

ENRICO JARDIM CLEMENTE SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL
PARA A SINDROME DE MARFAN
ATRAVÉS DA MANIPULAÇÃO DO GENOMA DO
CAMUNDONGO**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL PARA A
SINDROME DE MARFAN ATRAVÉS DA MANIPULAÇÃO DO
GENOMA DO CAMUNDONGO**

ENRICO JARDIM CLEMENTE SANTOS

**Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para a obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2005**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL PARA A
SINDROME DE MARFAN ATRAVÉS DA MANIPULAÇÃO DO
GENOMA DO CAMUNDONGO**

ENRICO JARDIM CLEMENTE SANTOS

**Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para a obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.**

**Área de concentração:
Biotecnologia**

**Orientador:
Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira**

**Co-orientador:
Prof. Dr. Alexandre Kerkis
Profa. Dra. Marina Sukoyan**

**São Paulo
2005**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS VERTEBRADOS EM
EXPERIMENTAÇÃO (CEA)**

Parecer referente a Projeto de Pesquisa ou aulas Práticas

Protocolo CEA/IBUSP: 019/2004

- Está de acordo com as normas e princípios éticos na Experimentação Animal, do COBEA (junho/1991).
- Não Está de acordo com as normas e princípios éticos na Experimentação Animal, do COBEA (junho/1991).
- As normas do COBEA não se aplicam totalmente ao caso em questão.

Opine sobre os procedimentos, de acordo com os tópicos do protocolo:

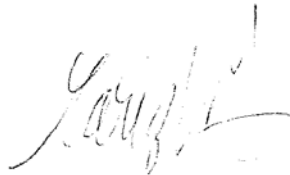
Os procedimentos incluem a provocação de super ovulação em fêmeas de camundongos, e a retiradas de mórulas após a fertilização. Estas serão cultivadas com células ES, para a obtenção de blastocistos mistos, que serão transferidos para fêmeas pseudogravídas, para obter quimeras.

Os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal. O projeto conta com equipe adequada e competente no cuidado e manutenção de biotérios.

Comentários específicos:

Sugiro que nos próximos projetos que utilizam técnica similar, seja utilizado o protocolo mais detalhado que consta do processo 22/2004 deste mesmo grupo.

Assinatura:



Nome: Mariz Vainzof

Instituição: Depto. de Biologia, IB-USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS VERTEBRADOS EM
EXPERIMENTAÇÃO (CEA)**

Parecer referente a Projeto de Pesquisa ou aulas Práticas

Protocolo CEA/IBUSP: 022/2004

- Está de acordo com as normas e princípios éticos na Experimentação Animal do COBEA (junho/1991).
- Não Está de acordo com as normas e princípios éticos na Experimentação Animal, do COBEA (junho/1991).
- As normas do COBEA não se aplicam totalmente ao caso em questão.

Opine sobre os procedimentos, de acordo com os tópicos do protocolo:

Os procedimentos descritos no presente projeto compreendem as seguintes etapas:

- 1- Preparo de machos estéreis através de procedimento cirúrgico de vasectomia
- 2- Produção de fêmeas doadoras de mórulas para agregação celular
- 3- Coleta de embriões e agregação de células ES com mórulas compactas
- 4- Produção de fêmeas pseudográvidas para serem usadas como fêmeas receptoras de embriões e mães adotivas.

Estes procedimentos, bem como o de sacrifício dos animais estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

Comentários específicos:

Assinatura:



Nome: Mariz Vainzof

Instituição: Depto. de Biologia, IB-USP

DEDICATÓRIA

**Dedico esta tese a todos que de alguma forma,
mesmo que ínfima,
ajudaram um sonho a se tornar realidade.
A todos vocês o meu muito obrigado!!!**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Heder e Rachel, por tudo que eles tem feito por mim durante todos estes anos.

Aos meus irmãos, Fabiano, Fabrício e Sabrina que mesmo a distância estiveram ao meu lado.

À minha avó Maria Auxiliadora que nos momentos mais complicados se prontificou a estar do meu lado.

À Andréia que esteve do meu lado, apoiando com muito amor e carinho durante os bons e maus momentos de minha vida em São Paulo.

À Dra. Lygia da Veiga Pereira, professora e orientadora, pelos conhecimentos e apoio fornecidos durante o desenvolvimento de minha tese.

Aos meus amigos, professores e tutores, Irina Kerkis e Alexandre Kerkis aos quais considero os meus “Pais Científicos”, por fazerem parte da minha formação tanto pessoal com profissional. Os verdadeiros responsáveis pela formação dos alicerces da minha carreira científica.

À Dra. Marina Soukoyan pelos conhecimentos, carinho e apoio dados desde o início da minha formação profissional.

Ao Dr. José Antonio Visintin pelo apoio tanto material como científico proporcionado durante toda a tese.

À Dr. Maria Lucia Zaidan Dagli pelas sugestões e apoio fornecidos no desenvolvimento da parte histológica deste trabalho

Ao Marco Bourg de Mello por todos s conhecimentos a mim transferidos sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus velhos amigos, Mariana, Luciana, Victor, Adriana, Margarida, Marcelle e Marília que mesmo a distância, sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos que passei aqui em São Paulo

À todos os meus novos amigos, Paulo Henrique, Adne, Xande, Sylvinha, German, Akira dentre tantos outros pelos bons momentos vividos em São Paulo.

À todas as pessoas que compõem os dois laboratórios onde foi desenvolvido este projeto, em especial a Camila, Viviane, Bruno e Gustavo que estiveram envolvidos no trabalho..

À todas as pessoas que passaram por minha vida, que de algum modo positivo ou não, contribuíram para o meu crescimento como pessoa.

À FAPESP por apoiar financeiramente o desenvolvimento deste projeto.

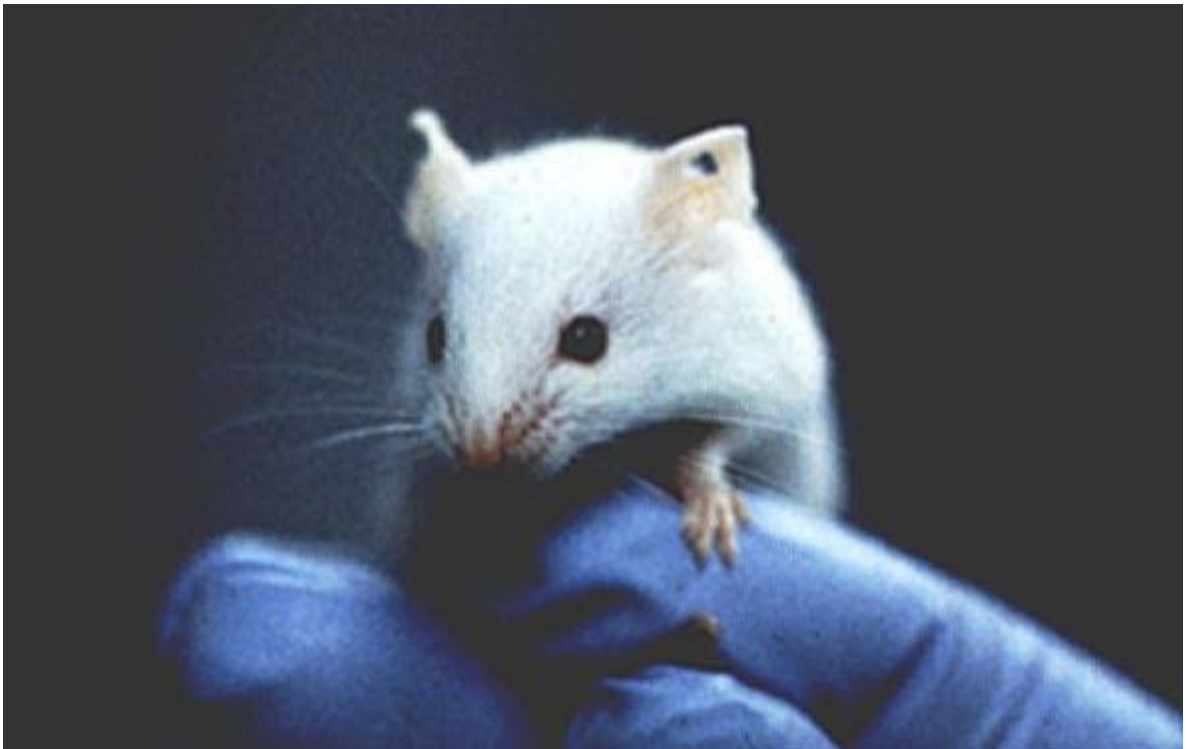
A todos vocês o meu muito obrigado!!

EPÍGRAFE

“Se um homem puder vencer a lacuna entre a vida e a morte, se puder continuar existindo mesmo após sua morte, então, talvez, tenha sido um grande homem. Para mim, o único triunfo, a única grandeza é a imortalidade.”

Jeames Dean

Este trabalho também é dedicado a todos os animais que foram sacrificados para que o mesmo fosse desenvolvido



As almas grandes têm muito em conta as coisas pequenas.
(Josemaría Escrivá)

RESUMO

A Síndrome de Marfan (SMF) é uma doença autossômica dominante causada por mutações do gene *FBNI* que afeta os sistemas ósseo, cardiovascular e ocular. O gene *FBNI* codifica uma glicoproteína de 350 kD, denominada fibrilina-1, o componente estrutural mais abundante das microfibras da matriz extracelular. Supõe-se que mutações no gene *FBNI* resultem na alteração da conformação da fibrilina-1 e conseqüentemente na interação de fibrilinas alteradas com as normais, perturbando a funcionalidade das microfibras - o chamado modelo dominante-negativo da patogênese. Estudos realizados em modelos animais para a SMF indicaram uma grande importância da fibrilina-1 na manutenção da integridade de tecidos. Porém, esses animais produziam pouco ou nenhuma quantidade de fibrilina-1 normal, e assim só apresentam algum fenótipo quando as respectivas mutações no gene *Fbn1* estão em homozigose, limitando sua aplicação como modelo animal para a SMF.

Neste trabalho, foi desenvolvido através da recombinação homóloga em células tronco embrionárias (células ES – do inglês *embryonic stem*), um modelo animal no qual se possa estudar a progressão das manifestações da SMF e serem testadas novas terapias.

O vetor $mg\Delta^{loxPneo}$ foi desenhado de forma a levar à substituição dos exons 19-24 do gene *Fbn1* de camundongo pelo cassete de expressão do gene de resistência à neomicina (*neo*) flanqueado por sítios loxP. O vetor foi introduzido nas células ES derivadas da linhagem de camundongo 129/Sv (linhagem USP-1) através de eletroporação e um clone positivo identificado por análises de Southern blot. Por meio da agregação de células do clone positivo com blastômeros das mórulas da linhagem CD-1, foram geradas quimeras que transmitiram a mutação para sua prole estabelecendo, desta forma, a linhagem de camundongos *Fbn1mg\Delta^{loxPneo}*.

A mutação foi colocada em dois backgrounds isogênicos 129/Sv e C57BL/6. Os animais heterozigotos C57BL/6 não apresentaram fenótipo, ao passo que alguns animais 129/Sv heterozigotos mostravam retardo no crescimento, defeitos ósseos (escoliose) e hipertrofia cardíaca que são manifestações similares às das SMF em humanos. A análise histológica do pulmão de heterozigotos mostrou alterações graves compatíveis com um quadro de enfisema. Também foi observada a fragmentação da matriz elástica nos vasos desses animais, equivalente ao encontrado em pacientes com a SMF.

Assim, os animais *Fbn1mgΔ^{loxPneo}* 129/Sv são um modelo animal dominante para a SMF com manifestações ósseas e cardiovasculares, onde poderão ser testadas novas terapias para a síndrome. Além disso, a variabilidade clínica existente entre as duas linhagens 129/Sv e C57BL/6, indica a presença de genes modificadores, de forma que as linhagens de camundongos *Fbn1mgΔ^{loxPneo}* representam um bom modelo experimental para o estudo da variabilidade clínica presente na SMF e para a identificação de genes modificadores do fenótipo.

ABSTRACT

Marfan syndrome (MFS) is an autosomal-dominant connective tissue disorder which affects the skeletal, ocular and cardiovascular systems caused by mutations in the *FBNI* gene. This gene encodes fibrillin-1, a glycoprotein of 350kD, which is the most abundant component of microfibrils of extracellular matrix. Mutations in the *FBNI* gene may result in interactions between mutated and normal fibrillins altering the microfibrils functioning – a dominant-negative model of the disease. Previous studies involving animal models of MFS suggested a major importance of fibrillin-1 in tissue maintenance. However, these animals only manifested the phenotype when the mutations in the *Fbn1* gene were found in homozygosis, limiting their application as animal models for the disease.

In this thesis, it was developed, by techniques of homologue recombination in embryonic stem cells (ES cells), a new animal model for studying the MFS phenotype progression, which can also be used for testing new drugs and therapies for the disease.

The vector $mg\Delta^{loxPneo}$ was built to substitute exons 19-24 of the *Fbn1* by an expression cassette of *neo* (gene that confers resistance to neomycin), which is flanked by loxP sites. The vector was introduced in ES cells derived from the mouse lineage 129/Sv (USP-1 lineage) by electroporation, and one positive clone was identified by Southern Blot analysis. Cells from the positive clone were aggregated with blastomeres from morulas of CD-1 lineage. Chimeras were generated and all the modifications were transferred to their offspring, establishing the $mg\Delta^{loxPneo}$ mouse lineage.

The mutation was placed in two different isogenic backgrounds: 129/Sv and C57BL/6. The heterozygotes animals C57BL/6 did not manifest the phenotype whereas some 129/Sv heterozygotes showed growth retard, skeletal injuries (such as scoliosis) and cardiac hypertrophy which are manifestations similar to the presented by MFS patients. The lung

histological analysis revealed serious alterations compatible with pulmonary emphysema. In addition, it was observed extracellular matrix fragmentation in the vessels of these animals, characteristic also found in patient with MFS.

In conclusion, the animals $mg\Delta^{loxPneo}129/Sv$ are a dominant animal model for MFS with skeletal and cardiovascular manifestations, and so it can be used for testing new therapies to the syndrome. Moreover, the clinical variability between the two lineages, 129/Sv and C57BL/6, indicates the presence of modifying genes. As a result, the mouse lineage $mg\Delta^{loxPneo}$ can be considered a good experimental model to study the clinical variability characteristic of MFS and to identify genes modifying the phenotype

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antonine-Bernard Marfan e Gabrielle	23
Figura 2. Manifestações clínicas características da Síndrome de Marfan. nos sistemas ósseo, ocular e esquelético	26
Figura 3. Cirurgia profilática.....	27
Figura 4. Localização do gene que codifica para a fibrilina-1	30
Figura 5. Estrutura primária da fibrilina-1	33
Figura 6. Modelo dominate-negativo	37
Figura 7. Modelo da haploinsuficiência	38
Figura 8. Desenvolvimento embrionário.....	43
Figura 9. Células do trofoblasto	43
Figura 10. Recombinação homóloga.....	47
Figura 11. Geração de uma linhagem de camundongos contendo a alteração de interesse	49
Figura 12. Sistema de recombinação Cre-loxP	51
Figura 13. Mutações no gene <i>Fbn1</i> geradas por recombinação homóloga em células ES	53
Figura 14. Modelo bovino para a SMF	54
Figura 15. Vetor de recombinação $mg\Delta^{loxPneo}$	55
Figura 16. Células embrionárias tronco	58
Figura 17. Geração de quimeras via agregação.....	64
Figura 18. Linhagem germinativa populada pelas células ES.....	65
Figura 19. Biópsia do tecido de coloração aguti da quimera	66
Figura 20: Identificação de dois clones positivos, 19 e 35, para a deleção de 6 exons induzida pelo vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$	82
Figura 21. Southern blot dos clones 19 e 35 após a digestão com as enzimas BamHI e HindIII	83
Figura 22. Resumo da análise cariotípica do clone USP1/19.....	84
Figura 23. Primeira ninhada de camundongos quiméricos <i>Fbn1</i> ^{<i>mgAloxPneo</i>}	86
Figura 24. Análise do processo de <i>splicing</i> via RT-PCR.....	87
Figura 25. Seqüência do cDNA da fibrilina-1 apresentando o exon 18 em amarelo e o 25 em vermelho	88

Figura 26. Seqüência do cDNA da fibrilina-1 após a retirada dos exons 19 a 24 apresentando o exon 18 em amarelo e o 25 em vermelho.....	89
Figura 27. Animais, gerados a partir da técnica de agregação, com fenótipos de aproximadamente 10% e 90% de quimerismo	90
Figura 28. Southern blot da primeira ninhada de animais $mg\Delta^{loxPneo}$	91
Figura 29. Heredograma da primeira ninhada da quimera	91
Figura 30. Heredograma da segunda família gerada a partir da quimera.....	92
Figura 31. Primeiro animal $mg\Delta^{loxPneo}$ heterozigoto a expressar o fenótipo	93
Figura 32. Heredograma do primeiro cruzamento da terceira ninhada da quimera	94
Figura 33. Heredograma do segundo cruzamento da terceira ninhada da quimera.....	95
Figura 34. Heredograma da linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$	97
Figura 35. Análise de Raio-X (3.0 Ms e 4.0 Kv) dos fenótipos selvagem (controle), heterozigoto leve, heterozigoto grave e heterozigoto muito grave(Tecno-Design – 500Ma/ 125 Kv) do linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$	98
Figura 36. Três animais de uma segunda ninhada da geração V.....	99
Figura 37. Análise de Raio-X (3.0 Ms e 4.0 Kv) dos três animais de uma segunda ninhada da geração V.....	100
Figura 38. Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmões de camundongos 129 $mg\Delta^{loxPneo}$	102
Figura 39. Heredograma da linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$	104
Figura 40. Heredograma da primeira ninhada obtida a partir do cruzamento entre dois animais heterozigotos C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ da geração IX (Macho A e fêmea A)	105
Figura 41. Heredograma da segunda ninhada obtida a partir do cruzamento entre dois animais heterozigotos C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ da geração IX (Macho B e fêmea B)	105
Figura 42. Análise das células tratadas com Cre.....	108
Figura 43. Análise dos subclones tratados com Cre.....	110
Figura 44. Análise cariotípica dos subclones tratados com Cre.....	111
Figura 45. Análise da expressão do alelo mutado do gene <i>Fbn1</i> por PCR em tempo real	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos experimentos de agregação até geração da primeira ninhada de quimeras $mg\Delta^{loxPneo}$	85
Tabela 2. Resultados dos experimentos de agregação que deu origem a segunda ninhada de quimeras $mg\Delta^{loxPneo}$	90
Tabela 3. Resultado do cruzamento entre animais heterozigotos (<i>background</i> misturado 129/Sv e CD-1).....	96
Tabela 4. Composição relativa do genoma das diferentes gerações de animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ visando o estabelecimento de uma linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ congênica	103
Tabela 5. Composição relativa do genoma das diferentes gerações de animais C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ visando o estabelecimento de uma linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ congênica	106
Tabela 6. Resultado do cruzamento entre animais heterozigotos (<i>background</i> C57BL/6)	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) com alto teor de glicose
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DEPC	Diethylpircarbonato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
dATP	desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	desoxi-citosina trifosfato
dGTP	desoxi-guanosina-trifosfato
dNTP	desoxi-nucleotídeo trifosfato
dTTP	desoxi-timidina trifosfato
ECG	Gonadotrofina coriônica de cavalo (Novormon)
G418	Geneticina (Gibco)
HCG	Gonadotrofina coriônica humana (Vetecor)
HE	Hematoxilina-Eosina
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MEF	DMEM, adicionado com 10% de SFB (Cultilab) e 2 mM de L-glutamina(Gibco)
Meio ES	DMEM, 15% de SFB (HyClone), 1% de MEM, 2 mM de L-glutamina(Gibco), 1×10^3 U/ml mLIF (Chemicon) e 0,15mM MTG
MEM	aminoácidos não essenciais(Gibco)
MTG	monoatílglicerol (Sigma)
PBS	Tampão fosfato salino (137 mM NaCl/ 3mM KCl/ 10 mM Na ₂ HPO ₄ / 1.7 mM KH ₂ P0 ₄ pH 7.4)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
SBF	Soro Fetal Bovino
SDS	Sódio dodecil sulfato
SSC	Solução de hidratação de ácidos nucleicos

(20 vezes concentrado: 0.3 M de citrato tri-sódico/ 3 M NaCl)

SS-DNA.....DNA de esperma de salmão

STET Tampão de lise (0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.0;
1 mM EDTA pH 8.0; 5% Triton X-100)

TAE..... Tampão de eletroforese 1 vez concentrado
(89 mM Tris-HCl, pH 8.0/ 89 mM Ácido Acético, pH 8.0/ 3 mM EDTA, pH 8.0)

Tampão de lise(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA;
0.5% Sarcosil; 10 mM NaCl; 100 µg/ml de proteinase K)

TE.....(10 mM Tris-HCl, pH 8.0/ 1 mM EDTA, pH 8.0)

TEN.....(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	23
1. Síndrome de Marfan	23
1.1. Histórico	23
1.2. Aspectos Clínicos	25
1.3. Critérios Diagnósticos	28
1.4. Biologia Molecular.....	29
1.4.1. Gene <i>FBNI</i>	29
1.4.2 Fibrilina-1.....	31
1.4.3. Mutações.....	34
1.5. Modelos de Patogênese para a SMF	36
1.6. A Família Gênica das Fibrilinas.....	39
1.7. Modelos animais	41
1.7.1. Desenvolvimento do Camundongo.....	42
1.7.2. Geração dos animais modificados geneticamente	44
1.8. Modelos animais para a SMF	52
II. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivos gerais	55
2.2. Objetivos específicos.....	55
III. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1. Vetor $mg\Delta^{loxPneo}$	56
3.2. Cultivo de células ES - recombinação homóloga	57
3.2.1. Obtenção de fibroblastos embrionários de camundongo.....	57
3.2.2. Cultivo de Células ES.....	58
3.2.3. Eletroporação.....	59
3.2.4. Coleta de colônias	60
3.2.5. Extração do DNA dos clones e identificação dos clones positivos (Southern blot).....	61
3.3. Produção de camundongos <i>knockout</i>	62
3.3.1. Preparo das células ES	62

3.3.2. Preparo de fêmeas	63
3.3.3. Agregação	63
3.3.4. Análise dos camundongos <i>knockout</i>	65
3.4. Análise do processamento do mRNA do alelo <i>Fbn1^{mgΔloxPneo}</i>	66
3.4.1. Obtenção do RNA.....	66
3.4.2. RT-PCR.....	67
3.4.3. Clonagem e Sequenciamento	68
3.4.3.1. Eletroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose	68
3.4.3.2. Purificação do DNA.....	69
3.4.3.3. Reação de ligação intermolecular: Clonagem.....	69
3.4.3.4. Transformação de células competentes	69
3.4.3.5. Extração de DNA plasmidial	70
3.4.3.6. Digestão de DNA com enzima de restrição	70
3.4.3.7. Reação de sequenciamento	71
3.5. Introdução do alelo mutado nas linhagens isogênica C57BL/6 e 129/Sv.....	71
3.6. Genotipagem dos animais	72
3.7. Raio X	73
3.8. Análise do fenótipo	73
3.9. PCR em tempo real	74
3.10. Clones <i>Fbn1^{CRE}</i>	76
3.10.1 Obtenção de clones <i>Fbn1^{CRE}</i>	76
3.10.2. Extração e digestão das amostras tratadas com Cre 4 μM e 8 μM.....	77
3.10.3. Subclones de <i>Fbn1^{CRE}</i>	77
3.11. Formação de corpos embriões.....	78
3.12. Análise citogenética	78
3.13. Histologia.....	79
3.13.1. Hematoxilina-Eosina	80
3.14. Necrópsia e exame histopatológico.....	80
IV. RESULTADOS.....	81
4.1. Recombinação homóloga em células ES.....	81
4.2. Geração da linhagem <i>Fbn1^{mgΔloxPneo}</i>	85
4.3. Linhagem 129/Sv <i>mgΔ^{loxPneo}</i>	96

4.4. Linhagem C57BL/6 mg $\Delta^{loxPneo}$	104
4.5. Recombinação mediada por Cre	107
V. DISCUSSÃO	113
5.1. Recombinação homóloga em células ES.....	114
5.2. Geração do modelo animal mg $\Delta^{loxPneo}$	117
5.3. Variabilidade fenotípica.....	118
5.4. Achados histológicos.....	121
5.5. Alelo <i>Fbn1</i> ^{mgCRE}	123
VI. CONCLUSÕES	125
VII. REFERÊNCIAS	126

I. INTRODUÇÃO

1. Síndrome de Marfan

1.1. Histórico

A Síndrome de Marfan (SMF)(OMIM#154700) foi inicialmente descrita em 1896 por Antonine-Bernard Marfan, professor de pediatria em Paris (Figura 1) (Marfan, 1896). Ele descreveu primeiramente o caso de Gabrielle P. (Figura 1) de cinco anos de idade, o qual denominou *pattes d'araignée* (patas de aranha), pois ela apresentava membros desproporcionalmente longos e finos. Embora Gabrielle fosse alta e apresentasse crânio estreito (dolicocefalia), os seus olhos, coração e intelecto eram normais. Através de análises radiológicas identificou-se escoliose tóraxico-lombar, relativa deformidade na região peitoral e tuberculose pulmonar.



Antonine-Bernard Marfan



Gabrielle

Figura 1. Antonine-Bernard Marfan e Gabrielle. Antonine-Bernard Marfan descreveu pela primeira vez a Síndrome de Marfan tendo como modelo para a descrição do fenótipo sua paciente Gabrielle (<http://www.pifo.uvsq.fr>).

Em 1931 foi introduzido o conceito no qual um defeito no desenvolvimento do tecido mesodérmico poderia resultar em uma distrofia congênita como descrita na SMF (Wave, 1931). No período de quarenta anos após a descrição deste primeiro caso, Antonine-Bernard Marfan relatou mais de 150 casos similares os quais denominou de dolicoostenomelia, termo que ele utilizava para se referir aos indivíduos com membros excessivamente longos (Marfan, 1938). Com o passar dos anos, outros fenótipos foram sendo identificados como estando relacionados com esta patologia, como o deslocamento das lentes (*ectopia lentis*) e mau funcionamento da válvula mitral. Marfan descobriu que gerações subseqüentes de uma mesma família são afetadas independente do sexo do indivíduo. Desta forma, ele caracterizou a patologia como sendo de característica mendeliana dominante (revisto por Pyeritz, 2000).

Em 1943 foi descrito pela primeira vez a relação existente entre a má formação da aorta e a SMF (Baer et al., 1943; Etter et al., 1943), sendo a extensão do comprometimento cardiovascular documentado apenas em 1955 (McKusick, 1955). McKusick sugeriu em 1956 que as alterações básicas identificadas na SMF teriam um constituinte em comum o qual veio a ser identificado e descrito 35 anos mais tarde (McKusick, 1956; Dietz et al., 1991b; Lee et al., 1991).

Em 1986, na cidade de Berlin, o Comitê Internacional de Nosologia propôs pela primeira vez, efetuar a classificação diagnóstica das mais comuns desordens hereditárias relacionadas ao tecido conjuntivo, incluindo a Síndrome do Hiper mobilidade (OMIM#154750), a síndrome vascular de Ehlers Danlos (OMIM#130020) e a SMF, a qual teve seus critérios revisados 10 anos depois por Anne De Paepe (Beighton et al., 1986; De Paepe et al., 1996).

A fibrilina-1 foi identificada e caracterizada em 1986 a partir de cultura de fibroblastos humanos, como o principal componente estrutural das microfibras da matriz extracelular (Sakai et al., 1986). Análises posteriores mostraram que o locus 15q15-21 está relacionado

com a SMF (Kainulainen et al., 1990, Dietz et al., 1991a). A relação entre a fibrilina-1 e a SMF foi sugerida inicialmente por Hollister e colaboradores (Hollister et al., 1990) e confirmada por Harry C. Dietz e colaboradores (Dietz et al., 1991b), que demonstraram que mutações no gene *FBNI*, que codifica a fibrilina-1, são responsáveis pelas manifestações clínicas da SMF (Dietz et al., 1991b).

1.2. Aspectos Clínicos

A Síndrome de Marfan (SMF) é a mais comum das doenças genéticas hereditárias do tecido conjuntivo afetando indivíduos de todas as raças e gêneros com igual frequência (Manusov et al., 1994). A SMF é uma doença autossômica dominante que apresenta uma incidência de aproximadamente 1 em cada 10.000 indivíduos, sendo que 30% destes casos são devidos a novas mutações (McKusick, 1956; Pyeritz, 1979).

Apesar da SMF apresentar alta variabilidade clínica intra e interfamiliar, sua penetrância é completa. A doença afeta primariamente três sistemas: esquelético, onde o indivíduo apresenta crescimento excessivo dos membros, hiperextensibilidade articular, escolioses e deformidades na região anterior do tórax (Sponseller et al., 1995); ocular, que se caracteriza pela fragilidade dos tecidos que sustentam o cristalino resultando em miopia, deslocamento das lentes para cima (*ectopia lentis*) (Boerger, 1914) e da retina; cardiovascular com dilatação da raiz da aorta e dissecação da mesma devido à fraqueza na sua camada média, além de prolapso da válvula mitral e regurgitação mitral e da aorta (Figura 2) (Pyeritz et al., 1979; Jones et al., 2002). Em 90% dos casos, a morte é causada por lesão cardiovascular (McKusick, 1956). Atualmente, o diagnóstico referente a SMF baseia-se tanto nas características esqueléticas, oculares e cardíacas como no histórico familiar quando disponível (De Paepe et al., 1996).

