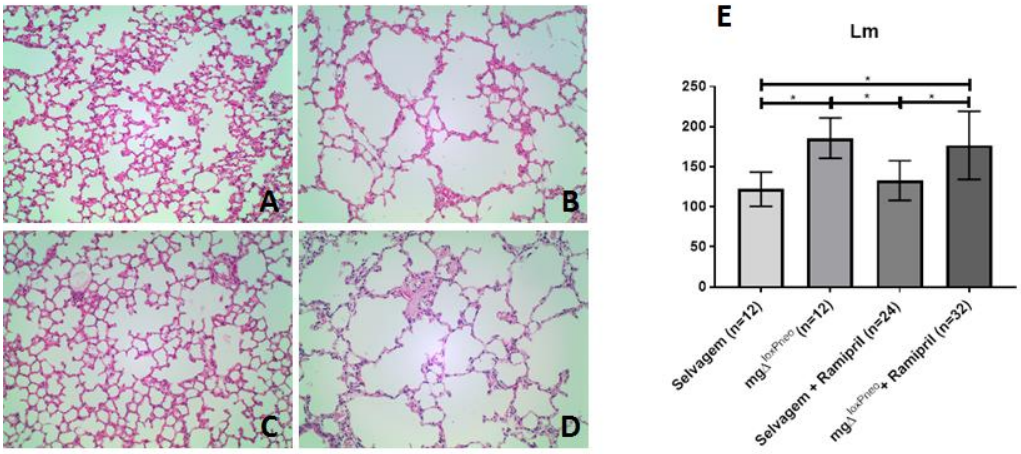

Figura 12 – Diâmetro alveolar médio pulmonar (Lm) dos grupos (A) selvagem (B) mgΔ^{loxPneo} (C) selvagem tratado com Ramipril e (D) mgΔ^{loxPneo} tratado com Ramipril. Amostras de pulmão de machos e fêmeas de 7 meses foram extraídas durante o sacrifício e processadas para histologia para coloração em HE. Animais mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com a droga, apresentaram um maior diâmetro alveolar médio quando comparados com os animais selvagens de ambos os grupos. (E) Quantificação do índice Lm dos grupos. * P = 0,0024.

4.1.2 – Análise do grau de cifose pelo método KI

Ao fim do tratamento de seis meses, foram obtidas imagens de raio-x de todos os animais, seguindo protocolo já descrito (ver item 3.6 de Materiais e Métodos). Essas imagens foram utilizadas para realizar as quantificações para cálculo do KI, descritas anteriormente, para analisar o grau de curvatura das colunas dos animais. Para a caracterizção do fenótipo ósseo, tanto pela medida da curvatura da coluna quanto para a análise da estrutura e da expressão de marcadores ósseos (itens seguintes), os animais foram separados por gênero a fim de evitar resultados com grandes desvios ou pouca significância, já que machos e fêmeas possuem diferenças na estrutura e no metabolismo ósseo (revisto por Seeman, 2001; Kim et al., 2003).

A análise do KI mostrou que os animais mgΔ^{loxPneo} machos apresentaram um fenótipo mais grave quando comparados aos machos selvagens controles e tratados. Apesar dos machos mgΔ^{loxPneo} terem apresentado uma média diferente dos animais selvagens controles, é possível observar que os animais mutantes tratados com Ramipril mostraram uma melhora fenotípica no grau de cifose quando comprados aos animais mutantes sem tratamento. O tratamento com Ramipril nos animais selvagens não mostrou efeito algum quando comparados com os mesmos animais sem tratar, o que sugere que o tratamento não interfere na curvatura da coluna desses animais (Figura 13A).

As fêmeas mgΔ^{loxPneo} também apresentaram o desenvolvimento de cifose quando comparadas ao grupo selvagem. Porém, para as fêmeas mutantes, o Ramipril não teve efeito benéfico na reversão do fenótipo (Figura 13B).

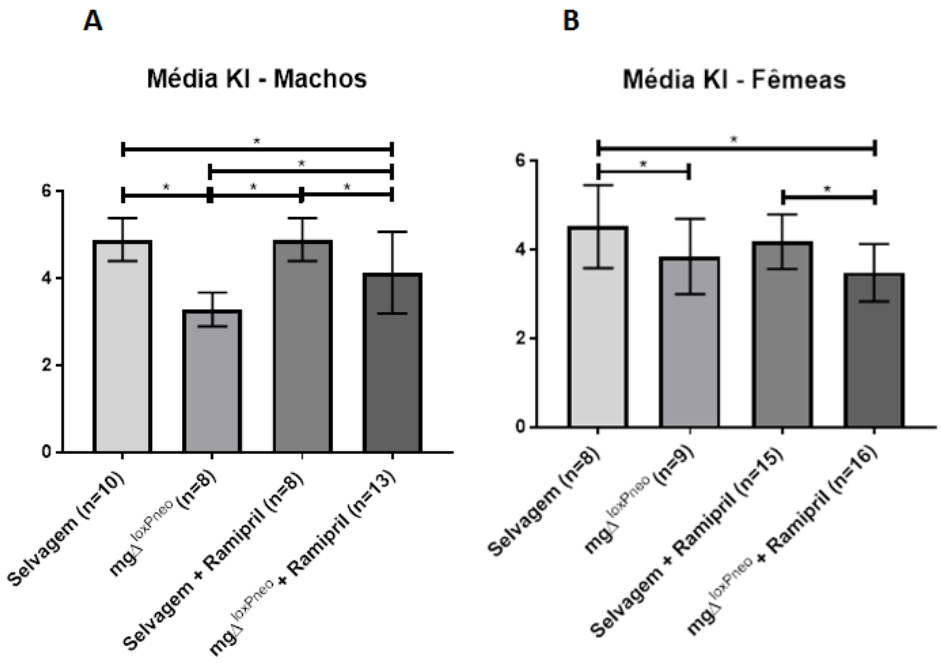

Figura 13 – Medida do KI dos grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. Animais de 7 meses, controles ou tratados por 6 meses, foram utilizados para obtenção de imagens de raio-x para análise do grau de cifose. (A) Machos. Os animais mgΔ^{loxPneo} controles apresentaram um fenótipo mais grave quando comparados aos grupos selvagens. O grupo mutante tratado com Ramipril apresentou melhora fenotípica quando comparado ao grupo mutante sem tratamento. *P = 0,0024. (B) Fêmeas. As fêmeas mutantes controles e tratadas com Ramipril apresentaram um agravamento da curvatura da coluna, quando comparadas às fêmeas selvagens controles. *P = 0,028.

Esses resultados mostram diferenças importantes do efeito do Ramipril entre manchos e fêmeas, e confirmam que o tratamento com a droga melhora a cifose em machos mgΔ^{loxPneo}.

4.1.3 – Análise da microestrutura óssea por µCT

Para obter resultados mais detalhados quanto ao fenótipo ósseo dos animais, foi realizada a análise de µCT. Essa análise fornece resultados sobre a microestrutura óssea revelando a qualidade do osso. Para isso, foram utilizados fêmures direitos e vértebras L4, extraídos no sacrifício, para o estudo da estrutura óssea dos animais mutantes comparados com os animais selvagens e o efeito do tratamento com Ramipril nesses animais.

Assim, foi realizada a quantificação dos parâmetros trabeculares e corticais de fêmures e vértebras. Para facilitar a descrição dos resultados, estes estão

resumidos nas tabelas 2-5. Os gráficos dos parâmetros citados a seguir se encontram nos Apêndices A até G.

Primeiramente, foi realizada a comparação entre a estrutura óssea de animais mgΔ^{loxPneo} e selvagens (Tabelas 2-5; Apêndices A a G). A análise realizada nos óssos das fêmeas não verificou diferença na estrutura trabecular e cortical entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagens. Por outro lado, foi possível verificar diferenças na estrutura trabecular de fêmur e vértebra entre os machos mgΔ^{loxPneo} e selvagens.

O parâmetro mais utilizado para caracterizar a estrutura trabecular é a razão entre o volume ósseo e o volume de tecido (BV/TV), que indica a porcentagem do volume de osso trabecular presente no volume total de tecido, incluindo espaços intertrabeculares e osso cortical. Portanto, quanto menor a porcentagem, menor o volume de trabéculas, afetando a estrutura óssea. Assim, os machos mgΔ^{loxPneo} apresentaram menor volume ósseo quando comparados com os animais selvagens (Tabela 2). Além disso, machos mgΔ^{loxPneo} apresentaram menor número de trabéculas (Tb.N), indicando maior fragilidade óssea quando comparados com animais selvagens (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparações dos resultados obtidos pela análise trabecular de fêmur entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem.

Parâmetro (Fêmur - Trabecular)	mgΔ^{loxPneo} x Selvagem			
	Macho	Ver Apêndice	Fêmea	Ver Apêndice
BV/TV (%)	Diminui	A – Figura 1	N/D	D – Figura 1
Tb.N (1/µm)	Diminui	A – Figura 1	N/D	D – Figura 1
Tb.Th (µm)	N/D	A – Figura 2	N/D	D – Figura 1
Tb.Sp (µm)	N/D	A – Figura 2	N/D	D – Figura 1
SMI	N/D	A – Figura 2	N/D	D – Figura 1
Tb.Pf (1/ µm)	N/D	A – Figura 2	N/D	D – Figura 1
DA	Diminui	A – Figura 1	N/D	D – Figura 1
PO	Aumenta	A – Figura 1	N/D	D – Figura 1

N/D: Não difere. **BV/TV**: Volume de osso/Volume de tecido**. Tb.N**: Número de trabéculas. **Tb.Th**: Espessura das trabéculas. **Tb.Sp**: Separação das trabéculas. **SMI**: Índice de Modelo Estrutural. **Tb.Pf**: Fator de Padrão Trabecular. **DA**: Grau de Anisotropia. **PO**: Porosidade aberta.

O Grau de Anisotropia (DA) é a medida de simetria das trabéculas em 3 dimensões, onde é avaliado o alinhamento das estruturas ao longo de um eixo específico. No caso de um osso em condições normais, as trabéculas se orientam em diferentes direções, que o torna capaz de resistir a cargas vindas de diferentes sentidos. Assim, quanto menos simétrico for o osso, maior o DA e a capacidade de reagir a diferentes forças mecânicas. Os fêmures dos animais mutantes

apresentaram menor DA quando comparados aos animais selvagens (Tabela 2). Também foi analisada a Porosidade Aberta (PO), que indica a porosidade das trabéculas, onde quanto maior a PO, maior será a fragilidade do osso. Os fêmures dos animais mgΔ^{loxPneo} apresentaram uma maior PO em relação aos animais selvagens (Tabela 2).

Nas vértebras de machos mgΔ^{loxPneo}, o único parâmetro trabecular alterado foi uma diminuição na espessura das trabéculas (Tb.Th), indicando a presença de trabéculas mais finas e frágeis (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparações dos resultados obtidos pela análise trabecular de vértebra entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem.

Parâmetro (Vértebra - Trabecular)	mgΔ^{loxPneo} x Selvagem			
	Macho	Ver Apêndice	Fêmea	Ver Apêndice
BV/TV (%)	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
Tb.N (1/µm)	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
Tb.Th (µm)	Diminui	B – Figura 1	N/D	E – Figura 1
Tb.Sp (µm)	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
SMI	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
Tb.Pf (1/ µm)	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
DA	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1
PO	N/D	B – Figura 2	N/D	E – Figura 1

N/D: Não difere. **BV/TV**: Volume de osso/Volume de tecido**. Tb.N**: Número de trabéculas. **Tb.Th**: Espessura das trabéculas. **Tb.Sp**: Separação das trabéculas. **SMI**: Índice de Modelo Estrutural. **Tb.Pf**: Fator de Padrão Trabecular. **DA**: Grau de Anisotropia. **PO**: Porosidade aberta.

Já a análise cortical dos fêmures e vértebras não identificou nenhuma alteração significativa em machos mgΔ^{loxPneo} (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Comparações dos resultados obtidos pela análise cortical de fêmur entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem.

Parâmetro (Fêmur - Cortical)	mgΔ^{loxPneo} x Selvagem			
	Macho	Ver Apêndice	Fêmea	Ver Apêndice
T.Ar (µm^2)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
B.Ar (µm^2)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
T.Pm (µm)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
B.Pm (µm)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
MMI (µm^4)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
Cs.Th (µm)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
Po.Cl (%)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
E.Pm (µm)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
MA (µm^2)	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1
B.Pm/B.Ar	N/D	C – Figura 1	N/D	F – Figura 1

N/D: Não difere**. T.Ar**: Área de tecido. **B.Ar**: Área de osso. **T.Pm**: Perímetro do tecido. **B.Pm**: Perímetro de osso. **MMI**: Momento de inércia. **Cs.Th**: Espessura transversal do osso cortical. **Po.Cl**: Porosidade fechada. **E.Pm**: Perímetro de endósteo. **MA**: Área medular. **B.Pm/B.Ar**: Perímetro de osso/Área de osso.

Tabela 5 - Comparações dos resultados obtidos pela análise cortical de vértebra entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem.

Parâmetro (Vértebra - Cortical)	mgΔ^{loxPneo} x Selvagem			
	Macho	Ver Apêndice	Fêmea	Ver Apêndice
T.Ar (µm^2)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
B.Ar (µm^2)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
T.Pm (µm)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
B.Pm (µm)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
MMI (µm^4)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
Cs.Th (µm)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
Po.Cl (%)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
E.Pm (µm)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
MA (µm^2)	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1
B.Pm/B.Ar	N/D	D – Figura 1	N/D	G – Figura 1

N/D: Não difere**. T.Ar**: Área de tecido. **B.Ar**: Área de osso. **T.Pm**: Perímetro do tecido. **B.Pm**: Perímetro de osso. **MMI**: Momento de inércia. **Cs.Th**: Espessura transversal do osso cortical. **Po.Cl**: Porosidade fechada. **E.Pm**: Perímetro de endósteo. **MA**: Área medular. **B.Pm/B.Ar**: Perímetro de osso/Área de osso.

Portanto, a partir dos resultados de µCT é possível concluir que os machos mgΔ^{loxPneo} apresentam uma pior qualidade da estrutura trabecular do fêmur e da vértebra em relação aos animais selvagens.

Em seguida, foi analisado o efeito do tratamento com Ramipril nos ossos dos animais mgΔ^{loxPneo} e selvagens. O Ramipril não mostrou ter efeito na estrutura trabecular e cortical de fêmur e vértebra em machos e fêmeas mgΔ^{loxPneo} (Tabela 6 a 9). Por outro lado, foi possível verificar um efeito prejudicial do Ramipril na estrutura trabecular de fêmur e vértebra de machos selvagens.

O tratamento diminuiu o Tb.N de fêmures de machos selvagens, indicando uma menor qualidade e maior fragilidade desses óssos (Tabela 6). Além disso, foi possível verificar que a droga também diminuiu a Tb.Th das vértebras de machos selvagens, indicando também uma diminuição da qualidade óssea desses ossos (Tabela 7).

Tabela 6 - Comparações dos resultados obtidos pela análise trabecular de fêmur entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem tratados com Ramipril.

Parâmetro (Fêmur - Trabecular)	mgΔ^{loxPneo} + Ramipril x mgΔ^{loxPneo}		Selvagem + Ramipril x Selvagem	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
BV/TV (%)	N/D	N/D	N/D	N/D
Tb.N (1/µm)	N/D	N/D	Diminui	N/D
Tb.Th (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
Tb.Sp (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
SMI	N/D	N/D	N/D	N/D

Tb.Pf (1/ µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
DA	N/D	N/D	N/D	N/D
PO	N/D	N/D	N/D	N/D
Ver Apêndice	**A**	**D**	**A**	**D**

N/D: Não difere. **BV/TV**: Volume de osso/Volume de tecido**. Tb.N**: Número de trabéculas. **Tb.Th**: Espessura das trabéculas. **Tb.Sp**: Separação das trabéculas. **SMI**: Índice de Modelo Estrutural. **Tb.Pf**: Fator de Padrão Trabecular. **DA**: Grau de Anisotropia. **PO**: Porosidade aberta.

Tabela 7 - Comparações dos resultados obtidos pela análise trabecular de vértebra entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem tratados com Ramipril.

Parâmetro (Vértebra - Trabecular)	mgΔ^{loxPneo} + Ramipril x mgΔ^{loxPneo}		Selvagem + Ramipril x Selvagem	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
BV/TV (%)	N/D	N/D	N/D	N/D
Tb.N (1/µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
Tb.Th (µm)	N/D	N/D	Diminui	N/D
Tb.Sp (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
SMI	N/D	N/D	N/D	N/D
Tb.Pf (1/ µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
DA	N/D	N/D	N/D	N/D
PO	N/D	N/D	N/D	N/D
Ver Apêndice	**B**	**E**	**B**	**E**

N/D: Não difere. **BV/TV**: Volume de osso/Volume de tecido**. Tb.N**: Número de trabéculas. **Tb.Th**: Espessura das trabéculas. **Tb.Sp**: Separação das trabéculas. **SMI**: Índice de Modelo Estrutural. **Tb.Pf**: Fator de Padrão Trabecular. **DA**: Grau de Anisotropia. **PO**: Porosidade aberta.

Tabela 8 - Comparações dos resultados obtidos pela análise cortical de fêmur entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem tratados com Ramipril.

Parâmetro (Fêmur - Cortical)	mgΔ^{loxPneo} + Ramipril x mgΔ^{loxPneo}		Selvagem + Ramipril x Selvagem	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
T.Ar (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Ar (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
T.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
MMI (µm^4)	N/D	N/D	N/D	N/D
Cs.Th (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
Po.Cl (%)	N/D	N/D	N/D	N/D
E.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
MA (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Pm/B.Ar	N/D	N/D	N/D	N/D
Ver Apêndice	**C**	**F**	**C**	**F**

N/D: Não difere**. T.Ar**: Área de tecido. **B.Ar**: Área de osso. **T.Pm**: Perímetro do tecido. **B.Pm**: Perímetro de osso. **MMI**: Momento de inércia. **Cs.Th**: Espessura transversal do osso cortical. **Po.Cl**: Porosidade fechada. **E.Pm**: Perímetro de endósteo. **MA**: Área medular. **B.Pm/B.Ar**: Perímetro de osso/Área de osso.

Tabela 9 - Comparações dos resultados obtidos pela análise cortical de fêmur entre os grupos mgΔ^{loxPneo} e selvagem tratados com Ramipril.

Parâmetro (Vértebra - Cortical)	mgΔ^{loxPneo} + Ramipril x mgΔ^{loxPneo}		Selvagem + Ramipril x Selvagem	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
T.Ar (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Ar (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
T.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
MMI (µm^4)	N/D	N/D	N/D	N/D
Cs.Th (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
Po.Cl (%)	N/D	N/D	N/D	N/D
E.Pm (µm)	N/D	N/D	N/D	N/D
MA (µm^2)	N/D	N/D	N/D	N/D
B.Pm/B.Ar	N/D	N/D	N/D	N/D
Ver Apêndice	**D**	**G**	**D**	**G**

N/D: Não difere**. T.Ar**: Área de tecido. **B.Ar**: Área de osso. **T.Pm**: Perímetro do tecido. **B.Pm**: Perímetro de osso. **MMI**: Momento de inércia. **Cs.Th**: Espessura transversal do osso cortical. **Po.Cl**: Porosidade fechada. **E.Pm**: Perímetro de endósteo. **MA**: Área medular. **B.Pm/B.Ar**: Perímetro de osso/Área de osso.

Assim, o experimento revelou que, além da cifose, os machos mgΔ^{loxPneo} apresentaram uma microestrutura óssea prejudicada quando comparados aos animais selvagens. O tratamento com Ramipril levou a uma melhora no grau de cifose dos animais mutantes, porém sem melhora da qualidade óssea. Esse resultado indica que o efeito benéfico na curvatura da coluna não está ligado a um efeito direto no osso desses animais. Além disso, o Ramipril apresentou um efeito prejudicial nos animais selvagens, diminuindo a qualidade do osso trabecular de fêmur e vértebra. Porém, para os animais selvagens não foi verificado efeito da droga quanto ao desenvolvimento de cifose, o que corrobora o fato de que o efeito em um fenótipo não está ligado ao outro.

Apesar das fêmeas mgΔ^{loxPneo} terem apresentado maior gravidade da cifose em relação às fêmeas selvagens, não foram observadas diferenças na microestrutura óssea desses animais. Esse resultado mostra que o desenvolvimento da cifose não deve estar ligado a uma pior qualidade óssea nas fêmeas mutantes, reforçando a hipótese de que esses dois fenótipos sejam independentes.

Portanto, concluí-se que a melhora no grau de cifose verificada nos machos mgΔ^{loxPneo} tratados com Ramipril não é ocasionada por uma melhora na microestrutura óssea. A hipótese levantada após esses resultados é a de que o Ramipril possa agir em tecidos adjacentes à coluna vertebral, como músculos

esqueléticos ou ligamentos, que dão sustentação à coluna, aumentando a resistência desses tecidos a pressões que levem à formação de cifose nos animais. Hipotonia e miopatia já foram observadas no modelo C1039G da SMF, além de outras manifestações como hipermobilidade de articulações (Jones et al., 2007; Donkervoort, et al., 2015). Assim, isso indica que os músculos e tecidos ligamentares podem estar alterados na doença e podem ser a causa do desenvolvimento da cifose, onde o Ramipril pode agir de forma benéfica e reverter o quadro. Além disso, o medicamento pode ser prejudicial quando os animais se encontram em condições biológicas normais, e possivelmente, não apresentar efeito nos animais mutantes por já apresentaram uma baixa qualidade óssea.

Estes resultados estão de acordo com um trabalho que analisou o efeito do Captopril, outro ACEi, no tecido ósseo de machos selvagens normotensos. Os pesquisadores verificaram que o tratamento diminuiu o nível de testosterona e aumentou o número de osteoclastos no osso trabecular do fêmur distal, o que pode explicar a perda de massa óssea trabecular verificada por µCT (Yang et al., 2016). Além disso, os autores verificaram que os animais tratados apresentaram uma maior expressão do receptor B2R, não sendo alterada a expressão de B1R e Ang-II em tíbia. Além disso, foi observado um aumento de 95% de expressão de pAkt e upregulation de pNFκB, proteínas que estão abaixo (*downstream*) na cascata de sinalização por B2R, indicando que o tratamento com ACEi ativa a sinalização por esse receptor (Yang et al., 2016).

Além disso, uma pesquisa realizada com homens acima de 65 anos, que participaram de um estudo coorte de fatores de risco para fraturas de osteoporose, mostrou que o uso de ACEi estava associado a um aumento no nível de perda óssea no quadril (Kwok et al., 2012). Porém, uma explicação para o aumento da perda óssea seria que ACEi podem diminuir concentrações de testosterona, como observado em homens hipertensos tratados com o ACEi Lisinopril (Koshida et al., 1998; Kwok et al., 2012).