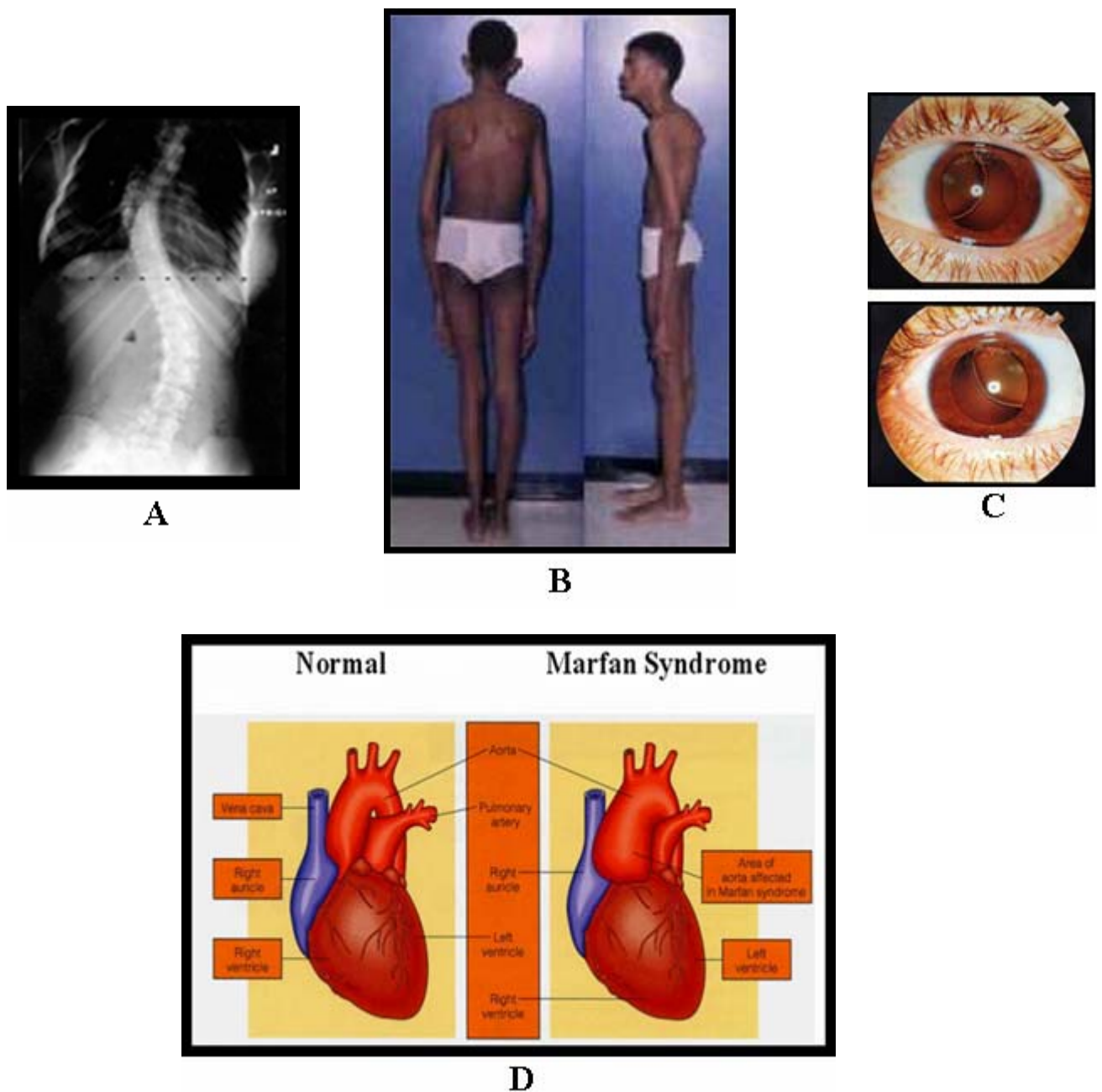


Figura 2. Manifestações clínicas características da Síndrome de Marfan nos sistemas ósseo, ocular e esquelético. A. Escoliose (<http://www.ajronline.org>); **B.** Alongamento das extremidades ósseas e hiperextensibilidade articular (<http://www.master.emedicine.com>); **C.** Deslocamento do cristalino (<http://www.medstudents.com.br>); **D.** Dilatação e dissecção da aorta (<http://www.mayoclinic.org>).

O diagnóstico precoce seguido de tratamentos terapêuticos com um agente bloqueador β -adrenérgico que visa uma diminuição do estresse hemodinâmico, assim como cirurgias profiláticas para o reparo da artéria aorta (Figura 3), possibilitaram um substancial prolongamento da sobrevida de 47 anos em 1972 para 61 anos em 1995 (Murdoch, 1972; Shores et al, 1994; Silverman et al., 1995; Baumgartner et al., 1999; Gott et al., 1999).

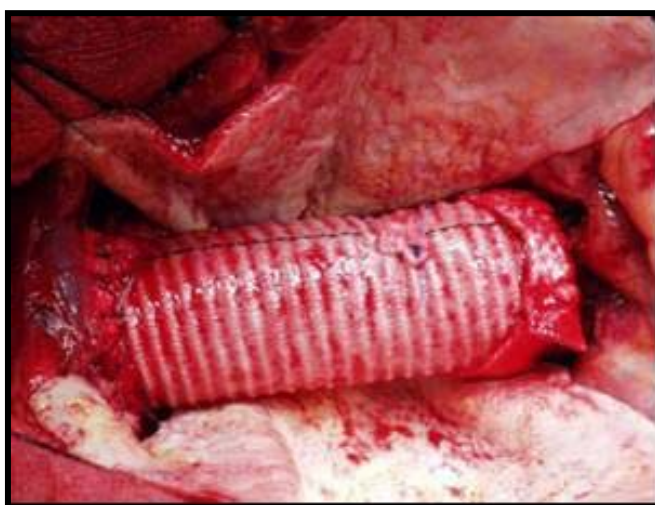


Figura 3. Cirurgia profilática. Visa o reparo da aorta por meio da substituição da região do aneurisma por uma prótese (www.clevelandclinic.org).

1.3. Critérios Diagnósticos

A definição de critérios diagnósticos para a SMF torna-se complexa devido ao fato da mesma apresentar uma grande variabilidade clínica mesmo em indivíduos da mesma família. Em 1979 estabeleceram-se quatro critérios para a determinação do quadro diagnóstico da SMF: característica familiar, achados oculares, cardíacos e esqueléticos (Pyeritz et al., 1979). Inicialmente determinou-se que pelo menos dois destes critérios estivessem presentes no indivíduo de forma a confirmar o diagnóstico sendo necessário três ou quatro critérios para a determinação do quadro clássico da SMF. Entretanto, em muitos casos o diagnóstico continuava suspeito mesmo quando dois ou mais critérios estavam presentes. Em função de cada uma das características clínicas da SMF ocorrerem com frequências variáveis na população, fez-se necessário a determinação de graus de relevância para identificar a patologia como grave ou leve. Sendo assim, classificou-se inicialmente como características graves a luxação do cristalino, a dilatação da aorta, a cifoescoliose severa e a deformidade anterior do tórax, de modo que miopia, prolapso de válvula mitral, a hiper mobilidade articular e aracnodactilia foram classificadas como características leves.

Em 1986 durante o 7º Congresso de Genética Humana em Berlim, Pyeritz e colaboradores alteraram os critérios diagnósticos para a SMF passando a tomar com base os sinais clínicos de maior frequência e especificidade, ou seja, luxação do cristalino, dilatação da aorta ascendente, dissecção da aorta e ectasia dural. Assim, os requisitos para o diagnóstico passaram a ser os seguintes: em casos esporádicos ou onde não se tenha um parente de primeiro grau afetado o paciente deveria apresentar comprometimento do sistema esquelético e de outros dois sistemas, manifestando em pelo menos um o fenótipo grave. Nos casos familiares, onde pelo menos um parente de primeiro grau apresenta o fenótipo positivo, deveria ocorrer o envolvimento de dois sistemas, sendo manifestação grave em pelo menos um dos sistemas dependendo do fenótipo familiar.

Posteriormente, De Paepe e colaboradores revisaram em 1996, os critérios de Pyeritz devido a descobertas moleculares e de sua correlação com o fenótipo, hoje conhecidos como critérios de GHENT. Assim sendo, os requisitos atuais para o diagnóstico são: na ausência de histórico familiar ou genético é necessária a identificação da patologia em sua forma grave em pelo menos dois diferentes órgãos/sistemas além do envolvimento de um terceiro. Entretanto, caso uma mutação característica da SMF tenha sido detectada é necessária a identificação do fenótipo grave em somente um órgão/sistema além do envolvimento de um segundo. Caso o indivíduo apresente histórico familiar ou genético passa a ser necessária a identificação da patologia em sua forma grave em um órgão/sistema além do envolvimento de um segundo (De Paepe et al., 1996).

1.4. Biologia Molecular

1.4.1. Gene *FBNI*

Os estudos moleculares acerca da SMF se iniciaram em 1986, quando o Comitê Internacional de Nosologia estabeleceu as bases clínicas da Síndrome de Marfan, as quais vieram posteriormente sustentar os dados moleculares (Beighton et al., 1986).

Dadas as manifestações clínicas da SMF, pesquisadores sempre assumiram que seu defeito básico seria em uma proteína da matriz extracelular. Em particular, em alguma proteína que compõe as fibras elásticas, estrutura mais afetada em exames histológicos de aortas de pacientes com esta síndrome. Várias destas moléculas foram testadas para o seu envolvimento com a SMF sem nenhum resultado positivo (Laitinen et al., 1968; Krieg and Muller, 1977; Lamberg, 1978; Appel et al., 1979; Abraham et al., 1982; Royce and Danks, 1982; Nakashima, 1986; Tsiouras et al., 1986; Ogilvie et al., 1987; Dalgleish et al., 1987; Francomano et al., 1988; Boileau et al., 1990; Kainulainen et al., 1990b).

A combinação de estudos genéticos e bioquímicos levou à descoberta do gene envolvido na SMF (Lee et al., 1991; Maslen et al., 1991). Este gene, denominado *FBNI*, localizado na região cromossômica 15q15 – q21.3 (Figura 4), codifica a fibrilina-1, que é o principal componente estrutural das microfibras que juntamente com a elastina forma as fibras elásticas (Sakai et al., 1986; Tsipouras et al., 1991). De fato, a localização da fibrilina-1 nos diferentes tecidos (periósteo, aorta, músculo, ligamentos das lentes, entre outros) se correlaciona bem com as manifestações clínicas características da SMF.

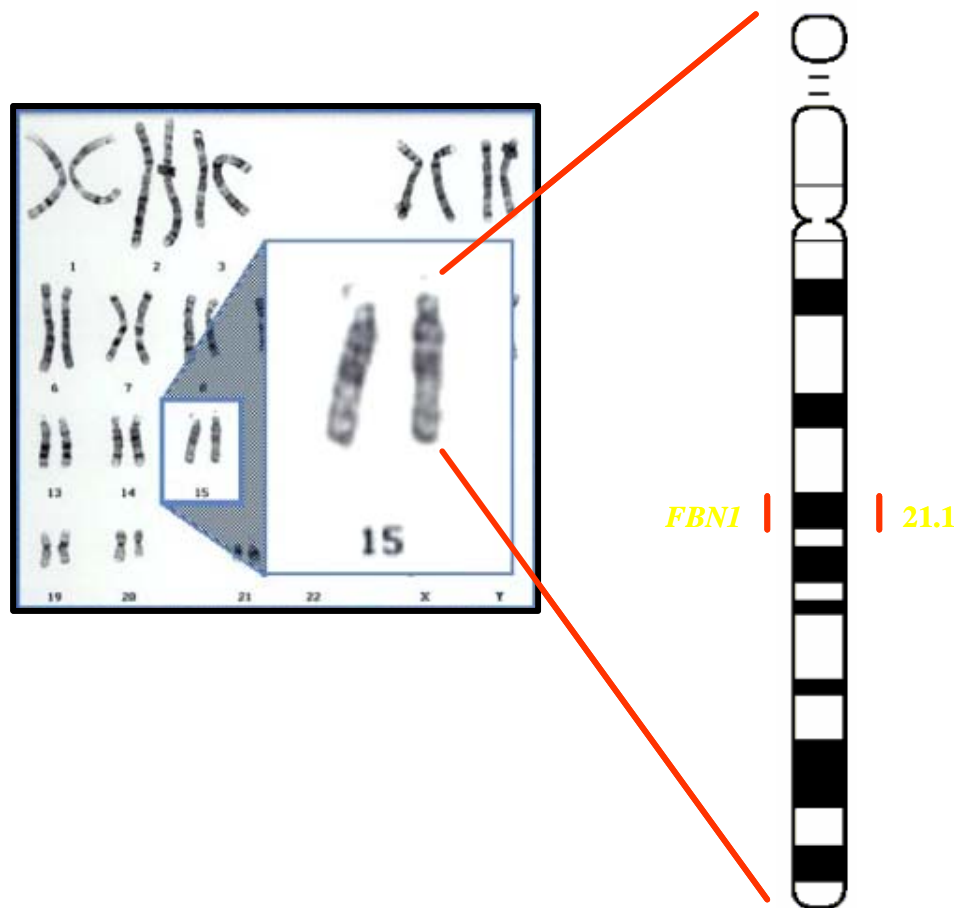


Figura 4. Localização do gene que codifica para a fibrilina-1. Identificação do locus 15q15 – q21.3 onde se encontra o gene *FBNI* que codifica para a glicoproteína fibrilina-1.

O gene *FBNI* foi completamente caracterizado, estando dividido em 65 exons distribuídos em aproximadamente 230 kb de DNA genômico e transcrevendo um mRNA de 10 kb (Pereira et al., 1993). O RNA processado é constituído de 9663 nucleotídeos apresentando um quadro de leitura de 8613 nucleotídeos e suas regiões não traduzidas 5' e 3' sendo compostas de 134 e 916 nucleotídeos respectivamente (Pereira et al., 1993).

1.4.2 Fibrilina-1

A fibrilina-1 é o principal componente das microfibras extracelulares com diâmetro de 10-12 nm. Elas encontram-se amplamente distribuídas em uma grande variedade de tecidos e órgãos, tanto em tecidos elásticos, associada a moléculas de elastina, quanto não elásticos (revisto por Ramirez et al., 1998). A fibrilina-1 é encontrada tanto em águas vivas como em humanos, o que demonstra ter sido, ao longo da evolução, altamente conservada (Kielty et.al., 2005).

A fibrilina-1 foi isolada em 1986, a partir de culturas de fibroblastos, utilizando-se anticorpos monoclonais contra âminio humano digerido por pepsina (Sakai et al., 1986). Sua composição bioquímica consiste de 2871 aminoácidos apresentando massa molecular de aproximadamente 350 kDa (Pereira et al., 1993). A fibrilina-1 é composta basicamente de quarenta e sete módulos homólogos denominados EGF (fator de crescimento epidermal (do inglês - *epidermal growth factor*)) sendo que quarenta e três destes módulos são associados ao cálcio (cbEGF – *calcium binding epidermal growth factor*), sete módulos TB (módulos com oito cisteínas) e três módulos Fib (módulos híbridos) (Figura 5) (Pereira et al., 1993).

Os módulos EGF têm como característica a presença de seis resíduos de cisteína espaçadas que estabelecem ligações dissulfídicas intramodulares (1-3, 2-4 e 5-6), responsáveis pela estabilidade da estrutura secundária dos módulos EGF (Davis, 1990). O gene *FBNI*

segue a mesma estrutura modular da glicoproteína, ou seja, cada um dos módulos homólogos de EGF que compõe a estrutura da fibrilina é codificado por apenas um exon, indicando que este gene evoluiu por duplicações múltiplas de um exon original (Pereira et al., 1993).

Os módulos cbEGF que são críticos para a integridade estrutural e funcional da fibrilina-1, estão diretamente relacionados com a estabilidade entre módulos, o alinhamento lateral dos monômeros, a formação de macroagregados e a proteção contra proteólises extracelulares (Ramirez, 1999; Kielty et al., 2005). Cerca de 74% das mutações, descritas no gene *FBNI*, ocorrem nos módulos cbEGF.

Os módulos TB, de estrutura globular, apresentam seqüências compostas por oito resíduos de cisteínas que se ligam por meio de pontes disulfídicas intramodulares (1-3, 2-6, 4-7 e 5-8), característica das proteínas LTPB (*latent transforming growth factor- β binding protein*). Na estrutura protéica da fibrilina-1, seis dos módulos TB encontram-se intercalados entre os módulos cbEGF ao passo que o sétimo módulo encontra-se precedendo uma região rica em prolina. O quarto módulo TB contém uma seqüência RGD (Arg-Gly-Asp) que confere às fibrilinas sua capacidade de se ligar às células mediadas pelas integrinas (Kielty et al., 2005). Diferentemente dos módulos cbEGF, os módulos TB exercem interações tanto intermoleculares como intramoleculares (Kielty et al., 2005).

Os três módulos Fib, aparentemente exclusivos das fibrilinas e LTBPs, presentes na estrutura da fibrilina-1, possuem características tanto dos domínios EGF quanto dos domínios TB (Pereira et al., 1993). Atualmente acredita-se na hipótese dos módulos Fib terem surgido a partir da fusão de exons codificadores dos módulos EGF e TB, pois sua estrutura da porção N-terminal tem as características dos módulos TB enquanto sua porção C-terminal apresenta características dos módulos cbEGF (Pereira et al., 1993). A maioria dos módulos Fib contém oito cisteínas. Entretanto, o primeiro módulo contém nove cisteínas sendo uma destas, responsável pela formação de pontes disulfídicas intermoleculares (Reinhardt et al., 2000).

A região aminoterminal da fibrilina-1, situada 23 resíduos após o sítio de clivagem, se caracteriza por ser rica em cisteínas. Ao analisar a região carboxiterminal é possível classificá-la como rica em lisinas embora ocorra a presença de duas cisteínas e um sítio de endoprotease furina/PACE (Kielty et al., 2005). A fibrilina-1 também se caracteriza por possuir ao longo de sua extensão quatorze sítios de glicosilação e uma região rica em prolina que devido a sua composição e hidrofobicidade facilita as interações intermoleculares (Ramirez, 1999).

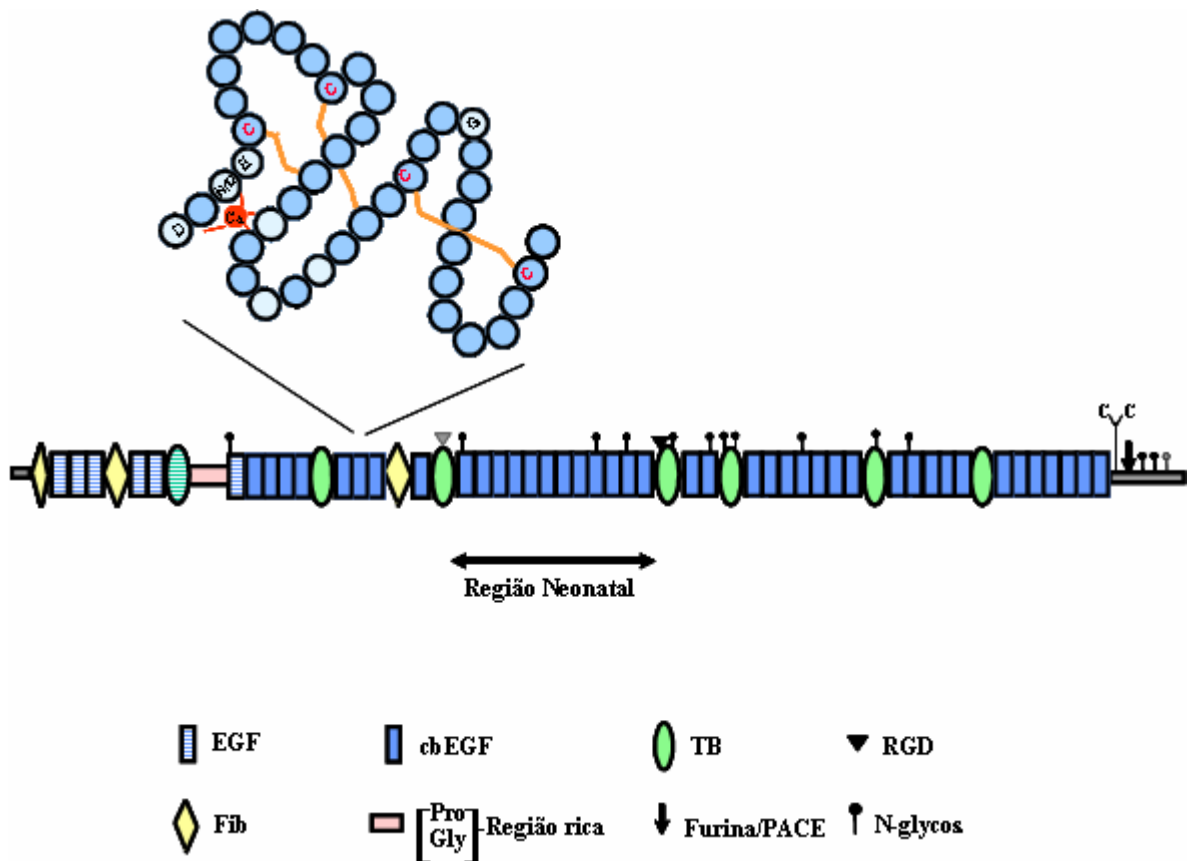


Figura 5. Estrutura primária da fibrilina-1. EGF (epidermal growth factor); TB (LTBP - latent transforming growth factor- β binding protein); cbEGF (calcium binding epidermal growth factor); Fib (híbridos de EGF e TB), N-glicos (sítio de glicosilação); furin/PACE (sítio de endoprotease); RGD (seqüência Arg-Gly-Asp).

A maior parte da síntese de fibrilina-1 parece estar associada a processos tardios de morfogênese (Zhang et al., 1995). Estudos sugerem que as fibrilinas parecem estar relacionadas ao processo de elastogênese, pois as microfibrilas estão presentes na matriz extracelular, antes da deposição de tropoelastinas. Por esse motivo, uma deficiência na síntese ou na estrutura da fibrilina-1 poderia prejudicar a formação de fibras elásticas, levando a processos patológicos como o colapso da artéria aorta (Zhang et al, 1995).

As microfibras podem desempenhar diversos papéis em diferentes tecidos. Em tecidos não elásticos, elas podem apresentar a função de ancoragem, como por exemplo, a ligação entre as lentes e o corpo ciliar dos olhos. Em tecidos elásticos, elas conectam as fibras elásticas ao longo delas mesmas e a outras estruturas e componentes celulares. A relação funcional entre a fibrilinas e o esqueleto pode estar associada às forças de tensão que regulam o crescimento ósseo. Microfibras ricas em fibrilinas podem controlar negativamente o crescimento dos ossos, pela manutenção de tensões periosteas, e pela força de tensionamento dos ligamentos e tendões (Zhang et al., 1995). O fenótipo esquelético de uma linhagem de camundongos com mutações no gene da fibrilina-1 sustenta essa hipótese (Pereira et al., 1999).

1.4.3. Mutações

Atualmente já foram identificadas e descritas mais de 562 mutações no gene *FBNI* relacionadas à SMF as quais não apresentam, em geral, qualquer predileção por uma região específica dentre os 65 exons que compõe o gene (revisto por Boileal et al., 2005). Dados recentes demonstraram que aproximadamente 492 das mutações descritas encontram-se na região codificante da glicoproteína fibrilina-1. Embora grande parte das mutações sejam únicas, análises feitas a partir do banco de dados (<http://www.umb.be>) demonstraram que

aproximadamente 12% das mutações encontram-se repetidas ao longo do gene (Boileal et al., 2005).

Praticamente todas as mutações até hoje descritas no gene *FBNI* estão relacionadas a ilhas CpG podendo assim serem classificadas como mutações “hot spot” (Boileal et al., 2005). Estas mutações encontram-se associadas a diversos fenótipos dentre os quais temos a síndrome do prolapso da válvula mitral (MIM#157700), aneurisma e dissecção da aorta ascendente (MIM#132900), *ectopia lentis* (MIM#129600) e síndrome da válvula mitral, aorta, estrutura óssea e pele (MASS) (MIM#604308).

As mutações no gene *FBNI* podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo é constituído por mutações que geram um códon de terminação prematuro, resultando desta forma, no encurtamento da molécula de fibrilina-1. Pessoas com este tipo de mutação apresentam um uma alta variabilidade clínica, e foi proposto que a severidade do fenótipo estaria diretamente relacionada à quantidade de mRNA transcrito a partir do alelo mutante (Dietz et al., 1993) e conseqüentemente à quantidade de proteínas truncadas que são incorporadas as microfibras (Nijbroek et al., 1995; Karttunen et al., 1998).

O segundo grupo compreende mutações pontuais que se encontram preferencialmente situadas nas seqüências que codificam os módulos cbEGF, cerca de 60% das mutações, afetando os resíduos de cisteína ou aminoácidos relacionados a ligação com cálcio. Estas mutações podem criar ou substituir resíduos de cisteína afetando desta forma as ligações disulfídicas intramodulares. Estudos recentes demonstraram que a substituição de cisteínas está relacionada com a alta incidência de *ectopia lentis* (Schrijver et al, 2002; Loeys et al., 2004; Adés et al., 2004).

Tendo como base os dados referentes às mutações relacionadas à SMF, ainda não foi possível estabelecer uma clara relação entre genótipo e fenótipo devido a sua grande

variabilidade clínica tanto interfamiliar quanto intrafamiliar (Hutchinson e cols, 2003). Ou seja, a mesma mutação pode causar quadros clínicos diferentes.

Entretanto pode ser feita uma exceção à forma neonatal da SMF, onde pode se fazer uma relação entre o fenótipo neonatal e mutações nos exons 24 a 32 (Revencu et al., 2004). Embora exista esta relação entre a fase neonatal e os exons 24 a 32, outros fenótipos encontram-se associados a esta região (Tiecke et al., 2001; Collod-Beroud et al., 2003).

1.5. Modelos de Patogênese para a SMF

Dois modelos foram propostos para explicar a patogênese da SMF. O Primeiro mecanismo proposto foi denominado de modelo dominante – negativo (Bonadio et al., 1990; Dietz et al., 1993). De acordo com este modelo, para a patogênese de proteínas multiméricas, as moléculas mutantes interagem com as normais, sendo incorporadas na ultra-estrutura correspondente, no caso da fibrilina, as microfibras. A presença destas moléculas mutadas altera a organização e a integridade da ultra-estrutura, gerando então o fenótipo (Figura 6).

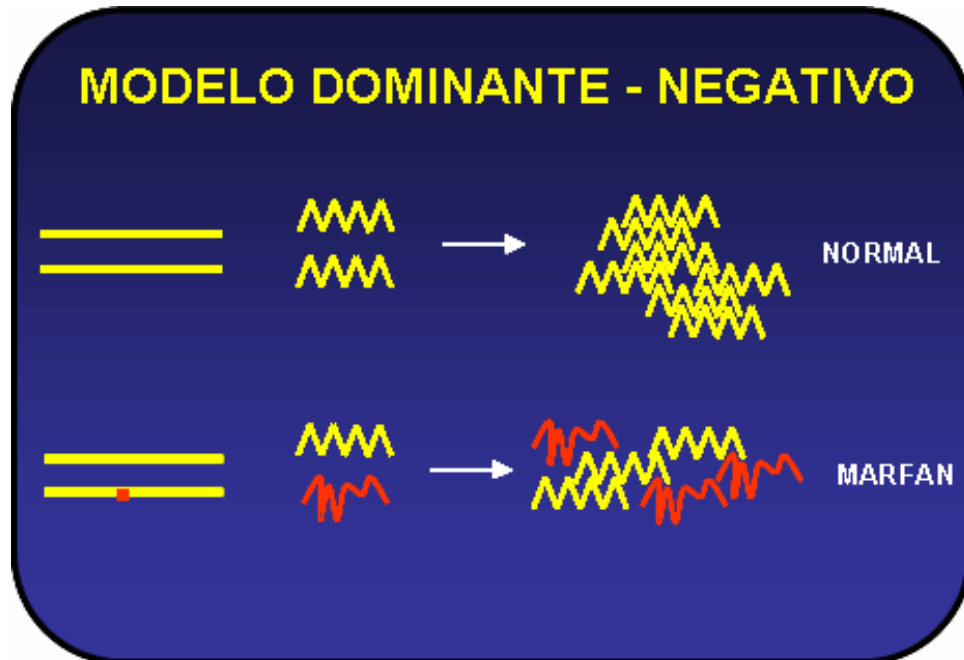


Figura 6. Modelo dominante-negativo. A mutação no gene *FBNI* gera uma fibrilina alterada (vermelho) que interage com a fibrilina normal (amarelo) perturbando a estrutura das microfibras e resultando no fenótipo característico da SMF.

É interessante notar que este modelo prevê que um alelo nulo do gene *FBNI* não seria deletério, o que não exclui a possibilidade de ser necessária a expressão de ambos os alelos do gene da fibrilina-1. Por outro lado, existe a possibilidade de que a formação das microfibras seja suscetível a um efeito de dosagem. Desta forma, indivíduos afetados que apresentem uma baixa expressão de fibrilina-1 mutada devem apresentar fenótipos menos severos da doença. Em contrapartida, pacientes que venham a expressar altos níveis de fibrilina-1 mutada tenderão a apresentar fenótipos mais severos.

O segundo modelo é o da haploinsuficiência da fibrilina-1 normal (Judge et al., 2004). De acordo com este modelo, não a presença de uma proteína mutante, mas sim, a diminuição na expressão da fibrilina-1 normal resultaria em uma redução na deposição da fibrilina-1 na matriz extracelular alterando a formação das microfibras (Figura 7).



Figura 7. Modelo da haploinsuficiência. Modelo no qual, não a presença de uma proteína mutante, mas sim, a diminuição na expressão da fibrilina-1 normal resultaria no fenótipo característico da SMF.

Estudos realizados com modelos animais, assim como em pacientes com SMF, demonstraram que o nível de expressão da proteína normal pode estar relacionado com a gravidade do quadro clínico da doença (Judge et al., 2004; Hutchinson et al., 2003). Foi descrita uma mutação pontual em um indivíduo com alterações esqueléticas, a qual gera uma alteração na região C-terminal da glicoproteína fibrilina-1, impedindo que os monômeros mutantes possam se agregar às microfibrilas. Isso sugere que esse indivíduo deve apresentar um fenótipo associado a um modelo de haploinsuficiência, semelhante ao quadro de um indivíduo que apresente um alelo nulo (Milewicz et al., 1995). Uma vez que os níveis de expressão da fibrilina-1 normal parecem apresentar o potencial de modular os efeitos patogênicos das proteínas mutadas, é possível que uma variação no nível de expressão dos alelos normais do gene *FBNI* possa explicar parte da heterogeneidade. Esta é encontrada em pacientes com SMF, principalmente naqueles com mutações *nonsense*, os quais, normalmente, apresentam baixa expressão de proteínas mutantes (Hutchinson et al., 2003).

1.6. A Família Gênica das Fibrilinas

Durante a clonagem do cDNA da fibrilina-1, um segundo cDNA, que codifica uma glicoproteína semelhante, foi isolado (Lee et al., 1991). O gene correspondente, *FBN2*, foi mapeado no cromossomo 5 sendo demonstrada a sua ligação com uma condição semelhante a SMF: Síndrome de Beals (SB) (OMIM#121050). Indivíduos afetados por esta rara anomalia do tecido conjuntivo compartilham algumas das características ósseas da SMF, porém apresentam contraturas ao invés de hiperextensibilidade articular (McKusick, 1956). Além de não apresentarem as manifestações oculares e cardiovasculares características da SMF, estes pacientes apresentam orelhas com deformidades características. A identificação de duas glicoproteínas homólogas ligadas a condições semelhantes levou à classificação destas com uma nova família de glicoproteínas extracelulares: fibrilina-1, produto do gene *FBN1* e fibrilina-2, produto do gene *FBN2* (Lee et al., 1991).

A fibrilina-2 é altamente semelhante a fibrilina-1, sendo também composta das mesmas unidades repetitivas ricas em cisteínas. É interessante notar que a única grande diferença entre as duas glicoproteínas, é um domínio na região amino da fibrilina-1 rico em prolinas, que na fibrilina-2 é rico em glicinas (Zhang et al., 1994)

Estudos relacionados aos padrões de expressão destes dois genes durante a embriogênese, mostra que, estes são expressos de maneiras diferentes, tanto em termos de distribuição nos tecidos quanto nos estágios de desenvolvimento (Zhang et al., 1995). Em geral, o transcrito da fibrilina-2 aparece mais cedo e se acumula por um período mais curto de tempo do que o transcrito da fibrilina-1.

A síntese de fibrilina-1 está relacionada com o período mais tardio da morfogênese e o aparecimento de estruturas mais definidas. Por outro lado, a síntese da fibrilina-2 coincide com as etapas iniciais da morfogênese, em particular com o começo da elastogênese. Logo, as microfibras morfologicamente homogêneas, são na verdade heterogêneas no que diz respeito

à composição das diferentes fibrilinas. Baseado nestes resultados foi proposto que as fibrilinas têm funções distintas, porém relacionadas, na fisiologia das microfibras. Segundo esta teoria, a fibrilina-1 promove principalmente suporte e força enquanto a fibrilina-2 tem uma função principal na regulação do processo inicial da formação da fibra elástica (Zhang et al., 1995).