Dessa forma, o efeito prejudicial do Ramipril na microestrutura óssea dos animais selvagens machos pode ser influência de uma diminuição da expressão de testosterona. Koshida et al. (1998) também observou que mulheres hipertensas tratadas com Lisinopril apresentaram maiores níveis de globulina ligadora de

hormônios sexuais (SHBG), glicoproteína que transporta hormônios sexuais no sangue. Uma alta concentração de SHBG já foi verificada em mulheres na pós-menopausa com fraturas no quadril resultantes de osteoporose e que apresentavam menor densidade óssea (Wild et al., 1987). Outro estudo também verificou altos níveis de SHBG e uma diminuição na razão de androstenediona, hormônio intermediário nas vias metabólicas de testosterona e estradiol, e SHBG em mulheres em pós-menopausa. Os autores discutem que quanto mais SHBG, menores os níveis de androstenediona livre no sangue, pela maior interação entre eles, o que diminui a ação do hormônio nos tecidos e pode levar ao maior risco de fraturas (Moberg et al., 2013).

Assim, a realização de estudos mais específicos e atualizados é necessária para definir o papel da SHBG e outros hormônios no metabolismo ósseo de mulheres, assim como o efeito de inibidores do RAS em hormônios sexuais. No entanto, uma observação relevante é que o Ramipril pode ter efeito na regulação dos hormônios sexuais de forma diferente entre machos e fêmeas, o que pode ser responsável pela diferença do efeito do tratamento no fenótipo da curvatura da coluna entre os gêneros. Além disso, diferentemente dos machos, no geral o Ramipril não demonstrou ter um efeito prejudicial na microestrutura óssea das fêmeas selvagens. Assim, são necessárias mais análises para determinar se essas diferenças se devem a ações do ACEi nos níveis hormonais dos animais.

Outro ponto a ser discutido é o fato do Losartan, nos animais mutantes, ter apresentado um efeito benéfico para o fenótipo pulmonar, enquanto que para a cifose não mostrou ser capaz de melhorar o fenótipo, como mostrado anteriormente pelos resultados do grupo. Por outro lado, o Ramipril mostrou ser efetivo na melhora da cifose, porém os resultados apresentados mostraram que não foi efetivo para o fenótipo pulmonar. Esses resultados indicam que, apesar dessas drogas agirem na mesma via do RAS, elas possuem mecanismos de ação diferentes levando a resultados distintos. Assim, sabendo dos possíveis mecanismos de interação de ACEi com receptores da BK e seu envolvimento nessa via, foi levantada a hipótese de que esta pudesse estar envolvida no desenvolvimento do fenótipo ósseo nos animais analisados.

4.2 – Geração e análise dos animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} e *knockout* para o receptor B2R de bradicinina

Para analisar a participação do receptor B2R no desenvolvimento da cifose no modelo murino para a SMF, foram gerados os animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} *knockout* para o receptor B2R de bradicinina. Para isso, na geração parental foi utilizado um macho heterozigoto para a mutação no gene *Fbn1* (Fbn1+/-) e selvagem para o receptor B2R (B2+/+), e uma fêmea selvagem para o gene *Fbn1* (Fbn1+/+) e homozigota *knockout* para o gene do receptor B2R (B2-/-) (Figura 14). Desse cruzamento foi obtida uma prole F1 de animais heterozigotos para a mutação no gene do receptor B2R, sendo que 50% desses animais foram selvagens para o gene *Fbn1* e 50% heterozigotas para o alelo mgΔ$^{loxPneo.}$ (Fbn1+/-; B2+/-). Os machos (Fbn1+/-; B2+/-) foram cruzados com fêmeas (Fbn1+/+; B2-/-), gerando uma prole F2 com os possíveis genótipos (Fbn1+/+; B2+/-), (Fbn1+/-; B2+/-), (Fbn1+/+; B2-/-), (Fbn1+/-; B2-/-), seguindo proporções mendelianas (Figura 14).

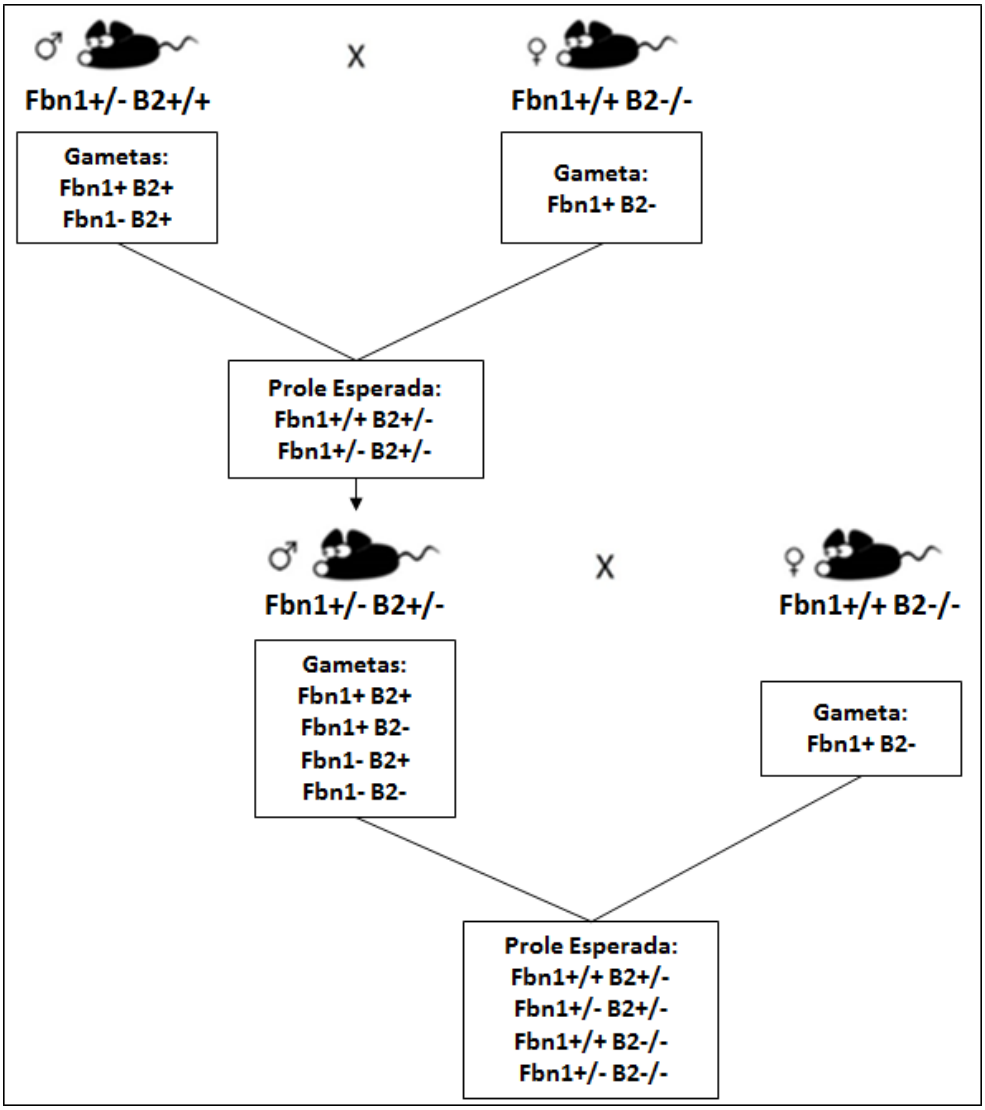

Figura 14 – Representação da geração dos animais da linhagem mg$^{\Delta loxPneo}$ e knockout para o receptor B2R de bradicinina. Inicialmente, machos Fbn1+/- B2+/+ foram cruzados com fêmeas Fbn1+/+ B2-/- visando a obtenção de machos Fbn1+/- B2+/-. Em seguida, esses machos foram cruzados com fêmeas Fbn1+/+ B2-/-. Desse cruzamento são mostrados os possíveis genótipos da prole.

A prole gerada por esse cruzamento foi genotipada seguindo protocolo descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. O resultado da genotipagem para o receptor B2R pode ser visto na Figura 15.

Figura 15 – Genotipagem para o receptor B2R dos animais da linhagem mgΔ^{loxPneo} e knockout para o receptor B2R de bradicinina. Amostras 1 e 2: apresentam apenas uma banda de 280 pb correspondente ao alelo mutante, sendo genotipados como B2-/-. Amostras 3 e 4: apresentam uma banda de 280 pb correspondente ao alelo mutante e outra de 361 pb correspondente ao alelo selvagem, sendo genotipados como B2+/. Amostra 5: controle positivo da reação. Amostra 6: controle negativo da reação.

A partir da genotipagem, foi possível dividir os animais nos grupos genotípicos e comparar dados obtidos pela análise da curvatura das colunas. Assim, foi calculado o grau da cifose dos animais seguindo o índice KI, como descrito anteriormente. Dessa forma, foi possível verificar que os animais mutantes para *Fbn1* e selvagens para o receptor B2R (Fbn1+/-; B2+/+) apresentaram menor KI quando comparados aos animais selvagens (Fbn1+/+; B2+/+), indicando o desenvolvimento de cifose nos animais mutantes, como já era esperado (Figura 16). Os animais mutantes para *Fbn1* e homozigotos *knockout* para o B2R (Fbn1+/-; B2-/-) e os animais mutantes para *Fbn1* e heterozigotos para o B2R (Fbn1+/-; B2+/-) também apresentaram maior grau de curvatura da coluna em relação aos animais selvagens (Fbn1+/+; B2+/+). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos (Fbn1+/-; B2+/+), (Fbn1+/-; B2+/-) e (Fbn1+/-; B2-/-) (Figura 16). Esses resultados indicam que o genótipo para o B2R não interfere no desenvolvimento do fenótipo.

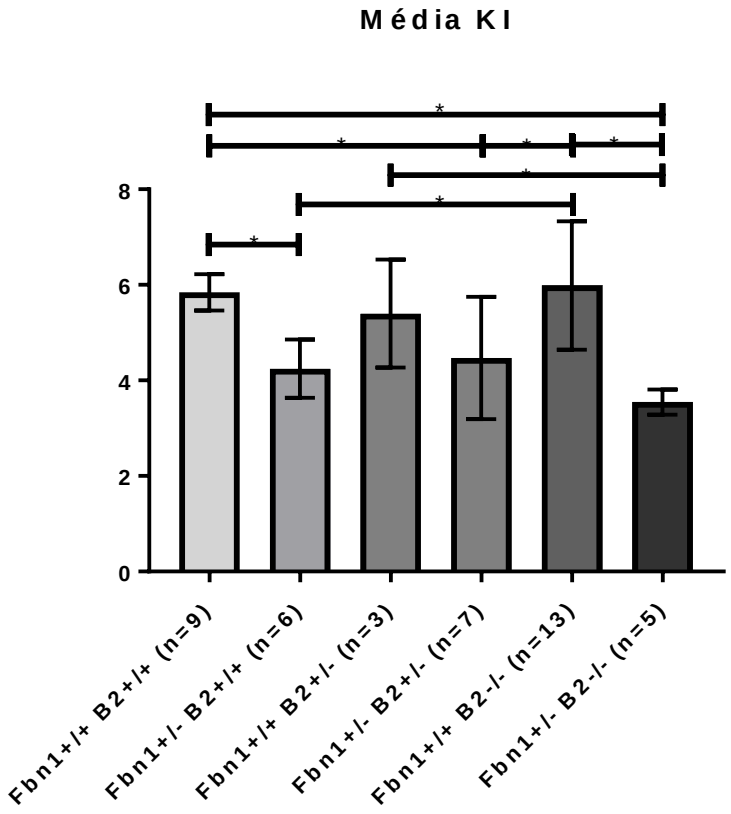

Figura 16 - Resultado dos KI dos animais de diferentes grupos genotípicos. (+/+) Animais selvagens. (+/-) Animais heterozigotos. (-/-) Animais homozigotos *knockout*. Os grupos (Fbn1+/-; B2+/+), (Fbn1+/-; B2+/-) e (Fbn1+/-; B2-/-) apresentaram maior grau de curvatura da coluna em relação aos animais (Fbn1+/+; B2+/+) e (Fbn1+/+; B2-/-), porém não foram observadas diferenças entre esses grupos, indicando que o genótipo para *Fbn1* está ligada ao desenvolvimento de cifose, enquanto o genótipo para o B2R não interfere no fenótipo. *P = 0,0024.

Verificou-se também que os animais (Fbn1+/-), independente do seu genótipo para o receptor B2R, apresentaram maior grau de cifose em relação aos animais selvagens para *Fbn1* e homozigotos *knockout* para o B2R (Fbn1+/+; B2-/-). Além disso, não houve diferença entre os animais (Fbn1+/+; B2+/+) e os (Fbn1+/+; B2-/-) (Figura 16), reforçando a hipótese de que o B2R não interfere no fenótipo.

A Figura 17 mostra as imagens de raio-x de um animal representando cada grupo genotípico. Pode-se perceber que os animais com genótipo (Fbn1+/+; B2-/-) (Figura 17E) apresentam um fenótipo semelhante ao do animal selvagem (Figura 20A), como foi quantificado no gráfico (Figura 16). É possível notar também que os animais (Fbn1+/+; B2+/-) (Figura 17C) também apresentam fenótipo semelhante ao selvagem. Já os animais (Fbn1+/-; B2+/-) e (Fbn1+/-; B2-/-) (Figura 17D e 17F,

respectivamente) apresentam um fenótipo semelhante aos animais (Fbn1+/-; B2+/+), somente mutantes para o gene da *Fbn1*.

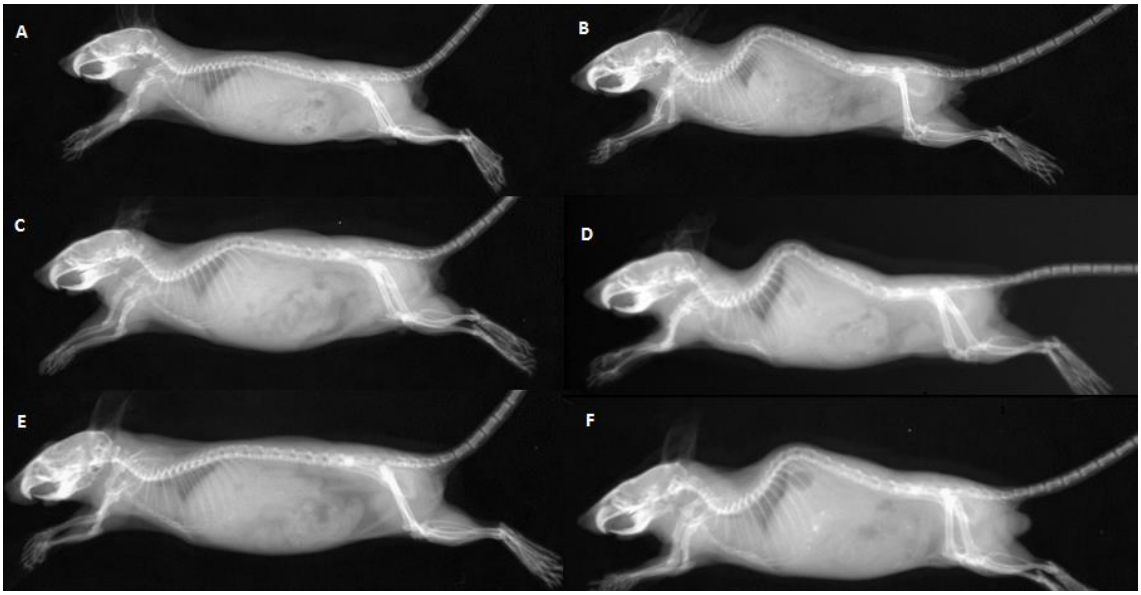

Figura 17 - Raio-x de animais representando cada grupo genotípico. Imagens utilizadas para obtenção das medidas de cálculo do KI. (A) Fbn1+/+ B2+/+. (B) Fbn1+/- B2+/+. (C) Fbn1+/+ B2+/-. (D) Fbn1+/- B2+/-. (E) Fbn1+/+ B2-/-. (F) Fbn1+/- B2-/-.

É importante ressaltar que para esse experimento, os grupos genotípicos incluem tanto machos quanto fêmeas, pois não foi possível gerar um grupo amostral com animais suficientes para as fêmeas. Para os machos foi possível comparar os grupos. Nos machos também foi possível verificar que o genótipo para o receptor B2R não interferiu no grau de curvatura tanto dos animais selvagens como mutantes (Figura 18).

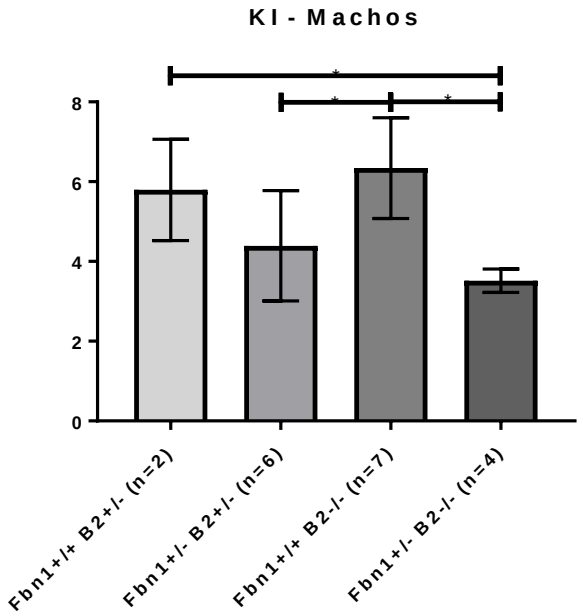

Figura 18 – Resultados dos KI dos machos. (+/+) Animais selvagens. (+/-) Animais heterozigotos. (-/-) Animais homozigotos *knockout*. O grupo (Fbn1+/-; B2-/-) apresentou maior grau de curvatura da coluna em comparação aos grupos (Fbn1+/+; B2+/-) e (Fbn1+/+; B2-/-). O grupo (Fbn1+/-; B2+/-) apresentou maior grau de curvatura da coluna em relação ao grupo (Fbn1+/+; B2-/-). O receptor B2R não parece interferir no grau de cifose dos animais selvagens e mutantes. *P = 0,029.

Portanto, os resultados obtidos pela análise da participação do receptor B2R de bradicinina no fenótipo ósseo indicam que, para os animais mgΔ^{loxPneo}, a ausência do receptor não influencia o desenvolvimento da cifose, indicando que a via da bradicinina não está envolvida na patogênese deste fenótipo.

Em seguida, foi analisado o envolvimento do receptor B2R no efeito terapêutico de ramipril nos animais MFS. Para isso, foi realizado o tratamento com Ramipril nos grupos (Fbn1 +/+; B2-/-) e (Fbn1+/-; B2-/-). Foi verificado que o Ramipril não teve efeito na cifose dos animais (Fbn1+/-; B2-/-) (Figura 19). Além disso, o tratamento foi prejudicial aos animais (Fbn1 +/+; B2-/-), fazendo com que esses animais desenvolvessem um grau de cifose semelhante aos animais mgΔ^{loxPneo} (ou Fbn1+/-; B2+/+) (Figura 19).

Esses resultados mostram que a ação do ramipril na melhora da cifose nos animais mgΔ^{loxPneo} depende da ação do receptor B2R. Além disso, em animais selvagens para *Fbn1*, a ausência de B2R leva a um efeito deletério de Ramipril na

curvatura da coluna – ou seja, em animais selvagens, a sinalização por B2R tem um efeito protetor ao tratamento com ramipril.

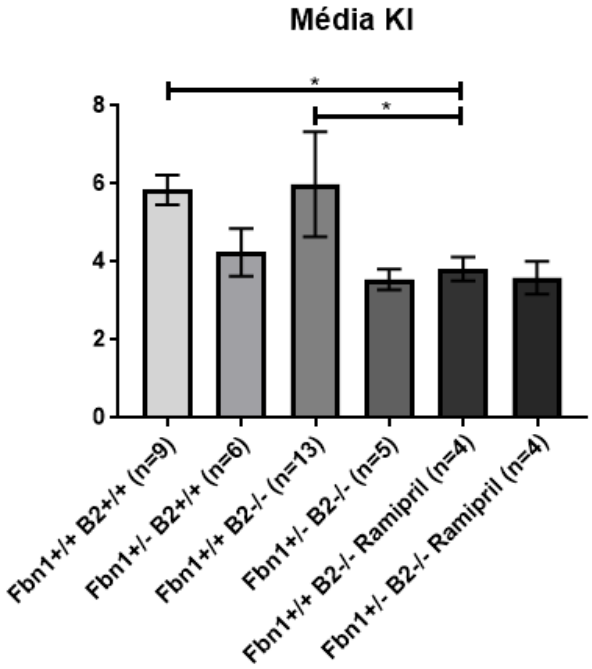

Figura 19 – Resultado dos KI dos grupos (Fbn1+/+; B2-/-) e (Fbn1+/-; B2-/-) tratados com Ramipril. O grupo (Fbn1+/+; B2-/-) tratado com Ramipril apresentou um maior grau de curvatura da coluna em relação aos grupos (Fbn+1/+; B2+/+) e (Fbn1+/+; B2-/-) sem tratamento.*P = 0,0024.

Apesar de ter demonstrado o envolvimento do receptor B2R na ação terapêutica de ramipril na cifose, a via de bradicinina não mostrou ter efeito no desenvolvimento da cifose nos animais mgΔ^{loxPneo}. Além disso, foi mostrado que o grau de curvatura não está relacionado à qualidade óssea. Assim, para investigar genes diferencialmente expressos que podem estar envolvidos na manifestação do fenótipo ósseo no modelo animal estudado, e assim, direcionar análises mais específicas visando elucidar mecanismos da patogênese e sugerir alvos de tratamentos, foi realizado o RNA-seq em amostras de fêmures de animais selvagens e mutantes.

4.3 – RNA-seq de amostras de RNA de osso obtidas dos animais mgΔ^{loxPneo}

Amostras de RNA total de fêmures de animais mgΔ^{loxPneo} e selvagens foram extraídas e analisadas por sequenciamento de nova geração, RNA-seq (ver item 3.11 de Materiais e Métodos), com o intuito de identificar genes diferencialmente

expressos e vias de sinalização que estejam alteradas no modelo para a SMF, e assim fornecer hipóteses sobre o desenvolvimento da doença. Dessa forma, essa estratégia visou explorar uma ampla gama de informações que pode levar a um delineamento de experimento mais direto e com maior embasamento, além de sugerir novos alvos de tratamento.

Pela análise dos genes diferencialmente expressos, levando-se em consideração um significado biológico com valor absoluto de log2FC superior a 0,13, ou seja, uma diferença de pelo menos 10% entre a expressão observada entre animais mutantes e selvagens, foi possível encontrar uma lista de 518 genes (Apêndice I). Dessa lista, 374 genes estavam *downregulated* e os outros 144 estavam *upregulated* nos animais mg$\Delta^{loxPneo}$ (Figura 20).