Recentemente, por meio do uso combinado de técnicas de PCR, sequenciamento e bioinformática, foi identificado um terceiro tipo de fibrilina, denominado de fibrilina-3. Esta nova fibrilina é codificada pelo gene *FBN3* que é composto de 66 exons e transcreve um mRNA de 9 kb que se encontra situado na posição 19p13.3-p13.2 em uma região de aproximadamente 85 kb. A proteína fibrilina-3 é composta de 2851 aminoácidos possuindo um peso aproximado de 305 kDa e apresenta um alto grau de homologia com os outros dois membros da família das fibrilinas, exceção feita à região interna que é rica em resíduos de prolina e glicina (Nagase et al., 2001; Corson et al., 2004). Análises recentes demonstraram que a fibrilina-3 é altamente expressa no cérebro podendo estar relacionada com a síndrome de Weill-Marchesani (WMS)(OMIM#277600) (Faivre et al., 2003a; Faivre et al., 2003b).

O genoma murino (Corson et al., 2004) mostrou que neste organismo o gene da fibrilina-3 é parcial e não funcional. Segundo os autores, é provável que a fibrilina-3 tenha sido interrompida e inativada devido a rearranjos cromossômicos e eventos de recombinação durante a evolução do camundongo.

O cDNA da fibrilina-1, em camundongos, foi isolado e caracterizado estando o gene localizado na banda F do cromossomo 2 (Li, X, et al., 1993; Yin, W, et al., 1995). Este estudo demonstrou que a fibrilina-1 humana e de camundongo apresentam 90% de homologia, uniformemente distribuída por todas as regiões estruturais da proteína. Baseado neste alto grau de conservação entre as duas proteínas pode-se esperar que mutações que perturbem a função da glicoproteína humana tenham o mesmo efeito na fibrilina-1 de camundongo. Esta

hipótese constitui a base para os experimentos de mutagênese no gene *Fbn1* em camundongos.

1.7. Modelos animais

Os modelos animais, principalmente os camundongos, vêm sendo utilizados como uma importante ferramenta no estudo de diversas doenças genéticas humanas como a fibrose cística, Alzheimer, leucemia, diabete, câncer e hipertensão, dentre tantas outras patologias.

Atualmente, dois tipos de modelos murinos vêm se destacando no campo da pesquisa biológica dentre os quais temos os mutantes e os *knockouts*. Embora ambos sejam importantes, os alvos na pesquisa são distintos. Enquanto os camundongos mutantes são mais eficientes na identificação de genes envolvidos com um fenótipo em particular, os animais *knockout* permitem determinar mais rapidamente a função dos genes. Atualmente, mais de 3000 linhagens de camundongos *knockout* encontram-se disponíveis comercialmente (<http://www.jax.org>).

A geração de animais mutantes é relativamente simples e consiste basicamente na exposição dos animais a agentes mutagênicos como o N-etil-N-nitrosourea (ENU) ou radiação ultravioleta (UV). Já os animais *knockout* que vem sendo produzidos desde a década de oitenta derivam de uma tecnologia mais complexa, na qual existem quatro aspectos básicos a serem considerados: a introdução, integração, expressão e transmissão da alteração gênica.

A introdução da seqüência gênica de interesse pode ser feita por meio de diferentes tecnologias dentre as quais a microinjeção, eletroporação, lipofecção, bombardeamento e infecção por retrovírus. A integração da seqüência ocorre na região alvo do genoma por meio da recombinação homóloga. Caso esta não ocorra, a seqüência introduzida pode ser perdida com o decorrer das divisões celulares resultando em um animal selvagem ou em um mosaico, caso apenas algumas células do animal continuem a reter a seqüência. A expressão da

seqüência alvo pode ocorrer de forma constitutiva ou tecido-específica de acordo com o promotor ao qual ela esteja submetida. A seleção das células que contem a seqüência de interesse é feita por meio de genes marcadores como o *neo* que confere resistência à neomicina. A transmissão do gene de interesse para as ninhadas subseqüentes, via linhagem germinativa, permite a geração de linhagens de modelo animais. Estas linhagens são cruzadas até serem estabelecidas como isogênicas (Maclean, 1994).

Os trabalhos que visam a geração de modelos animais murinos, sejam *knockouts* ou mutantes, tomam como base a ciência denominada de biologia do desenvolvimento.

1.7.1. Desenvolvimento do Camundongo

O desenvolvimento do camundongo inicia-se após a fertilização na qual o espermatozóide penetra na zona pelúcida e posteriormente na membrana externa do oócito, induzindo a ativação da segunda meiose e conseqüente expulsão do corpúsculo polar. Após a fertilização, os pronúcleos masculino e feminino, ambos haplóides, presentes no zigoto replicam seus cromossomos os quais irão se combinar durante a primeira divisão mitótica. Posteriormente ocorrem sucessivas divisões mitóticas até ser atingida a fase de mórula três dias após a fertilização. No quarto dia de desenvolvimento, aumentam-se os espaços intercelulares, criando-se uma cavidade central, denominada blastocelo. Neste estágio, o embrião ainda envolto pela zona pelúcida, passa a chamar-se blastocisto (Alberts et al., 1994).

O blastocisto é composto por duas linhagens celulares distintas: o trofoectoderma (trofoblasto) e massa celular interna (epiblasto) de onde derivam as células tronco embrionárias. O trofoectoderma corresponde às células externas do blastocisto, que envolvem a blastocelo e a massa celular interna. A massa celular interna que se mantêm agrupadas em um dos pólos do blastocisto (Figura8).

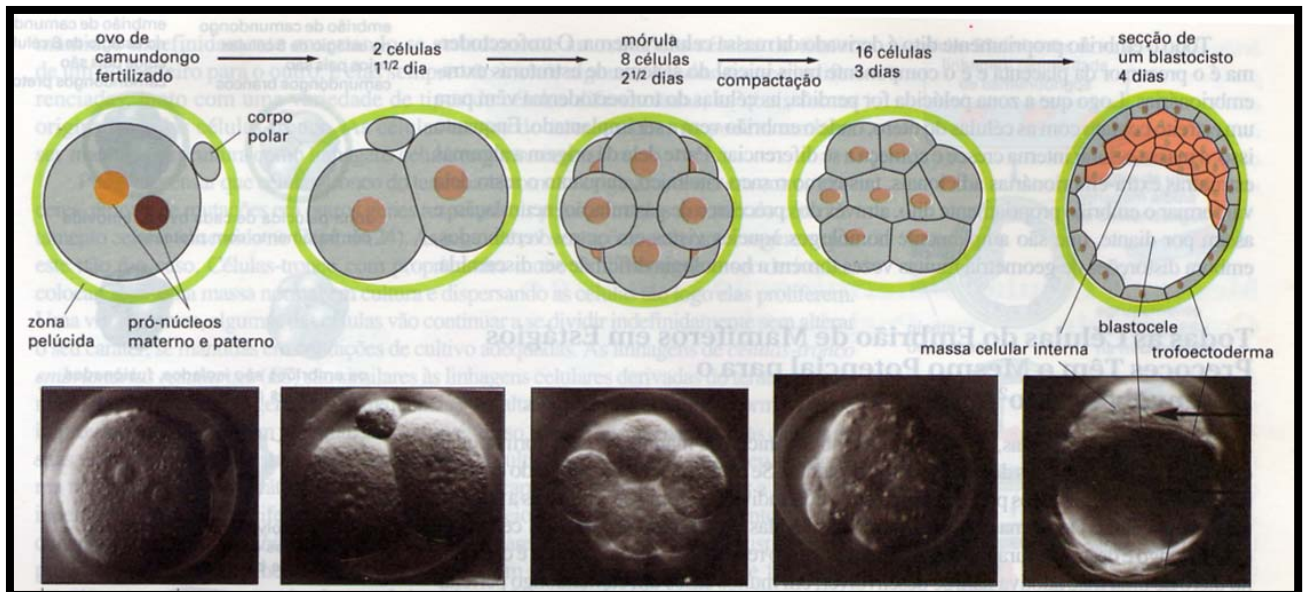


Figura 8. Desenvolvimento embrionário. Estágios do desenvolvimento de camundongos iniciando-se na fase de zigoto até a formação do blastocisto (Alberts et al., 1994).

As células do epiblasto irão formar o embrião propriamente dito e os tecidos embrionários (âmnio, saco vitelínico visceral, córion e placenta). Já as células do trofoblasto darão origem exclusivamente aos tecidos extra-embrionários: córions, placenta e saco vitelínico parietal (Figura 9) (Hogan et al., 1994).

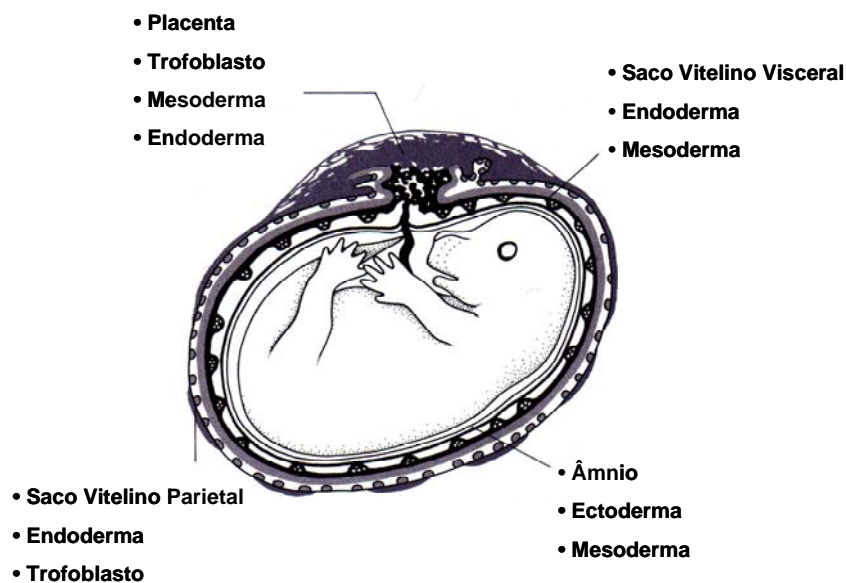


Figura 9. Células do trofoblasto. Membranas extra embrionárias e a placenta do embrião de 13.5 dias. (Hogan et al., 1994)

Por volta do quinto dia após a fertilização, a zona pelúcida é rompida, dando início ao processo de implantação do embrião na parede do útero. Nesse momento, inicia-se um processo que envolve uma série de mudanças estruturais o qual é denominado de gastrulação. Primeiramente, ocorre o desaparecimento da cavidade blastocística e o surgimento de uma nova cavidade interna do embrião, o arquêntero. As células embrionárias passam a formar três camadas distintas denominadas de ectoderma, mesoderma e endoderma. Estas camadas, denominadas de folhetos embrionários, darão início, durante os próximos 13-14 dias correspondentes ao final da gestação, a formação dos tecidos e órgãos que constituem o corpo do embrião. O ectoderma que recobre o embrião externamente dará origem à epiderme, ao sistema nervoso e aos órgãos dos sentidos. A partir do endoderma, camada celular que reveste o arquêntero, se formará o tubo digestivo, o fígado, o pâncreas e os pulmões. O mesoderma, camada que fica entre o ectoderma e o endoderma, dará origem a derme, aos ossos, às cartilagens, aos músculos esquelético e liso, ao sistema excretor, ao sistema circulatório e ao sistema reprodutor (Hogan et al., 1994).

1.7.2. Geração dos animais modificados geneticamente

Os primeiros experimentos de transformação em camundongos foram realizados por Roudolf Jaenisch e Beatrice Muniz, injetando DNA viral do SV40 (Simian Vírus 40) purificado na cavidade blastocística do blastocisto de camundongo obtendo animais contendo seqüência do DNA viral (Jaenisch e Muniz, 1974). Mais tarde, o pesquisador Roudolf Jaenisch em 1976, descobriu que camundongos adultos infectados nas fases iniciais de implantação com o M-MuLV (Moloney Murine Leukaemia Vírus), podiam transmitir integralmente a seqüência viral através de sua linhagem germinativa (Jaenisch, 1976).

No final da década de 70, Karl Illmensee e Stevens obtiveram animais quiméricos após cultivarem células de teratocarcinoma (Illmensee e Stevens, 1979). Eles injetaram uma

destas células em um embrião de camundongo no estágio de blastocisto, depositando-a na cavidade uterina de uma fêmea receptora onde se desenvolveu. Uma outra célula de teratocarcinoma foi implantada subcutaneamente em outro camundongo, aonde veio ocorrer o desenvolvimento de um tumor. Tal fato representava um meio pelo qual se podia introduzir gerar animais quiméricos que poderiam ter o gene exógeno em sua linhagem germinativa e conseqüentemente propagá-la (Illmensee et al., 1978). Entretanto, o fato das células de teratocarcinoma apresentarem uma baixa taxa de contribuição para a linhagem germinativa e de serem geralmente aneuplóides, apresentando diferentes rearranjos cromossômicos como a perda do cromossomo Y, translocações Robertsonianas, trissomias dentre outros, fazia com que elas não fossem apropriadas para experimento visando a obtenção de animais quiméricos.

No ano de 1980 foi introduzida pela primeira vez uma seqüência de DNA no pronúcleo masculino de um zigoto por meio da técnica de microinjeção (Gordon et al., 1980). O zigoto foi capaz de gerar um animal adulto que apresentou a capacidade de transmitir o “novo material genético” aos seus descendentes via linhagem germinativa. Uma limitação desta técnica foi o fato do DNA exógeno ser integrado ao acaso em um ou mais sítios, ou seja, o fragmento não é introduzido em uma região específica, mas sim aleatoriamente (Gordon et al. 1980). Desta forma, a seqüência exógena poderá não estar sob o controle de todos os elementos em cis que controlam a expressão do gene endógeno. Assim, a expressão temporal e espacial do transgene poderá não seguir o padrão de expressão do gene endógeno. Além disto, a introdução de um terceiro alelo cria uma situação artificial no que diz respeito à proporção entre os transcritos normais e mutantes. Esta proporção pode ser crítica em doenças suscetíveis a efeitos de dosagem gênica.

Mais recentemente, a combinação do cultivo de linhagens de células tronco embrionárias (células ES), derivadas da massa celular interna de blastocistos de camundongo

(Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981), e da recombinação homóloga resultou na criação de um método alternativo para modificar o genoma do camundongo.

A obtenção das células ES é uma das descobertas mais importantes ocorridas no decorrer do século passado, tanto no campo da Biologia do desenvolvimento como no da Biotecnologia Animal moderna, pois estas vêm mostrando ser de grande valor tanto para a pesquisa básica como para a aplicada (Solter and Gearhart, 1999; Vogel, 1999a; Vogel, 1999b; Alper, 1999). Estas células, derivadas do botão embrionário de blastocistos, têm como característica fundamental sua extraordinária capacidade de serem mantidas em cultura por tempo indeterminado sem que ocorra a perda de sua pluripotência. Para tal, elas são cultivadas sobre uma camada de fibroblastos, que tem sua atividade mitótica inibida pela ação da mitomicina-C ou radiação UV. A camada de fibroblastos propicia tanto os fatores nutricionais como os que possibilitam a inibição da diferenciação das células ES.

Além dos fatores liberados pelos fibroblastos, existem outras substâncias que inibem a diferenciação celular das células ES tais como DIA (differentiating inhibitory activity), o LIF (leukaemia inhibitory factor) e o HILDA (human interleukin for DA cells).

As células ES quando implantadas em blastocistos de camundongo retornam ao seu desenvolvimento normal contribuindo para a formação de todos os tecidos do organismo, incluindo a linhagem germinativa, quando combinadas com embriões pré-implantados para a formação de quimeras. É conhecido que as células ES são capazes de se diferenciarem espontaneamente e gerar várias linhagens *in vitro* sobre condições específicas podendo, desta forma, estimar o seu potencial de desenvolvimento em cultura por meio dos corpos embrióides.

Devido a estas características, quando injetadas em blastocistos de camundongos, as células ES são capazes de popular todos os tecidos do feto de forma a gerar quimeras e posteriormente uma linhagem específica do modelo murino de interesse (Bradley et al., 1984).

Tendo como base o extraordinário potencial das células ES, surgiu a possibilidade de introduzir ou deletar um gene de interesse por meio de recombinação homóloga (Figura 10). Para tal, é introduzido nas células ES um vetor de recombinação homóloga contendo a seqüência alvo a qual será inserida no genoma da célula ES de forma a produzir a mutação de interesse.

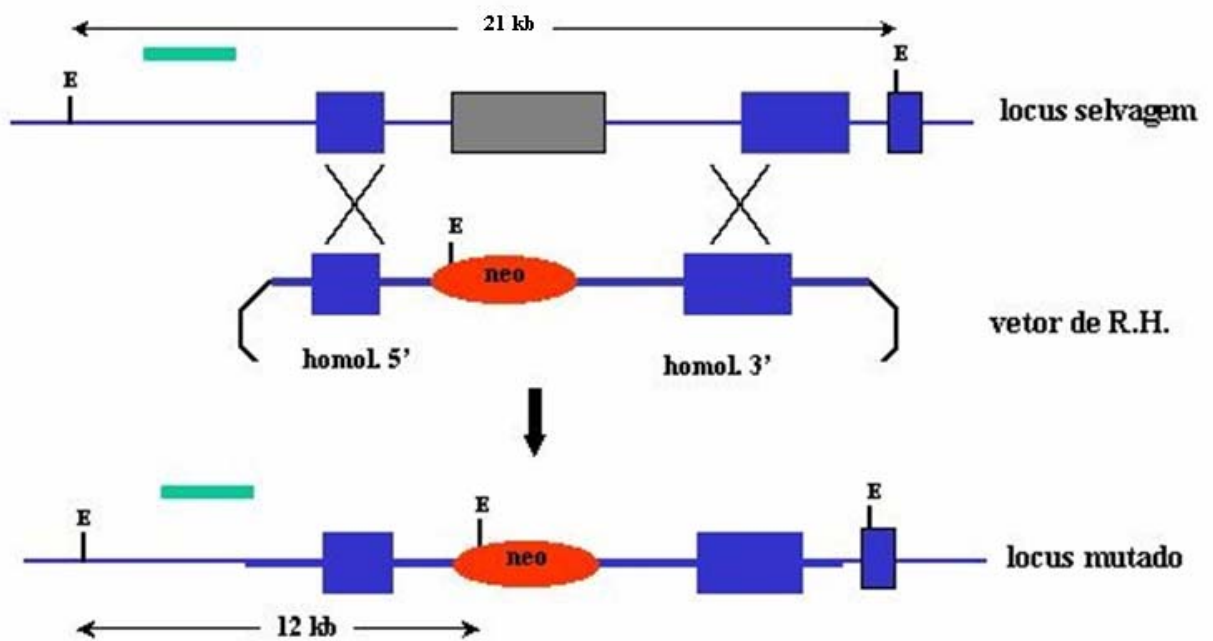


Figura 10. Recombinação homóloga. Exons estão representados por retângulos, íntrons por linhas azuis. O vetor de recombinação homóloga possui duas regiões de homologia ao gene alvo (homol. 5' e 3'). O pareamento dessas regiões com as regiões homólogas do locus endógeno permite que duas recombinações recíprocas levem à substituição de um exon (cinza) pelo cassete *neo*. A detecção do evento de recombinação homóloga é feita por Southern blot de DNA genômico das colônias de células ES. Uma sonda externa à região de homologia (barra verde) é utilizada em DNA digerido com a enzima de restrição EcoRI (E). A substituição do exon por *neo* introduz um sítio de EcoRI no locus, gerando uma banda menor referente ao alelo mutado.

Em 1987, foi demonstrado pela primeira vez que as alterações resultantes da introdução da seqüência exógena pode ser direcionada para um sítio específico por meio de um vetor de substituição de seqüências homólogas ao gene alvo (Thomas et al., 1987). A primeira transmissão via linhagem germinativa de uma mutação em células ES obtida via recombinação homóloga foi descrita em 1989 (Thompson et al., 1989; Capecchi, 1989a; Capecchi, 1989b).

A tecnologia para a geração de modelos murinos via células ES pode significar um aumento na eficiência na geração destes animais. Tal fato se deve a incrível capacidade das células ES se proliferarem *in vitro* fornecendo um enorme suprimento de células capazes de sofrer recombinação homóloga. A possibilidade de se selecionar, apenas os clones de células ES que obtiveram a correta integração e eventual expressão do gene exógeno, demonstra o poder desta tecnologia (Wheeler et al., 1995).

A introdução do vetor de recombinação homóloga contendo o gene de seleção, normalmente o cassete neo, em células ES é feito normalmente via eletroporação. Após seleção do clone positivo e sua identificação via técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e Southern blot, eles são introduzidos em blastocisto de uma fêmea receptora de pelagem distinta às das fêmeas que forneceram as células ES contendo o gene exógeno. As quimeras geradas são identificadas primeiramente pela cor dos olhos dos recém nascidos e posteriormente pela sua pelagem. A quimera é testada quanto a sua capacidade de ter populado a linhagem germinativa com as células ES transformada de forma a estabelecer a linhagem contendo o gene exógeno (Figura 11).

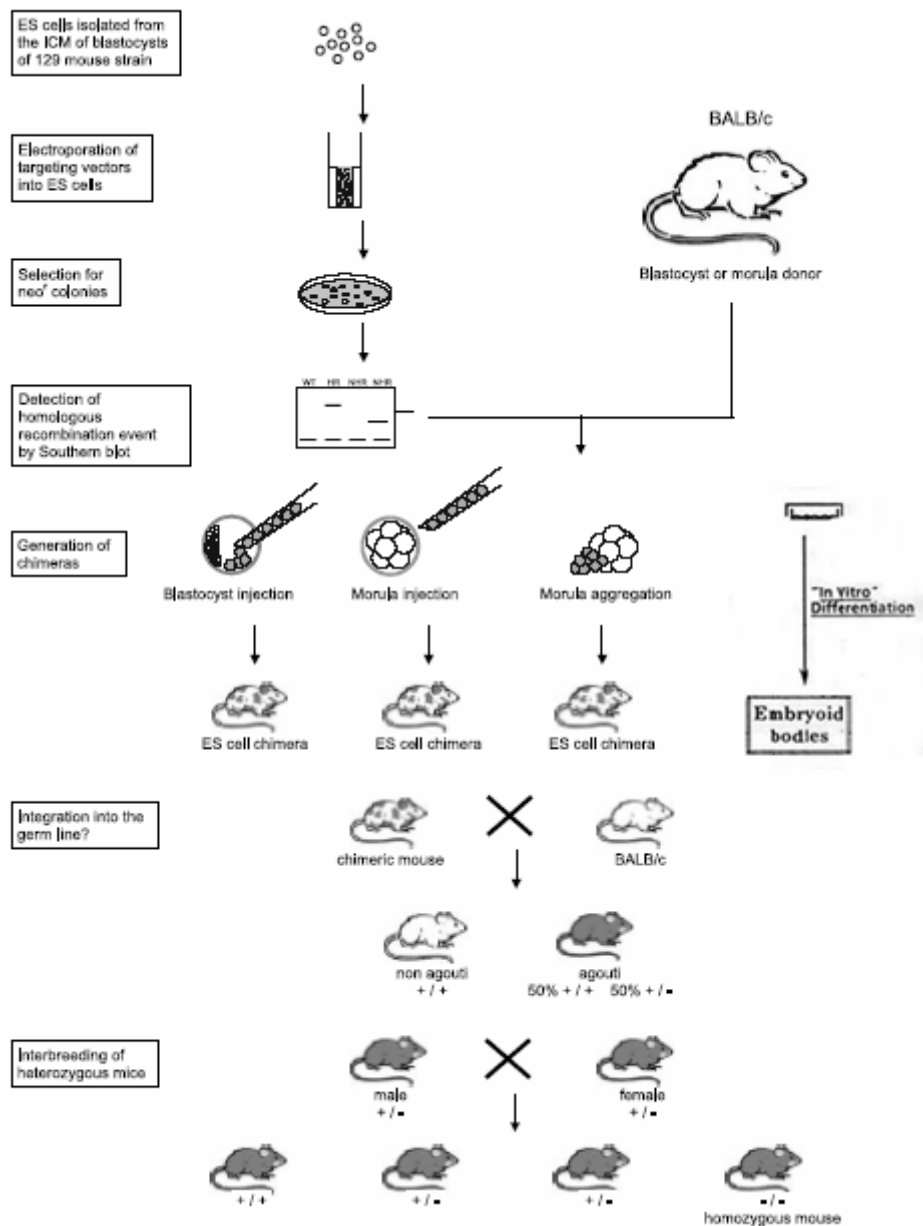


Figura 11. Geração de uma linhagem de camundongos contendo a alteração de interesse. O transfetado nas células ES por meio de eletroporação com posterior seleção e identificação das colônias positivas para a alteração desejada. As células ES podem ser então investigadas, *in vitro*, por meio dos corpos embriões, ou *in vivo*, ao serem introduzidas no blastocisto por meio de injeção ou agregação com os blastômeros da mórula visando a geração de animais quiméricos. Estes serão cruzados de forma a estabelecerem uma linhagem de camundongos contendo a alteração desejada (retirado de Prelle et al., 2002).

Outro tipo de vetor desenvolvido mais recentemente utiliza-se do sistema de recombinação em bactérias Cre-loxP (Sauer e Henderson, 1988; Chambers, 1994). Neste microorganismo, duas seqüências específicas de 34 pb, denominadas loxP (5'- ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA T - 3'), são reconhecidas pela proteína Cre de 38 kDa, do bacteriófago P1. A seqüência loxP se caracteriza pela presença de 13 bases invertidas em suas extremidades separadas por uma região de oito pares de bases. A proteína Cre se liga a esta seqüência interna promovendo a sua clivagem permitindo a remoção da seqüência de DNA inserida entre as seqüências loxP, ou seja, sua deleção (Hoess et al., 1985) (Figura 12).

O sistema Cre-loxP pode ser usado junto com a recombinação homóloga para a criação de mutações no genoma do camundongo sem que para tal ocorra a inclusão permanente de um gene de resistência ao fator de seleção, como por exemplo, o gene *neo* (Chambers, 1994). Neste caso o vetor de recombinação contém uma fusão do gene *neo* flanqueado diretamente por duas seqüências loxP e esta, por sua vez, flanqueada por seqüências homólogas ao gene alvo. Após a recombinação homóloga, a proteína Cre pode ser transientemente expressa nas células embrionárias recombinantes, causando um segundo evento de recombinação. Este causará a deleção do gene *neo*, tornando as células suscetíveis à droga G418.

A grande vantagem deste sistema é que com ele, o gene *neo* não fica inserido no gene alvo. A presença do gene *neo* em íntrons do gene alvo, pode atrapalhar o seu correto processo de splicing, diminuir o nível de expressão do alelo mutado ou de genes na sua proximidade. Este tipo de efeito já foi descrito no gene *Fbn1* (Pereira et al., 1997; Pereira et al., 1999), sendo que atualmente existem diversos modelos animais resultantes desta nova tecnologia (<http://www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm>; <http://www.emma.rm.cnr.it>; <http://www.jax.org>).

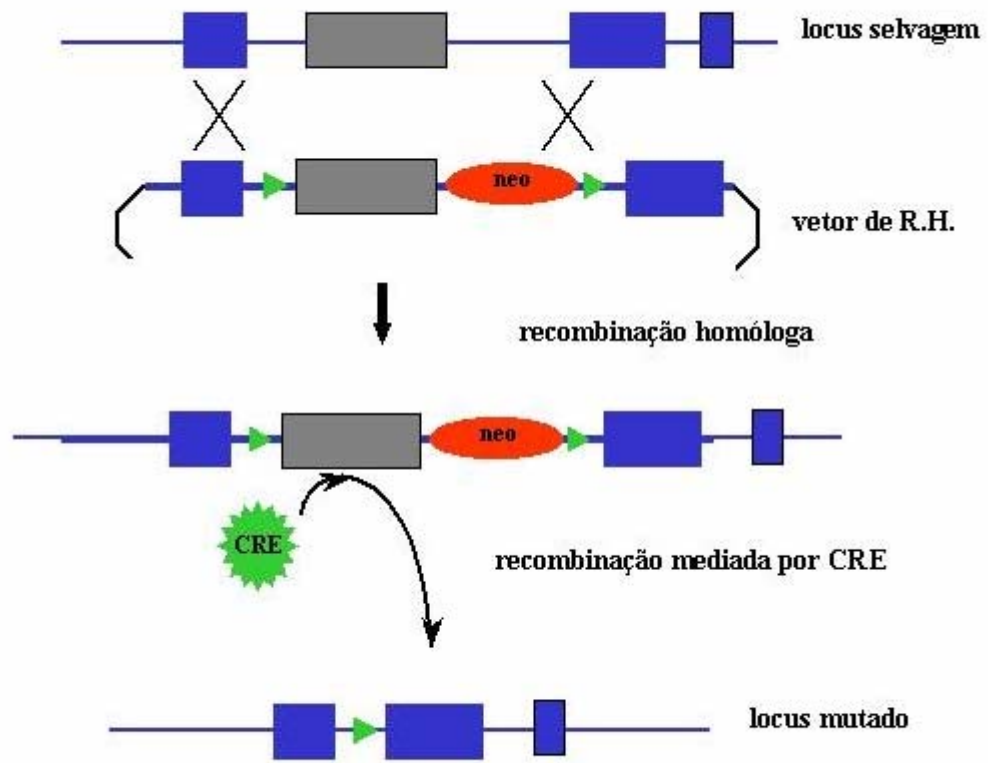


Figura 12. Sistema de recombinação Cre-loxP. Sequências loxP estão representadas por triângulos verdes. O primeiro evento de recombinação homóloga introduz os sítios loxP nas extremidades do exon a ser deletado. Em um segundo evento, a expressão da proteína Cre irá mediar a recombinação entre os dois sítios loxP, deletando a sequência entre eles. A expressão de Cre pode ser controlada de forma que induza a recombinação somente em tecidos ou estágios de desenvolvimento específicos do camundongo.

Esta abordagem vem permitindo uma ampla interligação entre a manipulação do genoma de mamíferos *in vitro* e a análise da expressão de genes realizada *in vivo*. A propriedade singular das células ES permite mantê-las como uma população celular estável *in vitro* e gerar modelos animais, para o estudo da função dos genes *in vivo* e sua regulação gênica durante o processo do desenvolvimento de mamíferos (Gossler et al., 1986; Kelly et al., 1995; Tajbakhsh et al., 1996).

1.8. Modelos animais para a SMF

Três modelos murinos para a SMF, denominados *Tsk*, *mgΔ* e *mgR* vêm contribuindo significativamente para a nossa compreensão da patogênese (Green et al, 1975; Pereira et al., 1997; Pereira et al., 1999). O modelo *mgΔ* se caracteriza pela substituição dos exons 19 a 24 do gene da fibrilina-1 pelo cassete de expressão *neo*. O modelo quando em heterozigose, se apresenta assintomático e morfológicamente normal ao passo que, quando em homozigose, o animal morre no primeiro mês após o seu nascimento em função de complicações cardiovasculares em decorrência da ausência da expressão de fibrilina-1 normal. O modelo animal *mgΔ* demonstrou que a falta da glicoproteína fibrilina-1 normal é compatível com o desenvolvimento embrionário, porém, não com a vida pós-nascimento (Pereira et al., 1997) (Figura 13).

O modelo *mgR* tem como característica a inserção do cassete *neo* entre os exon 18 a 19. Semelhante ao modelo *mgΔ*, quando em heterozigose o animal se apresenta assintomático e morfológicamente normal. Porém, quando em homozigose, o animal desenvolve deformidades ósseas, vindo a morrer eventualmente na fase adulta, de quatro a oito meses, devido a deficiências respiratórias e complicações cardiovasculares (Pereira et al., 1999) (Figura 13).

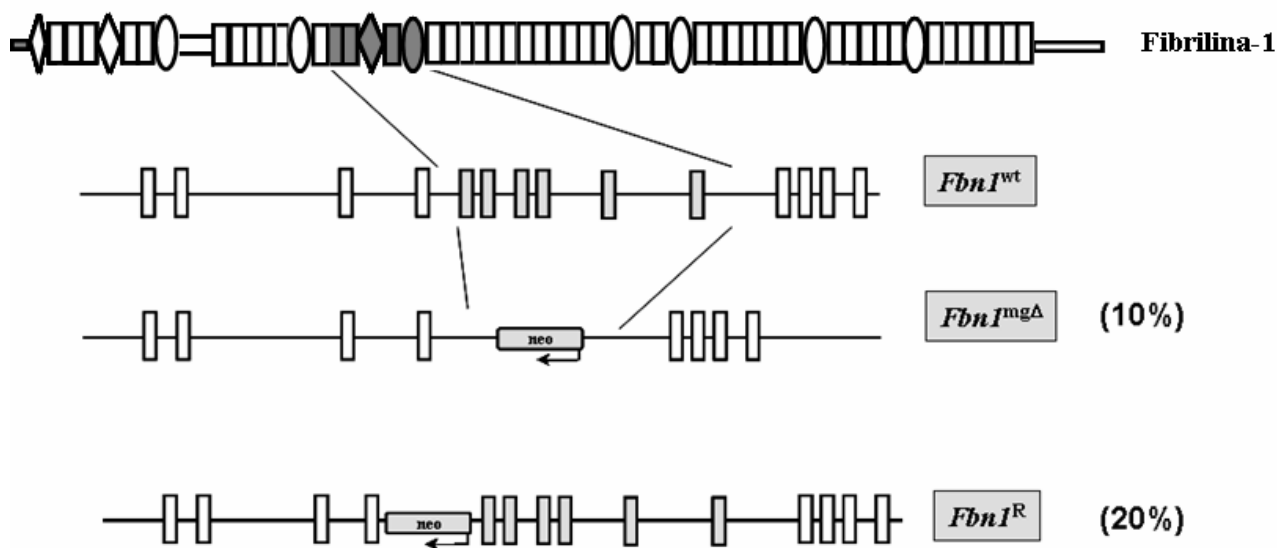


Figura 13. Mutações no gene *Fbn1* geradas por recombinação homóloga em células ES. A proteína fibrilina está esquematizada. Exons 17 a 28 do gene selvagem (*Fbn1*^{wt}) estão representados. Regiões em cinza correspondem àquelas modificadas nos alelos mutantes. O alelo mgΔ consiste na substituição dos exons 18 a 24 pelo cassete de expressão neo, o que leva à produção em baixa quantidade de monômeros de fibrilina com uma deleção interna (Pereira et al., 1997). O alelo mgR é uma inserção desse cassete no íntron 18 do gene *Fbn1*, resultando na baixa expressão de fibrilina normal (Pereira et al., 1999).

O modelo *Tsk*, diferente do modelo mgΔ, caracteriza-se pela duplicação da região dos exons 19 a 24. Tal alteração resulta na produção de uma da fibrilina-1 mutada contendo 984 aminoácidos a mais, gerando uma glicoproteína de 418 kD. O animal *Tsk* quando em heterozigose apresenta um aumento na produção de tecido ósseo, enfisema pulmonar e um aumento do tecido conjuntivo. Diferente dos modelos anteriores, este animal não apresenta complicações cardiovasculares características da SMF. Quando em homozigose o modelo *Tsk*, morre ainda na fase embrionária, mais especificamente no estágio de pré-implantação (Gayraud et al., 2000).

Apesar do primeiro modelo murino ter sido obtido em 1997, o primeiro modelo animal para a SMF foi identificado em 1990 por Besse e colaboradores (Besser et al., 1990). Trata-se

de um modelo bovino que apresenta todas as manifestações características da SMF em humanos como curvatura na região espinhal, pernas compridas e finas, dilatação da aorta e defeitos na válvula mitral além de miopia e *ectopia lentis* (Figura 13). O animal veio a morrer jovem devido a ruptura da aorta e da artéria pulmonar. Análises de cultura de fibroblastos e células do músculo da aorta demonstraram uma menor presença de fibrilina na matriz extracelular em comparação com os animais normais. O gene *Fbn1* bovino foi mapeado no cromossomo 10 sendo a primeira mutação situada na região cbEGF descrita recentemente o que valida estes animais como modelos para o estudo da SMF (Singleton et al., 2005).

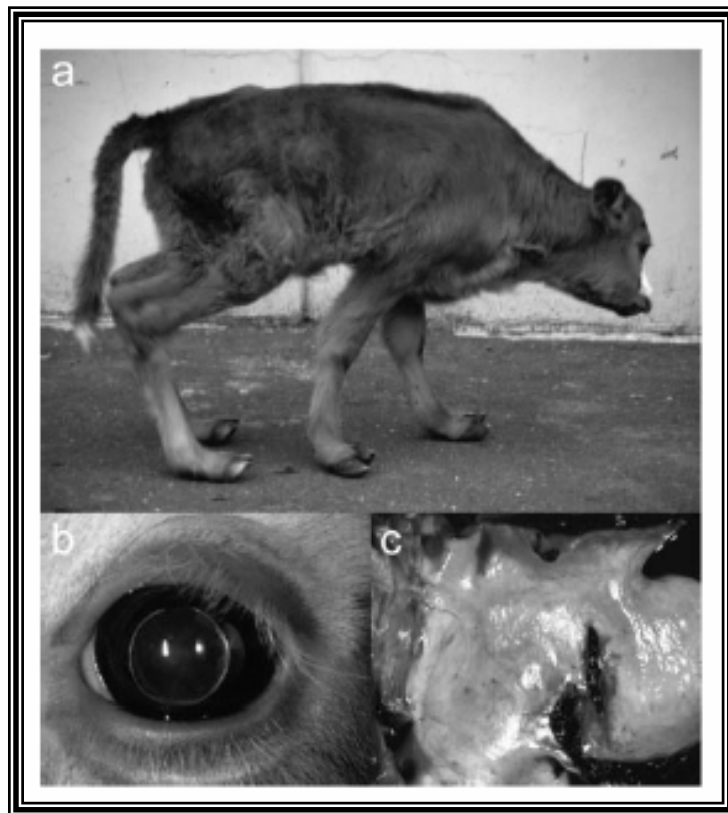


Figura 14. Modelo bovino para a SMF. Apresenta alterações **a.ósseas**, **b.oculares** e **c.cardiovasculares** características da SMF (Besser et al., 1990).

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa estabelecer um camundongo transgênico como um modelo animal para o estudo da SMF. As patologias associadas com esta síndrome nos permitirão examinar o papel das microfibras e das fibras elásticas no desenvolvimento e manutenção da integridade de pelo menos três sistemas: cardiovascular, ósseo e ocular nos animais mutantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Gerar camundongos *knockout* contendo um alelo dominante-negativo do gene *Fbn1* por recombinação homóloga em células ES.
2. Estabelecer as linhagens co-isogênicas C57BL/6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ e 129/Sv $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$
3. Retirar a seqüência neo *in vitro* por meio da expressão transiente de Cre nas células recombinantes.
4. Testar a expressão dos alelos mutados antes e depois da recombinação mediada por Cre [neo(+)] e neo(-)] *in vitro*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vetor $mg\Delta^{loxPneo}$

O vetor $mg\Delta$ foi utilizado na geração dos modelos murinos para a SMF denominados $mg\Delta$ e mgR (Pereira et al., 1997; Pereira et al., 1999), e utilizado pela Profa. Lygia V. Pereira para a construção do vetor $mg\Delta^{loxPneo}$. Este contém duas seqüências loxP, em ambas as extremidades do cassete *neo* para, por meio da ação da proteína Cre, ser possível retirar esse cassete presente entre os exons 18 e 25 no alelo *Fbn1* recombinante (Figura 15).

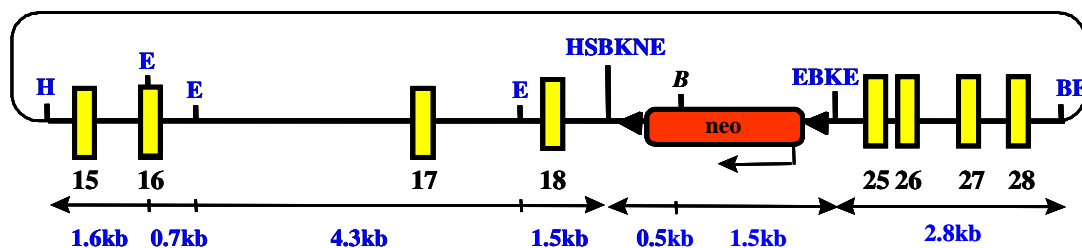


Figura 15: Vetor de recombinação $mg\Delta^{loxPneo}$. Exons representados por retângulos em amarelo. Sítios de restrição: E (EcoRI); H (HindIII); K (KpnI); N (NotI); S (Sall); B (BamHI). As Setas indicam a direção de transcrição do gene *neo*. Triângulo em preto, indica as extremidades loxP que flanqueiam o cassete *neo*.

3.2. Cultivo de células ES - recombinação homóloga

Foi utilizada, neste experimento, a linhagem de células ES de camundongo USP1, originárias do epiblasto de blastocisto de camundongo da sublinhagem 129/Sv com pelagem agouti (Sukoyan et al., 2002). Esta linhagem, estabelecida em nosso laboratório, possui um cariótipo de 38 cromossomos autossômicos e os cromossomos sexuais X e Y. A pluripotencialidade da linhagem USP1 foi testada, *in vitro*, por meio da técnica de atividade da fosfatase alcalina (Talbot et al., 1993) e formação de corpos embrióides. A capacidade de diferenciação das células USP1 foi avaliada *in vivo* através da geração de quimeras que possuíam em sua linhagem germinativa as células derivadas da linhagem USP1 (Sukoyan et al., 2002).

3.2.1. Obtenção de fibroblastos embrionários de camundongo

Fibroblastos primários de embriões de camundongo, necessários para formação de camada nutritiva para células ES, foram obtidos de embriões de 12-13 dias pós-coito de acordo com o protocolo descrito por Hogan (Hogan et al., 1994). Os fibroblastos embrionários provieram de camundongos transgênicos para o gene *neo* que desta forma podem ser utilizados tanto em cultivo com meio comum quanto com o meio seletivo com G418. Estes fibroblastos foram inativados por meio da ação de raios γ (5000Rad), durante o período de 45 min, estando desta forma, prontos para serem utilizado como camada nutritiva no cultivo de células ES. As células, em meio MEF, foram armazenadas em ampolas de criopreservação nas concentrações celulares desejadas e congeladas a -70°C e transferidas para o nitrogênio líquido após 24 horas.

3.2.2. Cultivo de Células ES

As células ES foram cultivadas de acordo com o protocolo de Hogan (Hogan et al., 1994). As células cresceram sobre uma camada de fibroblastos embrionários inativados (Figura 16), em meio ES sendo cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em alta umidade. Não deixamos as células ES superarem mais de 80% de confluência, executando repiques a cada 2-3 dias por meio da ação de Tripsina 0,25% com EDTA-4Na a 0,02% utilizada para dissociação das células.

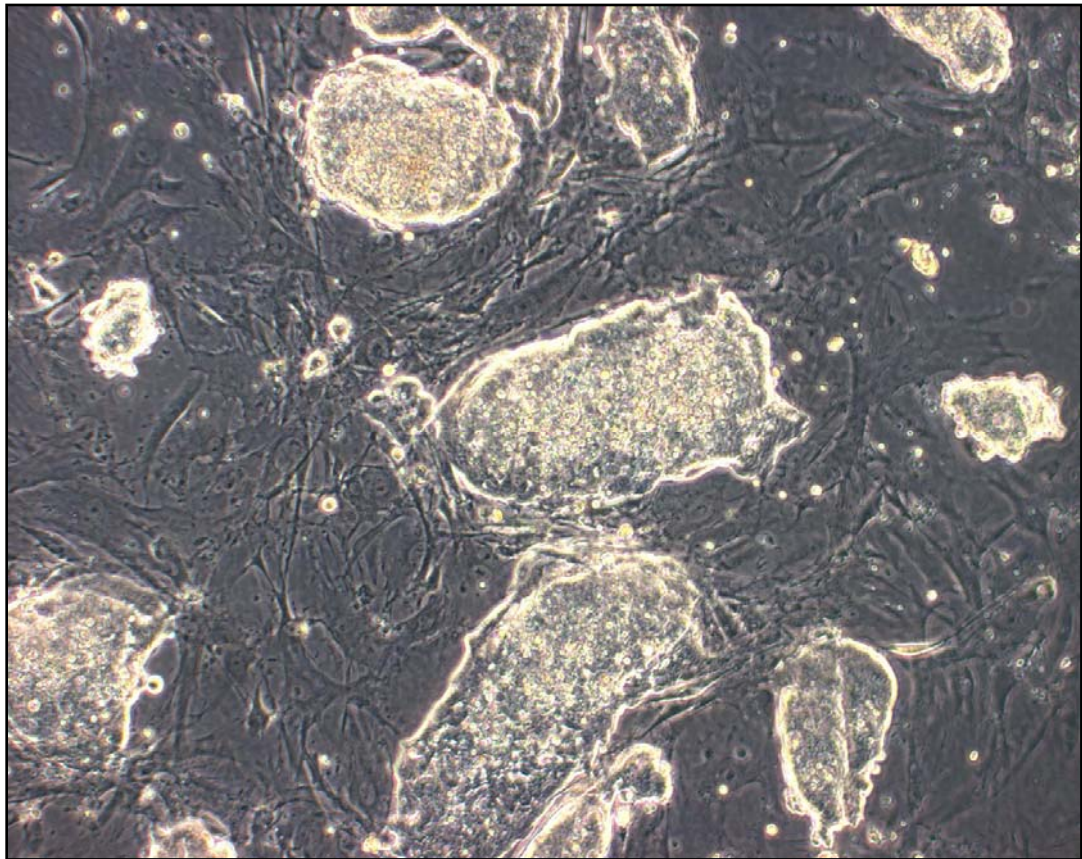


Figura 16. Células embrionárias tronco. As células ES crescendo sobre uma camada de fibroblastos embrionários inativados por meio de irradiação γ . (200X)

3.2.3. Eletroporação

O vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$ foi purificado por meio da utilização o kit de midi-prep segundo protocolo do fabricante (QIAfilter™ Midi Cartridges – Qiagen) e 20 μ g foram linearizadas com 45 U de XhoI, dando origem a um fragmento de 17 kb. O DNA digerido foi precipitado com 0.3 M de NaCl e dois volumes de etanol 96%, lavado em etanol 70%, centrifugado a 15300 x g 25°C por 5 minutos e ressuspenso em 20 μ l de água estéril em uma concentração final de 1 μ g/ μ l.

As células USP1, cultivadas em uma garrafa de 25 cm², foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7.2 e retiradas de pela ação da tripsina 0,25% com EDTA-4Na a 0,02%, quando atingiram uma confluência de 80%. A garrafa foi mantida por 10 minutos a 37°C com 5% de CO₂ em alta umidade e a tripsina inativada adicionando 3 ml de meio, contendo soro fetal bovino, previamente reservado. As células foram ressuspenso vigorosamente com pipeta e transferidas para um tubo Falcon de 15ml que foi centrifugado a 200 x g por 5 min a 21°C. Uma alíquota do homogeneizado foi aplicada na câmara de Newbauer de forma a determinar o número de células USP1 presentes no cultivo. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células USP1 foi ressuspenso em um volume de PBS de forma a se obter uma concentração de 10-20 milhões de células/ml. 0.8 ml da solução foi transferida para uma cubeta de eletroporação (gene Pulser Cuvette, 0.4 cm eletrodo – Bio-Rad) à qual foi adicionada 20 μ g da construção de DNA linearizada. A amostra foi homogeneizada e mantida por 5 min a 25°C. As células USP1, em presença do vetor $mg\Delta^{loxP}$ linearizado, foram submetidas a um pulso de 230 volts/500 μ F (Gene Pulser II – Bio-Rad) e transferidas para o gelo onde foram mantidas por 10 min. A amostra foi, em seguida, diluída em 10 ml de meio ES e distribuída entre 10 placas de 100 mm², cobertas com uma camada de fibroblastos embrionários inativos *neo* resistentes e contendo 9 ml de meio ES, de forma a cada placa conter de 1.5 a 2 milhões de células USP1. Vinte e quatro horas após eletroporação as células

foram postas em meio seletivo contendo 350ug/ml de G418. O meio seletivo foi trocado diariamente por 7 a 9 dias.

3.2.4. Coleta de colônias

Aproximadamente 8 dias após o início da seleção, colônias de células ES sobreviventes foram isoladas e expandidas em placas de 96 poços. Os poços foram previamente cobertos com uma camada de fibroblastos embrionários irradiados *neo*-resistentes em presença de 110 µl meio ES contendo 350ug/ml de G418. Preparou-se uma nova placa de 96 poços contendo 30 µl de tripsina 0,25% e 0,02% EDTA-4Na. As 10 placas de 100 mm² contendo os clones de células USP1 *neo*-resistentes foram lavadas 2 vezes com PBS sendo posteriormente adicionado 6 ml de DMEM puro. As colônias foram retiradas mecanicamente com micropipeta em um volume de aproximadamente 7 µl e transferidas para a placa de 96 poços contendo 30 µl de tripsina 0,25% e 0,02% EDTA-4Na. As colônias foram incubadas por 10 min a 37°C com 5% de CO₂ em alta umidade sendo em seguida adicionado 60 µl meio ES a cada um dos 96 poços o qual foi aspirando e soltando 40 vezes de forma a homogeneizar cada uma das colônias. As amostras, após serem cultivadas até a sub-confluência, foram divididas em duas placas de 96 poços previamente preparadas com uma camada de fibroblasto, como descrito anteriormente, resultando em um volume de 140 µl em cada poço. Uma das placas foi congelada em meio ES acrescido de 15% de SFB e 10% de DMSO a -70°C e outra utilizada na obtenção de DNA para análise de recombinação homóloga por Southern-blot.

3.2.5. Extração do DNA dos clones e identificação dos clones positivos (Southern blot)

O meio presente nos 96 poços foi descartado e a placa lavada 2 vezes com PBS com posterior adição de 50 µl de tampão de lise. A placa foi mantida 14 – 16 horas a 60°C em forno úmido e em seguida centrifugadas 200 x g por 1 min a 22°C. Adicionou-se 100 µl de etanol 100% mantendo a placa a 25°C por 30 min. Após este período, o etanol 100% foi descartado, a placa lavada por 2 vezes com etanol 70% e seca a 37°C.

O DNA foi ressuspenso em 35 µl de solução de digestão contendo 20 U de HindIII e 1x tampão da enzima (Amersham) As amostras foram separadas em gel de agarose 0.8% (técnica descrita no tópico 3.5.3.1.). O gel de agarose foi tratado com 0.1 HCl por 10 min, 1.5 M NaCl e 0.5 M NaOH por 1 hora e 1.5 M NaCl e 0.5 M Tris-HCl pH 7.0. O DNA foi transferido do gel para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺ - Amersham) por capilaridade em 10 x SSC durante 14 a 16 horas (Sambrook, 1989). O DNA foi fixado a membrana por raios ultra violeta de acordo com as instruções do fabricante (UV Stratalinker 1800 – Stratagene). Em seguida a membrana foi lavada em uma solução contendo 2 x SSC e 0.1% SDS e colocada em uma solução de pré-hibridização (50% formamida; 5X SSC; 1 x Denhardt's; 0.05 M Na₃HPO₄; 1% sds; 5% Dextran; 100 µg/ml SS-DNA) a 42°C por no mínimo 1 hora.

Aproximadamente 25 ng de DNA (sonda) em 20 µl de H₂O foi fervido por 5 min e transferido imediatamente para o gelo. A solução foi acrescentado os componentes do Kit de marcação Random Primers DNA Labelling System (Gibco BRL)(2 µl de dATP, 2 µl dGTP, 2 µl dTTP, 15 µl de tampão de iniciador randômico, 5 µl de (γ-³²P)dCTP marcado radioativamente e 1 µl de fragmento Klenow para um volume final de 50 µl de reação). A amostra foi mantida a 25°C por 3 horas adicionando-se em seguida 50 µl de TEN sendo o volume final passado em uma coluna de malha de vidro e sefadex-G50, por meio de centrifugação a 1200 x g a 25°C por 2 min.

A sonda marcada foi fervida em banho seco por 5 min e adicionada a solução de pré-hibridização que se encontrava em contato com a membrana. A hibridização foi feita a 42°C durante 14 a 16 horas. Após este período a membrana foi lavada em uma solução 2 x SSC e 0.1% SDS por 15 min a 65°C, 1 x SSC e 0.1% SDS por 15 min a 65°C, 0.5 x SSC e 0.1% SDS por 15 min a 65°C e 0.1 x SSC e 0.1% SDS por 15 min a 65°C. Após a última lavagem, a membrana foi exposta a um filme de raio-X e mantida a -70°C durante 72 horas. Em seguida o filme foi revelado em uma câmara escura utilizando-se revelador 25% (Kodak; MXG/PLUS) por 3 min e fixador 25% (Kodak; MXG/PLUS) por 5 min.

3.3. Produção de camundongos *knockout*

3.3.1. Preparo das células ES

O método de obtenção de quimeras se baseia na agregação de células ES geneticamente modificadas contendo a construção gênica de interesse, com os blastômeros que constituem o embrião nos estágios iniciais do desenvolvimento (a partir do embrião de oito células até o estágio de mórula compacta) (Nagy, A. et al., 1993; Khillan and Bao, 1997; Goto, Y and Takagi, N. 1998; Orimo et al., 1999). As células USP1/19 foram cultivadas em uma garrafa de 25 cm² contendo uma camada de fibroblastos embrionários inativados *neo*-resistentes e meio ES. Ao atingir uma confluência de 80%, a cultura foi lavada duas vezes com PBS pH 7.2 sendo posteriormente exposta à ação da Tripsina de 0,25% com EDTA-4Na de 0,02% por dez minutos de forma a dissociar as células. Após este intervalo de tempo, foi acrescido 3 ml de meio de cultivo a garrafa, de forma a inativar a tripsina por meio da ação do sistema complemento. A amostra foi homogeneizada e centrifugada por cinco minutos a 201 x g 21°C. O sobrenadante foi descartado sendo adicionado 2 a 3 ml de meio M16 ao precipitado que foi ressuspenso e incubado por 15 min a 37°C e 5% de CO₂ em alta umidade.

Desta forma, as células ES estão prontas para serem agregadas aos blastômeros derivados de mórulas (Sukoyan MA. et al., 2002).

3.3.2. Preparo de fêmeas

As fêmeas da linhagem CD-1, utilizadas nos experimentos de agregação, foram mantidas em biotério sob condições de luz e temperatura controladas. As fêmeas foram superovuladas por meio de tratamento hormonal. Para tal, aplicou-se 5 UI do hormônio ECG seguido de 5 UI do hormônio HCG após 44 horas. As fêmeas doadoras foram cruzadas com machos normais, enquanto que as receptoras foram cruzadas com machos vazectomizados. O tratamento hormonal nas fêmeas receptoras ter sido feito com um dia de atraso em relação às fêmeas doadoras (Hogan et al., 1994; Sukoyan MA. et al., 2002).

3.3.3. Agregação

Embriões no estágio de mórula foram obtidos por meio de lavagem do oviduto, via infundíbulo, com o meio M2 dois dias e meio após o cruzamento. As mórulas foram tratadas com ácido Tirode (9.6 g/L, Sigma, St. Louis MO, USA) por 1 min a 1 min e 30 seg ou até a remoção completa da zona pelúcida. Após a retirada da zona pelúcida, os embriões foram transferidos para meio M16 de forma a inativar a ação do ácido tirode, e deste para placas de 96 poços com fundo V em presença de meio M16. Aproximadamente 20 a 30 células USP1/19 foram depositadas em cada um dos 96 poços em presença de blastômeros derivados das mórulas. As placas foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade durante 24 horas.

Durante a agregação, as células ES aderem-se à superfície do embrião recipiente ocorrendo gradualmente a sua introdução no interior do agregado (mórula) de forma a gerar blastocistos quiméricos.

Após este período, as mórulas que se desenvolveram até o estágio de blastocisto, foram transferidas para as fêmeas CD-1 pseudográvidas (5 a 6 blastocistos por trompa uterina) de forma a gerarem fetos quiméricos (Hogan et al., 1994).

A contribuição das células USP1/19 na geração de animais quiméricos foi avaliada pela cor dos olhos (os animais aguti apresentam olhos escuros enquanto os animais CD-1 apresentam olhos claros) e da pelagem devido as quimeras apresentam manchas escuras derivadas das células USP1/19 agouti (Figura 17).

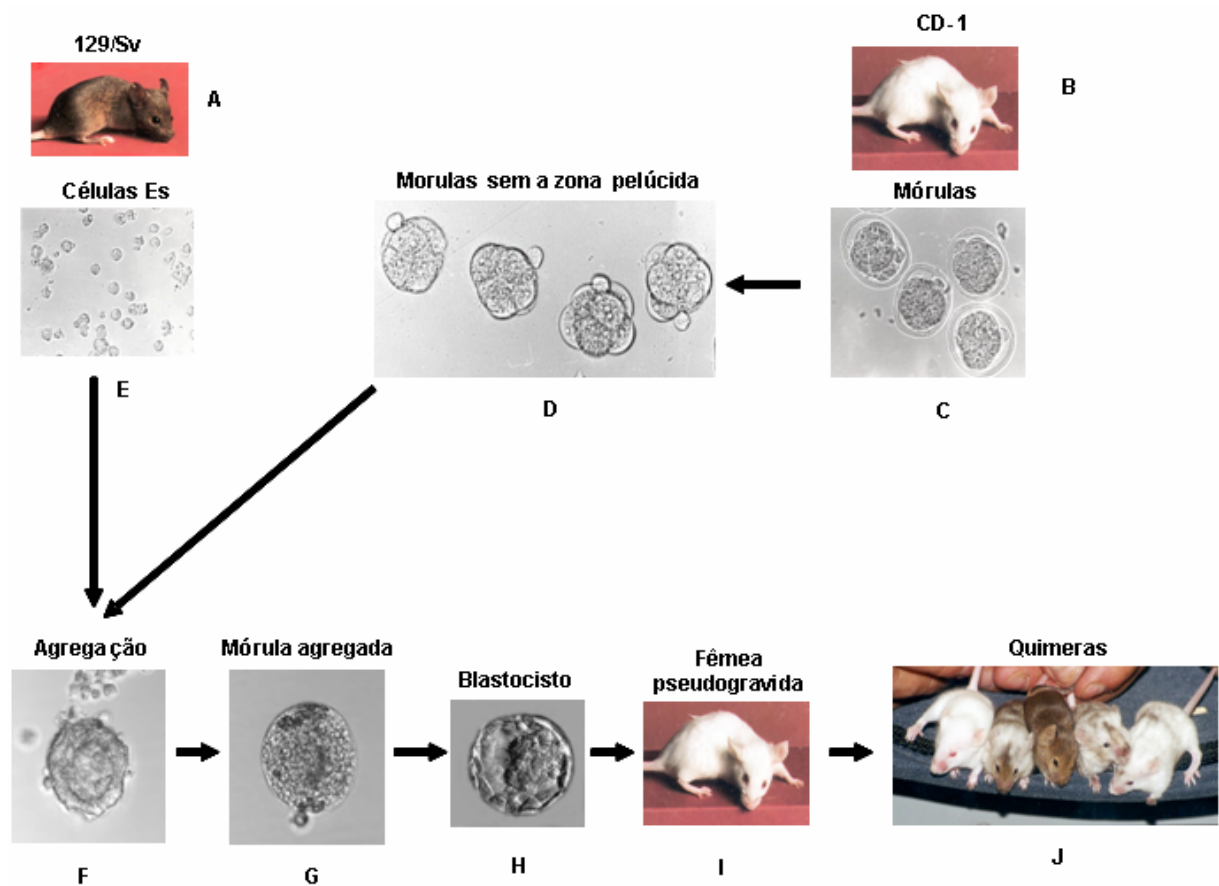


Figura 17. Geração de quimeras via agregação. A. Camundongo 129/Sv, pelagem aguti, que fornece as células ES; B. Camundongo CD-1 tratado com hormônios, do qual obtemos as mórulas; C. Mórulas obtidas do animal CD-1 por meio da lavagem do oviduto; D. Mórulas que tiveram sua zona pelúcida digerida pela ação da solução ácida tirode; E. Células ES que sofreram recombinação homologa; F e G. Processo de agregação das células ES com os blastômeros da mórula; H. Blastocisto obtido após 24 horas; I. Fêmea pseudográvida para a qual são transferidos os blastocistos obtidos após a agregação; J. Animais gerados com diversos graus de quimerismo.

3.3.4. Análise dos camundongos *knockout*

Os animais quiméricos foram cruzados com fêmeas CD-1 de forma a testar a sua capacidade de transmitir o alelo *Fbn1*^{mgAloxneo} por meio da linhagem germinativa (Figura 18). A prole de pelagem aguti demonstra que a linhagem germinativa das quimeras é derivada das células USP1/19. Os animais obtidos foram devidamente marcados tendo o seu DNA extraído a partir de um fragmento da cauda de acordo com o protocolo descrito por Sambrook (Sambrook, J.al. 1989). A genotipagem foi feita por PCR como descrito no tópico 3.7.



Figura 18. Linhagem germinativa populada pelas células ES. Linhagem de células USP1/19 modificadas geneticamente via recombinação homóloga foram transmitidas via linhagem germinativa.

3.4. Análise do processamento do mRNA do alelo *Fbn1*^{mgΔloxPneo}

3.4.1. Obtenção do RNA

Uma quimera fêmea foi sacrificada sendo feita uma biópsia da região da pele que apresentava coloração aguti. O tecido foi colocado em meio MEF acrescido de 50µg/ml de estreptomicina e 50U/ml de penicilina. Os fibroblastos estabelecidos foram selecionados em meio MEF contendo 350 µg/ml de G418, deixando as células atingirem 100% de confluência (Figura 19).



Figura 19. Biópsia do tecido de coloração aguti da quimera. O tecido foi cultivado de forma a selecionar, por meio da utilização de G418, apenas as células *neo*-resistentes as quais contém o cassete neo em um de seus alelos em substituição aos exons 19 a 24.

O cultivo foi lavado duas vezes com PBS pH 7.2, sendo as células expostas a Tripsina de 0,25% com EDTA-4Na de 0,02% por 10 minutos a 37°C com 5% de CO₂ em alta umidade de forma a dissociá-las. Após este intervalo de tempo, foi acrescido meio de cultivo a garrafa de forma a inativar a tripsina por meio da ação do sistema complemento. O homogenizado foi centrifugado por cinco minutos a 200 x g sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em trizol (Gibico) e incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se clorofórmio na proporção de 0.2 ml de clorofórmio para 1 ml de trizol sendo a amostra homogeneizada por 15, segundos e em seguida centrifugado por 30 minutos a 12000 x g a 4°C. A fase superior foi transferida para outro tubo ao qual foi acrescido isopropanol na proporção de 0.5 ml de isopropanol para 1 ml de trizol. A solução foi

homogeneizada e incubada por dez minutos a temperatura ambiente sendo, logo a seguir, centrifugada por 10 minutos a 15300 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado sendo acrescido ao precipitado 1 ml de etanol 70% o qual foi homogeneizado e centrifugada por 5 minutos a 15300 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado sendo o precipitado, RNA total, ressuspenso em 50 µl de água DEPC (TRIzol Reagent – Invitrogen Life Technologies).