A partir desses dados, foi possível obter o *volcano plot* (Figura 20A), que mensura tanto o significado estatístico (p-valor) quanto o significado biológico (FC) dos genes, representando-os nesse tipo de gráfico. Dessa forma, são considerados diferencialmente expressos os genes que estão acima do nível de significância (0,05) e aqueles externos aos limiares biológicos (log2FC de 0,13). Portanto, em verde se encontram os genes que estão acima do nível de significância e que apresentam um significado biológico abaixo do limiar, ou seja, menores que -0,13, os quais são considerados *downregulated*. Já em vermelho, se encontram os genes que estão acima do nível de significância e que apresentam um significado biológico acima do limiar, ou seja, maiores que 0,13, os quais são considerados *upregulated* no modelo murino para a SMF (Figura 20A).

Assim, de acordo com os genes identificados, foi possível obter o *heat map* (Figura 20B), que agrupa as amostras de acordo com o grau de similaridade do perfil de expressão dos genes identificados. Na Figura 20B, pelo dendrograma superior é possível verificar que as três amostras de cada grupo são mais similares entre si do que as amostras do outro grupo. Pelo dendrograma lateral é possível identificar grupos de genes com padrão de expressão similar (Figura 20B).

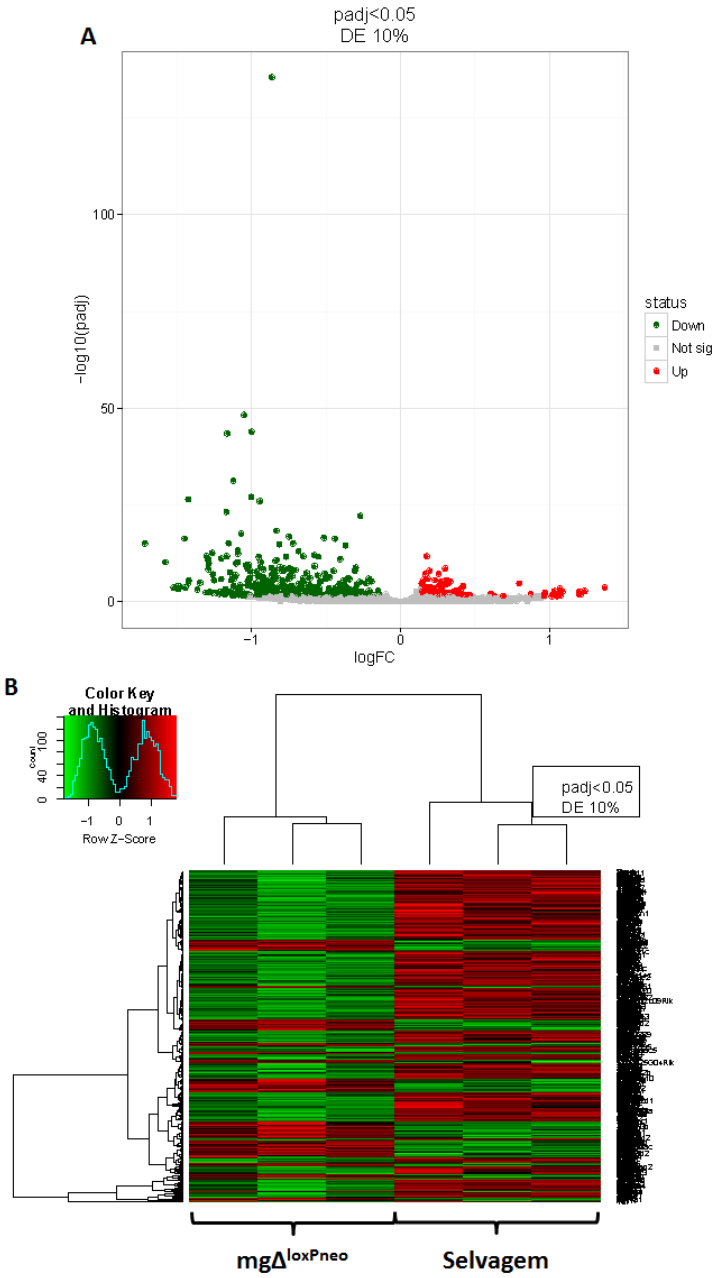

Figura 20 – Genes diferencialmente expressos, considerando-se um p-valor de 0,05 e um valor absoluto de log2FC superior a 0,13, nos animais mgΔ^{loxPneo}. (A) *Volcano plot*. Em verde, genes *downregulated*, e, em vermelho, genes *upregulated*. (B) *Heat map.* Genes diferencialmente expressos entre os animais mgΔ^{loxPneo} e os selvagens, nas diferentes amostras analisadas.

Utilizando os genes identificados, foram analisadas as vias de sinalização nas quais esses genes estão envolvidos e, portanto, enriquecidas com genes diferencialmente expressos no modelo para a SMF. Dessa forma, a análise forneceu um resultado com 28 vias alteradas no modelo mgΔ^{loxPneo} (Tabela 10). As vias estão organizadas de acordo com o valor significativo, considerando-se um p-valor ajustado (adjP) ≤ 0,05.

Tabela 10 - Vias de sinalização diferencialmente reguladas no modelo mgΔ^{loxPneo}. Foram utilizados os 518 genes obtidos pela análise, considerando-se um valor absoluto de log2FC superior a 0,13. Em verde: genes envolvidos *downregulated*. Em vermelho: genes envolvidos *upregulated*.

Via de Sinalização	Quantidade de genes envolvidos	Genes envolvidos	Estatística
Cardiomiopatia hipertrófica (HCM)	19	Des, Tpm2, Cacna1c, Prkaa2, Sgcb, Itgb6, Prkab1, Cacng1, Myl3, Itga7, Sgca, Cacna2d1, Prkab2, Dag1, Tpm1, Cacna1s, Cacnb1, Myl2, Ttn.	C=83; O=19; E=1.58; R=12.02; rawP=1.24e-15; adjP=1.35e-13
Cardiomiopatia dilatada	16	Des, Tpm2, Cacna2d1, Cacna1c, Sgcb, Dag1, Itgb6, Cacng1, Tpm1, Myl3, Cacna1s, Cacnb1, Itga7, Myl2, Ttn, Sgca.	C=89; O=16; E=1.70; R=9.44; rawP=1.17e-11; adjP=6.38e-10
Contração de músculo cardíaco	14	Tpm2, Cacna2d1, Cacna1c, Cox6a2, Cacng1, Tpm1, Myl3, Cacna1s, Cacnb1, Cox7a1, Atp1a2, Cox8b, Myl2, Atp1a4.	C=78; O=14; E=1.49; R=9.42; rawP=2.33e-10; adjP=8.47e-09
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (ARVC)	11	Des, Cacna2d1, Cacna1c, Sgcb, Dag1, Itgb6, Cacng1, Cacna1s, Cacnb1, Itga7, Sgca.	C=74; O=11; E=1.41; R=7.81; rawP=1.52e-07; adjP=4.14e-06
Via de sinalização do cálcio	14	Cacna1c, Slc25a4, Atp2a1, P2rx5, Cacna1s, P2rx4, Mylk2, Ryr1, Nos1, Phkg1, Tnnc2, Calm3, Camk2b, Vdac1.	C=178; O=14; E=3.39; R=4.13; rawP=8.74e-06; adjP=0.0002
Via de sinalização MAPK	16	Dusp7, Cacna1c, Cacng1, Egf, Map2k7, Hspb1, Nfatc2, Pla2g4e, Mapt, Cacna2d1, Flnc, Fgfr1, Pla2g4a, Cacna1s, Cacnb1, Zak.	C=266; O=16; E=5.07; R=3.16; rawP=5.75e-05; adjP=0.0010
Processamento de proteína no retículo endoplasmático	12	Rpn2, Ube2d1, Tram1, Rad23b, Cryab, Wfs1, Calr, Canx, Map2k7, Man1b1, Sec13, Pdia4.	C=169; O=12; E=3.22; R=3.73; rawP=0.0001; adjP=0.0014
Adesão focal	13	Lamb2, Flnc, Itgb6, Met, Itga7, Cav2, Lamc1, Col4a2, Egf, Myl2, Ilk, Mylk2, Cav3.	C=199; O=13; E=3.79; R=3.43; rawP=0.0001; adjP=0.0014
Miocardite viral	8	Myh14, Sgcb, Dag1, Myh8, Myh4, Myh1, Myh2, Sgca.	C=86; O=8; E=1.64; R=4.88; rawP=0.0002; adjP=0.0022

Interação receptor-meio extracelular (MEC)	8	Lamb2, Dag1, Itgb6, Itga7, Lamc1, Col4a2, Sv2b, Hspg2.	C=86; O=8; E=1.64; R=4.88; rawP=0.0002; adjP=0.0022
Junção ocludente	10	Pard6a, Myh14, Amotl1, Myh4, Myh1, Myl2, Myh8, Ybx3, Zak, Myh2.	C=134; O=10; E=2.55; R=3.92; rawP=0.0003; adjP=0.0030
Vias metabólicas	39	Polr2b, Ampd1, Pgam2, Gpt2, Acacb, Gale, Dtymk, Pgm2, Ndufs1, Ak1, Aox1, Man1b1, Lap3, Eno3, Hal, Agl, Ldhb, Cox8b, Acly, Ugp2, Hpse, Cyp2u1, Sephs1, Cox6a2, St6galnac5, Ckm, Wbscr17, Inpp5b, Asah1, Pla2g4e, Nos1, Rpn2, Pla2g4a, Aldoa, Adh5, Atp6v0e2, Nme1, Ada, Uck2.	C=1166; O=39; E=22.21; R=1.76; rawP=0.0005; adjP=0.0045
Contração de músculo liso vascular	9	Npr2, Cacna1c, Pla2g4a, Myl6b, Cacna1s, Ppp1r12b, Mylk2, Pla2g4e, Calm3.	C=122; O=9; E=2.32; R=3.87; rawP=0.0006; adjP=0.0050
Glicólise - Gluconeogênese	6	Pgm2, Eno3, Pgam2, Ldhb, Aldoa, Adh5.	C=60; O=6; E=1.14; R=5.25; rawP=0.0010; adjP=0.0078
Doença de Alzheimer	10	Cacna1c, Cox6a2, Atp2a1, Cacna1s, Cox7a1, Ndufs1, Cox8b, Nos1, Calm3, Mapt.	C=176; O=10; E=3.35; R=2.98; rawP=0.0021; adjP=0.0153
Regulação do citoesqueleto de actina	11	Myh14, Fgfr1, Itgb6, Itga7, Pfn2, Gsn, Egf, Myl2, Mylk2, Enah, Baiap2.	C=213; O=11; E=4.06; R=2.71; rawP=0.0027; adjP=0.0173
Secreção de ácido gástrico	6	Atp1a2, Mylk2, Calm3, Camk2b, Atp1a4, Cftr.	C=73; O=6; E=1.39; R=4.32; rawP=0.0027; adjP=0.0173
Via de sinalização GnRH	7	Cacna1c, Pla2g4a, Map2k7, Pla2g4e, Cacna1s, Calm3, Camk2b.	C=99; O=7; E=1.89; R=3.71; rawP=0.0029; adjP=0.0176
Secreção pancreática	7	Atp1a2, Pla2g4a, Atp2a1, Pla2g4e, Rab8a, Atp1a4, Cftr.	C=103; O=7; E=1.96; R=3.57; rawP=0.0036; adjP=0.0207
Via de sinalização da insulina	8	Prkab2, Prkaa2, Ppp1r3a, Acacb, Prkab1, Irs1, Phkg1, Calm3.	C=137; O=8; E=2.61; R=3.07; rawP=0.0048; adjP=0.0262

Fagossomo	9	M6pr, Rilp, Calr, Cd209f, Rab5c, Tuba4a, Atp6v0e2, Canx, Nos1.	C=174; O=9; E=3.31; R=2.72; rawP=0.0063; adjP=0.0312
Recuperação de bicarbonato no túbulo proximal	3	Atp1a2, Slc38a3, Atp1a4.	C=20; O=3; E=0.38; R=7.88; rawP=0.0062; adjP=0.0312
Amebíase	7	Serpinb10, Lamb2, Col4a2, Rab5c, Hspb1, Serpinb2, Lamc1.	C=116; O=7; E=2.21; R=3.17; rawP=0.0069; adjP=0.0327
Metabolismo de piruvato	4	Acyp2, Ldhb, Acacb, Ldhd.	C=42; O=4; E=0.80; R=5.00; rawP=0.0082; adjP=0.0358
Reparação *mismatch*	3	Rpa3, Rfc2, Rfc5.	C=22; O=3; E=0.42; R=7.16; rawP=0.0081; adjP=0.0358
Reparação de excisão de nucleotídeo	4	Rpa3, Rad23b, Rfc2, Rfc5.	C=43; O=4; E=0.82; R=4.88; rawP=0.0089; adjP=0.0373
Via de sinalização de adipocitocina	5	Prkab2, Prkaa2, Irs1, Acacb, Prkab1.	C=68; O=5; E=1.30; R=3.86; rawP=0.0096; adjP=0.0388
Degradação de RNA	5	Eno3, Tob1, Exosc9, Pnpt1, Lsm8.	C=73; O=5; E=1.39; R=3.60; rawP=0.0128; adjP=0.0498

C: número de genes de referência na categoria. **O**: número de genes observados no conjunto de genes e também na categoria. **E**: número de genes esperados na categoria. **R**: razão do enriquecimento. **rawP**: p-valor do teste hipergeométrico. **adjP**: p-valor ajustado pelo teste múltiplo.

Apesar de a análise ter sido realizada em RNA total de fêmur, o que mais chama a atenção é o fato de que foram encontrados genes que estão relacionados a músculo cardíaco e que indicaram alterações em diversas vias relacionadas a patologias ou funcionamento do sistema cardiovascular. Dentre as vias diretamente relacionadas a doenças, estão cardiomiopatia hipertrófica (HCM), cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo (ARVC) e miocardite viral. Já as vias relacionadas ao funcionamento do sistema cardiovascular, encontram-se as vias de contração de músculo cardíaco e contração de músculo liso vascular (Tabela 10).

A desregulação de outras vias como da adesão focal e interação receptor-meio extracelular podem levar uma a fixação alterada das células ósseas à MEC (Tabela 10). Essas vias são de extrema importância para a atividade dos osteoclastos, já que essas células precisam se fixar a uma superfície óssea para cumprir sua função de reabsorver o osso. Antes da adesão também é necessário que haja o reconhecimento de proteínas da MEC pelos osteoblastos para que estes se estabeleçam nas devidas regiões a serem reabsorvidas. Dessa forma, se há uma alteração na via de interação receptor-MEC, é possível que esse reconhecimento esteja prejudicado. Além disso, a adesão focal se deve à ancoragem das células à MEC através do citoesqueleto de actina, cuja via de regulação também se encontra alterada com todos os genes *downregulated* (Tabela 10). Assim, pode-se sugerir que a desregulação da interação receptor-MEC, da via do citoesqueleto de actina e da adesão focal nos animais mg$\Delta^{loxPneo}$ pode levar a uma atividade alterada dos osteoclastos.

Outra via que pode estar relacionada diretamente ao metabolismo ósseo é a via de junção ocludente (Tabela 10). Já foi mostrado que os osteoblastos estabelecem essas estruturas entre si, e que são importantes para direcionar vesículas para um sítio celular específico (Prêle, 2003). Assim, a desregulação dessa via pode levar a uma atividade alterada dos osteoblastos. Além disso, a via de sinalização do cálcio também se encontra alterada e pode estar relacionada a um desbalanço entre a sobrevivência e a proliferação das células ósseas (Tabela 10).

Outro resultado que vale ressaltar é o fato de que foi verificado que as vias de reparação por excisão de nucleotídeo e de reparação *mismatch* também se encontram alteradas (Tabela 10), onde os genes envolvidos nessas vias estão todos *upregulated*. Esse fato pode sugerir que o sistema de reparação de DNA no modelo animal estudado esteja desregulado ou com uma atividade muito elevada. Além disso, foi observada a desregulação da via de degradação de RNA e de processamento de proteína no retículo endoplasmático (Tabela 10), que podem sugerir que haja alteração na expressão de genes e na regulação de mRNAs e produtos proteicos que não estejam íntegros.

Meirelles et al. (2016) verificaram que nos animais mg$\Delta^{loxPneo}$, a mutação no gene *Fbn1* não leva a um estresse do retículo endoplasmático e que a fibrilina-1 é

secretada e processada como no animal selvagem. O grupo verificou ainda que a proteína PDI (*protein disulfide isomerase A1*), importante chaperona envolvida no processamento de proteínas no retículo endoplasmático, co-localiza com a fibrilina-1 de forma similar em animais mutantes e selvagens. Ao silenciar o PDI, eles verificaram uma maior secreção de fibrilina-1 e uma desorganização das microfibrilas em animais selvagens, e nenhuma alteração em animais mutantes, nos quais já era verificado microfibrilas alteradas (Meirelles et a., 2016). Já pela Tabela 10, foi verificado que na via de processamento de proteína no retículo endoplasmático o gene *Pdia4* (*protein disulfide isomerase associated 4*), membro da mesma família, está *upregulated* com uma diferença de expressão de 23% (Apêndice I). Pode-se sugerir que a maior expressão desse gene nos animais mutantes ocorre como uma tentativa de reter a secreção da fribrilina-1 mutada.

Além da identificação dos genes e vias diferencialmente expressos, foram verificadas as diferenças de expressão de marcadores de metabolismo ósseo. Foram analisados genes envolvidos na diferenciação e atividade de osteoblastos formação óssea, como Runx2, Osteocalcina, Osterix e fosfatase alcalina. Além disso, foram analisadas a expressão de: RANKL, marcador de diferenciação de osteoclastos; Colágeno tipo 1, proteína encontrada em tecido conjuntivo envolvida no suporte de tecidos; e PAI-1, alvo de TGF-β. Foi verificado que todos os genes se encontram abaixo do nível de 10% de diferença de expressão, onde é possível visualizar os marcadores na região acinzentada do *volcano plot* (Figura 21). Para confirmar esses resultados, foi analisada a expressão desses marcadores ósseos por RT-PCR. Os genes também não apresentaram diferença de expressão entre os grupos analisados (Apêndice H).

Também foi verificada a expressão dos genes modificadores candidatos, identificados dentro dos QTL (*quativative trait locus*) do fenótipo esquelético, que poderiam influenciar o desenvolvimento e a severidade das manifestações ósseas para o modelo de SMF, segundo trabalho anterior do grupo (Fernandes et al., 2016). Esse trabalho utilizou o modelo animal mg$\Delta^{loxPneo}$, híbrido para as linhagens B6 e 129, o que permitiu analisar uma ampla variação da severidade de fenótipos na geração F2 dos animais, cenário semelhante ao que ocorre em humanos. Para o fenótipo esquelético foram identificados 3 QTLs, Krq1, Krq2 e Krq3, onde foram selecionados os genes *Adamts9*, *Bmp15*, *Bmpr1b*, *Col25a1*, *Dnajb14*, *Foxp1*, *Foxp3*,

Npnt, *Porcn*, *Uba1*, *Ube3a*, *Ube3b*, *Ube3c* e *Usp27x*. Para os animais mgΔ^{loxPneo} da linhagem B6, esses genes não foram identificados com diferença de expressão significativa (Figura 21). Assim, expandimos a busca para todos os genes existentes nos três QTLs, e foram encontradas diferença de expressão dos genes: *Egf*, *Rpl34*, *Cyp2u1*, *Ddit4l*, *Adh5*, *Uba3*, *Lmod3* e *Pdzrn3* (Figura 22).

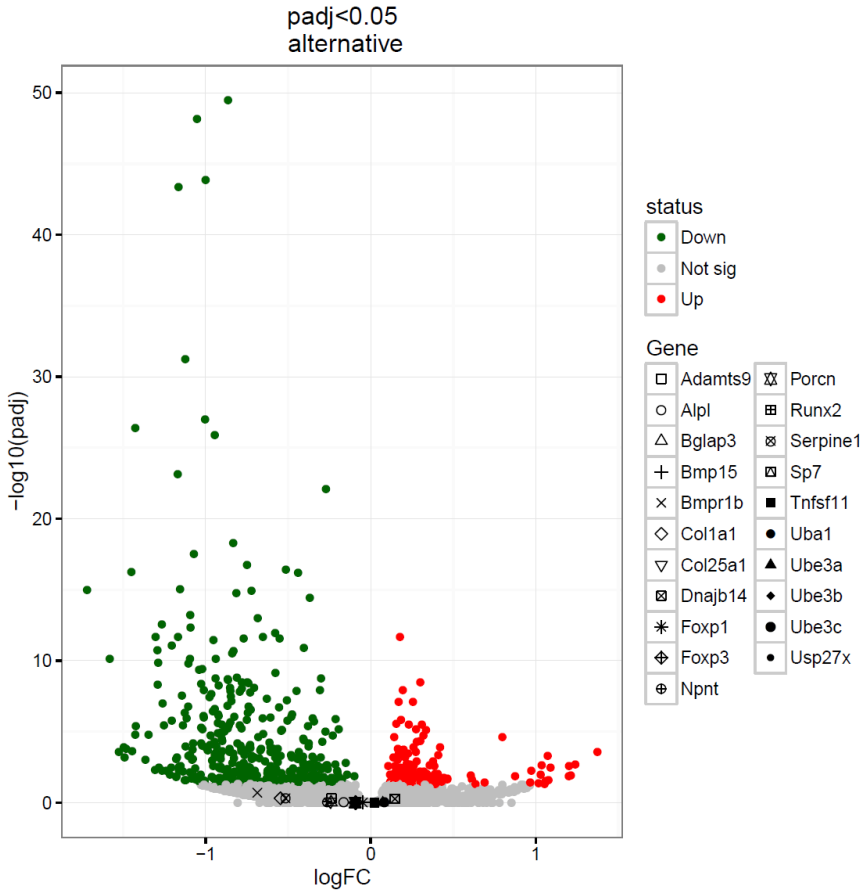

Figura 21 – Volcano plot dos genes diferencialmente expressos, considerando-se um p-valor de 0,05 e um valor absoluto de log2FC superior a 0,13, nos animais mgΔ^{loxPneo}. Os símbolos se referenciam aos marcadores ósseos analisados no trabalho e genes modificadores eleitos em trabalho anterior do grupo (Fernandes et al., 2016). Todos os genes se encontram fora da faixa considerada significativa.

Além disso, foram verificadas as expressões gênicas dos candidatos identificados nos QTLs envolvidos no fenótipo cardiovascular (Fernandes et al., 2016). Foi observado que os animais mgΔ^{loxPneo} apresentam diferença de expressão dos genes: *Cnksr1*, *Trim63*, *Myom3*, *Gale*, *Tcea3*, *C1qb*, *C1qc* e *Hspg2* (Figura 22).