3.4.2. RT-PCR

A fita de DNA complementar (cDNA) ao RNA mensageiro foi sintetizada a partir de 720 ng/µl de RNA total isolado a partir dos fibroblastos extraídos da pelagem aguti da quimera. Para tal, o RNA total foi mantido a 65°C por 5 min em presença de 5ng/µl de iniciador randômico em um volume total de 10 µl, sendo posteriormente, mantido em gelo por 5 min. Ao produto da reação foi acrescido tampão de síntese de cDNA, 2U/µl de RNaseOUT, 5 mM de DTT, 1 mM de dNTP e 0.75 u/µl de ThermoScript™RT em um volume final de 20 µl (ThermoScript™RT-PCR System - Invitrogen). A reação foi mantida nas seguintes condições: (1 ciclo) 25°C x 10 min, 50°C x 50 min e 85°C x 5 min.

O cDNA foi amplificado pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) sendo as condições de amplificação determinadas para um volume final de 10 µl. A reação final era composta por 10 ng/µl de iniciadores, 1 µl de tampão de reação taq 10x (Amersham Pharmacia), 1.6 mM de dNTP, 1,25 u/µl da enzima taq polimerase (Amersham Pharmacia) e água até o volume final de 10 µl. A reação foi mantida nas seguintes condições: Etapa 1 (1 ciclo): 94°C x 2 min e 30 seg. Etapa 2 (30 ciclos): 94°C x 1 min; 55°C x 1 min; 72°C x 1 min. Etapa 3 (1 ciclo): 72°C x 7 min, 4°C x 10 min.

Os diferentes fragmentos gerados correspondentes aos alelos normal (*Fbn1*) e mutado (*Fbn1^{mg^{ΔloxP}}*), se devem a utilização de quatro diferentes pares de iniciadores:

16F: 5'- ACTGAGTATGCATTTGGGGA -3'

22R: 5'- CACCTGCACTTAAAGCTGCC -3'

16F: 5'- ACTGAGTATGCATTTGGGGA -3'

mf19:5'- TGCGCATAGGAGAGGATCTCT -3':

17F: 5'- CTAGATCCTGATATTTGCC -3'

22R: 5'- CACCTGCACTTAAAGCTGCC -3'

17F: 5'- CTAGATCCTGATATTTGCC -3'

mf19: 5'- TGCGCATAGGAGAGGATCTCT -3'.

3.4.3. Clonagem e Sequenciamento

3.4.3.1. Eletroforese de ácidos nucléicos em géis de agarose

Os produtos de RT-PCR, acrescidas de tampão de amostra 6x (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilenocianol FF, 30% glicerol em água), foram analisadas por eletroforese em gel (10 x 15 cm) de agarose 0.8%, contendo 0.5 µg/ml de Brometo de Etídeo e tampão TAE 1x (89 mM Tris-HCl, pH 8.0/ 0.89 mM Ácido Acético, pH 8.0/ 3mM EDTA, pH 8.0), aplicando uma voltagem constante de 100 V durante 20 min, e visualizados sob luz UV.

3.4.3.2. Purificação do DNA

Os produtos de RT-PCR correspondentes aos alelos selvagem (*Fbn1*) e mutante (*Fbn1^{mgAloxP}*) foram recortados do gel de agarose 0.8% e purificados utilizando o Kit Concert Gel Extraction Systems (Gibico BRL) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.3.3. Reação de ligação intermolecular: Clonagem

Os produtos purificados, *Fbn1* (25 ng/μl) e *Fbn1^{mgAloxP}* (20 ng/μl), foram clonados no vetor pGEM-T Easy de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Foi acrescentado em ambas as extremidades dos insertos, uma adenina de forma a permitir a ligação ao vetor que contém uma timina livre em ambas as extremidades. Para tal, utilizou-se na reação 5 u de taq DNA polimerase, 0.2 mM de adenina, tampão de reação com MgCl₂ e 100 ng de DNA para um volume final de 10 μl sendo mantida a 70°C por 30 min. A reação de ligação foi efetuada em um volume de 11 μl onde utilizou-se 4 μl do produto de PCR, contendo adenina em suas extremidades, 1 μl do vetor pGEM-T Easy (50 ng/μl), 1 μl de T4 ligase (3 u/μl) e 5 μl de tampão de ligação T4 DNA ligase (2x) sendo a reação mantida por 14 – 16 horas a 4°C (pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems – Promega).

3.4.3.4. Transformação de células competentes

As células competentes DH5α, foram descongeladas sob gelo por 10 min e acrescidas de 10 μl da reação de ligação. As células foram mantidas sob gelo durante 10 min e transferidas sequencialmente a 37°C por 1 min e 30 seg. Posteriormente foram mantidas no gelo por 2 min sendo 500 μl de meio SOC adicionados à reação de transformação a qual foi mantida a 37°C durante o período de 1 hora. As células foram cultivadas em alta e baixa densidade celular, sob placas de agar LB contendo ampicilina (100 mg/ml) a 37°C por 14 –

16 horas (Sambrook, 1989). Foram estabelecidos cultivos de 5 ml em LB/Ampicilina (100 mg/ml) a partir de diferentes colônias selecionadas contendo o plasmídeo de interesse.

3.4.3.5. Extração de DNA plasmidial

A cultura de bactérias foi distribuída em tubos de polipropileno de 1.5 ml para microcentrifugação. As amostras foram centrifugadas por 1 min 15300 x g 25°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 210 µl de tampão de lise STET sendo acrescido a reação 15 µl de lisozima (10 mg/ml). As amostras foram homogeneizadas e mantidas em água fervendo por 50 seg sendo posteriormente centrifugadas a 15300 x g 25°C por 8 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 1.5 ml para microcentrifugação ao qual foi adicionado 100 µl de NH₄Ac 7.4 M e 300 µl de isopropanol (100%). As amostras foram novamente homogeneizadas e mantidas a 25°C por 10 min e centrifugadas a 15300 x g 25°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi acrescido de 250 µl de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 15300 x g 25°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento de ácidos nucléicos secado a 25°C. O precipitado foi ressuspense em 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0/ 1 mM EDTA, pH 8.0) contendo 20 µg/ml de RNase, incubado a 25°C.

3.4.3.6. Digestão de DNA com enzima de restrição

A digestão dos plasmídeos pGEM-T Eazy/wt e pGEM-T Eazy/mgΔ^{loxP} foram efetuadas por meio da ação da enzima Not I (1u/µg DNA) sítio específica em presença de seu tampão fornecido pelo fabricante (Amersham Pharmacia).

3.4.3.7. Reação de sequenciamento

As amostras, plasmídeos pGEM-T Eazy/wt(209 ng/μl) e pGEM-T Eazy/mgΔ^{loxP} (212 ng/μl), foram utilizadas como moldes no sequenciamento. A reação de sequenciamento foi constituída de 10 pmoles do iniciador T7, 4 μl de Big Dye (ABI PRISM BigDye terminator V 3.0 Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystems) e 2 μl de cada amostra em um volume final de 10 μl sendo as seguintes condições utilizadas: Etapa 1 (40 ciclos): 96°C x 10 seg; 55°C x 20 seg; 60°C x 4 min. Etapa 2 (1 ciclo): 4°C x 10 min. Adicionou-se ao produto da reação 40 μl de isopropanol 75% agitando em vórtex para posteriormente manter durante 20 min no escuro. As amostras foram centrifugadas por 25 min a 15700 x g a 25°C e o sobrenadante descartado adicionando em seguida 200 μl de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 21910 x g a 25°C, o sobrenadante descartado e as amostras secas no escuro a 25°C por aproximadamente 1 hora. Em seguida, adicionou-se às amostras 10 μl de Hi-Di formamida (ABI PRISM – Applied Biosystems) que foram posteriormente desnaturadas a 94°C por 4 min e transferidas para o gelo. Por fim, as amostras foram introduzidas no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystem – Hitashi) de forma a obtermos as sequências.

3.5. Introdução do alelo mutado nas linhagens isogênica C57BL/6 e 129/Sv

Um camundongo macho CD-1, heterozigoto para o gene mgΔ^{loxPneo}, foi cruzado com fêmeas 129/Sv e C57BL/6 tendo como objetivo a transferência desta alteração gênica para estas linhagens isogênicas. Os animais gerados foram genotipados sendo os heterozigotos cruzados novamente com animais selvagens de suas respectivas linhagens (retrocruzamento). Este ciclo foi repetido objetivando o estabelecimento de linhagens congênitas 129/SV *Fbn1*mgΔ^{loxPneo} e C57BL/6 *Fbn1*mgΔ^{loxPneo} após 8 gerações.

3.6. Genotipagem dos animais

Animais com 3 semanas de vida foram genotipados através da técnica de PCR. Cada animal, devidamente identificado através de marcação de orelha, teve um fragmento de aproximadamente 1 cm, correspondendo à extremidade distal da cauda, cortado. O fragmento foi colocado em tubo polipropileno de 1,5ml contendo 0,5 ml de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 5 mM EDTA; 0.2% SDS; 200 mM NaCl) (Sambrook, J. et al., 1989). Imediatamente após a adição de 2,5 µl de proteinase K (20mg/ml) o tubo foi colocado em banho maria a 55°C durante aproximadamente 12hrs.

Em seguida, o tubo foi centrifugado a 960 x g por 10 min e o sobrenadante contendo o DNA transferido para um novo tubo polipropileno de 1,5ml. A precipitação do DNA foi feita através da adição e mistura de 500 µl de isopropanol ao sobrenadante. O tubo foi centrifugado novamente a 15300 x g por 5 min, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 200 µl de TE. O DNA genômico dissolvido foi dosado através do espectrofotômetro sendo 0,4µl (~200 ng) utilizado nas reações de PCR.

Duas reações de PCR foram montadas para cada amostra de DNA genômico. A primeira utilizando os iniciadores NeoF e NeoR (433bp; Tm 57°C) [amplificam o cassete neo do alelo mutado *Fbn1*^{neoloxp}]; e a segunda usando os iniciadores 22F e CC-R (600pb; Tm 55°C) [amplificam os exons 21 a 22]

Neo sentido: 5' -GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT - 3'

Neo anti-sentido: 5' - CTC TTC GTC CAG ATC ATC CT - 3'

20F: 5' - AAA CCA TCA AGG GCA CTT GC - 3'

CC-R: 5' - CAC ATT GCG TGC CTT TAA TTC - 3'

As reações de PCR foram montadas adicionando-se 10 ng/ μ l de iniciadores, 1 μ l de tampão de reação taq 10x (Amersham Pharmacia), 1.6 mM de dNTP, 1,25 u/ μ l da enzima taq polimerase (Amersham Pharmacia) e água para um volume final de 10 μ l. Já as condições de amplificação variaram de acordo com os pares de iniciadores utilizados.

Quando utilizamos os iniciadores Neo sentido e Neo anti-sentido, seguimos as seguintes especificações: Etapa 1 (1 ciclo): 94°C x 2 min e 30 seg. Etapa 2 (30 ciclos): 94°C x 30 seg; 57°C x 1 min; 72°C x 1 min. Etapa 3 (1 ciclo): 72°C x 7 min, 4°C x 10 min.

Ao utilizarmos os iniciadores 22F e CC-R, seguimos as seguintes especificações: Etapa 1 (1 ciclo): 94°C x 2 min e 30 seg. Etapa 2 (30 ciclos): 94°C x 1 min; 55°C x 1 min; 72°C x 1 min. Etapa 3 (1 ciclo): 72°C x 7 min, 4°C x 10 min.

3.7. Raio X

Os animais foram anestesiados com 8.5% de Xilazina (Laboratórios Calier S.A., Les Franqueses Del Valles – Barcelona/Espanha), 8.5% de Ketamina (Parke-Davis) diluído em solução fisiológica. Os animais tiveram suas patas distendidas sendo expostos a 4.0 Kv de raio-x durante o período de 3.0 Ms (Tecno-Design – 500Ma/ 125 Kv).

3.8. Análise do fenótipo

Os animais foram classificados com base no fenótipo apresentado. Fenótipo muito grave, detectado com duas semanas de vida, menor tamanho, dificuldade de locomoção, acentuado desvio na coluna (escoliose), prolongamento das patas traseiras e constante tremedeira, vindo a morrer após três meses de vida; o fenótipo grave, expresso oito meses após o nascimento, apresenta uma escoliose menos acentuada em relação ao fenótipo muito grave, sem qualquer dificuldade de locomoção ou de gerar descendentes. Embora o tamanho seja equivalente ao do animal selvagem com o passar dos meses, ocorre um agravamento no

quadro de escoliose, uma relativa dificuldade em se locomover além de tremerem constantemente. Neste momento, os animais não reproduzem mais; o fenótipo leve se caracteriza por apresentar uma leve escoliose após um ano de vida embora nenhuma outra característica como alteração de tamanho, prolongamento das patas, dificuldade de locomoção, tremedeira ou geração de descendentes tenha sido detectada.

3.9. PCR em tempo real

Para o estudo foram utilizados iniciadores (sense: 5'- ACA TAA CTG GGA AAA ACT GTG TCG ATA - 3'; antisense: 5'- TTC CAG GTG TGT TTC GAC ATT GT - 3') e uma sonda fluorescente (VIC TGT GCT GAA CAG TCT ACT MGBNFQ) para o alelo selvagem (90 pb); e outro par de iniciadores (sense: 5'- GGG ATA TGA AGT AGA CAT AAC TGG GAA A - 3'; antisense: 5'- GAG GCT GGG TAT CAT CTT GCA - 3') e sonda fluorescente (FAM ACT GTG TCG ATA TCA ATG MGBNQF) para o alelo $mg\Delta^{loxPneo}$ (124 pb). O desenvolvimento dos iniciadores e das sondas foi feito com o auxílio do programa Primer Express (Applied Biosystems) o qual permite a determinação prévia de todos os parâmetros necessários para a otimização da técnica da reação.

Para a extração do RNA das células em cultura utilizou-se o Rneasy mini kit de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen Tnc, Valencia, CA), sendo a amostra extraída e quantificada por espectrofotometria.

A amostra contendo o RNA total, acrescidas de tampão de amostra 6x (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilenocianol FF, 30% glicerol em água), foi corrida em gel de agarose 0.8% contendo 0.5 µg/ml de Brometo de Etídeo e tampão TAE, aplicando uma voltagem constante de 100 V durante 20 min de forma a testar a integridade o RNA total.

A síntese de cDNA complementar foi obtida a partir por meio do seguinte protocolo. Primeiro 250ng de oligo (dT) foram adicionados a 1 µg de RNA total, acrescidos de 10 mM

de *dNTP Mix* e aquecidos a 65°C durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado a reação 200 U da enzima *Superscript III reverse transcriptase* juntamente com 4 µl do tampão *First-Strand 5X*, 0,1 M de DTT e 40 U da enzima *Rnase Inhibitor I*. A amostra foi incubada a 50°C durante 30-60 minutos e posteriormente a 70°C durante 15 minutos para a inativação da reação (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR – Invitrogen).

O gene constitutivo GAPDH (GAPDH exon 6, sense (5' – CTGCACCACCAACTGCTTA - 3') e GAPDH exon 7, anti-sense (5' – CTAGACGGCAGGTCAGGTC - 3')) (sintetizados pela Invitrogen)) foi amplificado por meio da reação de PCR composta de 10 ng/µl de iniciadores, 1 µl de tampão de reação taq 10x (Amersham Pharmacia), 1.6 mM de dNTP, 1,25 u/µl da enzima taq polimerase (Amersham Pharmacia) e água até o volume final de 10 µl. Para a reação, foram utilizadas as seguintes especificações. Etapa 1 (1 ciclo): 94°C x 3 min. Etapa 2 (30 ciclos): 94°C x 45 seg; 55°C x 45 seg; 72°C x 1 min. Etapa 3 (1 ciclo): 72°C x 10 min, 4°C x 10 min. A amostra foi corrida em gel de agarose 0.8% de forma a testar a qualidade de nossas amostras após a reação de RT-PCR.

A reação de PCR foi feita e analisada no aparelho *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* conectado a um computador de forma a registrar os dados das amplificações. O aparelho foi ajustado e programado com as condições de PCR pré-estabelecidas: Etapa 1 (1 ciclo): 50°C x 2 min. Etapa 2 (1 ciclo): 95°C x 10 min. Etapa 3 (40 ciclos): 95°C x 15 seg; 60°C x 1 min. As amostras são preparadas para um volume total de 25 µl, contendo a amostra de cDNA a ser estudada (100 ng), os primers (3 mM), as sondas (2.5 mM) e o tampão de amostra do *kit TaqMan Universal PCR master mix* (Applied Biosystems). O transcrito do alelo selvagem do gene *Fbn1* foi utilizado como controle endógeno. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

Ao final das ampliações os resultados obtidos foram analisados no programa 7500 System Software. Os dados foram convertidos em gráficos, que permitem a comparação da expressão do mRNA do gene em estudo nas diferentes amostras.

3.10. Clones *Fbn1*^{CRE}

3.10.1 Obtenção de clones *Fbn1*^{CRE}

As células USP1/19 foram cultivadas em uma garrafa de 25 cm² sobre uma camada de fibroblastos embrionários inativados *neo*-resistentes, em presença de meio ES a 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade. Ao atingir uma confluência de 80%, a cultura foi lavada duas vezes com PBS pH 7.2 sendo posteriormente expostas a ação de 300 µl de Tripsina 0,25% com EDTA-4Na 0,02% por dez minutos a 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade. A tripsina foi inativada com o meio previamente reservado e as células ressuspensas vigorosamente com pipeta e transferidas para um tubo Falcon de 15ml que foi centrifugado 200 x g por 5 min a 21°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio ES, contendo 4 µM ou 8 µM da proteína Crê (doada por Dr. H. Earl Ruley), na concentração de 2.5 x 10⁶ células/ml. As amostras foram cultivadas sobre uma camada de fibroblastos embrionários irradiados, presentes em dois poços de uma placa de 24 poços, durante um período de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade. Após este intervalo de tempo, o meio foi descartado e os poços lavados com duas vezes com PBS pH 7.2 sendo posteriormente adicionado meio ES sem a presença da proteína Cre. Ao atingirem uma confluência de aproximadamente 80% as colônias tratadas com Cre, nas concentrações de 4 µM e 8 µM, foram tripsinizadas e replaqueadas em placas de 100 mm² (10 ml) contendo a camada de fibroblastos embrionários irradiados e uma placa de 35 mm² (2ml) em ausência da camada de fibroblastos embrionários inativados, as quais foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade.

3.10.2. Extração e digestão das amostras tratadas com Cre 4 μ M e 8 μ M

As placas de 35 mm² tiveram seu meio descartado após 2 dias de cultivo sendo posteriormente lavadas 2 vezes com 3 ml de PBS pH 7.2 com posterior adição de 2 ml de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% Sarcosil; 10 mM NaCl; 100 μ g/ml de proteinase K). As placas foram mantidas de 14 a 16 horas à 37°C e 5% de CO₂ em presença de alta umidade sendo posteriormente agitadas durante o período de 30 min a 25°C. Foi adicionado 2 ml de isopropanol as placas e estas mantidas em agitação por 3 horas. O DNA que se encontrava em suspensão, foi retirado com a ajuda de uma ponteira sendo transferido para um tubo de polipropileno de 1.5 ml sendo centrifugado a 201 x g / 22°C por 5 min. Adicionou-se às amostras 1 ml de etanol 70% homogeneizando-as e centrifugando por 5 min a 201 x g a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 25°C com posterior adição de 50 μ l de TE incubando as amostras a 50°C durante o período de 14 a 16 horas. O DNA extraído das amostras tratadas com Cre foi quantificado utilizando espectrofotômetro 4 μ M (1,10 μ g/ μ l) e 8 μ M (2.95 μ g/ μ l) sendo 10 μ g/ μ l de cada amostra digerida com 3.3 u// μ l da enzima de restrição BamHI. As digestões foram corridas em gel de agarose 0.8% e analisadas por Southern blot.

3.10.3. Subclones de *Fbn1*^{CRE}

As colônias de células *Fbn1*^{CRE} foram isoladas e expandidas em placas de 96 poços de acordo com o protocolo descrito no tópico 3.10.1. Após as células terem atingido aproximadamente 80% nos 96 poços o sobrenadante foi descartado e a placa lavada 2 vezes com PBS pH 7.2 com posterior adição de 30 μ l de tripsina 0,25% e 0,02% EDTA-4Na. sendo mantida por 10 min a 37°C com 5% de CO₂ em alta umidade. Após este período a placa foi retirada da estufa sendo adicionado 60 μ l meio ES completo a cada um dos 96 poços o qual foi aspirando e soltando 40 vezes de forma a homogeneizar cada uma das colônias.

As amostras foram divididas em duas placas de 96 poços contendo camada de fibroblasto, resultando em um volume de 140 µl em cada poço. Uma das placas continha 350ug/ml de G418 acrescido ao meio ES enquanto a outra não o tinha de forma a permitir a seleção negativa dos clones *Fbn1^{CRE}*. As colônias mortas em presença de G418 foram isoladas da outra placa e analisadas e por meio das técnicas de PCR e Southern blot de forma a confirmadas a perda do cassete neo.

3.11. Formação de corpos embrióides

As células ES foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7.2 e dissociadas pela ação da Tripsina de 0,25% com EDTA-4Na de 0,02% a 37°C, 5% de CO₂ em alta umidade durante 10 min. A tripsina foi inativada com o meio previamente reservado e as células ressuspensas vigorosamente com pipeta e transferidas para um Falcon de 15ml que foi centrifugado 201 x g por 5 min a 21°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 6 ml meio ES em ausência de LIF. Em seguida, 3 ml do homogeneizado foram distribuídos igualmente entre 3 placas coberta com agarose 0.6% constituindo um volume total de 10 ml. Os 3 ml restantes foram utilizados para a extração de RNA total segundo protocolo descrito anteriormente. As 3 placas foram mantidas na estufa a 37°C, 5% de CO₂ em alta umidade sendo o meio trocado a cada 2 dias. As células ES, já diferenciadas, tiveram o seu RNA total extraído nos dias 7, 11 e 19.

3.12. Análise citogenética

Foi adicionado ao cultivo celular 2 mg/ml de Brometo de Etídeo. Após 1 hora e 30 minutos foi adicionada Colchicina 4×10^{-7} mM a qual ágil durante 30 min. Após este período, as células foram lavada 2 vezes com PBS pH 7.2 e dissociadas pela ação da Tripsina de 0,25% com EDTA-4Na de 0,02% a 37°C, 5% de CO₂ em alta umidade durante 10 min. A

tripsina foi inativada com o meio previamente reservado e as células ressuspensas vigorosamente com pipeta e transferidas para um Falcon de 15ml que foi centrifugado 201 x g por 5 min a 21°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2 vezes com PBS pH 7.2 seguindo o processo descrito anteriormente. Adicionou-se ao precipitado 7 ml de KCl (0.075M) a temperatura de 36°C sendo a amostra mantida por 10 min a 25°C e posteriormente adicionado fixador gelado (metanol-ácido acético 3:1). O material foi homogeneizado e centrifugado a 201 x g por 5 min a 21°C sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em fixador gelado (0-4°C) por 10 minutos. O material foi novamente centrifugado a 201 x g por 5 min a 21°C sendo posteriormente ressuspense em 3 ml de fixador gelado. O material foi gotejado em lâminas molhadas por meio de pipeta Paster sendo posteriormente mantidas a 37°C durante 2 semanas. Após este período, as lâminas foram submersas em 2 x SSC durante 5 a 15 min de acordo com o envelhecimento da lâmina (quanto mais velha, menos tempo de exposição ao 2 x SSC). Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada corrente e secadas a 25°C. Após secarem, as lâminas foram submersas em tripsina 0.025% durante 15 seg a 1 min e 30 seg sendo posteriormente submersas em etanol 70%. Em seguida as lâminas foram expostas à ação do corante Giemsa 2% diluído em tampão fosfato pH 6.8 durante o período de 3 min. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água destilada corrente, secas a 25°C e analisadas ao microscópio óptico.

3.13. Histologia

As amostras foram retiradas do camundongo após este sofrer o processo de perfusão e submetidas as técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, as amostras foram expostas a quatro tipos de coloração: HE, Verhoeff, Reticulina e Picro-Sirius.

3.13.1. Hematoxilina-Eosina

Após a remoção da parafina, as amostras foram expostas à ação da Hematoxilina durante 5 min sendo mantidas posteriormente em água corrente durante 1 min. As amostras foram lavadas rapidamente em álcool ácido (500 ml de álcool 70% para 2.5 ml de HCl) sendo posteriormente lavadas em água corrente durante o período de 15 min. Em seguida, o material foi exposto a Eosina durante 1 min e lavado rapidamente em álcool 95% para serem posteriormente desidratados, diafanizados e montados.

3.14. Necrópsia e exame histopatológico

Camundongos heterozigotos portadores ou não do fenótipo e camundongos selvagens, que vieram a óbito ou foram sacrificados, foram necropsiados. As alterações macroscópicas foram descritas. Fragmentos representativos dos seguintes órgãos ou estruturas foram colhidos: globos oculares, pulmões, coração, artéria aorta, fígado, além da coluna vertebral e membro anterior para o exame dos ossos. Os fragmentos foram fixados em formol a 10%, e rotineiramente processados para inclusão em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram corados com H&E e examinados em microscópio de luz (Nikon E-800). As imagens foram digitalizadas com o auxílio de câmera Nikon Cool-Pix e sistema de análise de imagens Image-Pro-Plus.

IV. RESULTADOS

4.1. Recombinação homóloga em células ES

O vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$ foi introduzido, por meio de eletroporação, nas células USP1 de forma a ocorrer a substituição dos exon 19 a 24 da *Fbn1* pelo cassete *neo* flanqueado pelas seqüências loxP. Foram obtidos 363 clones resistentes à neomicina os quais tiveram seu DNA extraído e digeridos com a enzima de restrição BamHI de forma a serem analisados pela técnica de Southern blot. Utilizando a sonda I de 1.5 kb, foi possível identificar os clones que sofreram o correto processo de recombinação homóloga, pois estes produziram duas bandas, sendo uma de aproximadamente 12 kb (alelo recombinante) e outra de cerca de 21 kb (alelo selvagem) (clones USP1/19 e USP1/35)(Figura 20).

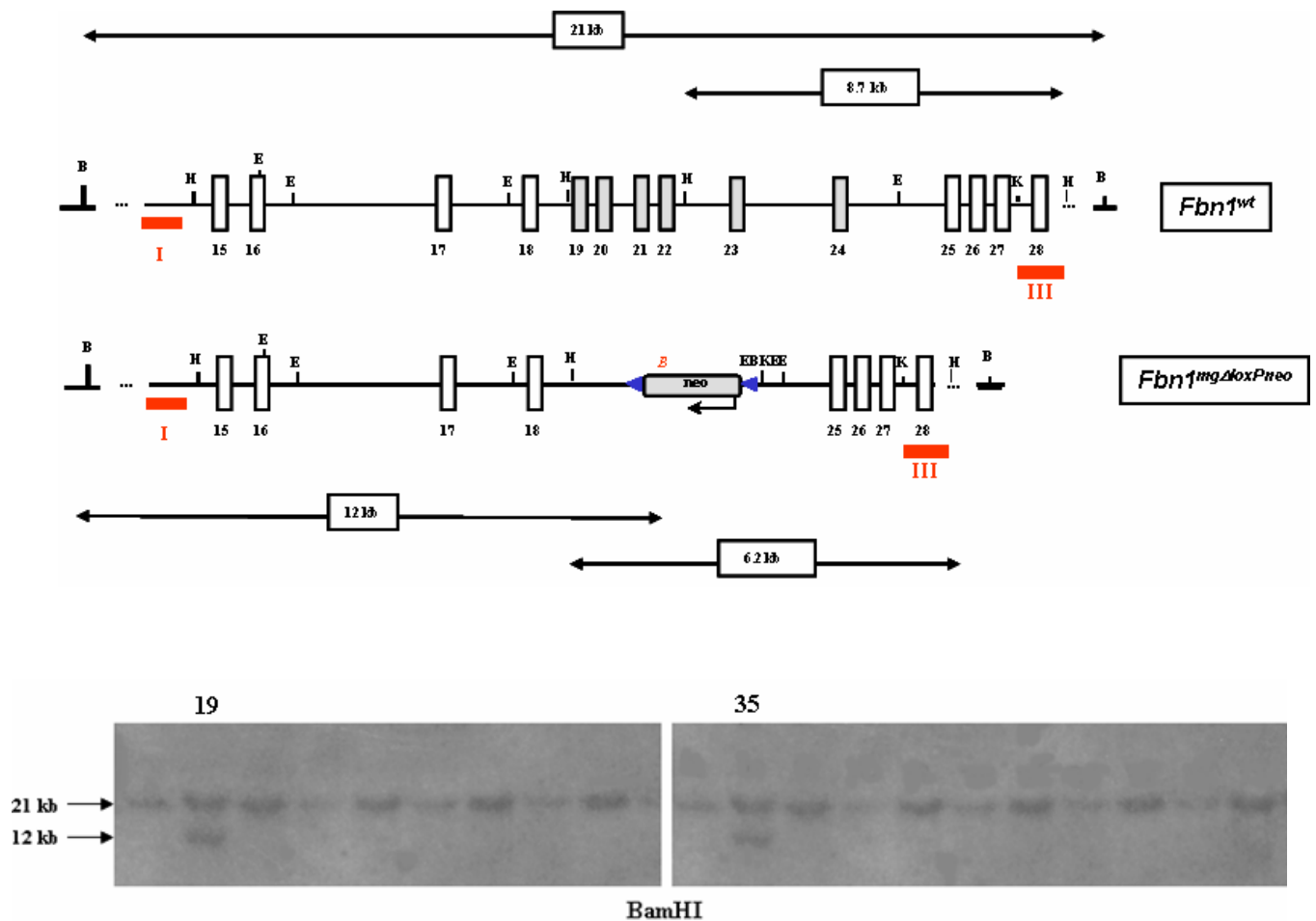


Figura 20: Identificação de dois clones positivos, 19 e 35, para a deleção de 6 exons induzida pelo vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$. Os exons estão representados por retângulos em branco, os triângulos azuis indicam sítios loxP flanqueando *neo* que é representado pelo retângulo em cinza sendo as sondas I e III identificadas por linhas vermelhas. Os quatro sítios de restrição presentes são: E (EcoRI); H (HindIII); B (BamHI); K (KpnI). Os asteriscos indicam clones positivos os quais apresentaram duas bandas, uma de 21 kb (alelo selvagem) e outra de 12 kb (alelo recombinado).

O DNA dos clones USP1/19 e USP1/35 foram digeridos com as enzimas BamHI e HindIII e marcados com as sondas I e III respectivamente, de forma a confirmar a correta inserção do cassete *neo* em substituição aos exons 19 a 24 por recombinação homóloga (Figuras 20 e 21). A digestão com a enzima BamHI gerou duas bandas, uma de 21 kb e a outra de 12 kb, em ambos os clones. Entretanto, a digestão com a enzima HindIII resultou no surgimento de duas bandas no clone USP1/19, uma de 8.7 kb e outra de 6.2 kb, e apenas uma banda de 8.7 kb no clone USP1/35 (Figura 21). Este resultado sugeriu um erro na seqüência 3' do clone 35 após o processo de recombinação homóloga. Sendo assim, o clone 35 foi descartado e o clone USP1/19, utilizado nos experimentos subsequentes.



Figura 21. Southern blot dos clones 19 e 35 após a digestão com as enzimas BamHI e HindIII. A digestão com BamHI resultou em fragmentos de 12 kb (alelo recombinado) e 21 kb (alelo selvagem) marcados com a sonda I; a digestão com HindIII resultou em fragmentos de 6.2 kb (alelo recombinado) e 8.7 kb (alelo selvagem) marcados com a sonda III (ver Figura 20)..

Para verificar a estabilidade do número cromossômico do clone USP1/19 foi feita a análise citogenética do mesmo. O resultado obtido demonstrou ser o clone USP1/19 citogeneticamente estável em relação ao seu número cromossômico, pois 81% das mitoses analisadas apresentavam 40 cromossomos (Figura 22). Desta forma, o clone mostrou ser citogeneticamente favorável à geração de animais quiméricos.

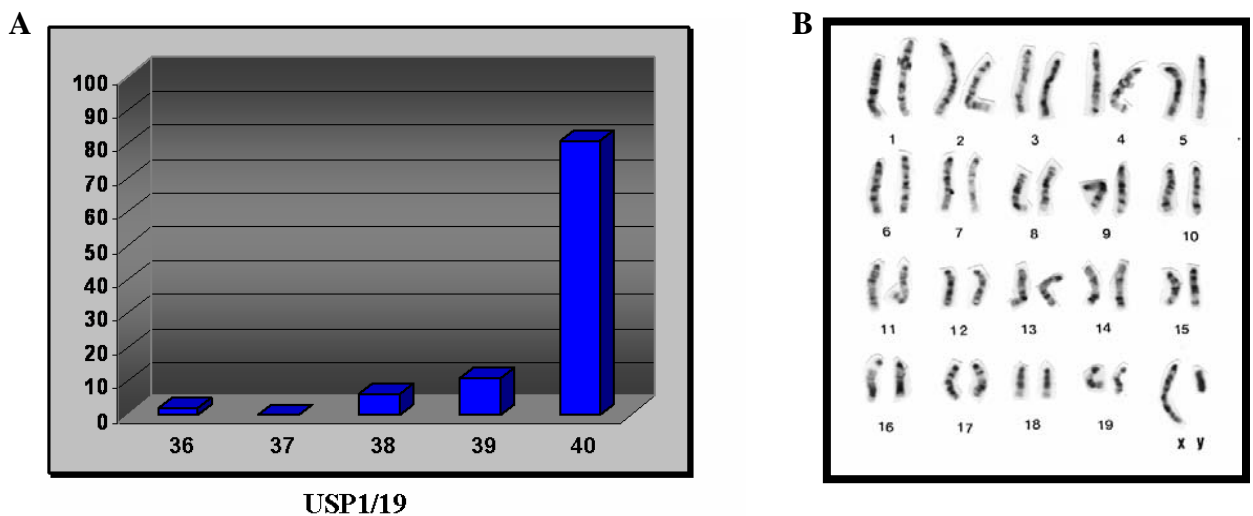


Figura 22. Resumo da análise cariotípica do clone USP1/19. **A.** Os números cromossômicos presentes em 100 metáfases analisadas do clone USP1/19. Os resultados mostram que 81% das metáfases apresentam o número de cromossomos normais para células de camundongo (40 cromossomos). **B.** Cariótipo normal do clone USP1/19 obtido através da análise citogenética de suas metáfases.

4.2. Geração da linhagem *Fbn1*^{mgΔloxPneo}

Foram feitos quatro experimentos para a obtenção da primeira ninhada de animais quiméricos *mgΔ*^{loxPneo} (Tabela 1). Nesta, obtivemos 72 mórulas a partir da lavagem do oviduto de fêmeas CD-1 grávidas. As mórulas foram agregadas com as células USP1/19 sendo que 43 se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Estas foram transferidas para três fêmeas CD-1 pseudográvidas. Uma das fêmeas deu origem a duas quimeras: um macho que apresentou 100% de quimerismo e uma fêmea com aproximadamente 50% de quimerismo (Figura 23A e B). O macho apresentou atraso significativo no seu desenvolvimento em comparação aos seus irmãos (Figura 23C, D e E), enquanto uma análise de sua radiografia demonstrou uma grande deformidade na coluna vertebral do animal (Figura 23F). Este camundongo veio a morrer dois meses após o seu nascimento, não tendo a sua linhagem germinativa sido testada, em função do animal não ter conseguido cruzar.

A fêmea que apresentou aproximadamente 50% de quimerismo não demonstrou qualquer alteração fenotípica, e foi cruzada com machos CD-1, dando origem a uma prole que nasceu com pelagem branca, indicando a não população da linhagem germinativa pelas células USP1/19.

Tabela 1. Resultados dos experimentos de agregação até geração da primeira ninhada de quimeras *mgΔ*^{loxPneo}.

Mórulas obtidas	Blastocistos transferidos	Receptoras	Nascimentos	Quimeras Macho / Fêmea	Transmissão pela linhagem germinativa
61	42	3	0	0	0
82	56	4	0	0	0
63	40	3	0	0	0
72	43	3	2	1 / 1	0

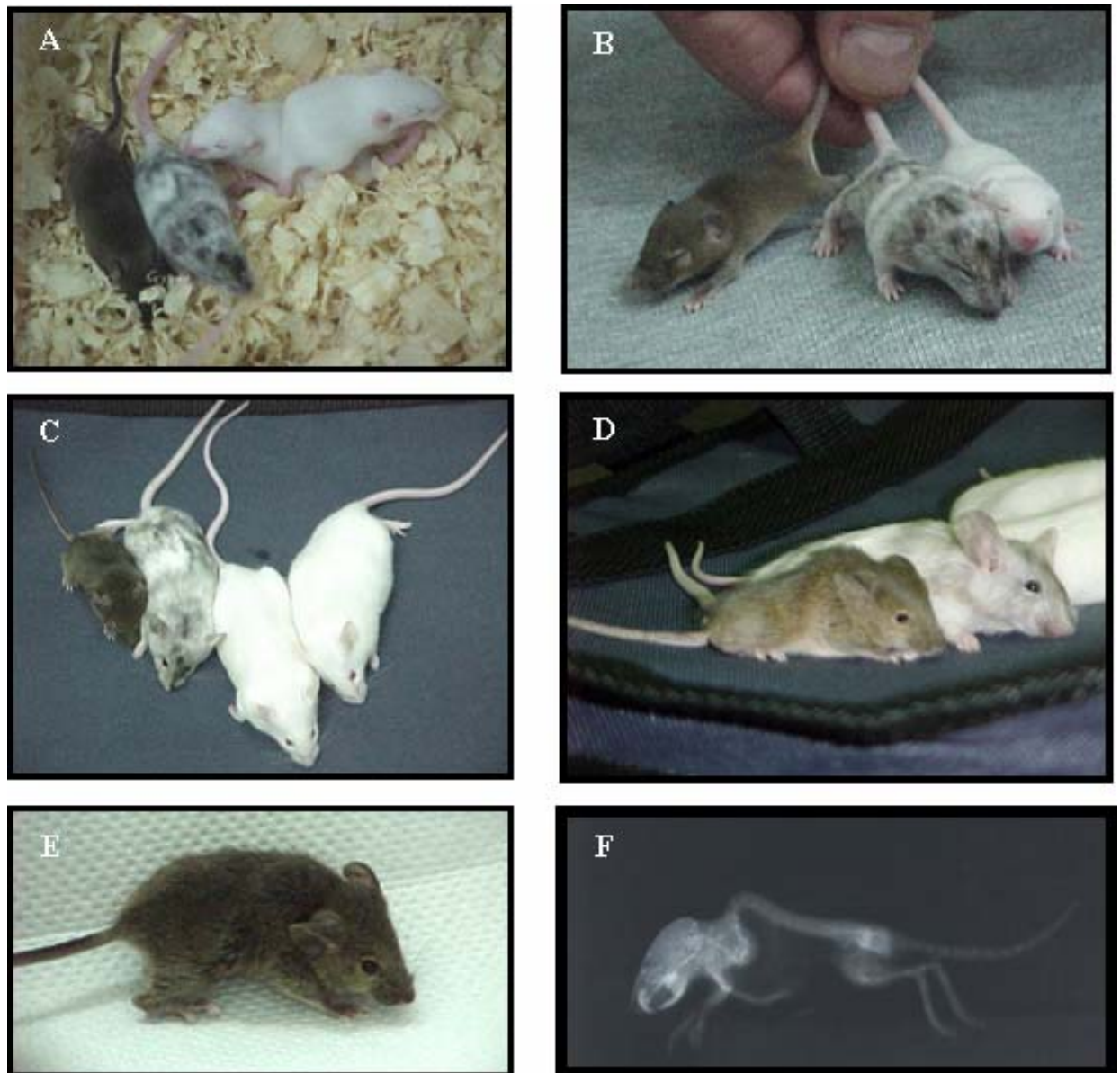


Figura 23. Primeira ninhada de camundongos quiméricos *Fbn1^{mgΔloxPneo}*. Foram gerados dois animais quiméricos, um macho, que apresentou 100% de quimerismo e uma fêmea, com aproximadamente 50% de quimerismo. **A e B.** Os animais estão como sete dias de vida; **C e D.** Animais com dois meses de vida, **E e F.** Quimera que apresentou deformidade grave em sua coluna e sua radiografia, respectivamente (3.0 Ms e 4.0 Kv).

Foram retirados fragmentos da pele da fêmea quimérica da região de coloração agouti, derivadas das células USP1/19. O cultivo primário foi selecionado por meio de geneticina de forma a obtermos fibroblastos *neo*-resistentes.

Foi feita uma análise do RNA mensageiro do alelo *Fbn1*^{mgAloxPneo} por RT-PCR de forma a poder determinar o correto processamento do splicing. O resultado obtido, por meio de utilização de diferentes iniciadores, apresentou os fragmentos de tamanhos esperados (Figura 24).

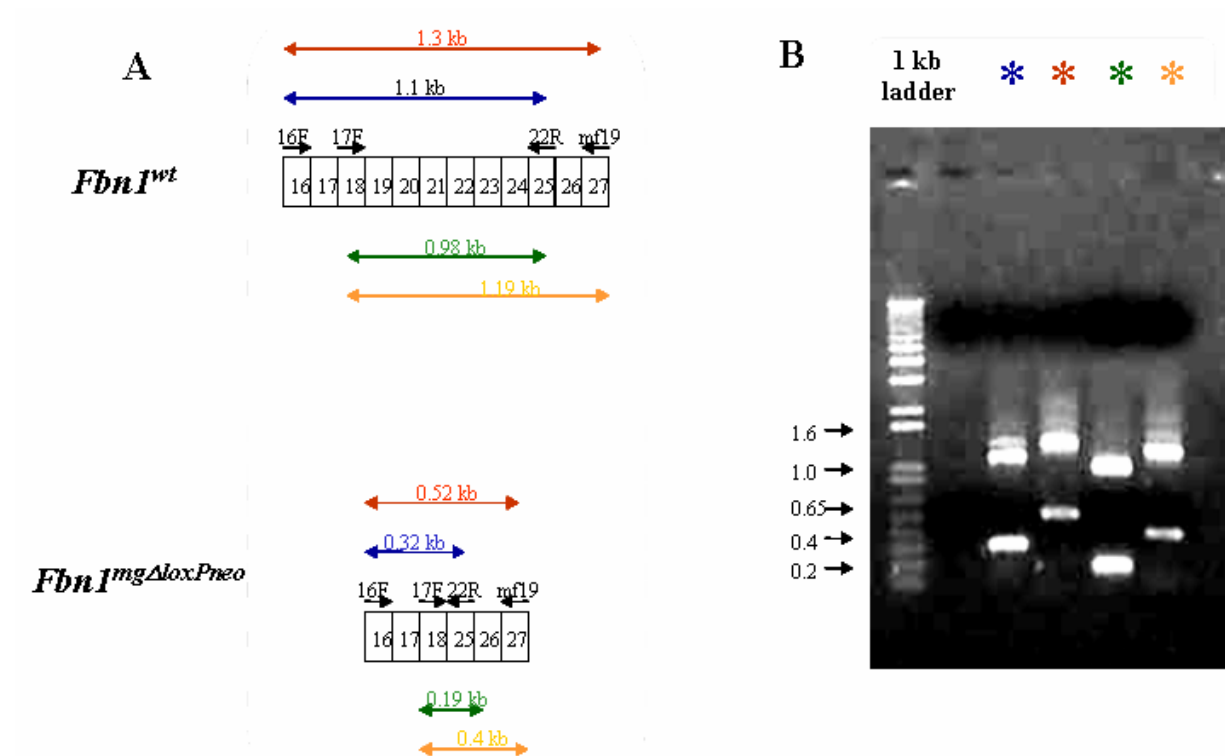


Figura 24. Análise do processo de *splicing* via RT-PCR. Utilizamos quatro diferentes pares de iniciadores os quais deram origem a diferentes fragmentos, tanto no alelo normal como no alterado. **A.** Esquema dos produtos de RT-PCR: vermelho (iniciadores 16F e mf19); azul (iniciadores 16F e 22R); verde (iniciadores 17F e 22R); amarelo (iniciadores 17F e mf19). **B.** gel de agarose 0.8% apresentando os fragmentos esperados: vermelho (1.3 kb para *Fbn1* e 0.52 kb para *Fbn1*^{mgAloxPneo}); azul (1.1 kb para *Fbn1* e 0.32 kb para *Fbn1*^{mgAloxPneo}); verde (0.98 kb para *Fbn1* e 0.19 kb para *Fbn1*^{mgAloxPneo}); laranja (1.19 kb para *Fbn1* e 0.4 kb para *Fbn1*^{mgAloxPneo}).

Os produtos de RT-PCR como os primers 17F e 22R foram clonados no vetor pGEM-T Easy sendo um clone correspondente ao alelo normal e um clone correspondente ao alelo mutado seqüenciados. A análise das seqüências demonstrou o correto processamento do mRNA entre os exons 18 e 25 do alelo mutado. Desta forma, ao analisarmos a seqüência de aminoácidos traduzida, a partir do cDNA da fibrilina-1 mutada, em comparação a fibrilina normal (Figura 25), constatamos que, como previsto, a deleção dos exons 19 a 24 não ocasionou alteração em seu quadro de leitura (Figura 26).

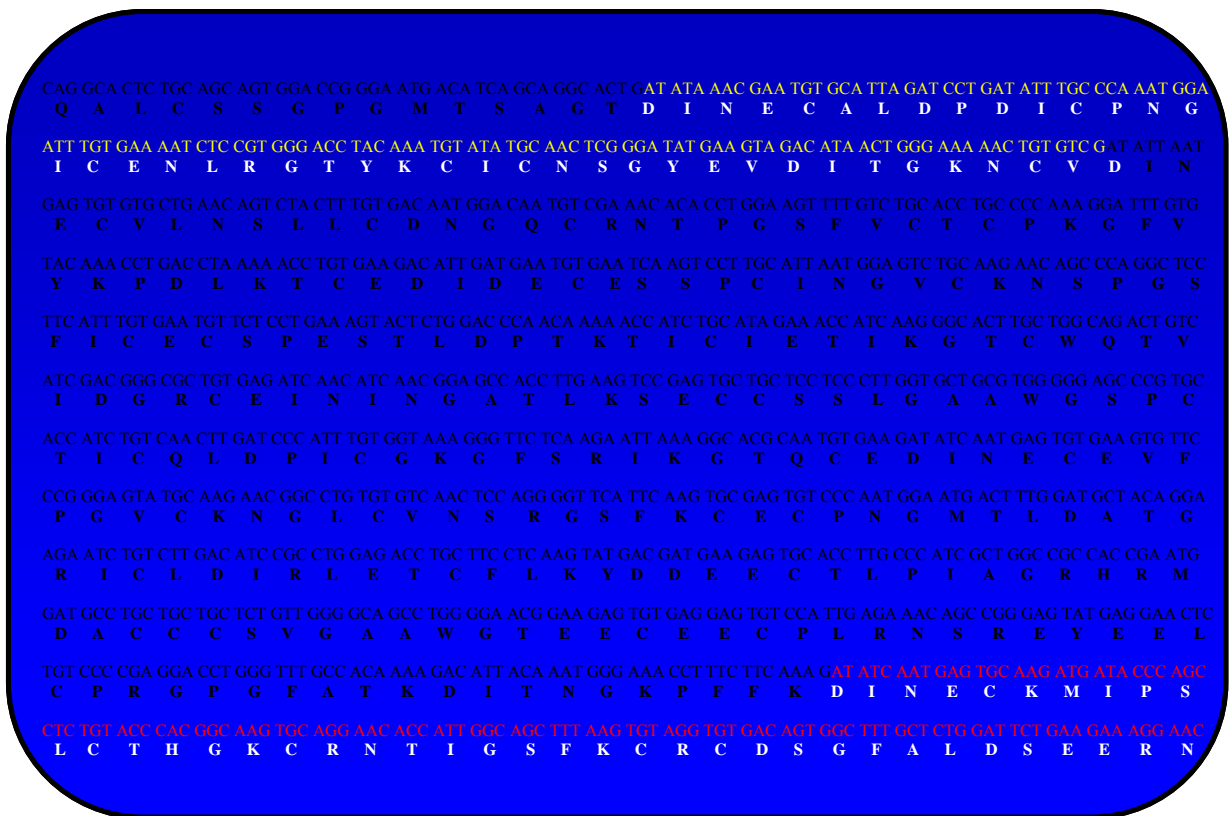


Figura 25. Seqüência do cDNA da fibrilina-1 apresentando o exon 18 em amarelo e o 25 em vermelho. As seqüências de aminoácidos traduzidos pelos exons 18 e 25 se encontram descritas em branco, enquanto as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos exons 19 a 24 e parte da seqüência do exon 17 estão descritas em preto.

```

CAG GCA CTC TGC AGC AGT GGA CCG GGA ATG ACA TCA GCA GGC ACT GAT ATA AAC GAA TGT GCA TTA GAT CCT GAT ATT TGC CCA AAT GGA
Q A L C S S G P G M T S A G T D I N E C A L D P D I C P N G
ATT TGT GAA AAT CTC CGT GGG ACC TAC AAA TGT ATA TGC AAC TCG GGA TAT GAA GTA GAC ATA ACT GGG AAA AAC TGT GTC GAT AIC AAT
I C E N L R G T Y K C I C N S G Y E V D I T G K N C V D I N
GAG TGC AAG ATG ATA CCC AGC CTC TGT ACC CAC GGC AAG TGC AGG AAC ACC ATT GGC AGC TTT AAG TGT AGG TGT GAC AGT GGC TTT GCT
E C K M I P S L C T H G K C R N T I G S F K C R C D S G F A
CTG GAT TCT GAA GAA AGG AAC TGT ACA GAC ATT GAT GAG TGC CGC ATA TCT CCT GAC CTC TGT GGC CGA GGC CAG TGT GTG AAC ACC CCG
L D S E E R N C T D I D E C R I S P D L C G R G Q C V N T P

```

Figura 26. Seqüência do cDNA da fibrilina-1 após a retirada dos exons 19 a 24 apresentando o exon 18 em amarelo e o 25 em vermelho. A seqüência de aminoácidos traduzidos pelos exons 18 e 25 se encontra em branco, enquanto parte da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos dos exons 17 a 26 estão em preto.

Foram feitos mais cinco experimentos visando a obtenção de mais animais quiméricos sendo que em dois geramos animais (Tabela 2). No primeiro obtivemos três animais, dois machos e uma fêmea, que não se mostraram quiméricos tanto na cor da pelagem com por meio de cruzamento.

Em outro experimento de agregação, geramos dois machos quiméricos (Figura 27). Um macho apresentou um fenótipo com aproximadamente 90% de quimerismo. Este animal foi cruzado com uma fêmea CD-1 e a prole teve pelagem agouti, demonstrando que as células do clone USP1/19 popularam sua linhagem germinativa. A prole foi genotipada por Southern blot sendo três dos oito animais heterozigotos para o alelo *Fbn1^{mgAloxPneo}* (Figura 28). O outro macho que apresentou um fenótipo de aproximadamente 10% de quimerismo, não teve sua linhagem germinativa populada pelas células USP1/19.

Tabela 2. Resultados dos experimentos de agregação que deu origem a segunda ninhada de quimeras $mg\Delta^{loxPneo}$.

Mórulas obtidas	Blastocistos transferidos	Receptoras	Nascimentos	Quimeras Macho / Fêmea	Transmissão pela linhagem germinativa
54	23	2	0	0	0
96	61	4	0	0	0
64	43	2	3	0	0
32	28	2	0	0	0
43	25	3	2	2 / 0	1



Figura 27. Animais, gerados a partir da técnica de agregação, com fenótipos de aproximadamente 10% e 90% de quimerismo.



Figura 28. Southern blot da primeira ninhada de animais $mg\Delta^{loxPneo}$. As amostras de DNA genômico foram digeridas com BamHI e marcadas com a sonda I gerando fragmentos de 12kb e 21kb.

Os heterozigotos da primeira ninhada de animais $mg\Delta^{loxPneo}$ não apresentaram qualquer fenótipo relacionado a SMF. Os animais não geraram descendentes tanto em cruzamentos entre heterozigotos como em retro-cruzamentos cruzamentos com animais CD-1. Os animais foram sacrificados com aproximadamente um ano de vida sem expressar qualquer fenótipo (Figura 29).

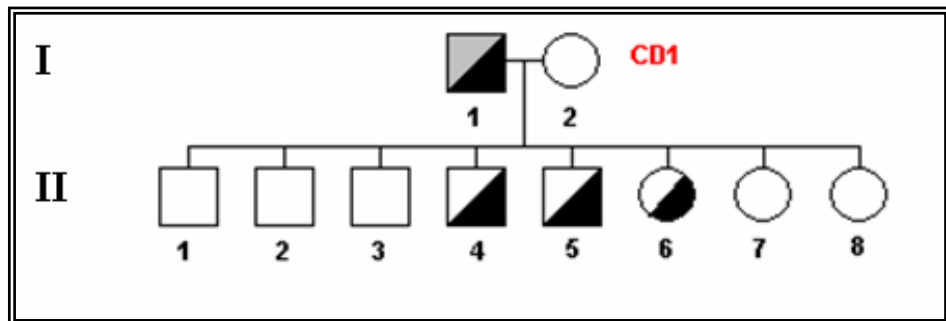


Figura 29. Heredograma da primeira ninhada da quimera. Quimera (▨); Macho selvagem (□); Macho heterozigoto assintomático (▤); Fêmea selvagem (○); Fêmea heterozigota assintomática (◐).

A segunda ninhada de animais $mg\Delta^{loxPneo}$ deu origem a quatro animais heterozigotos que não apresentaram fenótipo durante um ano de vida (Figura 30) . O macho heterozigoto II-2 foi cruzado com a fêmea II-3, dando origem a cinco animais heterozigotos, três machos e duas fêmeas. Dentre os animais heterozigotos obtidos, o macho III-3 apresentou o fenótipo muito grave [menor tamanho, dificuldade de locomoção, acentuado desvio na coluna (escoliose), prolongamento das patas traseiras além do fato de tremer constantemente], vindo a morrer após três meses de vida sem dar origem a descendentes (Figura 31). Os demais animais heterozigotos da geração III foram cruzados gerando animais heterozigotos que não apresentaram nenhum fenótipo característico da SMF. Em todos os cruzamentos entre animais heterozigotos, não se obteve animais homozigotos.

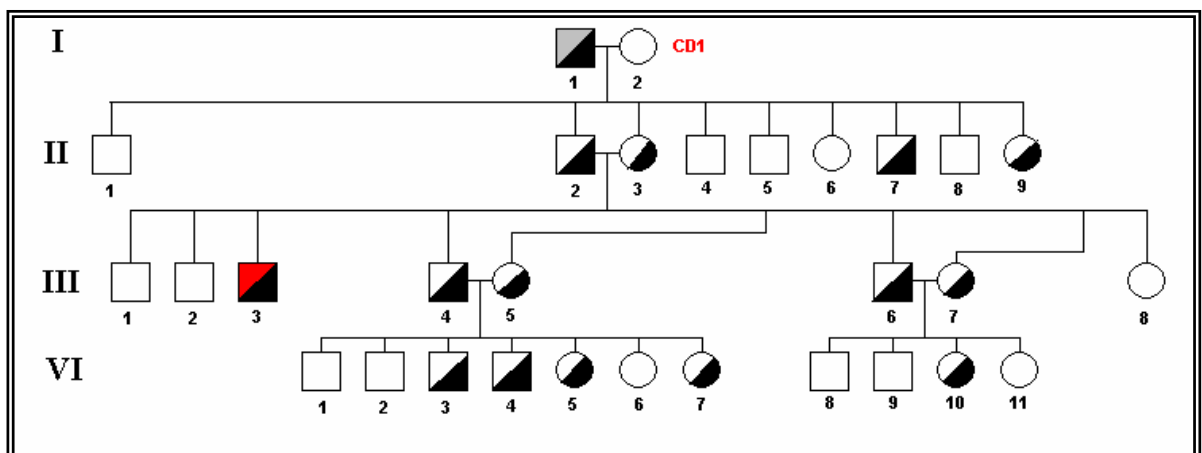


Figura 30. Heredograma da segunda família gerada a partir da quimera. Quimera (■); Macho selvagem (□); Macho heterozigoto assintomático (◻); Macho Heterozigoto com fenótipo muito grave (■); Fêmea selvagem (○); Fêmea heterozigota assintomática (◐).

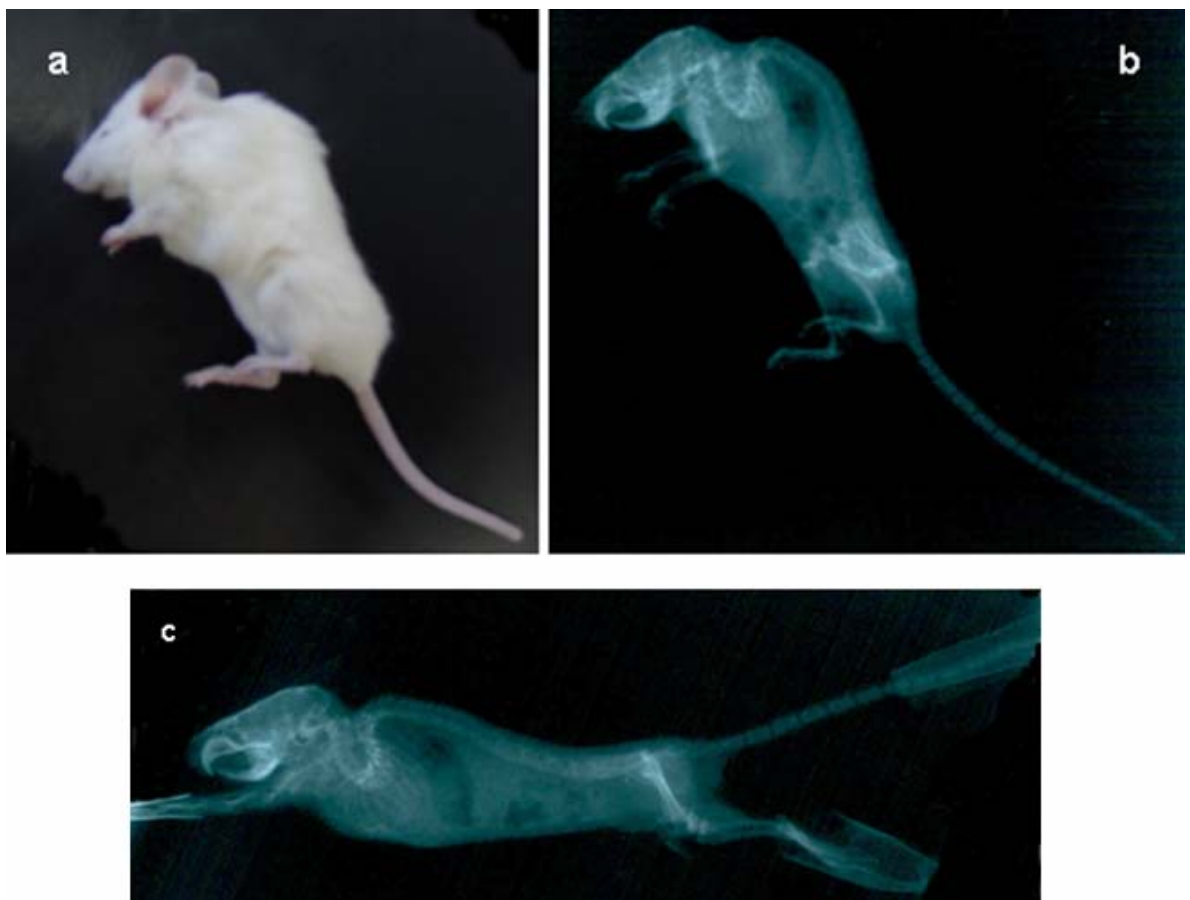


Figura 31. Primeiro animal $mg\Delta^{loxPneo}$ heterozigoto a expressar o fenótipo: menor tamanho, dificuldade de locomoção, acentuado desvio na coluna (escoliose), prolongamento das patas traseiras e tremor. Este animal veio a morrer três meses após seu nascimento sem dar origem a descendentes. **a.** Foto do animal $mg\Delta^{loxPneo}$ heterozigoto expressando o fenótipo; **(b e c)** Filmes de Raio-X do animal(3.0 Ms e 4.0 Kv), (b) animal relaxado e (c) animal estendido.

Na terceira família, obtida a partir do cruzamento da quimera com uma fêmea CD-1, o macho heterozigoto II-8, foi cruzado com as fêmeas heterozigotas II-7 e II-9 (Figura 32). Em uma das ninhadas, um macho heterozigoto (III-2) apresentou o fenótipo muito grave. Este animal veio a óbito, três meses após o seu nascimento apresentando as mesmas características do animal descrito anteriormente (Figura 31) e sem gerar prole. Dos cruzamentos entre animais heterozigotos da geração III foram obtidos oito heterozigotos sendo que um deles (IV-7) apresentou o fenótipo muito grave e vindo a falecer após três meses de vida sem dar origem a descendentes.

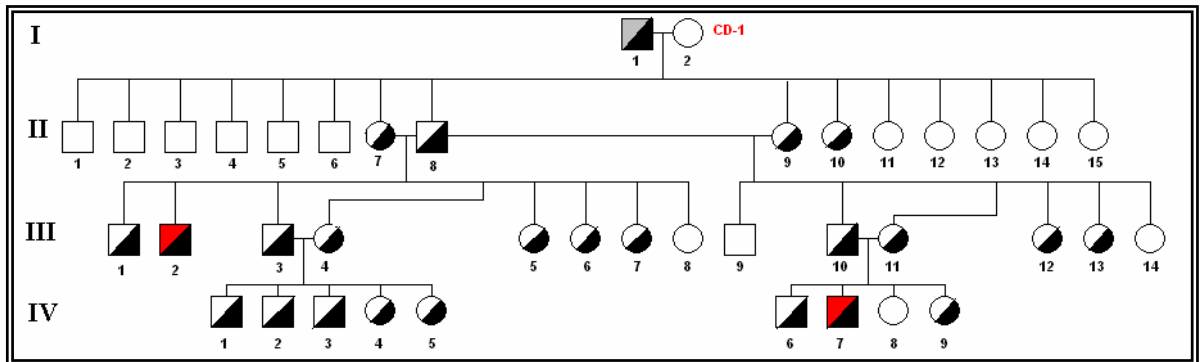


Figura 32. Heredograma do primeiro cruzamento da terceira ninhada da quimera. Quimera (■); Macho selvagem (□); Macho heterozigoto assintomático (◐); Macho heterozigoto com fenótipo muito grave (■); Fêmea selvagem (○); Fêmea heterozigota assintomática (◑).

O segundo cruzamento entre animais heterozigotos da geração II da terceira família da quimera está representado na figura 33. Dos dezesseis animais heterozigotos da geração III apenas um (III-2) apresentou o fenótipo muito grave. Este morreu após três meses de vida sem dar origem a uma geração subsequente. Nesta geração, foram obtidos os primeiros animais homozigotos e que faleceram entre quatro e oito dias após o nascimento. O cruzamento de animais heterozigotos da geração III originou três animais heterozigoto, porém nenhum homozigoto.