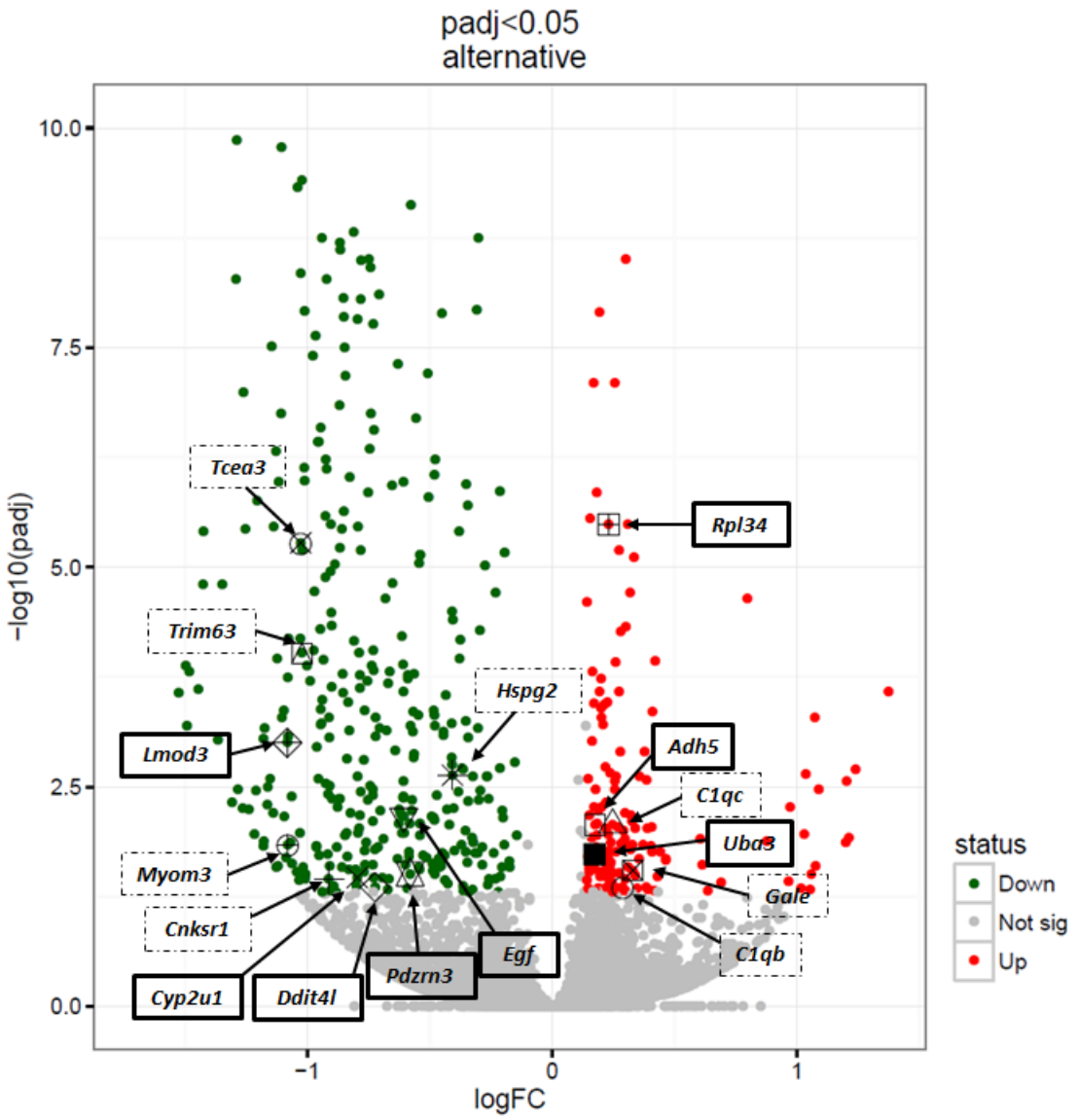

Figura 22 – Volcano plot dos genes diferencialmente expressos, considerando-se um p-valor de 0,05 e um valor absoluto de log2FC superior a 0,13, nos animais mgΔ^{loxPneo}. Os símbolos referenciam genes identificados nos QTLs para o fenótipo esquelético e cardiovascular (Fernandes et al., 2016) e que estão diferencialmente expressos neste trabalho.

O gene *Pdzrn3* (*PDZ Domain Containing Ring Finger 3*) apresentou uma menor expressão de aproximadamente 30% (Figura 22 e Apêndice I). A proteína codificada por esse gene está relacionada a diferenciação de adipócitos, mioblastos e osteoblastos (Gene Cards, GC03M073431). Assim, uma baixa expressão desse gene, pode afetar a diferenciação dos osteoblastos nos animais mgΔ^{loxPneo} e estar relacionada à pior qualidade óssea verificada pelo µCT.

O gene *Lmod3* (*Leiomodin 3*) codifica uma proteína da família das leiomodinas, que age como catalisador na nucleação de actina e é importante na organização dos filamentos finos dos sarcômeros em músculo esquelético (Gene

Cards, GC03M069156). Nos animais mgΔ^{loxPneo}, esse gene encontra-se com uma expressão de aproximadamente 50% menor do que os animais selvagens (Figura 22 e Apêndice I), o que pode indicar uma estrutura alterada dos sarcômeros e consequentemente do músculo esquelético no modelo para a SMF.

O gene *Egf* (*Epidermal Growth Factor*), *downregulated* nos animais mutantes com 34% de diferença de expressão, tem papel importante na regulação de crescimento, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (Gene Cards, GC04P109912) e está relacionado à via de regulação do citoesqueleto de actina (Tabela 10). A expressão alterada desse gene pode levar à desregulação do ciclo celular e função do citoesqueleto de actina. Já o gene *Rpl34* (*Ribosomal Protein L34*) codifica uma proteína ribossomal da subunidade 60S e uma superexpressão desse gene já foi observada em alguns tipos de cânceres (Gene Cards, GC04P108620). Nos animais mgΔ^{loxPneo}, esse gene apresenta um aumento de expressão de 17% (Figura 22 e Apêndice I). Enquanto que o gene *Uba3* (*Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 3*), 13% *upregulated* nos animais mutantes (Figura 22 e Apêndice I), codifica uma proteína da família E1 de enzimas ativadoras de ubiquitina, que por sua vez se associa a uma outra enzima e ativa a proteína NEDD8 “ubiquitina-*like*”, que regula divisão e sinalização celular e embriogênese (Gene Cards, GC03M069054). A diferença de expressão dos últimos dois genes citados pode indicar uma maior atividade dos ribossomos e do mecanismo celular de degradação de proteínas, que pode ser ocasionada pelos efeitos crônicos da mutação no gene *Fbn1*.

O gene *Ddit4l* (*DNA Damage Inducible Transcript 4 Like*), 39% *downregulated* nos animais mutantes (Figura 22 e Apêndice I), está envolvido na via de sinalização de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), um regulador central de síntese proteica, onde pode ser capaz de inibir o crescimento celular (Gene Cards, GC04M10018). Uma menor expressão desse gene pode levar a uma alteração na regulação do ciclo celular controlada pela via do mTOR.

Dentre os genes encontrados nos QTLs para o fenótipo cardiovascular, o gene *Trim63* (*Tripartite Motif Containing 63*), 51% downregulated nos animais mgΔ^{loxPneo}, codifica uma proteína da família *RING zinc finger*, encontrada em músculo estriado e na íris (Gene Cards, GC01M026062). Além disso, o gene *Myom3*

(*Myomesin 3*), com uma expressão de 53% menor nos animais mutantes, a partir de similaridades estruturais, pode estar envolvido na ligação dos filamentos intermediários do citoesqueleto ao disco-M das miofibrilas de músculo estriado, (Gene Cards, GC01M024056). Dessa forma, a menor expressão desses genes no modelo para SMF pode indicar uma alteração na estrutura do tecido muscular estriado.

Além disso, foi observado que o gene *Hspg2* (perlecan, *heparan sulfate proteoglycan 2*), um candidato a gene modificador do fenótipo cardiovascular, está *downregulated* com uma diferença de expressão de 25% (Figura 22 e Apêndice I). Mutações nesse gene estão ligadas à Síndrome Shwartz-Jampel (SJS1) (OMIM 255800), doença autossômica recessiva caracterizada por miotonia permanente e displasia esquelética, resultando em baixa estatura, cifoescoliose, curvatura de diáfises e epífises irregulares (Viljoen et al., 1992). A proteína perlecan se liga a várias proteínas da lâmina basal, como colágeno IV e laminina-1, e receptores de superfície celular, como β1-integrina e α-dystroglican. Assim, as mutações no gene *Hspg2* podem levar a uma perda de função da proteína e, consequentemente, diminuir a integridade das membranas basais das células e da matriz cartilaginosa (Nicole et al., 2000).

Durante a obtenção das imagens de µCT (escaneamento) dos fêmures de machos mg$\Delta^{loxPneo}$, foram observadas deformidades da epífise distal desses ossos (Figura 23). De 6 animais mutantes sem tratamento, 3 apresentaram essa deformação (Figura 23A-C). Enquanto que, de 9 animais mutantes tratados com Ramipril, 1 apresentou uma deformação menos visível (Figura 23D). Não foram encontradas deformações em fêmeas. Essas deformidades foram citadas como característica da SJS1, e podem ter influência da baixa expressão de *Hspg2*.

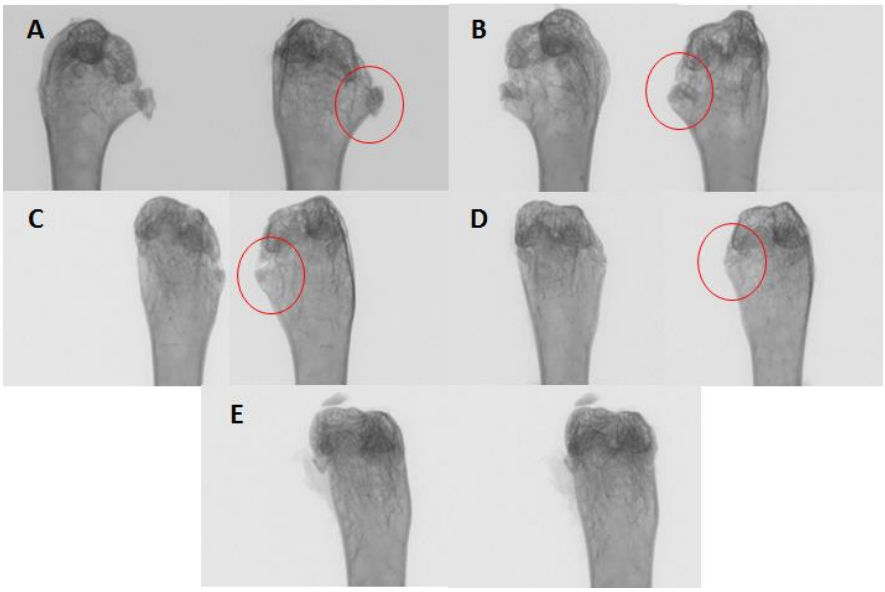

Figura 23 – Imagens de escaneamento por µCT da extremidade distal dos fêmures. Deformações encontradas nos fêmures de machos mgΔ^{loxPneo}. (A-C) Machos sem tratamento. (D) Macho tratado com Ramipril. (E) Macho selvagem sem tratamento. Círculos vermelhos indicam a região da deformação. Círculos vermelhos indicam a região da deformação.

A partir de outras análises, foram geradas outras listas de genes com 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150% e 200% de diferença de expressão entre os animais mgΔ^{loxPneo} e os animais selvagens, com o intuito de identificar os genes presentes em determinados níveis de diferença de expressão conforme o aumento da restringência (Tabela 11). Essas listas foram geradas a partir da atribuição do valor de log2FC referente ao nível de expressão diferencial de interesse. A Tabela 11 fornece ainda a quantidade total de genes presentes em cada nível analisado, identificando-se as quantidades de genes *downregulated* e *upregulated*.

Tabela 11 - Quantidade de genes diferencialmente expressos nos animais mgΔ^{loxPneo} em determinados níveis de diferença de expressão.

Diferença de Expressão	Quantidades de Genes	*Downregulated*	*Upregulated*
200%	1	1	0
150%	14	13	1
100%	100	87	13
90%	128	113	15
80%	165	150	16
70%	205	188	17
60%	240	222	18
50%	275	254	21
40%	305	284	21
30%	355	320	35
20%	425	355	70
10%	518	374	144

A partir dessa análise foi possível verificar que o gene da fibrilina-1 se encontra *downregulated* no modelo mgΔ^{loxPneo} com uma diferença de expressão de 20%. Além disso, o único gene que se apresenta com um nível de diferença de expressão em torno de 200% é o gene *Xirp1* (*xin actin-binding repeat containing 1*), *downregulated* no modelo para SMF. Esse gene é expresso durante o desenvolvimento de músculos cardíaco e esquelético, e animais knockout para esse gene apresentam uma branda miopatia e uma regeneração do músculo esquelético afetada (Al-Sajee, 2015). Além do *Xirp1*, diversos genes relacionados ao desenvolvimento e metabolismo muscular esquelético foram encontrados na análise de expressão diferencial, como o *Myf6* (myogenic factor 6) e o *Myoz2* (myozenin 2), ambos *downregulated* com um nível de expressão diferencial de 150%. Outros genes já citados também estão envolvidos com a regulação de músculos esquelético e estriados.

Estudos sugerem que o tecido muscular esquelético pode regular a qualidade óssea. Hamrick (2011) reúne diversos estudos que apresentam evidências que indicam que existe uma interação metabólica entre músculo e osso, levantando a hipótese de que o tecido muscular, pela liberação de miocinas, pode regular a massa óssea tanto positivamente quanto negativamente. Dessa forma, a baixa expressão de genes ligados ao metabolismo do músculo esquelético pode ser um reflexo do estado desse tecido no modelo animal, e que este deve estar regulando de forma negativa o metabolismo ósseo.

Assim, uma hipótese para a manifestação da cifose seria que a baixa expressão de genes ligados ao metabolismo do músculo esquelético presente no osso pode ser um reflexo do estado muscular no modelo animal. Isso faz com que o osso sofra uma regulação negativa do músculo e, além disso, a estrutura muscular alterada pode não ser capaz de sustentar a coluna de forma correta, levando à curvatura da coluna nos animais mg$\Delta^{loxPneo}$.

5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realisada uma caracterização detalhada do fenótipo ósseo do modelo mgΔ^{loxPneo}, identificando pior qualidade do osso trabecular em machos afetados. Além disso, apesar de se mostrar que o tratamento com ramipril melhora o grau de cifose no modelo, a droga não altera a qualidade óssea. Conclui-se assim, que a cifose não é causada somente por uma microestrutura óssea alterada, já que os animais mutantes tratados com Ramipril apresentaram melhora do fenótipo sem melhora dos parâmetros ósseos; e que a melhora da cifose ocasionada pelo Ramipril em animais mgΔ^{loxPneo} não é ocasionada pela melhora da estrutura óssea, o que leva à hipótese de que a droga pode agir em tecidos adjacentes à coluna vertebral como músculos e ligamentos, que dão sustentação às vértebras.

Como os fenótipos ósseo e pulmonar respondem de forma diferente ao tratamento com ramipril e losartan, indicando diferentes vias metabólicas envolvidas nos dois fenótipos, foi testada a participação da via da bradicinina no fenótipo ósseo. A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que a ausência do receptor B2R não interfere no desenvolvimento de cifose nos animais mgΔ^{loxPneo}, mas está relacionada ao efeito do Ramipril nos animais selvagens e mutantes. Assim, a estratégia de análise diferencial de expressão gênica foi utilizada para se identificar vias alteradas no sistema ósseo dos animais mutantes.

Da lista de genes obtida pela análise de RNA-seq de fêmur, é possível verificar que diversos genes relacionados ao metabolismo do músculo esquelético estão diferencialmente expressos nos animais mgΔ^{loxPneo}, o que corrobora a hipótese de que a cifose pode ser ocasionada por um estado alterado do músculo adjacente às vértebras. Apesar de a análise ter sido realizada em amostras de osso, o fato de esses genes terem sido observados na análise pode sugerir que haja uma regulação parácrina do osso e do músculo nesses animais, onde uma pior qualidade muscular pode levar a uma pior qualidade óssea.

Este trabalho foi capaz de fornecer um direcionamento mais específico para o estudo do desenvolvimento de cifose no modelo para SMF, e ajuda a elucidar o efeito da droga Ramipril na cifose do modelo animal da SMF mgΔ^{loxPneo}. São necessários mais estudos para concluir a hipótese de que a droga possa agir em músculos ou ligamentos adjacentes à coluna vertebral, mas os resultados obtidos

neste trabalho já mostram que o metabolismo do osso e do músculo podem estar diretamente relacionados. Além disso, a análise de expressão diferencial em osso entre animais SMF e selvagens identificou vários genes e vias candidatas a estarem envolvidas na patogênese óssea na SMF, que deverão ser explorados em trabalhos futuros.

Referências

AHIMASTOS, AA, et al. **Ramipril reduces large-artery stiffness in peripheral arterial disease and promotes elastogenic remodeling in cell culture**. Hypertension, 2005. 45(6): 1194-9. DOI: 10.1161/01.HYP.0000168945.44069.aa.

AL-SAJEE D, et al. **Xin-deficient mice display myopathy, impaired contractility, attenuated muscle repair and altered satellite cell functionality**. Acta Physiol (Oxf). 2015 Jun;214(2):248-60. doi: 10.1111/apha.12455. Epub 2015 Jan 28.

ANDREWS S. **FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence**. Data: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

ANDRIKOPOULOS K, et al. **Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly**. Nat Genet, 1995. 9(1): p. 31-6. DOI: 10.1038/ng0195-31.

ANNES JP, Munger JS, Rifkin DB. **Making sense of latent TGF-beta activation**. J Cell Sci. 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-24.

ASABA Y, et al. **Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension**. J Bone Miner Res. 2009 Feb;24(2):241-50. doi: 10.1359/jbmr.081006.

BEIGHTON P, et al**. International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue.** Berlin, 1986. Am J Med Genet. 1988 Mar;29(3):581-94. DOI: 10.1002/ajmg.1320290316

BOOMS P, et al. **Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments**. Hum Genet. 2000 Sep;107(3):216-24.

BORDER, WA and Noble, NA. **Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis**. Hypertension, 1998. 31(1 Pt 2): 181-8.

BRECHTER AB, et al. **Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha**. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. Bone. 2008 Jul;43(1):72-83. doi: 10.1016/j.bone.2008.02.003. Epub 2008 Mar 10.

BULÉON M, et al. **Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model**. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 May;294(5):F1249-56. DOI: 10.1152/ajprenal.00501.2007.

CARTA L, et al. **Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development**. J Biol Chem. 2006 Mar 24;281(12):8016-23. Epub 2005 Dec 28. DOI: 10.1074/jbc.M511599200.

CHARBONNEAU NL, et al. **In vivo studies of mutant fibrillin-1 microfibrils**. J Biol Chem. 2010 Aug 6;285(32):24943-55. doi: 10.1074/jbc.M110.130021. Epub 2010 Jun 7.

CHEN S, et al. **Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton**. Mol Genet Metab. 2015 May;115(1):53-60. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.02.006. Epub 2015 Feb 27.

CHOI BG, et al. **Impact of Renin-Angiotensin System Inhibitors on Long-Term Clinical Outcomes of Patients With Coronary Artery Spasm**. J Am Heart Assoc. 2016 Jul 21;5(7). pii: e003217. doi: 10.1161/JAHA.116.003217.

DALLAS SL, et al. **Role of the latent transforming growth factor beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo**. J Bone Miner Res. 2000 Jan;15(1):68-81. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.68.

DE PAEPE A1, et al. **Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome**. Am J Med Genet. 1996 Apr 24;62(4):417-26. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960424)62:4<417::AID-AJMG15>3.0.CO;2-R

DIETZ HC, et al. **Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene**. Nature. 1991 Jul 25;352(6333):337-9.

DONKERVOORT S, et al. **The neuromuscular differential diagnosis of joint hypermobility**. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2015 Mar;169C(1):23-42. doi: 10.1002/ajmg.c.31433.

DUNNILL, M.S. **Quantitative Methods in the Study of Pulmonary Pathology**. Thorax, 1962. 17: p. 320-28.

ERBEL R, et al. **Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult**. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2014 Nov 1;35(41):2873-926. doi: 10.1093/eurheartj/ehu281. Epub 2014 Aug 29.

ERDÖS EG, Tan F, Skidgel RA. **Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function**. Hypertension. 2010 Feb;55(2):214-20. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144600.

FERNANDES GR, Massironi SM, Pereira LV. **Identification of Loci Modulating the Cardiovascular and Skeletal Phenotypes of Marfan Syndrome in Mice**. Sci Rep. 2016 Mar 1;6:22426. doi: 10.1038/srep22426.

FLEMING I. **Signaling by the angiotensin-converting enzyme**. Circ Res. 2006 Apr 14;98(7):887-96. Review.

FOURNIER PG, et al. **The TGF-β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone**. Cancer Cell. 2015 Jun 8;27(6):809-21. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.009. Epub 2015 May 14.

GENE CARDS. http://www.genecards.org/. Acesso em: 19 de outubro de 2016.

GERBER EE, et al**. Integrin-modulating therapy prevents fibrosis and autoimmunity in mouse models of scleroderma**. Nature. 2013 Nov 7;503(7474):126-30. doi: 10.1038/nature12614. Epub 2013 Oct 9.

GRAFE I, et al. **Excessive transforming growth factor-β signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta**. Nat Med. 2014 Jun;20(6):670-5. doi: 10.1038/nm.3544. Epub 2014 May 4.

GU SS, et al. **Involvement of the skeletal renin-angiotensin system in age-related osteoporosis of ageing mice**. Biosci Biotechnol Biochem. 2012;76(7):1367-71. Epub 2012 Jul 7.

HABASHI JP, et al. **Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism**. Science. 2011 Apr 15;332(6027):361-5.

HABASHI JP, et al. **Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome**. Science. 2006 Apr 7;312(5770):117-21.

HAGIWARA H, et al. **Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells**. J Endocrinol. 1998 Mar;156(3):543-50.

HAMRICK MW. **A role for myokines in muscle-bone interactions**. Exerc Sport Sci Rev. 2011 Jan;39(1):43-7. doi: 10.1097/JES.0b013e318201f601. Review.

ISOGAI Z, et al. **Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein**. J Biol Chem. 2003 Jan 24;278(4):2750-7. Epub 2002 Nov 11. DOI: 10.1074/jbc.M209256200.

IZU Y, et al. **Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass**. J Biol Chem. 2009 Feb 20;284(8):4857-64. doi: 10.1074/jbc.M807610200. Epub 2008 Nov 11. DOI: 10.1074/jbc.M807610200.