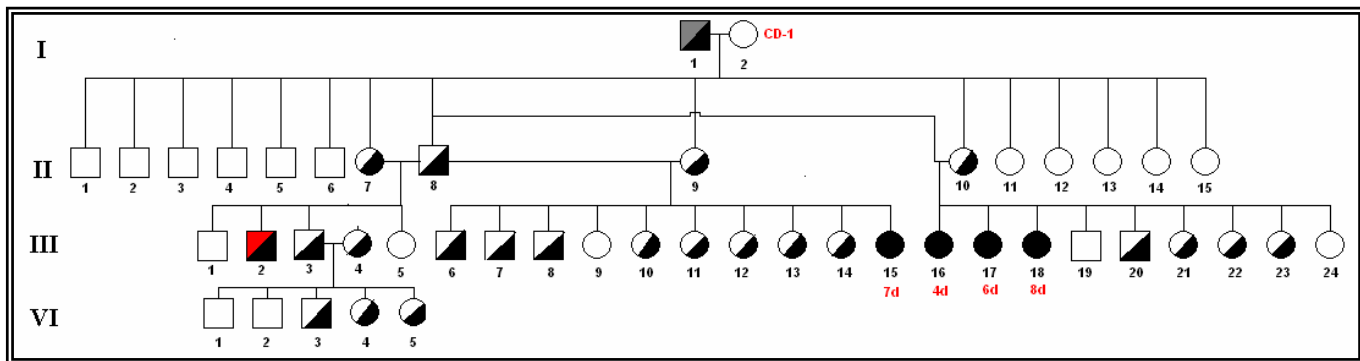


Figura 33. Heredograma do segundo cruzamento da terceira ninhada da quimera. Quimera (■); Macho selvagem (□); Macho heterozigoto assintomático (◻); Macho heterozigoto com fenótipo muito grave (◼); Fêmea selvagem assintomático (○); Fêmea heterozigota assintomático (◐); Fêmea homozigota (●).

Os resultados obtidos nos cruzamentos com animais CD-1 revelaram uma variabilidade no fenótipo dos heterozigotos. Para testar se esta variabilidade é causada pelo *background* genético, a mutação foi transferida para as linhagens isogênicas C75BL/6 e 129/Sv de forma a estabelecer as linhagens congênicas C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ e 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$. Para tal, foi utilizado como matriz o animal heterozigoto II-8 da terceira família (Figura 33). Este animal é 50% 129/Sv e 50% CD-1.

A tabela 3 resume o número de animais de cada genótipo gerado nos cruzamentos entre heterozigotos em um *background* genético misturado, CD-1 e 129/Sv. As frequências observadas de animais selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes na prole discrepam significativamente de 1/4: 1/2: 1/4, indicando uma diminuição acentuada de homozigotos mutantes ($P \ll 0.05$).

Tabela 3. Resultado do cruzamento entre animais heterozigotos (*background* misturado 129/Sv e CD-1).

Gerações	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto
2º Família (III)	3	5	0
2º Família(IV)	6	5	0
3º Família(III)	8	26	4
3º Família(IV)	3	11	0
Total	20	47	4
Soma Total	71		

4.3. Linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$

Como método para o estabelecimento de uma linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ congênica, foi feito o retro-cruzamento com animais 129/Sv selvagens isogênicos (Figura 34). Em todas as gerações foram observados animais com fenótipos apresentando diferentes níveis de gravidade os quais foram classificados como leve, grave e muito grave de acordo com as manifestações ósseas visíveis a olho nu e confirmadas por radiografia.

Na geração II, quatro animais heterozigotos não apresentaram fenótipo enquanto dois apresentaram o fenótipo leve (II-8 e II-12). Na geração III, quatro dos oito animais heterozigotos apresentaram fenótipo sendo três graves (III-7, III-9 e III-11) e um muito grave (III-13). A geração IV, dentre os quatro animais heterozigotos presentes, dois desenvolveram o fenótipo, um leve (IV-1) e outro grave (IV-7). Na geração V os três animais heterozigotos apresentaram fenótipo os quais foram identificados com leve (V-1), grave (V-5) e muito grave

(V). As gerações VI e VII apresentaram dois animais heterozigotos em cada, sendo que todos apresentaram o fenótipo grave (VI-1, VI-2, VII-3 e VII-5) (Figura 34).

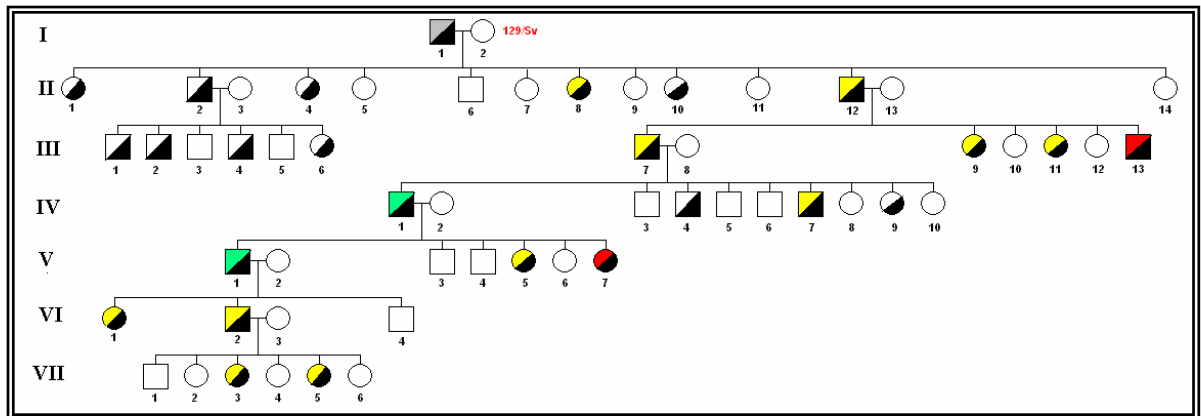
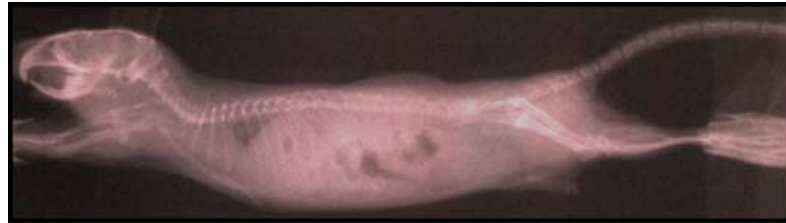
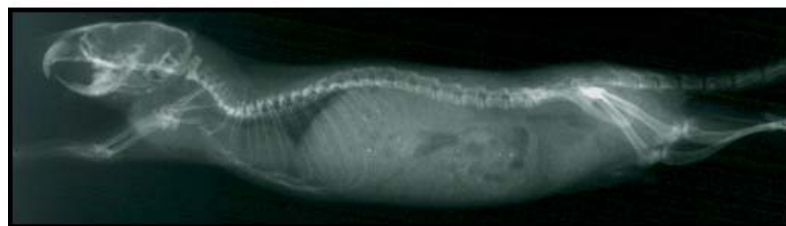


Figura 34. Heredograma da linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$. Macho selvagem (\square); Fêmea selvagem (\circ); Macho heterozigoto assintomático (\blacksquare); Fêmea heterozigota assintomática (\bullet); Macho heterozigoto com fenótipo leve (\blacksquare); Macho heterozigoto com fenótipo muito grave (\blacksquare); Fêmea heterozigota com fenótipo muito grave (\bullet); Macho Heterozigoto com fenótipo grave (\blacksquare); Fêmea heterozigota com fenótipo grave (\bullet).

Os animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ da geração V que apresentaram os fenótipos leve, grave e muito grave tiveram a estrutura óssea analisada por Raio-X. Os resultados alterações na coluna, escoliose, de todos os três animais em relação ao animal controle. A análise das radiografias mostrou a existência de diferentes graus de escoliose nos três animais o que veio a confirmar as observações iniciais a olho nu (Figura 35).



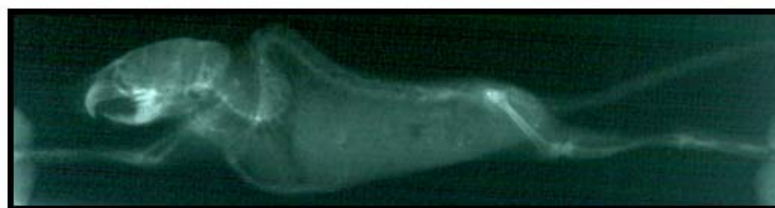
Selvagem (controle)



Heterozigoto (fenótipo leve)



Heterozigoto (fenótipo grave)



Heterozigoto (fenótipo muito grave)

Figura 35. Análise de Raio-X (3.0 Ms e 4.0 Kv) dos fenótipos selvagem (controle), heterozigoto leve, heterozigoto grave e heterozigoto muito grave (Tecno-Design – 500Ma/ 125 Kv) do linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$. Note os diferentes graus de escoliose nos animais heterozigotos em relação ao selvagem

Três animais de uma segunda ninhada da geração V, um selvagem e dois heterozigotos, um deles com o fenótipo grave e outro assintomático, foram sacrificados visando a análise histológica do animal com fenótipo muito grave. Como os animais foram sacrificados com três meses de vida, não foi possível determinar se o heterozigoto assintomático iria expressar um possível fenótipo leve ou grave quando atingisse os oito meses de vida (Figura 36).

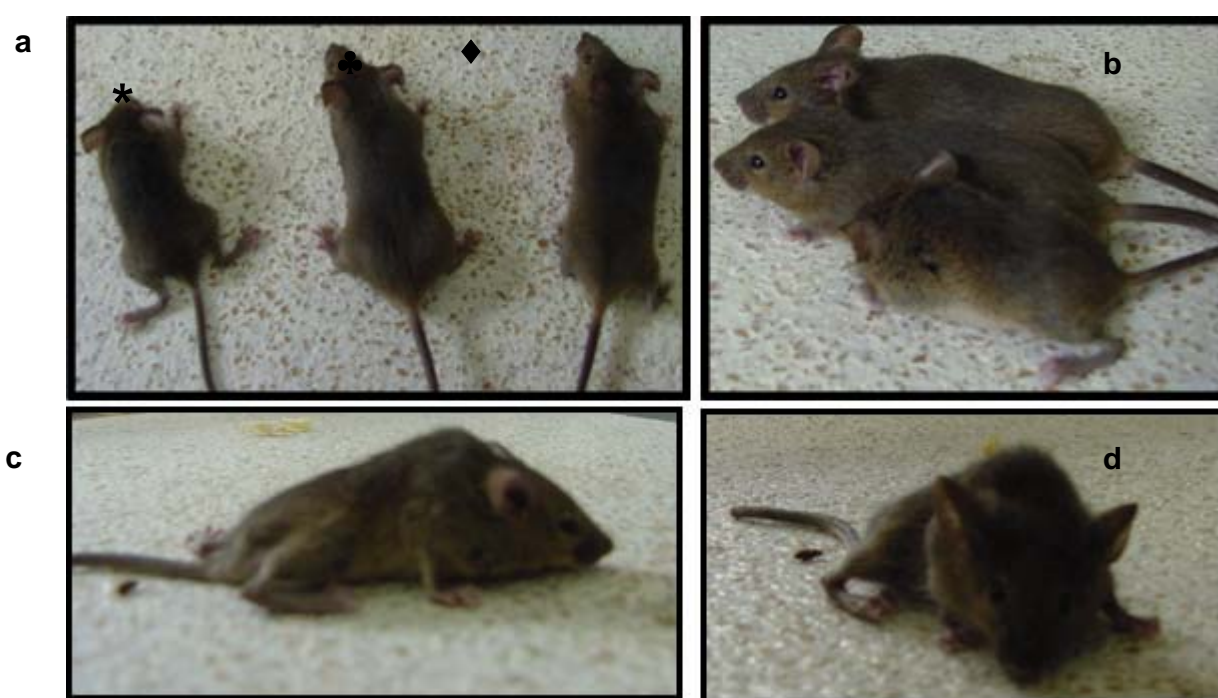
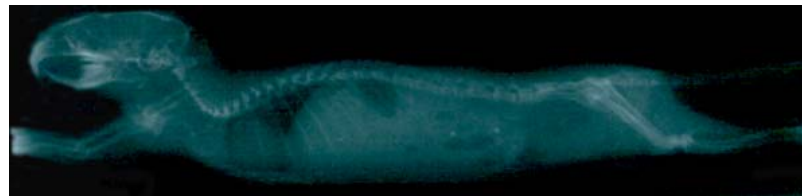
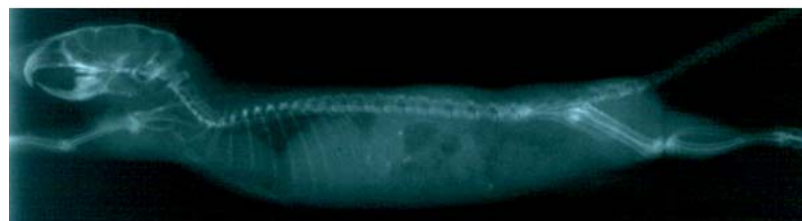


Figura 36. Três animais de uma segunda ninhada da geração V. (a e b) Linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ com um animal heterozigoto muito grave, que já apresentava o fenótipo antes de completar um mês de vida (*), animal heterozigoto assintomático (♣) e um animal normal (◆). Note atraso significativo de desenvolvimento em comparação com irmãos. (c e d). animal heterozigoto muito grave com deformidade acentuada na coluna vertebral.

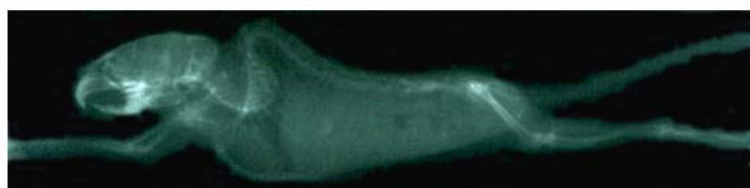
A estrutura óssea do animal heterozigoto assintomático se mostrou normal em uma primeira análise visual. Entretanto, por meio da técnica de raios-X, foi possível detectar um pequeno desvio em sua coluna em comparação com o animal controle, indicando que ele deve ser na verdade um heterozigoto com fenótipo grave (Figura 38). Os membros do animal heterozigoto assintomático não se mostram alongados como observado no animal com o fenótipo muito grave. Este, diferentemente do assintomático, apresenta um alto grau de deformidade na coluna e prolongamento das patas traseiras como demonstrado na análise de raio-X (Figura 37).



Heterozigoto (sem fenótipo)



Selvagem (controle)



Heterozigoto (fenótipo muito grave)

Figura 37. Análise de Raio-X (3.0 Ms e 4.0 Kv) dos três animais de uma segunda ninhada da geração V. Animais heterozigoto assintomático, heterozigoto positivo (fenótipo muito grave) e controle da segunda. ninhada da geração V de animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ (ver Figura 36).

Diversos tecidos desses animais foram submetidos à análise histológica. Nos fragmentos corados com Hematoxilina-Eosina (HE) de globo ocular, miocárdio, aorta e fígado não foram observadas alterações morfológicas quando comparados os animais heterozigotos e o selvagem. Já nos pulmões dos dois heterozigotos, foi observado alargamento acentuado dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhado por destruição de paredes alveolares e sem fibrose evidente, compatível com um quadro de enfisema pulmonar (Figura 38a, 38b, 38c, 38d, 38e e 38f). Um outro animal heterozigoto, sacrificado aos 8 meses de idade com fenótipo grave, apresentou também alargamento, espessamento e destruição dos septos alveolares, que estavam preenchidos por células inflamatórias e/ou deposição de material róseo e amorfo, assemelhando-se a fibrose (Figura 38g e 38h).

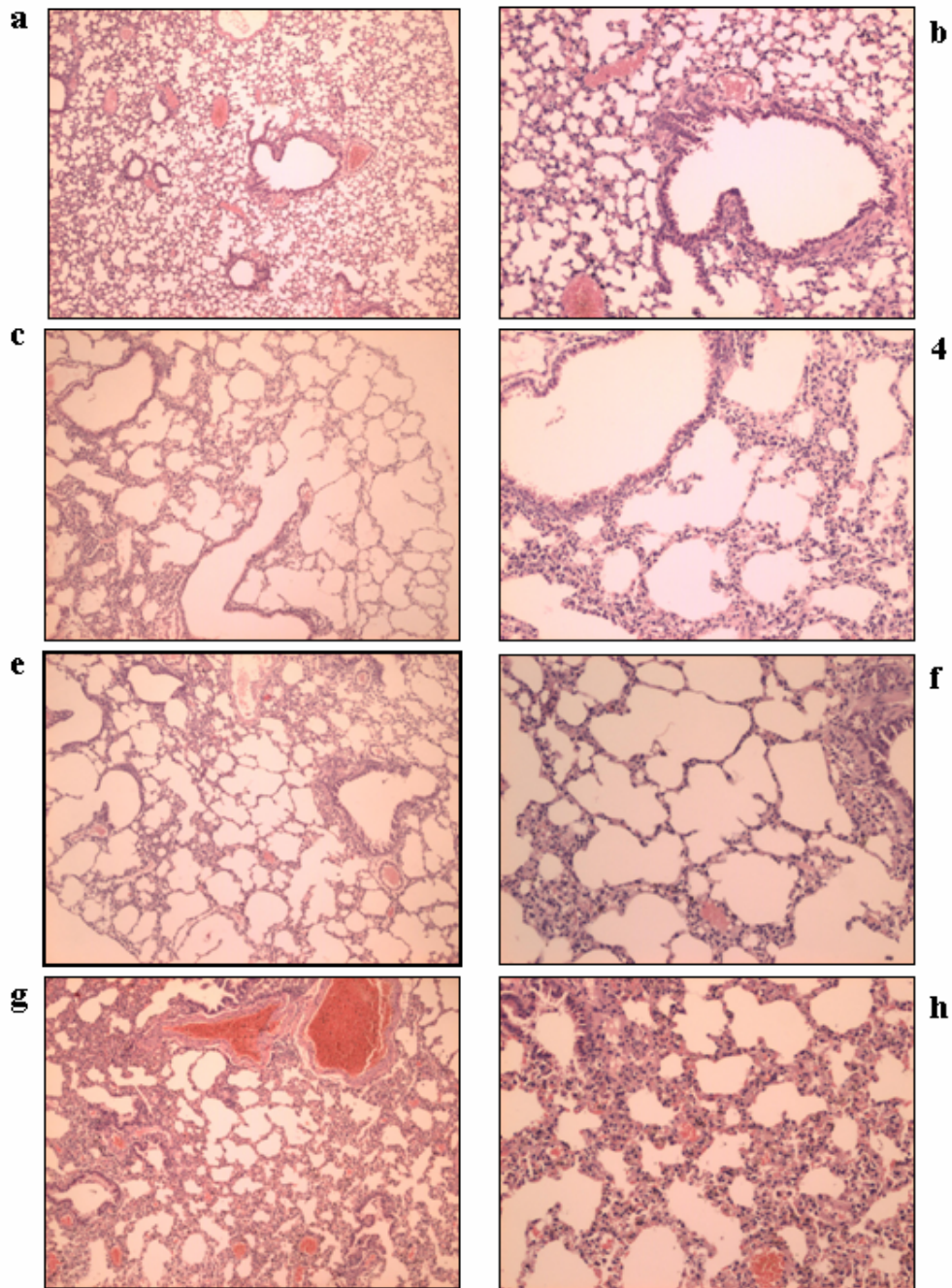


Figura 38. Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmões de camundongos $129\text{ mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$. (a e b) Pulmão de camundongo selvagem com 3 meses de idade (HE, objetiva 4x e 10x, respectivamente); (c e d) Pulmão de camundongo heterozigoto muito grave com 3 meses de idade (HE, objetiva 4x e 10x, respectivamente); (e e f) Pulmão de camundongo heterozigoto assintomático aos 3 meses de idade (HE, objetiva 4x e 10x, respectivamente); (g e h) Pulmão de camundongo heterozigoto grave com 8 meses de idade (HE, objetiva 4x e 10x, respectivamente);

Na sexta geração de animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ 99.22% do genoma é de origem 129/Sv, o que pode ser considerado uma linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ congênica (Tabela 3).

Tabela 4. Composição relativa do genoma das diferentes gerações de animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ visando o estabelecimento de uma linhagem 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ congênica.

Linhagem	CD- 1(%)	129/Sv (%)
Quimera		100
Quimera x CD-1	50	50
129/Sv - F1	25	75
129/Sv - F2	12.5	87.5
129/Sv - F3	6.25	93.75
129/Sv - F4	3.125	96.875
129/Sv - F5	1.56	98.44
129/Sv - F6	0.78	99.22
129/Sv - F7	0.39	99.61
129/Sv - F8	0.19	99.81
129/Sv - F9	0.09	99.91
129/Sv - F10	0.04	99.96
129/Sv - F11	0.02	99.98
129/Sv - F12	0.01	99.99

4.4. Linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$

A linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ foi estabelecida através de retro-cruzamentos (Figura 39). Os animais heterozigotos observados da geração II até IX não apresentaram alterações fenotípicas.

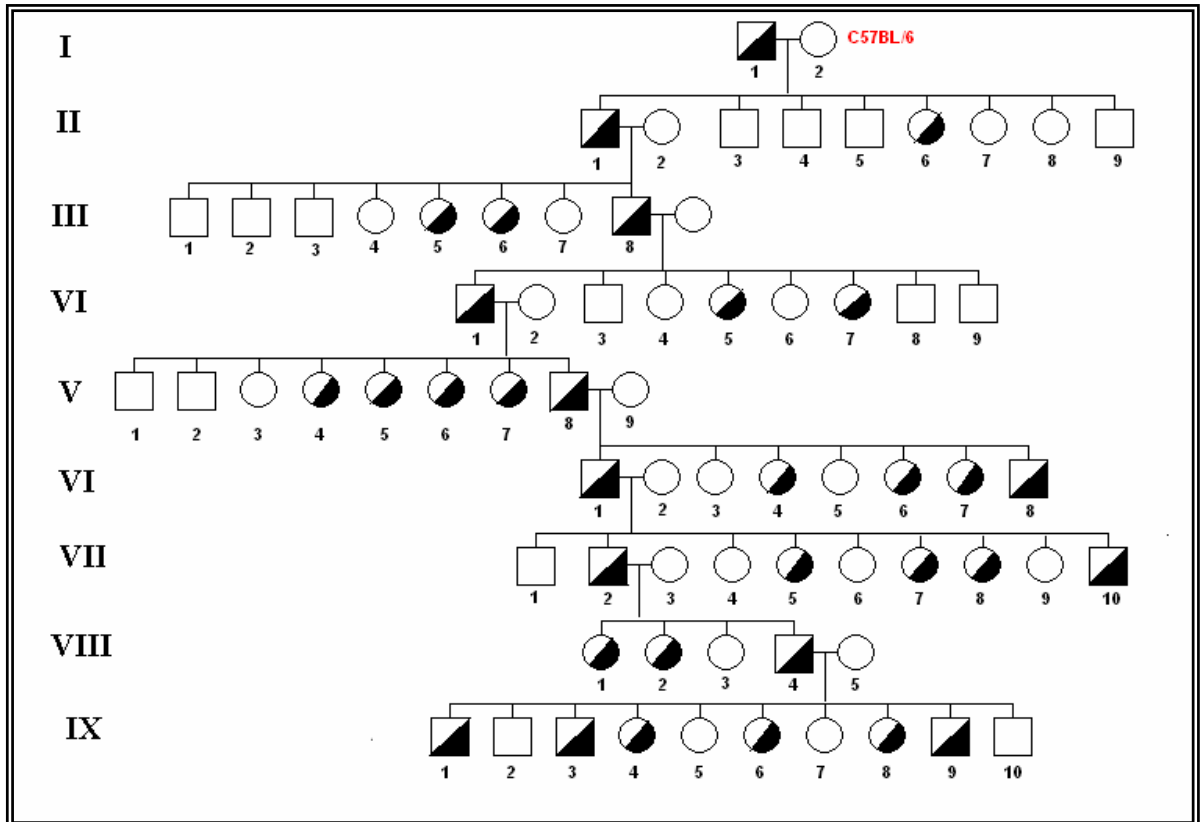


Figura 39. Heredograma da linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$. Macho selvagem (□); Fêmea selvagem (○); Macho heterozigoto assintomático (◼); Fêmea heterozigota assintomática (◐).

Foram feitos cruzamentos entre animais heterozigotos C57BL/6 mg $\Delta^{loxPneo}$ da geração IX visando a obtenção de animais homozigotos viáveis. Alguns animais foram gerados, entretanto não sobreviveram mais de uma semana (Figuras 42 e 43). Os animais heterozigotos não apresentaram qualquer alteração fenotípica característica da SMF.

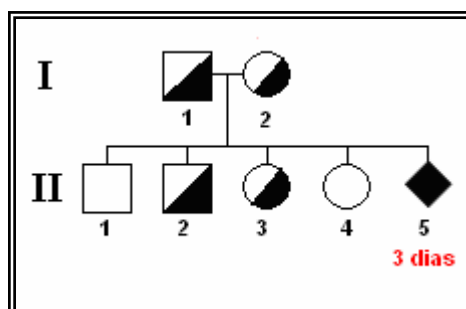


Figura 40. Heredograma da primeira ninhada obtida a partir do cruzamento entre dois animais heterozigotos C57BL/6 mg $\Delta^{loxPneo}$ da geração IX (Macho A e fêmea A). Macho selvagem (□); Fêmea selvagem (○); Macho heterozigoto sem fenótipo (▣); Fêmea heterozigota sem fenótipo (◐); Animal homozigoto morto com sexo indefinido (◆).

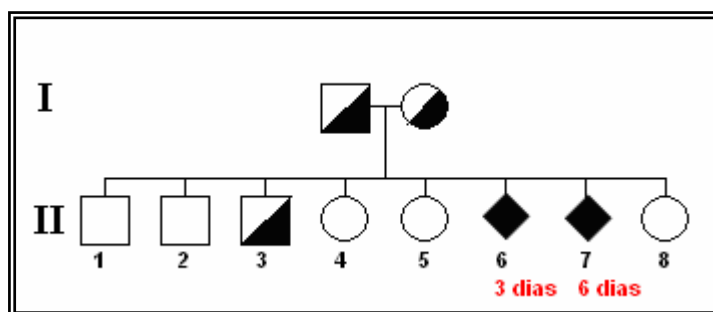


Figura 41. Heredograma da segunda ninhada obtida a partir do cruzamento entre dois animais heterozigotos C57BL/6 mg $\Delta^{loxPneo}$ da geração IX (Macho B e fêmea B). Macho selvagem (□); Fêmea selvagem (○); Macho heterozigoto sem fenótipo (▣); Fêmea heterozigota sem fenótipo (◐); Animal homozigoto morto com sexo indefinido (◆).

Na oitava geração de animais C57BL/6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$, 99.61% do genoma é de origem C57BL/6, o que pode ser considerado uma linhagem C57BL/6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ congênica (Tabela 4).

Tabela 5. Composição relativa do genoma das diferentes gerações de animais C57BL/6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ visando o estabelecimento de uma linhagem C57BL/6 $\text{mg}\Delta^{\text{loxPneo}}$ congênica.

Linhagem	129/Sv + CD-1(%)	C57 (%)
Quimera	100	0
C57 - F1	50%	50
C57 - F2	25	75
C57- F3	12.5	87.5
C57- F4	6.25	93.75
C57- F5	3.125	96.875
C57- F6	1.56	98.44
C57- F7	0.78	99.22
C57- F8	0.39	99.61
C57- F9	0.19	99.81
C57- F10	0.09	99.91
C57- F11	0.04	99.96
C57- F12	0.02	99.98

A tabela 5 resume o número de animais gerados nos cruzamentos entre heterozigotos em um *background* congênico C57BL/6. As frequências observadas de animais selvagem (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigotos mutantes (-/-) na prole discrepam apenas marginalmente dos esperados 1/4: 1/2 : 1/4: [qui-quadrado (2 q.1.) = 6,23; P < 0.05], provavelmente devido ao tamanho pequeno da amostra.

Tabela 6. Resultado do cruzamento entre animais heterozigotos (*background* C57BL/6).

Gerações	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto
1º Família (IX)	1	1	1
2º Família (IX)	5	1	2
Total	6	2	3
Soma Total	11		

4.5. Recombinação mediada por Cre

O clone USP1/19 foi tratado, *in vitro*, com a proteína Cre nas concentrações de 4 μ M e 8 μ M, visando a retirada do cassete *neo* flanqueado em ambas as extremidades pela sequência loxP. O DNA das células tratadas foi analisado por Southern blot utilizando-se a enzima de restrição BamHI e a sonda I (Figura 42a). Os dados obtidos apresentaram duas bandas no controle células USP1/19 não expostas à ação da proteína Cre, uma banda referente ao alelo normal de 21 kb, e outra correspondente ao alelo alterado *Fbn1* $mg\Delta^{loxPneo}$ de 12 kb. Já as células tratadas com Cre apresentaram além daquelas duas bandas, uma banda de 11.5 kb que corresponde ao alelo *Fbn1* $mg\Delta^{loxPneo}$ sem a presença do cassete de expressão *neo*, denominado de *Fbn1* $mg\Delta^{CRE}$ (Figura 42b).