JONES KB, et al. **Symposium on the musculoskeletal aspects of Marfan syndrome: meeting report and state of the science**. J Orthop Res. 2007 Mar;25(3):413-22.

JUDGE DP, et al. **Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome**. J Clin Invest. 2004 Jul;114(2):172-81. DOI: 10.1172/JCI20641.

KAARTINEN V, Warburton D. **Fibrillin controls TGF-beta activation**. Nat Genet. 2003 Mar;33(3):331-2. DOI: 10.1038/ng0303-331.

KAINULAINEN K, Peltonen L. **Marfan gene discovered**. Ann Med. 1991 Oct;23(4):395-6.

KAKOKI M, et al. **Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 1;107(22):10190-5. DOI: 10.1073/pnas.1005144107.

KIM BT, et al. **The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats.** J Bone Miner Res. 2003 Jan;18(1):150-5. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.1.150.

KOSHIDA H, Takeda R, Miyamori I. **Lisinopril decreases plasma free testosterone in male hypertensive patients and increases sex hormone binding globulin in female hypertensive patients**. Hypertens Res. 1998 Dec;21(4):279-82.

KWOK T, et al. **Does the use of ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers affect bone loss in older men?**. Osteoporos Int. 2012 Aug;23(8):2159-67. doi: 10.1007/s00198-011-1831-7. Epub 2011 Nov 12.

LAVOIE JL, Sigmund CD. **Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system**. Endocrinology. 2003 Jun;144(6):2179-83.

LAWS N, Hoey A**. Progression of kyphosis in mdx mice**. J Appl Physiol (1985). 2004 Nov;97(5):1970-7. Epub 2004 Jul 2. DOI: 10.1152/japplphysiol.01357.2003.

LEE B, et al. **Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes**. Nature. 1991 Jul 25;352(6333):330-4. DOI: 10.1038/352330a0.

LIMA BL, 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. 2010 Nov 30;5(11):e14136. DOI: 10.1371/journal.pone.0014136.

LIU YY, et al. **Captopril improves osteopenia in ovariectomized rats and promotes bone formation in osteoblasts**. J Bone Miner Metab. 2011 Mar;29(2):149-58. doi: 10.1007/s00774-010-0209-9. Epub 2010 Aug 6.

LOEYS B. **The search for genotype/phenotype correlation in Marfan syndrome: to be or not to be?**. Eur Heart J. 2016 Apr 20. pii: ehw154. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw154.

LOEYS BL, et al. **The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome**. J Med Genet. 2010 Jul;47(7):476-85. doi: 10.1136/jmg.2009.072785.

MEIRELLES T, et al. **Fibrillin-1 mgΔ(lpn) Marfan syndrome mutation associates with preserved proteostasis and bypass of a protein disulfide isomerase-dependent quality checkpoint.** Int J Biochem Cell Biol. 2016 Feb;71:81-91. doi: 10.1016/j.biocel.2015.12.009.

MOBERG L, et al. **Low androstenedione/sex hormone binding globulin ratio increases fracture risk in postmenopausal women**. The Women's Health in the Lund Area study. Maturitas. 2013 Jul;75(3):270-5. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.04.010. Epub 2013 May 15.

MOHAMMAD KS, et al. **Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone**. PLoS One. 2009;4(4):e5275. doi: 10.1371/journal.pone.0005275. Epub 2008 Apr 16.

MORELLO R, et al. **CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta**. Cell. 2006 Oct 20;127(2):291-304. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.039.

NAKAGAMI H, Osako MK, Morishita R. **Potential effect of angiotensin II receptor blockade in adipose tissue and bone**. Curr Pharm Des. 2013;19(17):3049-53. Review.

NAMAZI S, ARDESHIR-ROUHANI-FARD S, ABEDTASH H. **The effect of renin angiotensin system on tamoxifen resistance**. Med Hypotheses. 2011 Jul;77(1):152-5. doi: 10.1016/j.mehy.2011.04.004. Epub 2011 May 4.

NEPTUNE ER, et al. **Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome**. Nat Genet. 2003 Mar;33(3):407-11.

NICOLE S, et al. **Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia)**. Nat Genet. 2000 Dec;26(4):480-3. DOI: 10.1038/82638.

NISTALA H, et al. **Differential effects of alendronate and losartan therapy on osteopenia and aortic aneurysm in mice with severe Marfan syndrome**. Hum Mol Genet. 2010 Dec 15;19(24):4790-8. (c)

NISTALA H, et al. **Extracellular microfibrils control osteoblast-supported osteoclastogenesis by restricting TGF-β stimulation of RANKL production**. J Biol Chem. 2010 Oct 29;285(44):34126-33. (b)

NISTALA H, et al. **Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF-β and BMP bioavailability during bone formation**. J Cell Biol. 2010 Sep 20;190(6):1107-21. (a)

NOTICE OF RETRACTION. Hypertension. 2016 Jan;67(1):e1. doi: 10.1161/HYP.0000000000000038.

NYMAN JS, et al. **Combined treatment with a transforming growth factor beta inhibitor (1D11) and bortezomib improves bone architecture in a mouse model of myeloma-induced bone disease**. Bone. 2016 Jul 14;91:81-91. doi: 10.1016/j.bone.2016.07.007.

PALZ M, et al. **Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3' region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation**. Am J Med Genet, 2000. 91(3): 212-21.

PEREIRA L, et al. **Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome.** Hum Mol Genet, 1993. 2(10): 1762.

PEREIRA L, et al. **Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):3819-23.

PEREIRA L, et al. **Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome**. Nat Genet. 1997 Oct;17(2):218-22.

PRÊLE CM, et al. **Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts.** Exp Cell Res. 2003 Jan 1;282(1):24-34. doi:10.1006/excr.2002.5668.

PUTNAM EA, et al. **Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly**. Nat Genet. 1995 Dec; 11(4):456-8.

PYERITZ RE. **Evaluation of the adolescent or adult with some features of Marfan syndrom**e. Genet Med. 2012 Jan;14(1):171-7. doi: 10.1038/gim.2011.48. Epub 2012 Jan 5.

PYERITZ RE. **The Marfan syndrome**. Annu Rev Med. 2000;51:481-510. DOI: 10.1146/annurev.med.51.1.481.

RAGHUNATH M, et al. **The cutaneous microfibrillar apparatus contains latent transforming growth factor-beta binding protein-1 (LTBP-1) and is a repository for latent TGF-beta1**. J Invest Dermatol. 1998 Oct;111(4):559-64. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00339.x.

RAMACHANDRA CJ, et al. **Molecular pathogenesis of Marfan syndrome**. Int J Cardiol. 2015;187:585-91. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.423. Epub 2015 Mar 31. Review.

RAMALINGAM L, et al. **The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance**. Biochim Biophys Acta. 2016 Aug 4. pii: S0925-4439(16)30187-9. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.019.

RAUCH F, Glorieux FH. **Osteogenesis imperfecta**. Lancet. 2004 Apr 24;363(9418):1377-85. Review. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16051-0.

RIFKIN DB, Todorovic V. **Bone matrix to growth factors: location, location, location**. J Cell Biol. 2010 Sep 20;190(6):949-51.

RIFKIN DB. **Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability**. J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):7409-12. Epub 2004 Dec 16. DOI: 10.1074/jbc.R400029200.

ROBINSON PN, Godfrey M. **The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies**. J Med Genet. 2000 Jan;37(1):9-25.

RODRIGUEZ-VITA, J, et al. **Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism**. Circulation, 2005. 111(19): p. 2509-17.

RUIZ-ORTEGA, M., et al. **Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury**. Curr Hypertens Rep, 2003. 5(1): p. 73-9.

SAHARINEN J, Taipale J, Keski-Oja J. **Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1**. EMBO J. 1996 Jan 15;15(2):245-53.

SAKAI LY, et al. FBN1: **The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders**. Gene. 2016 Jul 17. pii: S0378-1119(16)30559-5. doi: 10.1016/j.gene.2016.07.033. [Epub ahead of print] Review.

SEEMAN E. **Clinical review 137: Sexual dimorphism in skeletal size, density, and strength**. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Oct;86(10):4576-84. DOI: 10.1210/jcem.86.10.7960.

SENGLE G, et al. **A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7**. J Mol Biol. 2008 Sep 12;381(4):1025-39.

SENGLE G, et al. **Microenvironmental regulation by fibrillin-1**. PLoS Genet. 2012 Jan;8(1):e1002425. doi: 10.1371/journal.pgen.1002425. Epub 2012 Jan 5.

SILVERMAN DI, et al. **Life expectancy in the Marfan syndrome**. Am J Cardiol. 1995 Jan 15;75(2):157-60.

SIRACUSA LD, et al. **A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation**. Genome Res. 1996 Apr;6(4):300-13.

VILJOEN D, Beighton P. **Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia)**. J Med Genet. 1992 Jan;29(1):58-62.

VON KODOLITSCH Y, et al. **Perspectives on the revised Ghent criteria for the diagnosis of Marfan syndrome**. Appl Clin Genet. 2015 Jun 16;8:137-55. doi: 10.2147/TACG.S60472.

WILD RA, et al. **Adrenal androgens, sex-hormone binding globulin and bone density in osteoporotic menopausal women: is there a relationship?**. Maturitas. 1987 Apr;9(1):55-61.

YAMAMOTO S, et al. **Use of renin-angiotensin system inhibitors is associated with reduction of fracture risk in hemodialysis patients**. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0122691. doi: 10.1371/journal.pone.0122691. eCollection 2015.

YANG M, et al. **Impairing effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor Captopril on bone of normal mice**. Eur J Pharmacol. 2016 Jan 15;771:40-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.12.011. Epub 2015 Dec 9.

YANG T, et al. **E-selectin ligand 1 regulates bone remodeling by limiting bioactive TGF-β in the bone microenvironment**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 30;110(18):7336-41. doi: 10.1073/pnas.1219748110. Epub 2013 Apr 15.

Apêndice A – Análise trabecular de fêmures de machos.

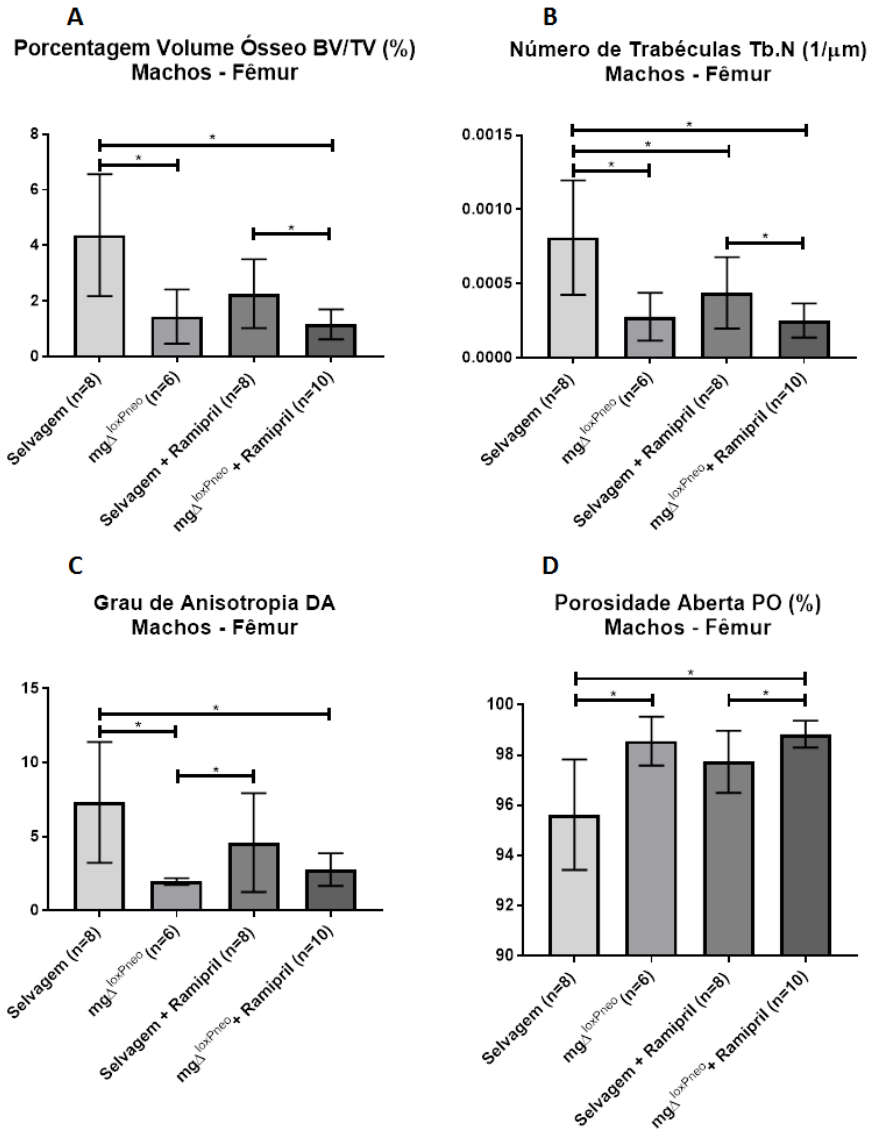

Figura 1 – Parâmetros trabeculares obtidos por µCT de fêmures de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) BV/TV. Animais mgΔ^{loxPneo}, controles e tratados com Ramipril, e selvagens tratados apresentaram uma pior estrutura óssea quando comparados com os animais selvagens. Animais mutantes tratados com Ramipril apresentaram diminuição em relação aos animais selvagens também tratados. (B) Tb.N. Animais mgΔ^{loxPneo}, controles e tratados com Ramipril, e selvagens tratados apresentaram uma diminuição do número de trabéculas quando comparados aos animais selvagens. (C) DA. Os animais mutantes, controles e tratados, apresentaram menor DA em relação ao grupo selvagem controle. Houve diferença significativa entre os grupos mgΔ^{loxPneo} controle e selvagem tratado. (D) PO. Os animais mutantes, controles e tratados, apresentaram maior PO em relação aos animais selvagens controles. Os animais mgΔ^{loxPneo} tratados também apresentaram maior média em relação ao grupo selvagem tratado. *P = 0,029.

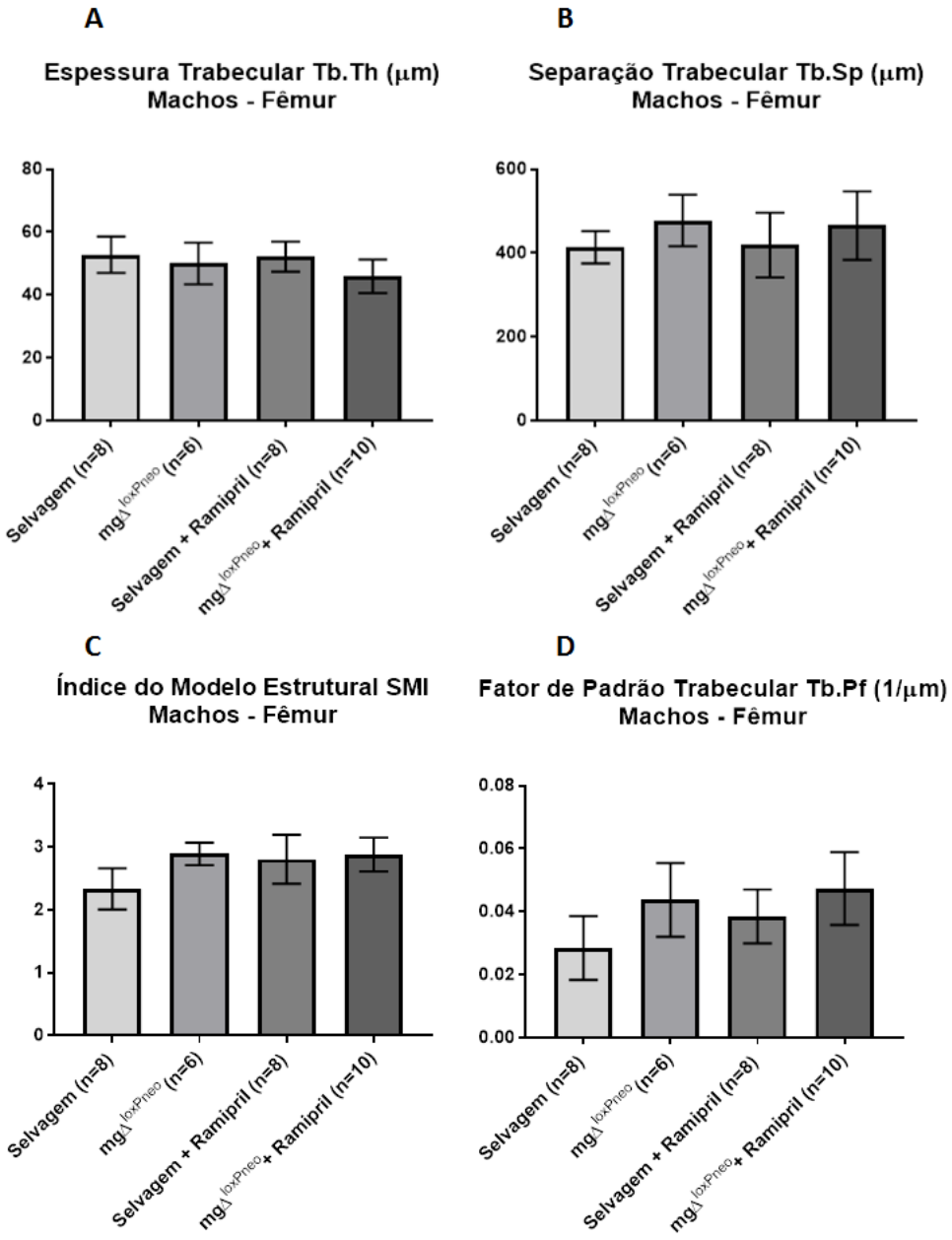

Figura 2 – Parâmetros trabeculares obtidos por µCT de fêmures de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) Tb.Th. (B) Tb.Sp. (C) SMI. (D) Tb.Pf. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice B – Análise trabecular de vértebras de machos.

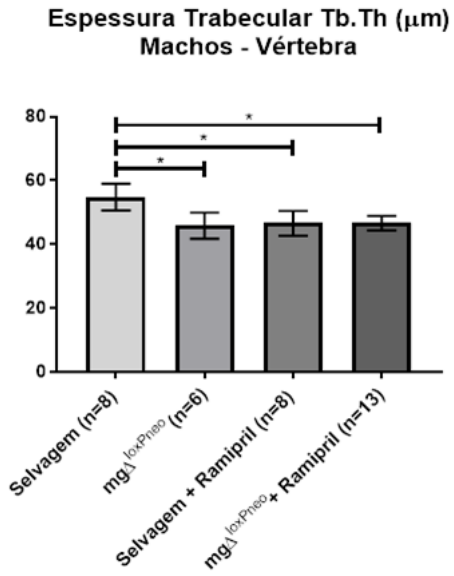

Figura 1 – Parâmetros trabeculares obtidos por µCT de vértebras de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. Parâmetro Tb.Th. Os animais mutantes, controles e tratados, e selvagens tratados apresentaram menor espessura trabecular em relação ao grupo selvagem controle. *P = 0,024.

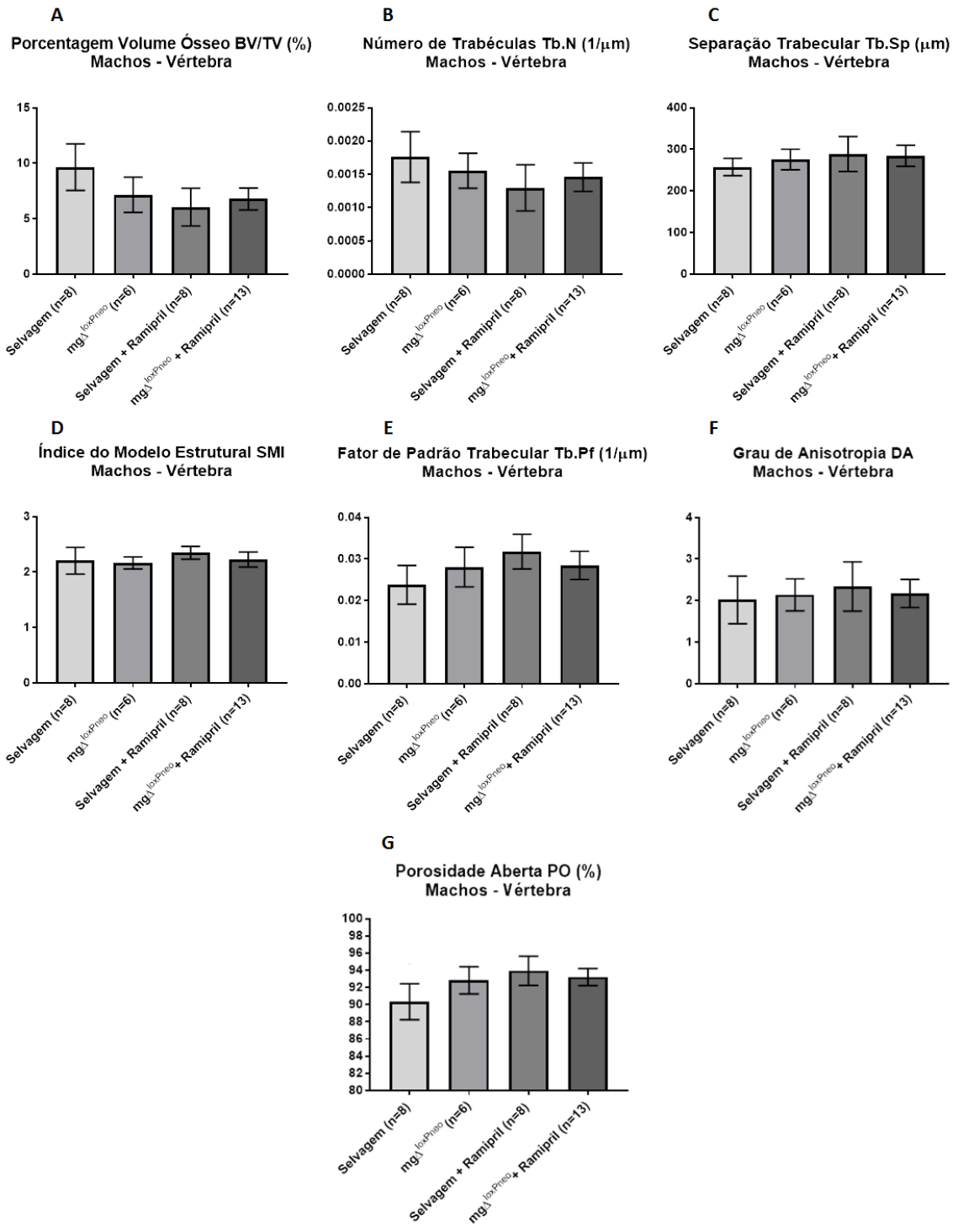

Figura 2 – Parâmetros trabeculares obtidos por μCT de vértebras de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) Tb.N. (B) Tb.Sp. (C) SMI. (D) DA. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice C – Análise cortical de fêmures de machos.

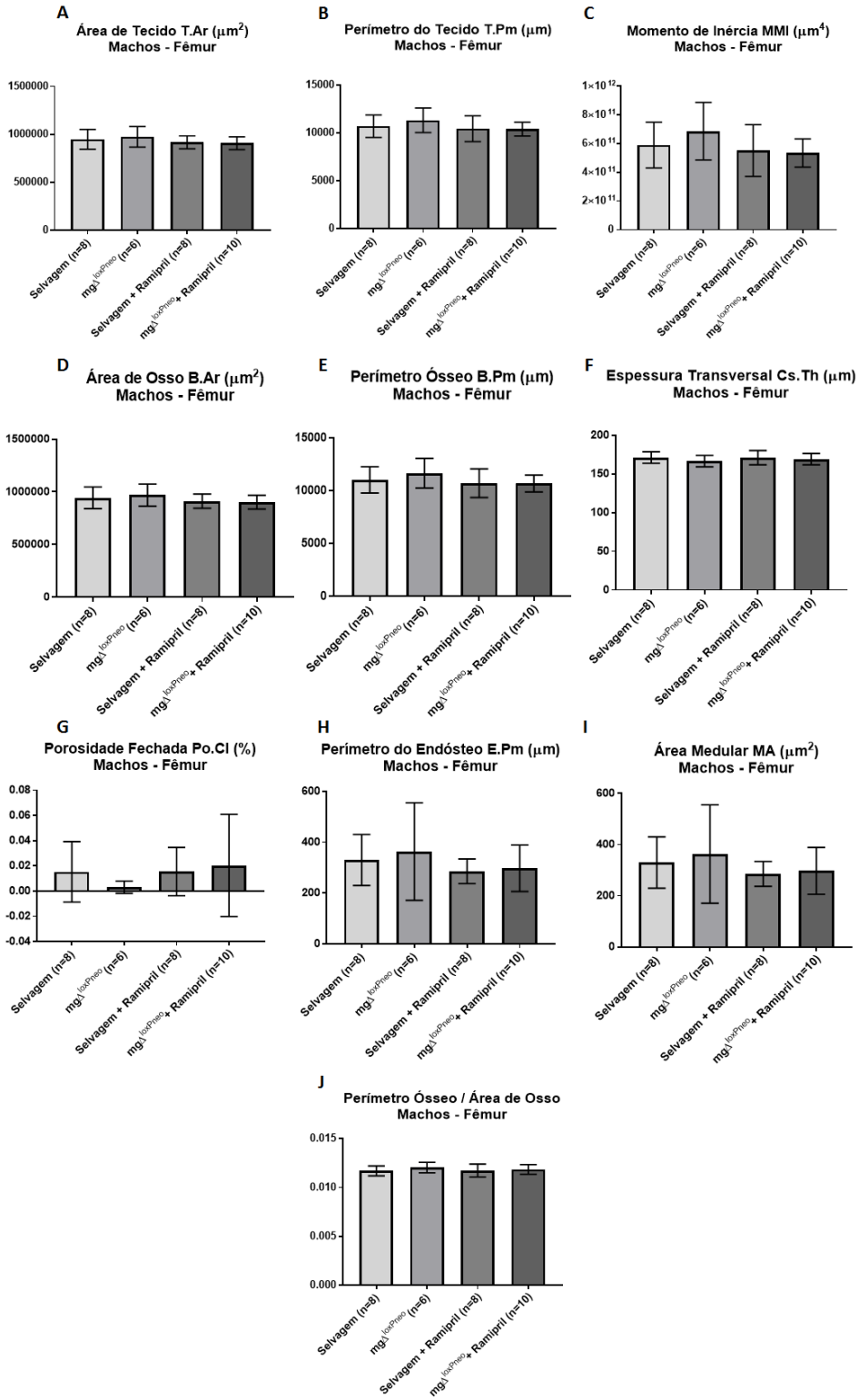

Figura 1 – Parâmetros corticais obtidos por µCT de fêmures de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) T.Ar. (B) T.pm. (C) MMI. (D) B.Ar. (E) B.Pm. (F) Cs.Th. (G) Po.Cl. (H) E.Pm. (I) MA. (J) Razão B.Pm/B.Ar. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice D – Análise cortical de vértebras de machos.

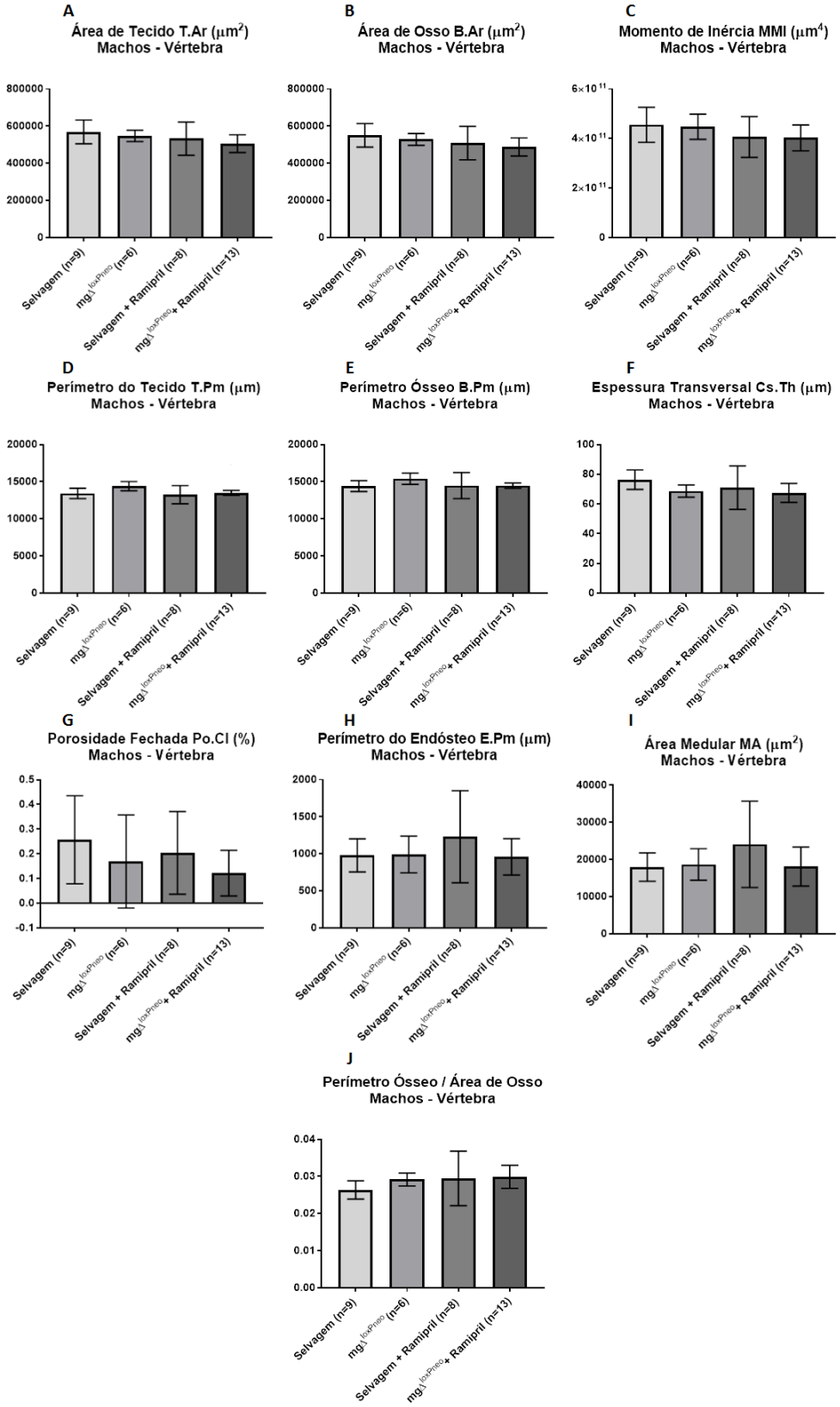

Figura 1 – Parâmetros corticais obtidos por µCT de vértebras de machos de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) T.Ar. (B) T.pm. (C) MMI. (D) B.Ar. (E) B.Pm. (F) Cs.Th. (G) Po.Cl. (H) E.Pm. (I) MA. (J) Razão B.Pm/B.Ar. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice D – Análise trabecular de fêmures de fêmeas.

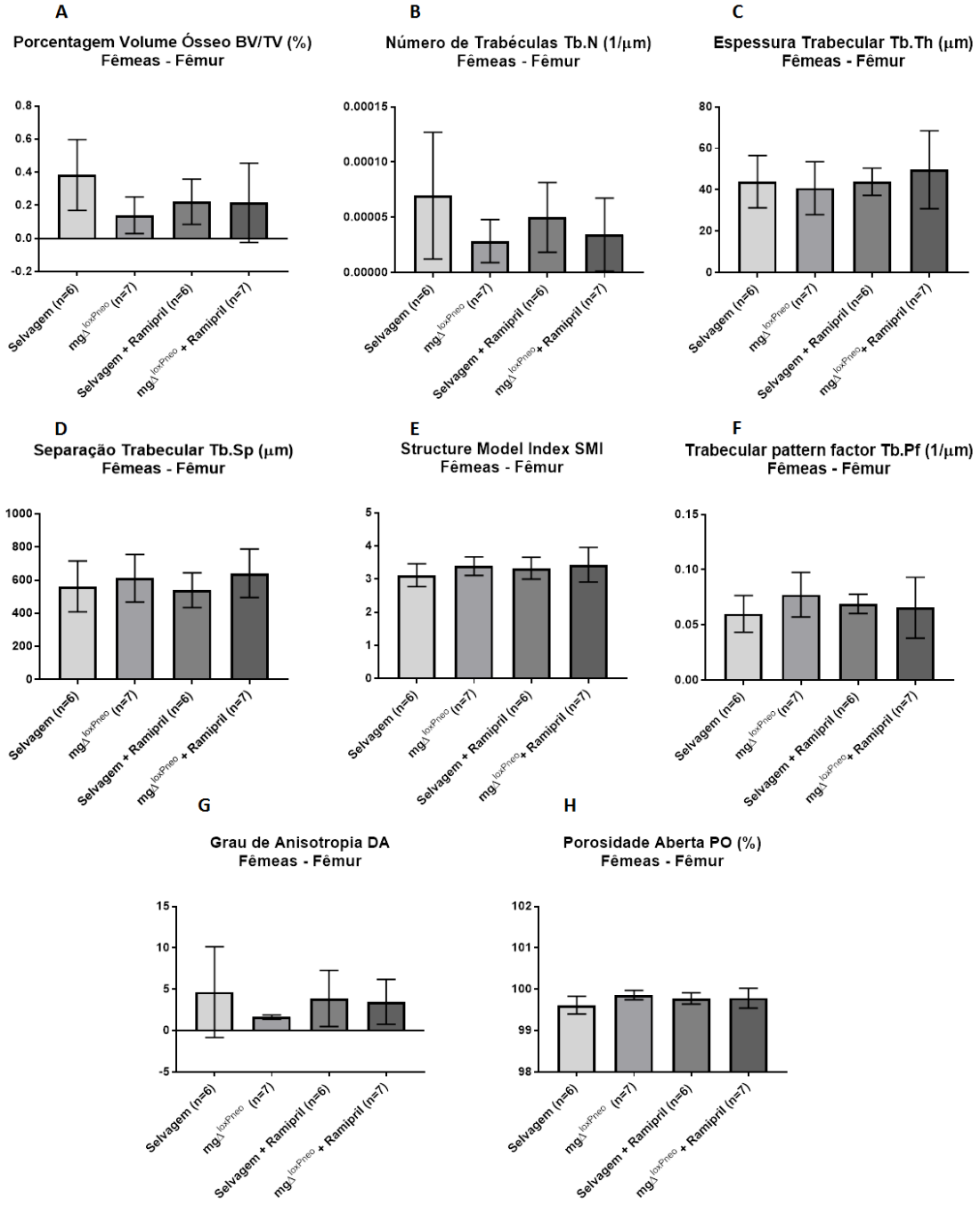

Figura 1 – Parâmetros trabeculares obtidos por µCT de fêmures de fêmeas de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) BV/TV. (B) Tb.N. (C) Tb.Th. (D) Tb.Sp. (E) SMI. (F) Tb.Pf. (G) DA. (H) PO. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice E – Análise trabecular de vértebras de fêmeas.

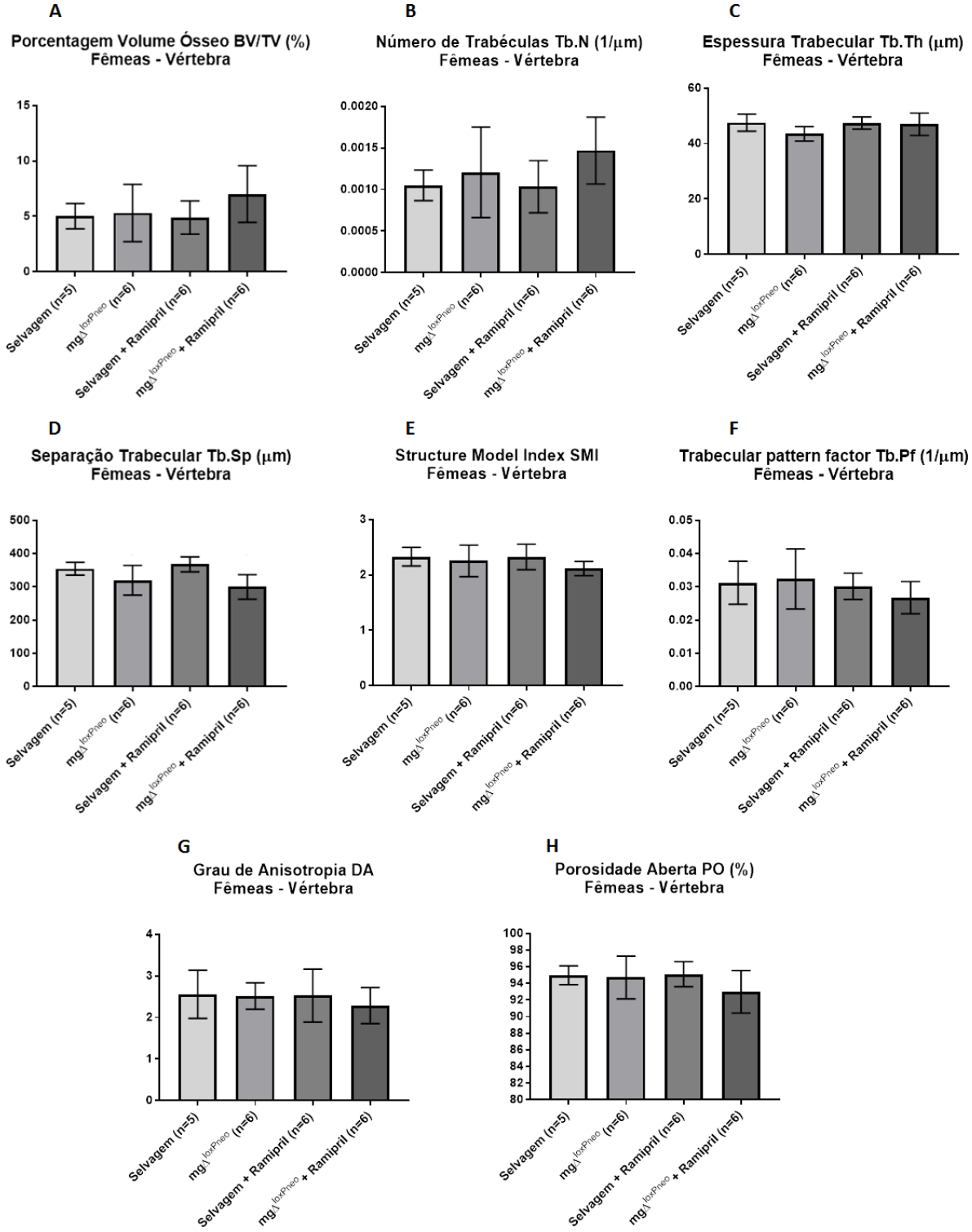

Figura 1 – Parâmetros trabeculares obtidos por µCT de vértebras de fêmeas de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) BV/TV. (B) Tb.N. (C) Tb.Th. (D) Tb.Sp. (E) SMI. (F) Tb.Pf. (G) DA. (H) PO. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice F – Análise cortical de fêmures de fêmeas.

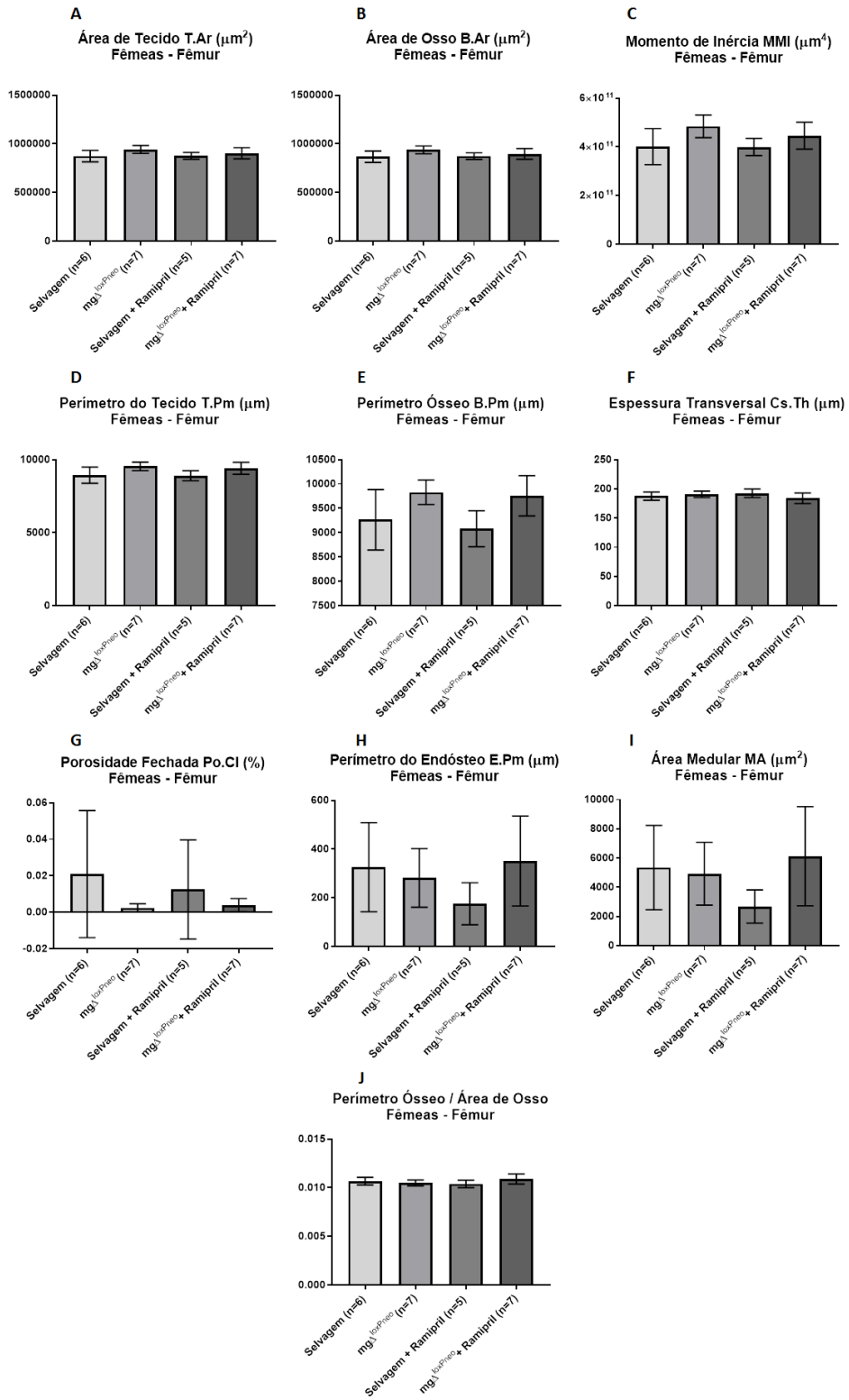

Figura 1 – Parâmetros corticais obtidos por µCT de fêmur de fêmeas de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) T.Ar. (B) T.pm. (C) MMI. (D) B.Ar. (E) B.Pm. (F) Cs.Th. (G) Po.Cl. (H) E.Pm. (I) MA. (J) Razão B.Pm/B.Ar. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice G – Análise cortical de vertebras de fêmeas.

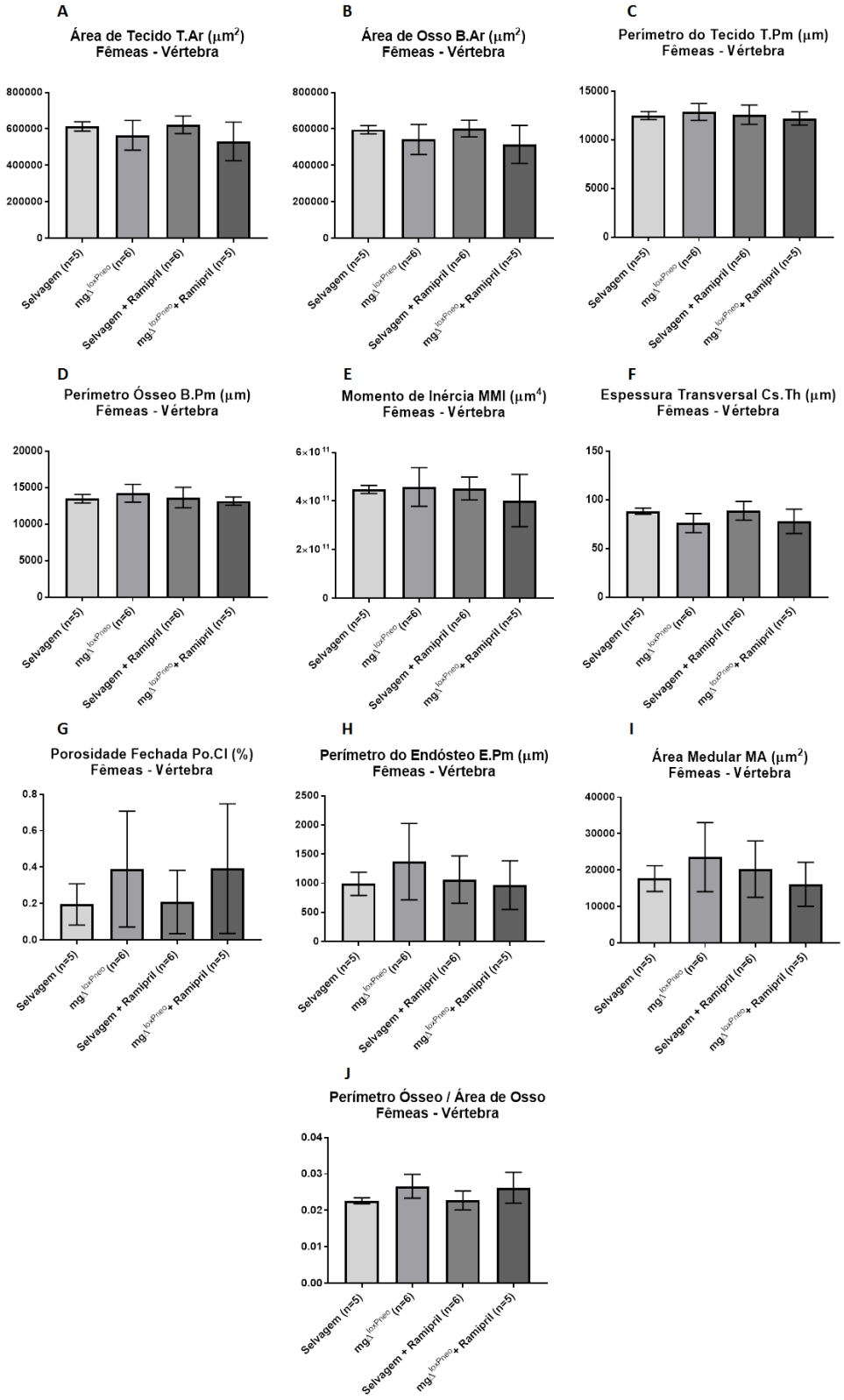

Figura 1 – Parâmetros corticais obtidos por µCT de vértebras de fêmeas de 7 meses. Foram analisados grupos selvagem e mgΔ^{loxPneo} controles e tratados com Ramipril. (A) T.Ar. (B) B.Ar. (C) T.Pm. (D) B.Pm. (E) MMI. (F) Cs.Th. (G) Po.Cl. (H) E.Pm (I) MA. (J) B.Pm/B.Ar. Para esses parâmetros não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Apêndice H – Resultados sem nível de significância com p ≤ 0,05 da análise de RT-PCR.

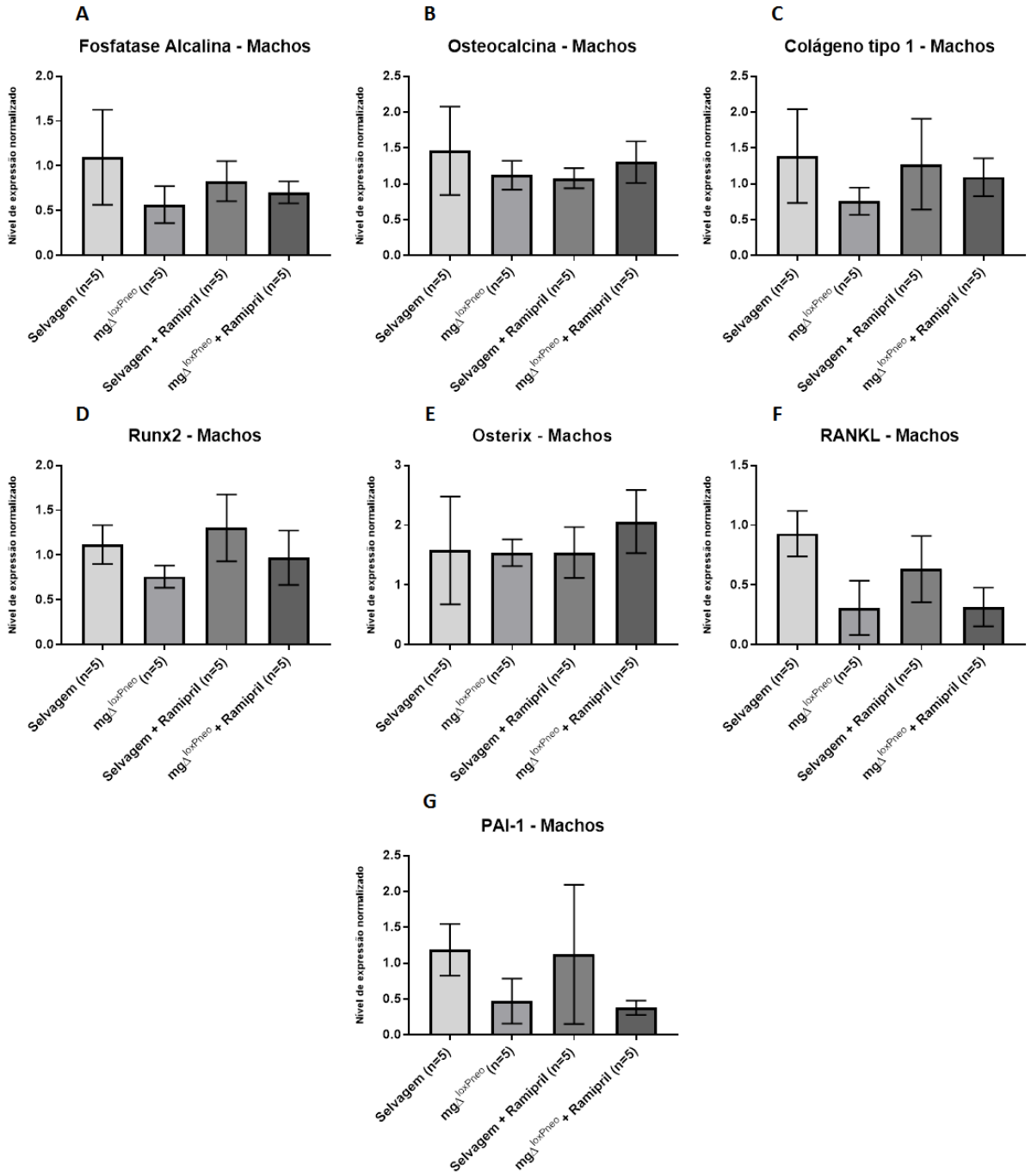

Figura 1 – Análise de expressão de marcadores ósseos por RT-PCR de amostras de cDNA de fêmures de machos de 7 meses. (A) Fosfatase alcalina. (B) Osteocalcina. (C) Colágeno tipo 1. (D) Runx2. (E) Osterix. (F) RANKL. (G) PAI-1.

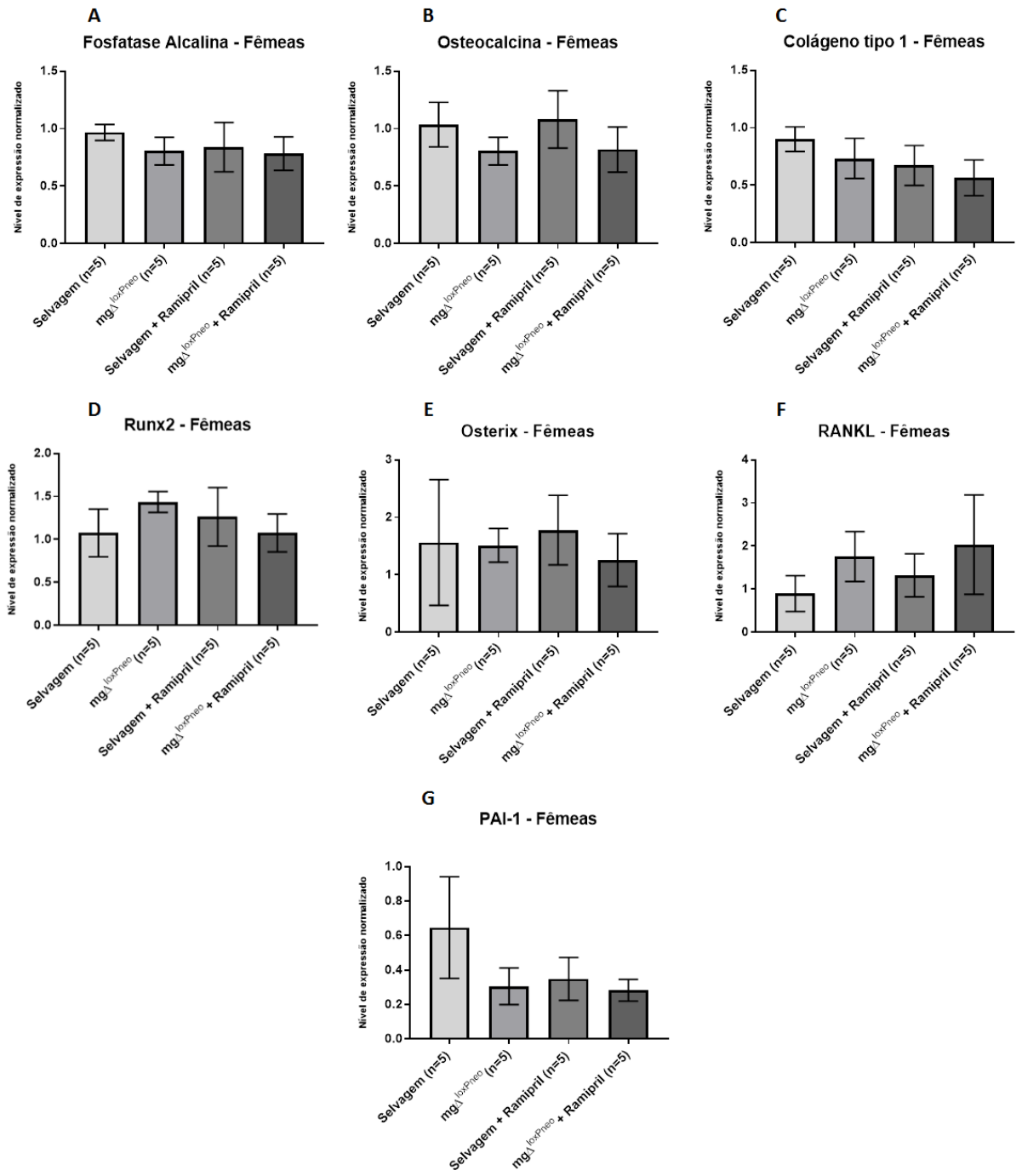

Figura 2 – Análise da expressão de marcadores ósseoa por RT-PCR de amostras de cDNA de fêmures de fêmeas de 7 meses. (A) Fosfatase alcalina. (B) Osteocalcina. (C) Runx2. (D) PAI-1. (E) Osterix. (F) RANKL. (G) PAI-1.

Apêndice I – Lista de genes diferencialmente expressos nos animais mgΔ^{loxPneo} em amostras de fêmures obtida por RNA-seq.

Entrez ID	Gene	Fold Change	p-valor	padj	Status
240726	Slco5a1	61%	0,000435	0,016286861	Down
72265	Tram1	112%	4,15E-10	7,89E-08	Up
277328	Trpa1	45%	0,000105	0,005109145	Down
57339	Jph1	56%	6,17E-09	9,49E-07	Down
210933	Adgrb3	50%	0,001005	0,031243206	Down
78321	Ankrd23	50%	2,96E-48	1,43E-44	Down
226977	Actr1b	87%	0,000157	0,0070324	Down
77633	NA	78%	0,00024	0,010127379	Down
381339	Tmem182	59%	5,83E-06	0,000425929	Down
17700	Mstn	42%	4,92E-16	2,96E-13	Down
11761	Aox1	62%	0,001115	0,034089329	Down
72823	Pard3b	87%	0,000378	0,014522955	Down
227197	Ndufs1	86%	9,42E-09	1,36E-06	Down
73884	Zdbf2	36%	1,83E-06	0,000155477	Down
17901	Myl1	59%	0,00035	0,013714345	Down
381269	Mreg	64%	2,01E-05	0,00123192	Down
21961	Tns1	77%	3,14E-08	3,91E-06	Down
22145	Tuba4a	114%	0,001579	0,045658001	Up
13346	Des	45%	1,10E-18	9,37E-16	Down
11790	Speg	63%	2,66E-06	0,000213324	Down
210293	Dock10	113%	0,000113	0,005418367	Up
16367	Irs1	75%	2,99E-05	0,001762136	Down
15463	Agfg1	116%	0,000613	0,021235745	Up
70788	Klhl30	44%	1,03E-05	0,00067679	Down
67086	NA	49%	0,001236	0,036844502	Down
21915	Dtymk	114%	0,001547	0,044905714	Up
18788	Serpinb2	134%	1,32E-06	0,000118632	Up
241197	Serpinb10	125%	0,00018	0,007942259	Up
13798	En1	35%	1,49E-06	0,000130757	Down
240753	Plekha6	73%	0,000669	0,022878516	Down
329251	Ppp1r12b	80%	0,000347	0,013679098	Down
77552	Shisa4	53%	5,79E-05	0,003098063	Down
27280	Phlda3	57%	5,03E-12	1,55E-09	Down
21952	Tnni1	46%	0,000814	0,026517678	Down
12292	Cacna1s	48%	9,38E-53	6,78E-49	Down
18783	Pla2g4a	133%	6,23E-06	0,000446066	Up
69399	1700025G04Rik	79%	9,59E-05	0,004700457	Down
226519	Lamc1	81%	9,24E-05	0,004543916	Down
240879	Mettl11b	53%	0,000751	0,025179594	Down
240892	Dusp27	45%	4,33E-15	2,09E-12	Down
226610	Fam78b	68%	2,46E-05	0,001482729	Down
80914	Uck2	125%	0,000149	0,006757206	Up

100862094	NA	69%	0,000531	0,019011743	Down
17085	Ly9	120%	1,36E-06	0,000121082	Up
12506	Cd48	134%	0,001743	0,048834962	Up
12372	Casq1	55%	1,69E-08	2,31E-06	Down
27222	Atp1a4	36%	9,79E-06	0,000649298	Down
98660	Atp1a2	45%	1,49E-10	3,07E-08	Down
109232	Sccpdh	80%	0,001658	0,047099284	Down
67426	Adck3	53%	4,83E-09	7,59E-07	Down
67459	Nvl	114%	0,001776	0,049574819	Up
13800	Enah	78%	0,000481	0,017639135	Down
100039138	NA	208%	0,000989	0,031011206	Up
26381	Esrrg	45%	0,000136	0,006264927	Down
11910	Atf3	52%	4,70E-05	0,002597496	Down
320977	NA	75%	0,0002	0,008644122	Down
76142	Ppp1r14c	60%	6,54E-05	0,003430489	Down
13982	Esr1	87%	0,000806	0,026373742	Down
22634	Plagl1	72%	6,78E-06	0,000483113	Down
378431	Txlnb	52%	1,46E-09	2,55E-07	Down
73681	Trmt11	122%	0,000237	0,010063217	Up
100504586	NA	80%	0,000492	0,01792281	Down
76757	Trdn	55%	1,97E-06	0,000165513	Down
212898	Dse	113%	6,41E-05	0,003380775	Up
15182	Hdac2	120%	0,000213	0,009167929	Up
215929	AI317395	54%	0,001815	0,049990136	Down
78977	Popdc3	41%	4,00E-13	1,38E-10	Down
23828	Bves	51%	1,78E-07	1,91E-05	Down
215031	Vgll2	37%	3,20E-08	3,96E-06	Down
100038725	Cep85l	85%	0,000506	0,018283585	Down
68802	Mypn	48%	2,64E-21	3,18E-18	Down
216080	Ube2d1	76%	3,98E-07	4,02E-05	Down
12822	Col18a1	72%	5,98E-06	0,000434548	Down
19205	Ptbp1	115%	2,32E-06	0,00018923	Up
71912	Jsrp1	46%	2,88E-09	4,73E-07	Down
69564	Nmrk2	47%	6,79E-07	6,54E-05	Down
77976	Nuak1	65%	6,27E-07	6,08E-05	Down
109272	Mybpc1	42%	5,60E-10	1,04E-07	Down
15109	Hal	153%	0,00072	0,024311769	Up
17878	Myf6	37%	6,02E-20	5,80E-17	Down
17245	Mdm1	115%	0,001107	0,033959655	Up
320183	Msrb3	74%	0,000527	0,018894923	Down
319272	NA	236%	3,49E-05	0,002028164	Up
237611	Stac3	53%	1,01E-07	1,12E-05	Down
17938	Naca	87%	5,91E-08	6,94E-06	Down
210582	Coq10a	67%	0,000128	0,006008613	Down
216459	Myl6b	52%	9,10E-06	0,000617905	Down
16404	Itga7	56%	0,000276	0,011265059	Down

67815	Sec14l2	127%	0,001589	0,045781221	Up
84035	Kremen1	75%	2,47E-05	0,001482729	Down
56012	Pgam2	58%	3,01E-06	0,000239004	Down
12323	Camk2b	52%	1,91E-13	7,07E-11	Down
12808	Cobl	55%	6,42E-11	1,41E-08	Down
216558	Ugp2	84%	8,72E-05	0,004349632	Down
216565	Ehbp1	80%	4,32E-05	0,002435862	Down
71701	Pnpt1	111%	0,000837	0,027058738	Up
68585	Rtn4	83%	5,50E-26	7,95E-23	Down
75572	Acyp2	66%	8,41E-05	0,004238758	Down
69556	Bod1	70%	3,18E-10	6,21E-08	Down
14694	Gnb2l1	111%	2,09E-08	2,80E-06	Up
59044	Rnf130	123%	0,000134	0,006217176	Up
12330	Canx	115%	0,000577	0,020345175	Up
22333	Vdac1	79%	1,46E-08	2,01E-06	Down
27041	G3bp1	117%	0,000269	0,011099581	Up
404346	Olfr322	42%	0,000119	0,005652332	Down
382522	NA	131%	4,77E-05	0,002622558	Up
380698	Obscn	47%	7,89E-16	4,56E-13	Down
216810	Tom1l2	78%	7,72E-09	1,14E-06	Down
16515	Kcnj12	44%	1,44E-05	0,000899176	Down
22368	Trpv2	123%	4,75E-07	4,74E-05	Up
17882	Myh2	47%	6,02E-06	0,000434867	Down
17879	Myh1	54%	0,00011	0,005338965	Down
17884	Myh4	63%	1,82E-06	0,000155477	Down
17885	Myh8	49%	0,000935	0,029707698	Down
22318	Vamp2	71%	0,0007	0,023806205	Down
11443	Chrnb1	53%	2,51E-08	3,27E-06	Down
56486	Gabarap	113%	0,001771	0,049532598	Up
13808	Eno3	60%	1,71E-06	0,000148004	Down
16562	Kif1c	72%	9,77E-06	0,000649298	Down
276829	Smtnl2	63%	0,001178	0,035552828	Down
94045	P2rx5	47%	0,000155	0,006975294	Down
280408	Rilp	65%	0,000144	0,00657775	Down
216961	Coro6	41%	3,97E-15	2,05E-12	Down
55978	Ift20	119%	0,001795	0,049632034	Up
16859	Lgals9	119%	0,00165	0,047063595	Up
217012	Unc45b	60%	5,69E-05	0,003057243	Down
71489	NA	74%	0,001351	0,039949458	Down
103841	Cuedc1	67%	0,00055	0,019531608	Down
18102	Nme1	125%	0,000446	0,016643624	Up
22057	Tob1	72%	7,88E-05	0,004025987	Down
20391	Sgca	56%	1,56E-10	3,19E-08	Down
18604	Pdk2	60%	1,47E-11	3,86E-09	Down
432593	NA	202%	0,00159	0,045781221	Up
18023	Nfe2l1	82%	0,000412	0,015528457	Down

67036	Mrpl45	123%	0,000374	0,014423304	Up
12295	Cacnb1	68%	6,92E-06	0,000490259	Down
21393	Tcap	45%	1,16E-47	4,19E-44	Down
104112	Acly	114%	5,63E-11	1,27E-08	Up
19345	Rab5c	110%	2,43E-07	2,51E-05	Up
73635	Ptges3l	57%	0,000135	0,00622205	Down
74499	Sost	73%	0,000812	0,026499661	Down
18107	Nmt1	114%	0,000129	0,006019061	Up
17762	Mapt	53%	1,19E-07	1,31E-05	Down
83796	Smarcd2	111%	0,000844	0,02724238	Up
110880	Scn4a	59%	2,66E-05	0,00158529	Down
12299	Cacng1	55%	6,92E-12	2,00E-09	Down
208659	Fam20a	69%	6,30E-08	7,28E-06	Down
27404	Abca8b	66%	7,02E-09	1,06E-06	Down
217258	Abca8a	78%	0,001441	0,042330379	Down
66528	Smim5	116%	0,001106	0,033959655	Up
19039	Lgals3bp	124%	0,00078	0,025739837	Up
192170	Eif4a3	111%	0,000938	0,029749761	Up
108100	Baiap2	80%	0,000302	0,012190759	Down
100861766	NA	45%	4,65E-05	0,002585581	Down
68701	Ppp1r27	48%	7,94E-05	0,00404284	Down
20892	Stra13	128%	4,33E-05	0,002435862	Up
217378	Dnajc27	78%	0,001721	0,048444786	Down
76820	Fam49a	120%	0,000472	0,017368935	Up
227526	Cdnf	65%	0,000609	0,021154595	Down
109079	Sephs1	121%	2,11E-05	0,00128352	Up
74186	Ccdc3	66%	0,00072	0,024311769	Down
208618	Etl4	73%	0,000761	0,025336594	Down
227619	Man1b1	113%	4,75E-06	0,000353681	Up
30934	Tor1b	111%	0,001579	0,045658001	Up
665700	NA	60%	1,61E-09	2,77E-07	Down
227721	Plpp7	66%	4,98E-05	0,00270831	Down
11636	Ak1	58%	6,93E-11	1,49E-08	Down
227753	Gsn	81%	1,06E-05	0,000692618	Down
17996	Neb	55%	4,93E-08	5,99E-06	Down
16420	Itgb6	43%	1,92E-14	8,15E-12	Down
241431	Xirp2	53%	5,44E-05	0,002934909	Down
228003	Klhl41	46%	9,80E-10	1,77E-07	Down
78830	Slc25a12	90%	2,81E-05	0,001663803	Down
107435	Hat1	112%	0,000296	0,011975141	Up
56508	Rapgef4	72%	0,001012	0,031401253	Down
65964	Zak	85%	1,88E-07	1,99E-05	Down
100628587	NA	51%	9,60E-07	8,95E-05	Down
22138	Ttn	53%	1,94E-08	2,62E-06	Down
68678	Smtnl1	51%	0,000414	0,015543432	Down
22259	Nr1h3	132%	0,000211	0,009113578	Up

80708	Pacsin3	50%	4,67E-09	7,41E-07	Down
620695	Gm13889	56%	0,000549	0,019531608	Down
329502	Pla2g4e	48%	0,000345	0,013624432	Down
17754	Map1a	67%	6,11E-06	0,000439249	Down
327655	Ppip5k1	71%	0,000903	0,028806278	Down
14118	Fbn1	79%	0,001795	0,049632034	Down
67333	Stk35	86%	0,001787	0,049632034	Down
20612	Siglec1	130%	0,001519	0,04418566	Up
12156	Bmp2	76%	0,00045	0,016748743	Down
100313519	NA	65%	0,000187	0,008237651	Down
56488	Nxt1	126%	0,000373	0,014423304	Up
228785	Mylk2	61%	3,24E-11	7,94E-09	Down
74711	Ttll9	52%	0,001796	0,049632034	Down
20648	Snta1	62%	1,71E-16	1,07E-13	Down
19383	Raly	110%	0,001228	0,036688239	Up
67068	Dynlrb1	113%	0,000412	0,015528457	Up
68728	Trp53inp2	77%	7,11E-05	0,00366941	Down
20014	Rpn2	119%	4,97E-05	0,00270831	Up
66642	Ctnnbl1	121%	5,50E-08	6,52E-06	Up
59091	Jph2	52%	1,25E-06	0,000113251	Down
11486	Ada	138%	0,000634	0,021861712	Up
21925	Tnnc2	53%	2,13E-11	5,32E-09	Down
19025	Ctsa	116%	0,000992	0,031030834	Up
18019	Nfatc2	71%	0,000152	0,006847516	Down
13628	Eef1a2	44%	4,76E-27	7,65E-24	Down
18767	Pkia	56%	8,33E-14	3,17E-11	Down
15213	Hey1	65%	0,000138	0,006324585	Down
381485	Trim55	56%	0,000863	0,027729239	Down
72607	Usp13	49%	1,21E-12	3,98E-10	Down
14359	Fxr1	86%	0,001101	0,033959655	Down
50911	Exosc9	113%	0,000821	0,026658569	Up
18645	Pfn2	59%	1,01E-08	1,43E-06	Down
17349	Mlf1	54%	4,65E-07	4,66E-05	Down
17035	Lxn	132%	0,000398	0,015137925	Up
12038	Bche	54%	0,001439	0,042330379	Down
403175	Tigd4	58%	2,72E-08	3,48E-06	Down
11801	Cd5l	174%	2,18E-07	2,28E-05	Up
18008	Nes	58%	0,000147	0,006698043	Down
19769	Rit1	111%	0,000555	0,019664069	Up
54124	Cks1b	118%	3,78E-05	0,002175317	Up
19885	Rorc	61%	0,000406	0,015398057	Down
78784	Celf3	54%	2,88E-06	0,000230104	Down
19172	Psmb4	114%	0,000189	0,008275611	Up
50874	Tmod4	50%	4,14E-31	9,98E-28	Down
20360	Sema6c	47%	7,29E-06	0,000511448	Down
319176	Hist2h2ac	130%	2,05E-05	0,001249858	Up

319154	Hist2h3b	131%	0,000217	0,0092907	Up
69585	Hfe2	52%	6,87E-30	1,24E-26	Down
67549	Gpr89	121%	0,001722	0,048444786	Up
108097	Prkab2	77%	1,22E-06	0,000110817	Down
83679	Pde4dip	59%	1,65E-20	1,84E-17	Down
433632	NA	232%	0,000303	0,012190759	Up
21384	Tbx15	69%	7,91E-08	9,01E-06	Down
229665	Ampd1	64%	4,06E-15	2,05E-12	Down
17306	Sypl2	56%	5,12E-14	2,00E-11	Down
77559	Agl	81%	5,00E-11	1,17E-08	Down
59006	Myoz2	37%	3,15E-06	0,000248873	Down
118449	Synpo2	52%	2,25E-09	3,78E-07	Down
13645	Egf	66%	0,000153	0,006879637	Down
68436	Rpl34	117%	2,47E-08	3,27E-06	Up
71519	Cyp2u1	58%	0,001125	0,034249624	Down
73284	Ddit4l	61%	0,001505	0,043951434	Down
11532	Adh5	113%	0,000197	0,008563621	Up
93684	Sep15	114%	3,32E-06	0,000259355	Up
69219	Ddah1	45%	2,66E-08	3,44E-06	Down
70892	Ttll7	72%	3,66E-09	5,95E-07	Down
68810	Nexn	55%	2,92E-08	3,67E-06	Down
26938	St6galnac5	46%	0,000756	0,025297285	Down
52187	Rragd	70%	1,14E-08	1,60E-06	Down
56323	Dnajb5	66%	8,40E-05	0,004238758	Down
22004	Tpm2	46%	4,93E-13	1,66E-10	Down
230103	Npr2	73%	5,75E-11	1,28E-08	Down
68016	Murc	56%	4,63E-06	0,00034667	Down
19359	Rad23b	113%	9,77E-09	1,40E-06	Up
545622	Ptpn3	73%	0,000762	0,025336594	Down
18198	Musk	47%	0,00059	0,020694368	Down
326623	Tnfsf15	183%	0,000335	0,013299279	Up
71886	2310002L09Rik	53%	1,40E-05	0,000881124	Down
18028	Nfib	77%	7,13E-07	6,78E-05	Down
72157	Pgm2	74%	7,27E-20	6,57E-17	Down
108079	Prkaa2	68%	1,95E-06	0,000164894	Down
230700	Foxj3	86%	3,37E-05	0,001972811	Down
56198	Heyl	53%	0,000523	0,018821109	Down
442834	NA	91%	0,00028	0,011384607	Down
16330	Inpp5b	121%	0,000956	0,030179326	Up
619605	Zcchc17	115%	0,000112	0,00537507	Up
194231	Cnksr1	53%	0,00118	0,035552828	Down
433766	Trim63	49%	1,04E-06	9,60E-05	Down
242702	Myom3	47%	0,000371	0,01440095	Down
74246	Gale	126%	0,000885	0,028307879	Up
21401	Tcea3	49%	4,31E-08	5,28E-06	Down
12260	C1qb	122%	0,001513	0,044088194	Up

12262	C1qc	119%	0,000198	0,008580943	Up
15530	Hspg2	75%	4,10E-05	0,002341006	Down
433771	Minos1	82%	0,00073	0,024534783	Down
29818	Hspb7	33%	2,20E-13	7,91E-11	Down
433791	Gm13251	152%	0,00031	0,012366032	Up
170731	Mfn2	89%	0,000798	0,026215034	Down
16561	Kif1b	77%	5,24E-18	3,61E-15	Down
230936	Phf13	69%	0,000863	0,027729239	Down
70025	Acot7	127%	0,001044	0,032333245	Up
66448	Mrpl20	117%	0,00046	0,017057299	Up
74183	Perm1	63%	0,001654	0,047069522	Down
12293	Cacna2d1	61%	1,53E-18	1,16E-15	Down
100628584	NA	46%	7,29E-09	1,09E-06	Down
117590	Asb10	49%	6,87E-07	6,57E-05	Down
66993	Smarcd3	76%	0,000117	0,005600667	Down
58522	Trim54	55%	7,94E-10	1,45E-07	Down
100038629	NA	50%	0,00118	0,035552828	Down
231134	Dok7	48%	0,000688	0,023472089	Down
231148	Ablim2	51%	1,82E-05	0,001117605	Down
22393	Wfs1	60%	1,16E-11	3,17E-09	Down
66988	Lap3	119%	4,24E-10	7,97E-08	Up
723822	NA	50%	0,001005	0,031243206	Down
11787	Apbb2	84%	0,001175	0,035552828	Down
11980	Atp8a1	112%	1,81E-06	0,000155477	Up
75581	Yipf7	55%	3,53E-06	0,000270174	Down
24051	Sgcb	77%	3,40E-05	0,00198078	Down
66661	Srp72	113%	0,000274	0,011207399	Up
231329	Polr2b	117%	4,58E-06	0,000344601	Up
56744	Pf4	123%	1,16E-11	3,17E-09	Up
109979	Art3	58%	1,03E-06	9,55E-05	Down
15442	Hpse	126%	6,81E-08	7,81E-06	Up
13406	Dmp1	66%	0,0016	0,045988652	Down
94111	Mepe	76%	3,03E-14	1,25E-11	Down
100504779	NA	83%	0,00141	0,041591126	Down
433938	Mn1	63%	1,10E-05	0,000715945	Down
74376	Myo18b	52%	8,23E-15	3,61E-12	Down
100705	Acacb	58%	3,79E-11	8,97E-09	Down
77407	Rab35	115%	5,53E-06	0,000407953	Up
19079	Prkab1	114%	0,000622	0,021500546	Up
80888	Hspb8	50%	2,49E-06	0,000200976	Down
72151	Rfc5	120%	4,34E-05	0,002435862	Up
18125	Nos1	60%	7,83E-05	0,004014092	Down
17906	Myl2	40%	9,73E-05	0,004734982	Down
18438	P2rx4	121%	3,34E-06	0,000259355	Up
56430	Clip1	83%	8,56E-08	9,59E-06	Down
75695	Rilpl1	66%	1,43E-06	0,000126991	Down

93897	Fzd10	44%	0,000334	0,013299279	Down
18682	Phkg1	66%	7,99E-05	0,004054386	Down
212996	Wbscr17	49%	0,000252	0,010560786	Down
19718	Rfc2	118%	0,000665	0,022841158	Up
66138	Wbscr22	117%	0,000571	0,020193463	Up
58805	Mlxipl	55%	0,000796	0,026215034	Down
15507	Hspb1	45%	6,00E-05	0,003201753	Down
619309	NA	42%	2,91E-08	3,67E-06	Down
100504556	NA	68%	2,20E-05	0,001332488	Down
100628626	NA	60%	0,00072	0,024311769	Down
19791	NA	46%	2,15E-35	6,21E-32	Down
27273	Pdk4	53%	0,001696	0,048089709	Down
68240	Rpa3	121%	0,001711	0,04831519	Up
140491	Ppp1r3a	58%	1,20E-11	3,21E-09	Down
12390	Cav2	78%	3,51E-05	0,002028234	Down
17295	Met	133%	0,000471	0,017368935	Up
12638	Cftr	207%	0,001632	0,046639511	Up
76522	Lsm8	118%	0,000969	0,030520598	Up
78910	Asb15	56%	1,10E-05	0,000715945	Down
93677	Lmod2	37%	1,47E-07	1,59E-05	Down
68794	Flnc	41%	2,06E-11	5,22E-09	Down
73652	NA	47%	2,21E-06	0,000182255	Down
27205	Podxl	64%	1,41E-07	1,55E-05	Down
12723	Clcn1	61%	0,000129	0,006019061	Down
12304	Pdia4	123%	0,001707	0,048307795	Up
76252	Atp6v0e2	53%	7,40E-05	0,003808617	Down
434025	NA	204%	0,00027	0,011099581	Up
692165	NA	210%	7,28E-06	0,000511448	Up
692161	NA	230%	5,14E-05	0,002782005	Up
620050	NA	46%	1,21E-06	0,000110518	Down
667865	NA	213%	6,39E-05	0,003380775	Up
667881	NA	205%	3,97E-05	0,002275019	Up
16071	NA	155%	0,001739	0,048815227	Up
12180	Smyd1	51%	1,95E-10	3,91E-08	Down
26903	Dysf	72%	0,00017	0,007565493	Down
93674	Cml3	49%	0,000802	0,026285105	Down
56505	Ruvbl1	128%	0,000606	0,021146868	Up
14115	Fbln2	71%	0,000161	0,007168421	Down
22200	Uba3	113%	0,000521	0,018798523	Up
320502	Lmod3	47%	1,62E-05	0,000998406	Down
55983	Pdzrn3	67%	0,000995	0,031059076	Down
16979	Lrrn1	58%	0,000253	0,010560786	Down
30937	Lmcd1	49%	1,47E-12	4,71E-10	Down
100503613	NA	54%	8,79E-05	0,004365577	Down
12391	Cav3	50%	6,80E-09	1,04E-06	Down
110379	Sec13	118%	0,000348	0,013679098	Up

20965	Syn2	59%	0,000943	0,029836294	Down
67088	Cand2	60%	9,39E-07	8,82E-05	Down
12288	Cacna1c	67%	9,01E-05	0,004459637	Down
22419	Wnt5b	67%	0,000484	0,017692928	Down
17113	M6pr	119%	6,33E-05	0,003364559	Up
11810	Apobec1	116%	0,000217	0,0092907	Up
16977	Lrrc23	41%	6,55E-05	0,003430489	Down
56449	Ybx3	89%	0,00066	0,022716384	Down
13730	Emp1	70%	0,00059	0,020694368	Down
16832	Ldhb	54%	3,25E-07	3,31E-05	Down
16651	Sspn	74%	3,76E-06	0,000285917	Down
67623	Tm7sf3	111%	4,71E-05	0,002597496	Up
387314	Tmtc1	67%	2,04E-15	1,14E-12	Down
21955	Tnnt1	44%	0,000393	0,014993262	Down
381836	Sbk2	51%	0,000391	0,014953597	Down
20364	Sepw1	75%	8,90E-06	0,000607049	Down
12315	Calm3	111%	0,000148	0,006716929	Up
13400	Dmpk	66%	3,29E-06	0,00025837	Down
232941	Ppm1n	259%	3,35E-06	0,000259355	Up
20167	Rtn2	55%	3,62E-11	8,71E-09	Down
14282	Fosb	43%	6,78E-05	0,003537229	Down
12715	Ckm	61%	7,58E-06	0,000524613	Down
57278	Bcam	65%	0,000251	0,010560786	Down
22594	Xrcc1	116%	3,18E-05	0,001866005	Up
210172	Zfp526	124%	2,51E-08	3,27E-06	Up
108075	Ltbp4	58%	5,30E-08	6,38E-06	Down
60594	Capn12	195%	0,001285	0,038230226	Up
73830	Eif3k	115%	7,51E-06	0,000521766	Up
20190	Ryr1	52%	6,01E-12	1,78E-09	Down
77254	Yif1b	118%	0,001216	0,036481361	Up
12865	Cox7a1	57%	0,000868	0,027811123	Down
243912	Hspb6	41%	4,43E-14	1,78E-11	Down
20266	Scn1b	65%	2,45E-10	4,86E-08	Down
233199	Mybpc2	62%	2,19E-07	2,28E-05	Down
71960	Myh14	55%	8,62E-05	0,004327973	Down
15464	Hrc	57%	7,30E-07	6,90E-05	Down
16495	Kcna7	58%	6,99E-05	0,003622863	Down
20174	Ruvbl2	131%	0,001626	0,046535653	Up
19899	Rpl18	125%	1,87E-07	1,99E-05	Up
13732	Emp3	126%	0,000219	0,009345133	Up
16514	Kcnj11	60%	0,001123	0,034249624	Down
17927	Myod1	54%	0,000412	0,015528457	Down
16502	Kcnc1	57%	0,001444	0,042359266	Down
13009	Csrp3	39%	1,50E-05	0,000932441	Down
233246	Ano5	61%	1,04E-05	0,00068125	Down
68981	Snrpa1	121%	0,001607	0,046107527	Up

233335	Synm	60%	1,00E-09	1,79E-07	Down
64176	Sv2b	35%	3,46E-06	0,000266233	Down
116904	Alpk3	49%	5,39E-08	6,44E-06	Down
12877	Cpeb1	69%	0,000779	0,025739837	Down
244091	Fsd2	60%	8,08E-11	1,72E-08	Down
26557	Homer2	56%	2,58E-05	0,001540212	Down
66273	Aamdc	69%	6,27E-08	7,28E-06	Down
27050	Rps3	114%	0,00092	0,029291255	Up
449631	NA	75%	3,13E-07	3,21E-05	Down
22064	Trpc2	122%	0,000362	0,014140549	Up
11875	Art5	59%	0,00073	0,024534783	Down
11870	Art1	50%	5,37E-11	1,23E-08	Down
101700	Trim68	74%	0,001219	0,03649037	Down
16202	Ilk	117%	9,70E-05	0,004734982	Up
100417831	NA	230%	0,000341	0,013521458	Up
320878	Mical2	69%	0,00019	0,008286676	Down
21676	Tead1	57%	2,53E-18	1,83E-15	Down
11937	Atp2a1	53%	3,72E-09	5,98E-07	Down
11674	Aldoa	70%	3,75E-20	3,87E-17	Down
434246	Trim72	50%	1,53E-06	0,000133182	Down
12862	Cox6a2	56%	0,000257	0,010719201	Down
29810	Bag3	67%	2,42E-12	7,61E-10	Down
57752	Tacc2	51%	1,10E-10	2,31E-08	Down
100628579	NA	52%	4,24E-06	0,000320554	Down
100502937	NA	60%	0,000178	0,00789062	Down
12176	Bnip3	68%	1,15E-09	2,03E-07	Down
12869	Cox8b	52%	5,61E-06	0,000411685	Down
213350	Pddc1	118%	0,000777	0,025739837	Up
66853	Pnpla2	74%	1,16E-05	0,00074794	Down
21953	Tnni2	55%	8,66E-12	2,45E-09	Down
21957	Tnnt3	56%	3,45E-10	6,65E-08	Down
330677	NA	52%	2,18E-09	3,71E-07	Down
69142	Cd209f	196%	0,000112	0,005388784	Up
26400	Map2k7	85%	0,001185	0,035628476	Down
12827	Col4a2	77%	0,000369	0,014374015	Down
234072	Adprhl1	39%	1,48E-07	1,59E-05	Down
17930	Myom2	60%	1,49E-06	0,000130757	Down
102032	Smim19	79%	0,000668	0,022878516	Down
20377	Sfrp1	129%	0,000383	0,014694345	Up
14182	Fgfr1	74%	1,28E-05	0,000815738	Down
353310	Zfp703	72%	0,000607	0,021146868	Down
11886	Asah1	117%	0,001504	0,043951434	Up
53318	Pdlim3	49%	1,76E-11	4,56E-09	Down
654824	Ankrd37	161%	0,001333	0,039485879	Up
11739	Slc25a4	60%	2,69E-09	4,47E-07	Down
76294	Asb5	55%	8,73E-05	0,004349632	Down

234365	NA	47%	1,33E-05	0,000846572	Down
26457	Slc27a1	67%	0,000188	0,00825773	Down
17274	Rab8a	116%	0,000829	0,026875397	Up
74166	Tmem38a	56%	4,10E-22	5,39E-19	Down
12317	Calr	123%	0,001155	0,035081117	Up
320466	NA	59%	9,20E-05	0,004538712	Down
65114	Vps35	119%	0,00178	0,049576097	Up
108682	Gpt2	66%	0,00026	0,010786191	Down
78688	Nol3	58%	0,00022	0,009366333	Down
67971	Tppp3	66%	2,26E-06	0,000185458	Down
56513	Pard6a	135%	0,001107	0,033959655	Up
66164	Nip7	138%	0,000605	0,021146868	Up
319518	Pdpr	83%	4,37E-05	0,002437313	Down
52815	Ldhd	58%	4,23E-05	0,002405749	Down
85305	Kars	116%	9,33E-06	0,000630549	Up
12554	Cdh13	59%	2,43E-06	0,000197016	Down
76454	Fbxo31	74%	0,000122	0,005769265	Down
11459	Acta1	47%	9,27E-17	6,09E-14	Down
112405	Egln1	87%	0,000129	0,006019061	Down
22601	Yap1	72%	5,74E-09	8,93E-07	Down
18689	NA	54%	8,32E-08	9,39E-06	Down
75723	Amotl1	68%	5,86E-15	2,73E-12	Down
72828	Ubash3b	121%	5,57E-07	5,44E-05	Up
723892	NA	211%	0,000762	0,025336594	Up
53376	Usp2	61%	1,34E-05	0,000849163	Down
399548	Scn4b	58%	2,04E-06	0,000169566	Down
59095	Fxyd6	67%	9,58E-06	0,000640996	Down
67010	Rbm7	119%	0,000982	0,030851422	Up
235323	Usp28	81%	0,000499	0,018070228	Down
12955	Cryab	43%	1,26E-08	1,75E-06	Down
244867	Arhgap20	65%	0,000123	0,005810481	Down
121021	Cspg4	82%	5,29E-07	5,20E-05	Down
100504377	NA	79%	1,38E-05	0,000868277	Down
72565	Uaca	59%	6,39E-15	2,89E-12	Down
67891	Rpl4	113%	4,12E-15	2,05E-12	Up
66131	Tipin	111%	0,000472	0,017368935	Up
214425	Cilp	69%	0,000278	0,011328808	Down
22003	Tpm1	64%	8,04E-09	1,17E-06	Down
12442	Ccnb2	118%	0,001322	0,0392355	Up
50772	Mapk6	123%	0,000309	0,012366032	Up
244923	Klhl31	55%	2,36E-140	3,41E-136	Down
13627	Eef1a1	116%	5,00E-06	0,000371019	Up
70598	Filip1	53%	7,45E-06	0,000520579	Down
235542	Ppp2r3a	73%	0,000499	0,018070228	Down
24059	Slco2a1	62%	0,000306	0,012305598	Down
235584	Dusp7	136%	0,000485	0,017692928	Up

436090	Gpr62	43%	0,00027	0,011099581	Down
12700	Cish	67%	1,18E-05	0,000759546	Down
434436	NA	52%	0,000538	0,019199438	Down
76257	Slc38a3	47%	2,24E-13	7,91E-11	Down
13138	Dag1	81%	6,03E-12	1,78E-09	Down
16779	Lamb2	78%	8,36E-06	0,000575384	Down
17758	Map4	83%	4,35E-05	0,002435862	Down
17897	Myl3	42%	0,000123	0,005810481	Down
74249	Lrrc2	52%	5,10E-07	5,05E-05	Down
73748	Gadl1	59%	0,000458	0,017008423	Down
22437	Xirp1	30%	1,35E-18	1,09E-15	Down
67115	Rpl14	112%	1,56E-05	0,000970208	Up
270210	Zfp651	66%	2,02E-06	0,000169141	Down
72330	Klhl40	37%	2,06E-30	4,25E-27	Down
74770	Hhatl	52%	8,86E-06	0,000607049	Down
17281	Fyco1	82%	6,82E-05	0,003544834	Down

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

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

www.ib.usp.br

OF.CEUA/IB/022/2014

São Paulo, 30 de setembro 2014

Prezada Senhora,

Dirijo-me a V.Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 29 de setembro de 2014, **APROVOU** o Projeto "Participação do receptor B2R de bradicinina na melhora fenotípica induzida por Ramipril em um modelo murino para a Síndrome de Marfan", **Protocolo 203/2014**, de sua responsabilidade (Colaboradores: Elisa Ito Kawahara, Luis Ernesto Farinha Arcieri, Giovana Pirolla Cardozo e Carolina Mendonça).

A pesquisadora responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.
Profa. Dra. LYGIA DA VEIGA PEREIRA CARRAMASCHI
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - IB

Rua do Matão • Travessa 14 • nº 321 • Cidade Universitária • São Paulo • SP • CEP 05508-090 • Brasil