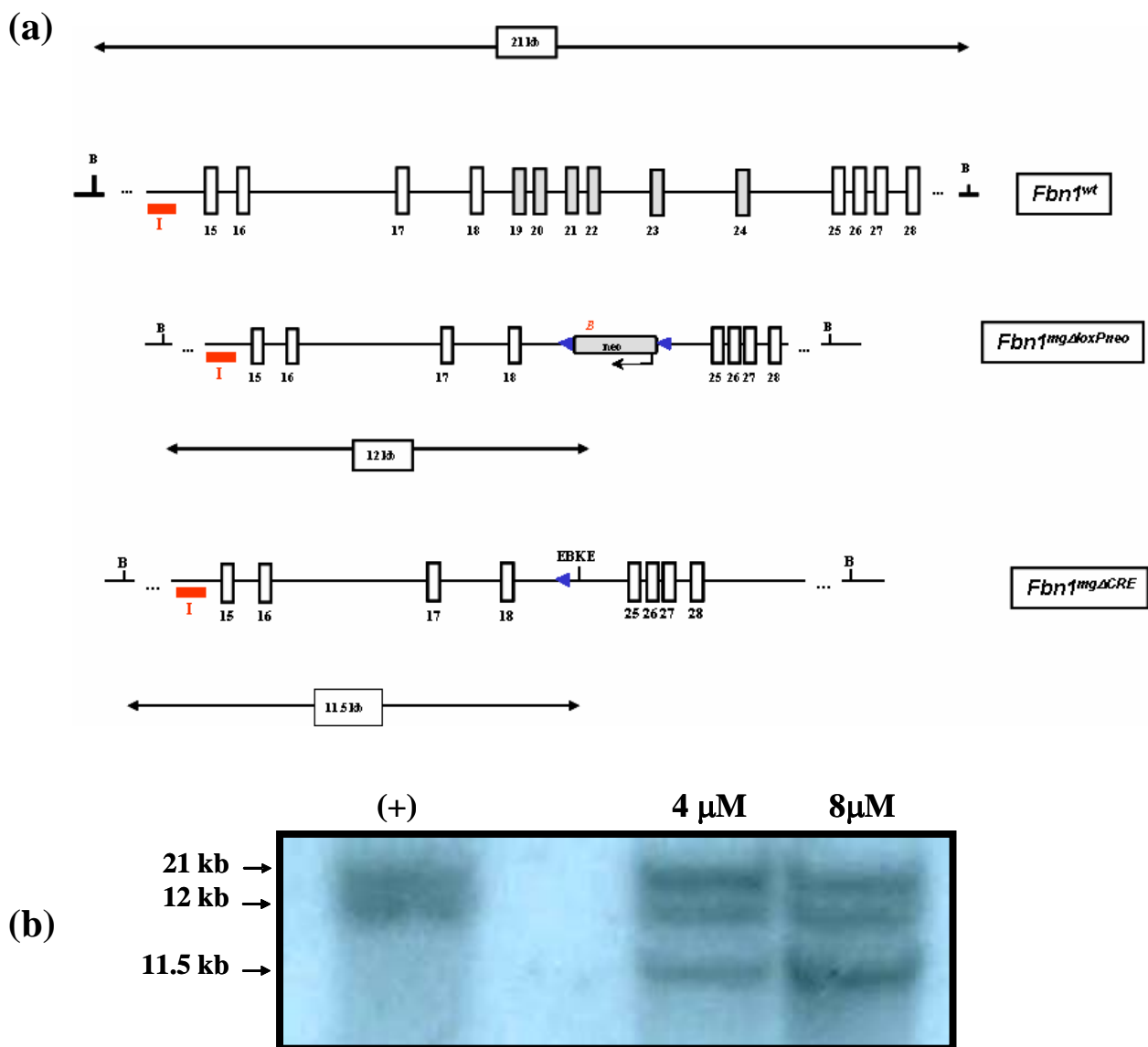


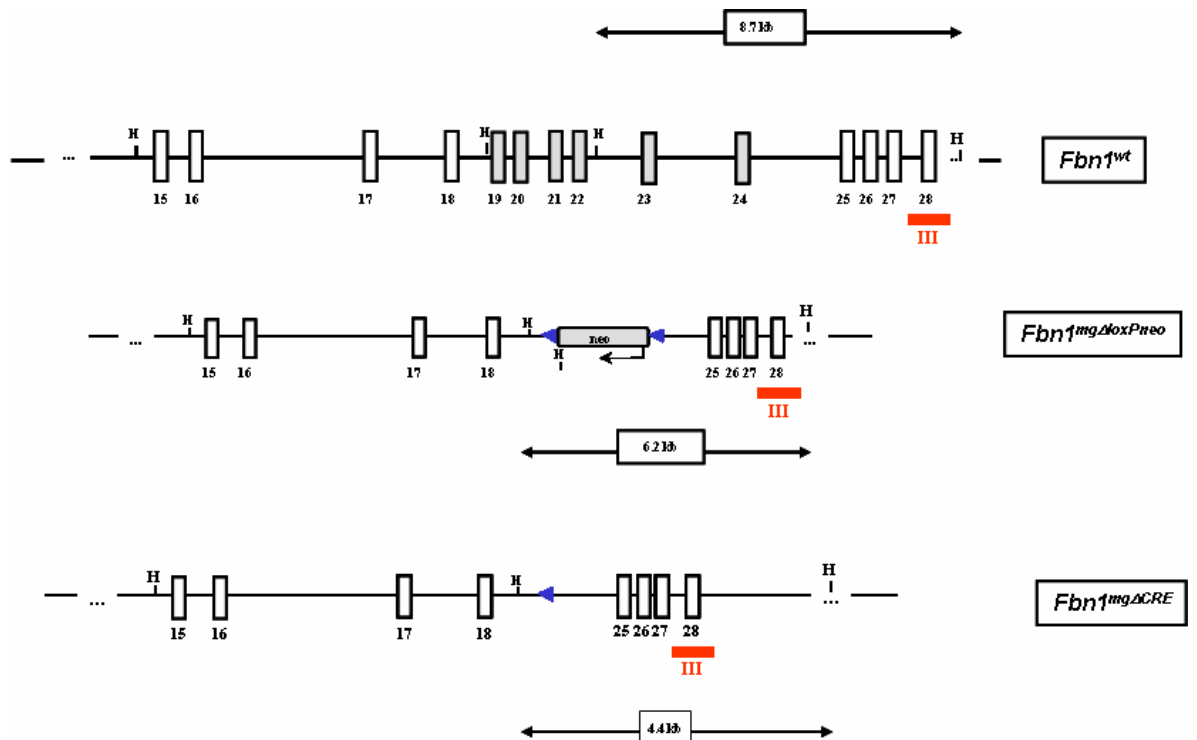
Figura 42. Análise das células tratadas com Cre. (a) Estrutura dos alelos *Fbn1* selvagem (*Fbn1^{wt}*), *Fbn1mgΔ^{loxPneo}* e *Fbn1mgΔ^{CRE}*. (b) Southern blot das amostras obtidas a partir do clone USP1/19, controle positivo, e das células USP1/19 após sofrerem a ação da proteína Cre nas concentrações 4 μM e 8 μM . Após a digestão com a enzima de restrição BamHI e marcação com a sonda I observamos bandas de 21 kb (alelo *Fbn1^{wt}*), 12 kb (alelo *Fbn1^{mgΔloxPneo}*) e 11.5 kb (alelo *Fbn1^{mgΔCRE}*).

A presença de uma banda de 12 kb nas amostras após o tratamento com Cre, demonstrou que nem todas as células ali presentes tiveram o cassete de expressão *neo* retirado. Assim sendo, foi necessário fazermos sub-cultivos destas células de forma a selecionarmos apenas as colônias onde houve a recombinação mediada pela ação da proteína Cre.

As células tratadas com 4 μ M de Cre foram plaqueadas em baixa densidade e 65 colônias foram isoladas e plaqueadas na presença e ausência de G418 para se identificar aquelas sensíveis a neomicina. Por este método, obtivemos 15 colônias que provavelmente haviam perdido o gene *neo* por meio da ação do sistema Cre-loxP.

As 15 colônias sensíveis a G418 obtidas tiveram o seu DNA analisado por Southern blot com a enzima HindIII e sonda III (Figura 43). Em 14 colônias (sc 1 a sc 14) foram observados dois fragmentos, um de 8.4 kb correspondente ao alelo normal *Fbn1*^{wt} e o outro de 4.4 kb referente ao alelo *Fbn1*^{mg Δ CRE}. Entretanto, em uma das colônias a qual denominamos sc 15, obtivemos fragmentos de 8.4 kb e 6.2 kb que correspondem aos alelos *Fbn1*^{wt} e *Fbn1*^{mg Δ loxPneo} respectivamente. Estes dados demonstram que dentre os 15 subclones obtidos, apenas o subclone 15 não perdeu o cassete *neo*. Desta forma foi possível selecionar as 14 colônias (21.5%) que haviam perdido o cassete *neo* devido ao tratamento com a proteína Cre.

(a)



(b)

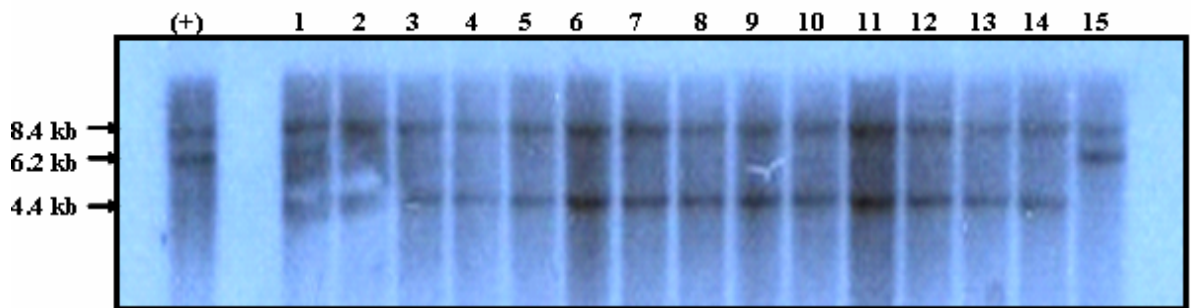


Figura 43. Análise dos subclones tratados com Cre. (a) Estrutura dos alelos *Fbn1* selvagem (*Fbn1*^{wt}), *Fbn1mg*Δ^{loxPneo} e *Fbn1mg*Δ^{CRE}. (b) Southern blot das amostras obtidas a partir dos 15 subclones tratados com 4 μM de proteína Cre. Os subclones de 1 a 14 apresentaram os fragmentos de 8.4 kb (alelo *Fbn1*^{wt}) e 4.4 kb (*Fbn1mg*Δ^{CRE}), esperados após a ação da enzima HindIII e hibridização com a sonda III (barra vermelha). O Subclone 15 apresentou uma banda de 6.2 kb (*Fbn1mg*Δ^{loxPneo}) correspondente a seqüência que ainda contém o cassete *neo*.

Os 14 subclones obtidos contendo o alelo *Fbn1*^{mg^ΔCRE} foram analisados citogeneticamente de forma a avaliar a estabilidade do número cromossômico, tendo em vista o seu uso geração de quimeras viáveis. Dentre todos os 14 subclones analisados, apenas os subclones 7, 12 e 14 apresentaram uma boa estabilidade do cariótipo, ou seja, mais de 75% das metáfases destes subclones apresentaram 40 cromossomos o que permite sua utilização no processo de agregação (Figura 44).

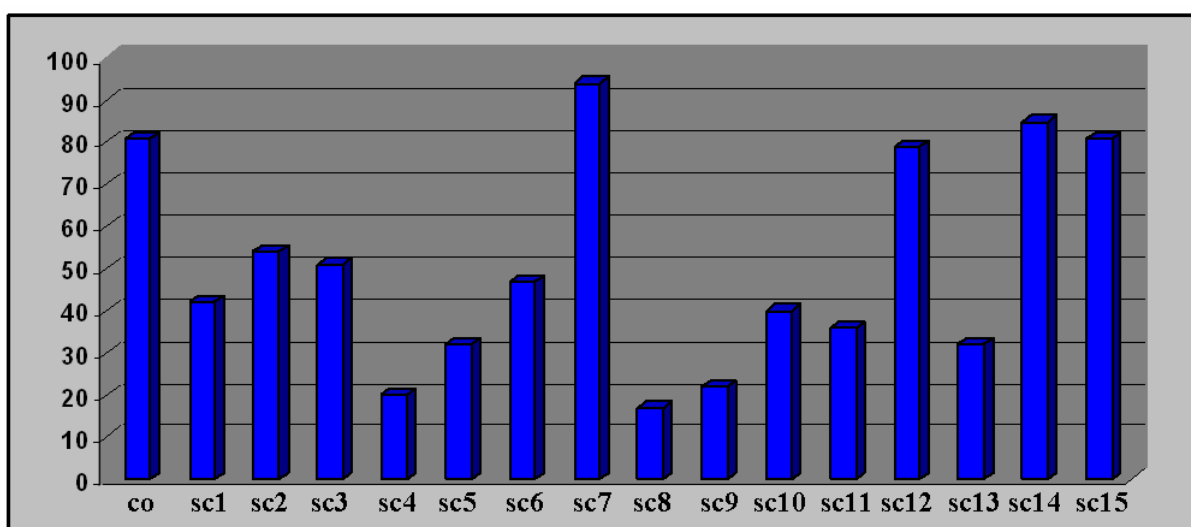


Figura 44. Análise cariotípica dos subclones tratados com Cre. Porcentagem de células com número normal de cromossomos em cada subclone obtido após o tratamento do clone USP/19 com a proteína Cre. CO: Clone original USP/19 antes do tratamento com a proteína Cre; sc: subclone.

Os subclones 7, 12, 14 e 15 juntamente com os clones USP1/19 e USP1 foram analisados quanto ao nível de expressão do alelo mutado do gene *Fbn1* em relação ao alelo normal no décimo primeiro dia de diferenciação celular por meio da técnica de PCR em tempo real. Os subclones 7 e 14 apresentaram uma maior expressão do alelo mutado em comparação ao subclone 15 e ao clone USP1/19, que apresentaram o mesmo nível de expressão daquele alelo (Figura 45).

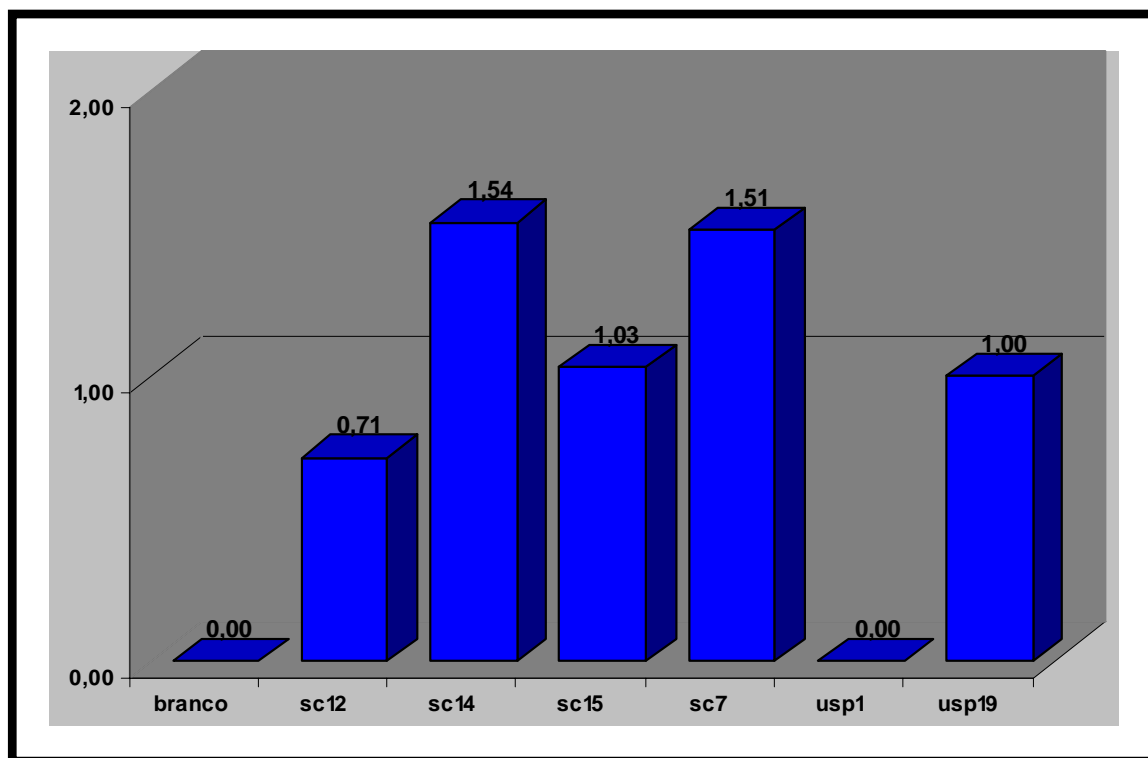


Figura 45. Análise da expressão do alelo mutado do gene *Fbn1* por PCR em tempo real. Branco: controle sem cDNA. Sc: subclone. A expressão no clone USP1/19 foi considerada 1.

V. DISCUSSÃO

A Síndrome de Marfan se caracteriza por ser uma doença multi-sistêmica do tecido conjuntivo que apresenta um alto grau de variabilidade clínica tanto intra como interfamiliar. Sendo uma patologia relativamente freqüente em humanos, que apresenta uma considerável morbidade e mortalidade especialmente devido a complicações cardiovasculares, a SMF tem sido alvo de diversos estudos tanto clínicos como moleculares.

Atualmente o animal mais utilizado para a construção de modelos experimentais para o estudo de doenças genéticas humanas é o camundongo. Tal fato se deve a sua grande semelhança, tanto a nível genético como fisiológico, com os seres humanos. Adicionalmente, o fato de ter um período curto de gestação, cerca de 20 dias, atingir a sua maturidade sexual em aproximadamente 40 dias e gerar grandes ninhadas facilita seu uso como animal experimental. Além disso, a capacidade de se manipular o genoma do camundongo faz deste o melhor modelo a ser utilizado nos dias atuais.

Diferentes técnicas vêm sendo propostas visando a obtenção de um modelo ideal para o estudo de uma determinada patologia, sendo os animais *knockout*, *knockin* e transgênicos os mais utilizados atualmente.

O presente trabalho teve como objetivo específico a geração, por meio da técnica de recombinação homóloga em células ES, de um animal experimental para a SMF no qual a interação entre a fibrilina-1 truncada e a normal resultaria, segundo o modelo dominante-negativo, em um animal com o fenótipo relacionado a patologia. Desta forma, teríamos em nosso laboratório um modelo *in vivo* para o estudo da SMF.

5.1. Recombinação homóloga em células ES

A idéia inicial deste trabalho se baseou nos dados obtidos através da geração de animais *mgΔ*, no qual a substituição dos exons 19 a 24 do gene *Fbn1* por um cassete de expressão do gene da neomicina (*neo*) resultaria na deleção em fase de 272 nucleotídeos do mRNA, produzindo desta forma uma proteína truncada. Esta, segundo o modelo dominante-negativo (Bonadio et al., 1990; Dietz et al., 1993), interagiria com a fibrilina-1 normal resultado no fenótipo. Entretanto, inesperadamente os animais *mgΔ* heterozigotos não apresentaram nenhum fenótipo. Os resultados obtidos por Northern blot mostraram uma diminuição de cerca de 10% dos níveis de mRNA em animais homozigotos. Os dados sugeriram que a redução na expressão do mRNA do alelo *Fbn1* mutante (*Fbn1^{mgΔ}*) se devesse à interferência do cassete *neo* no processamento daquele transcrito (Pereira et al., 1997; Pereira et al., 1999).

Baseado nesta hipótese, seqüências loxP foram introduzidas em ambas as extremidades do cassete *neo* no vetor de recombinação homóloga de forma a possibilitar a retirada do mesmo por meio do sistema de recombinação Cre - loxP (Sauer e Henderson, 1988; Chambers, CA, 1994), resultando teoricamente em uma maior expressão do alelo mutado. A análise por Southern blot dos 363 clones das células USP1 transfectadas, obtidos após a seleção com 350 µg/ml de G418, revelou que em dois deles ocorreu a recombinação homóloga da forma esperada.

A freqüência de recombinação homóloga neste experimento foi de 1 clone recombinante em 181 clones *neo*-resistentes, ou seja, aproximadamente 0.5% de eficiência. As freqüências descritas de recombinação homóloga em células ES variam de 0.1% a 10%, e dependem de diversos fatores, entre eles características desconhecidas do locus alvo. Um fator importante para o aumento da freqüência de recombinação homóloga é o tamanho das regiões de homologia do vetor com seqüências do gene alvo, que em conjunto devem ter pelo

menos 7-8kb (Thomas e Capecchi, 1987). O vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$ possui 10.9 kb de homologia com o gene *Fbn1*. Além disso, ele foi construído a partir de clones de DNA genômico de camundongos 129/Sv, a mesma linhagem de onde foram derivadas as células ES USP1 (Sukoyan et al., 2002). Isso elimina a existência de polimorfismos entre o vetor e o gene alvo, o que pode diminuir a frequência de recombinação homóloga.

Os vetores clássicos de recombinação homóloga possuem um elemento de seleção negativa em uma de suas extremidades, o mais comumente usado sendo um cassete de expressão do gene da timidina quinase (*tk*) (Capecchi, 1989a). A presença desse cassete permite a seleção dupla das células transfectadas com neomicina e ganciclovir, que é tóxico somente na presença da timidina quinase. Como o evento de recombinação homóloga deve eliminar o cassete *tk* na extremidade do vetor, as células recombinantes serão resistentes a ganciclovir, ao contrário daquelas onde o vetor se inseriu aleatoriamente que devem manter *tk* intacto e serem sensíveis à droga. Assim, a seleção dupla, positiva (*neo*) e negativa (*tk*), teoricamente aumenta a frequência de clones recombinantes. O vetor $mg\Delta^{loxPneo}$ não possui um elemento de seleção negativa. Optou-se por simplificar a construção do vetor omitindo a clonagem de *tk* no mesmo, e aumentar o número de colônias de células ES resistentes a neomicina analisadas. A frequência de aproximadamente 0.5% de colônias positivas demonstrou que esta estratégia é adequada e que a seleção negativa não é fundamental para se identificar colônias de células ES onde ocorreu a recombinação homóloga.

Os resultados da análise mais detalhada da estrutura dos alelos recombinantes nos dois clones mostraram que em um deles o padrão de bandas não foi o esperado, sugerindo que ocorreu um erro no processo de recombinação homóloga da extremidade 3' do mesmo. Esse resultado reforça a necessidade de se averiguar a estrutura do alelo recombinante com diversas enzimas de restrição e sondas, uma vez que a recombinação homóloga pode ocorrer

de forma diferente da prevista. De fato, a linhagem mgR foi derivada de um evento de recombinação homóloga alterado na região 3' do vetor mg Δ , que visava a substituição dos exons 18-24 de *Fbn1* pelo cassete *neo* (Pereira et al., 1999). Em vez disso, aqueles animais possuem somente a inserção de *neo* no íntron 17, sem a deleção de nenhum exon de *Fbn1* (Figura 13).

O clone USP1/19 foi analisado citogeneticamente de forma a determinarmos o grau de estabilidade do seu número cromossômico normal ($2n = 40$ cromossomos). Esta análise se faz necessária, pois anormalidades no número cromossômico das células ES estão associadas a uma diminuição na capacidade das mesmas de colonizar as células germinativas em quimeras (Longo et. al., 1997; Liu et. al., 1997). Longo e colaboradores (1997) mostraram que a instabilidade do cariótipo, e não a perda da totipotência, é a principal responsável pela baixa contribuição das células ES para a linhagem germinativa em quimeras (Longo et. al., 1997).

Após a contagem de 100 metáfases, obtivemos 81 metáfases com 40 cromossomos. Trabalhos anteriores sugerem que 50% a 60% de metáfases anormais, resultam na impossibilidade da contribuição destas células para a linhagem germinativa (Longo et. al., 1997; Suzuki et. al., 1997). Desta forma, o clone USP1/19 que apresentou 81% de metáfases mostrou ser citogeneticamente viável para a geração de quimeras.

5.2. Geração do modelo animal $mg\Delta^{loxPneo}$

O clone USP1/19 foi utilizado nos experimentos de agregação visando a obtenção de quimeras. O fato de termos utilizado o processo de agregação das células USP/19 com os blastômeros das mórulas, em vez injeção das células no blastocisto, se deve ao fato de no processo de agregação podermos trabalhar com um número maior de embriões, aumentando desta forma, a nossa chance de sucesso. Além disso, essa metodologia dispensa o uso de equipamentos mais sofisticados.

A eficiência de desenvolvimento das mórulas agregadas com as células USP1/19 em blastocistos foi de aproximadamente 66% . Já o fato de termos obtido animais quiméricos em dois experimentos em onze realizados, 18% de eficiência, se deve a diferentes fatores que podem estar influenciando no processo de obtenção das quimeras. Estes fatores podem ser identificados durante o cultivo, transferência ou/e gestação do embrião.

A degeneração do embrião pode ocorrer devido a diferentes fatores durante o cultivo, dentre os quais temos: a manipulação da mórula antes do cultivo/transferência, ou seja, excessiva exposição ao ácido Tirode para remoção da zona pelúcida; condições inadequadas de cultivo (meio de cultura contaminado ou com o pH desfavorável, temperatura instável da estufa, pouca umidade da estufa); número excessivo de células ES na agregação.

Na transferência, a degeneração do embrião pode ocorrer devido aos seguintes fatores: muito tempo de manipulação no momento da transferência; sangramento na hora de colocá-los no útero, que é considerado tóxico devido a resultar em reações imunológicas; perda dos embriões na hora de colocá-los no útero; má condição uterina devido a infecções e/ou níveis hormonais.

No que se refere à gestação, a perda pode se dar devido a problemas relacionados à receptora, assincronia entre o desenvolvimento uterino e embrionário, níveis inadequados de progesterona, fatores de estresse e por último infecções ou qualquer outra questão de saúde.

Ao todo obtivemos quatro quimeras $mg\Delta^{loxPneo}$, as quais apresentaram variações de 10%, 50%, 90% e 100% em seu quimerismo. O animal com 100% de quimerismo apresentou menor tamanho, dificuldade de locomoção, acentuado desvio na coluna (escoliose), prolongamento das patas traseiras e constante tremedeira, o que sugere que o fato da quimera ser praticamente 100% constituída de células USP1/19 resulta em um fenótipo muito grave levando à morte do animal. Em oposição a este quadro temos o animal com 10% de quimerismo, que não apresentou nenhum fenótipo aparente. Estes dados sugeriram que a mutação $mg\Delta^{loxPneo}$ se manifestaria em heterozigose.

A substituição dos exons 19 a 24 pelo cassete *neo* poderia gerar um processo de *splicing* inesperado do transcrito do gene *Fbn1*. Por meio do sequenciamento de produtos de RT-PCR dos alelos $Fbn1^{mg\Delta loxPneo}$ e $Fbn1^{wt}$ foi possível determinar que o processamento do mRNA do alelo mutante ocorreu como previsto, unindo as sequências dos exons 18 e 25 sem haver alteração no quadro de leitura. Estes dados são compatíveis com os obtidos nos animais $mg\Delta$ (Pereira et. al., 1997).

5.3. Variabilidade fenotípica

Os primeiros animais $mg\Delta^{loxPneo}$ heterozigotos não apresentaram nenhum fenótipo aparente, equivalente aos animais $mg\Delta$ (Pereira et al., 1997). No entanto, nas gerações subseqüentes foram observados alguns animais heterozigotos que apresentavam um fenótipo grave, caracterizado por deformidades na coluna. Esses animais continham diferentes contribuições dos genomas das linhagens 129/Sv (isogênica) e CD-1 (não isogênica). Essa dramática variabilidade na expressão do fenótipo nos heterozigotos poderia ser devido ao *background* genético heterogêneo dos animais. Os resultados daqueles primeiros cruzamentos sugerem que um aumento do *background* 129/Sv pode estar relacionado ao surgimento do fenótipo.

Para testar essa hipótese, o alelo *Fbn1*mg $\Delta^{loxPneo}$ foi colocado nos *backgrounds* isogênicos C57BL/6 e 129/Sv, de forma a estabelecer as linhagens congênicas C57BL/6 mg $\Delta^{loxPneo}$ e 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$.

A linhagem 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$ se caracterizou por apresentar indivíduos heterozigotos com diferentes graus de severidade no fenótipo em todas as gerações. A medida que a contribuição do genoma derivado da linhagem 129/Sv aumentou, todos os heterozigotos apresentaram o fenótipo (Figura 35). Uma das características mais marcantes em relação aos animais afetados são os diferentes níveis de escoliose que semelhante aos humanos, apresentou os graus mais característicos de média e grave, estando a primeira presente em animais graves e a segunda em animais muito graves. Outro fato de relevância é característica progressiva da escoliose em todos os animais afetados estando mais bem definida nos animais heterozigotos graves. Nestes, a expressão do fenótipo tem seu início determinado com cerca de cinco meses estando definitivamente estabelecido com oito meses de vida. Assim, os animais 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$ são um modelo animal para o estudo da progressão das manifestações ósseas da SMF, onde poderão ser estudados fatores que controlam o crescimento ósseo.

Diferentemente dos animais mg Δ (Pereira et. al., 1997) e mgR (Pereira et. al., 1999), o modelo 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$ expressa o fenótipo nos heterozigotos, melhor reproduzindo o que acontece na SMF. Além disso, os animais 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$ homozigotos, diferentemente dos modelos mg Δ e mgR, não nascem com a frequência esperada, o que indica que a mutação em homozigose é letal no período pré e neo-natal. Essa diferença entre os fenótipos dos animais mg Δ e 129/Sv mg $\Delta^{loxPneo}$ foi surpreendente, uma vez que os respectivos alelos mutantes diferem somente pela presença de duas sequências loxP flanqueando o cassete *neo* no último modelo. Porém, o alelo *Fbn1*^{mg Δ} está no *background* C57BL/6, e nunca foi colocado no *background* 129/Sv. A variabilidade de fenótipos de camundongos *knockout* em diferentes

backgrounds isogênicos está bem documentada, e pode ser a causa da diferença observada entre os dois modelos (Threadgill et. al., 1995; Rozmahl et.al., 1996). De fato, como o modelo $mg\Delta$, a linhagem C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ não apresentou fenótipo detectável nos heterozigotos.

A variabilidade do fenótipo dos heterozigotos entre as duas linhagens congênicas $mg\Delta^{loxPneo}$ reproduz a variabilidade intra-familiar observada na SMF, onde a mesma mutação pode causar quadros clínicos distintos dentro de uma família. Essa variabilidade intra-familiar indica a existência de genes modificadores do fenótipo da SMF.

A expressão diferenciada, em modelos murinos, de um determinado fenótipo em *backgrounds* distintos, está diretamente relacionada à atuação de genes modificadores, os quais podem modular a penetrância, dominância, pleiotropia ou expressividade dos genes. Os efeitos fenotípicos resultantes desta interação entre genes podem ser classificados como mais ou menos severos, novos, inalterados ou epistáticos (Nadeau, 2001; Nadeau, 2003). A diferença de fenótipos entre os animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ e C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ se deve provavelmente a diferenças no genoma de ambas as linhagens, causadas pela distância genética existente entre elas (Beck et. al., 2000). Vale ressaltar que análises mais detalhadas dos animais C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ podem revelar fenótipos não detectados pelas análises superficiais realizadas. Mesmo assim, estes resultados indicam que no *background* isogênico C57BL/6 existam alelos atenuantes do fenótipo Marfan.

A pesquisa de genes modificadores visa identificar um conjunto de genes cujos alelos são responsáveis pela modulação quantitativa de um fenótipo conferido por uma mutação monogênica. Dadas as dificuldades de se desenvolver esses estudos em humanos, modelos animais são ferramentas fundamentais para a identificação desses fatores. Assim, fatores genéticos identificados em camundongos podem fornecer genes candidatos ao estudo em humanos ou, ao menos, indicar vias metabólicas e de processos fisiológicos que tenham uma probabilidade importante de serem conservadas entre as duas espécies (Panthier, 2003).

Os resultados aqui descritos mostram claramente uma diferença na expressão do fenótipo patológico entre as linhagens C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ e 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$. Assim, essas duas linhagens são modelos adequados para a identificação de genes modificadores do fenótipo da SMF.

Alguns candidatos a genes modificadores incluem o próprio gene *Fbn1* e genes envolvidos nas vias de sinalização do TGF- β . Judge e colaboradores (2004) demonstraram em camundongos transgênicos que a expressão de altos níveis de fibrilina-1 normal revertiam o efeito fenotípico de uma mutação no gene *Fbn1*, indicando um papel importante da haploinsuficiência na patogênese da SMF (Judge et al., 2004). Assim, podemos levantar a hipótese de que diferentes níveis de expressão do gene *Fbn1* nas as linhagens C57BL/6 e 129/Sv possam estar envolvidos na variabilidade do fenótipo entre as duas linhagens.

Finalmente, Neptune et al. (2003) identificaram um papel importante da fibrilina-1 na regulação dos níveis de TGF- β livre na matriz do pulmão do modelo $mg\Delta$, o que levava à desregulação de sinalização por esta molécula e apoptose naquele órgão nos animais mutantes. Consistente com estas observações no camundongo, recentemente foram identificadas mutações causadoras da SMF nos genes *TGFBR1* e *TGFBR2*, codificadores dos receptores TGF- β 1 e TGF- β 2, do fator de transcrição TGF- β (Mizuguchi et al., 2004; Loeys et al., 2005). Em conjunto, esses trabalhos abrem novas perspectivas para o envolvimento de diferentes mecanismos de patogêneses envolvidos na SMF, que podem ser testados nos modelos animais $mg\Delta^{loxPneo}$.

5.4. Achados histológicos

Apesar de preliminar, a análise histológica da aorta não detectou anormalidades em dois animais heterozigotos (um com o fenótipo grave e o outro muito grave). Pacientes com a SMF apresentam lesões focais na camada média da aorta, caracterizada por fragmentação das

fibras elásticas e diminuição da quantidade de elastina. Achados similares foram encontrados na aorta de animais $mg\Delta$ (Pereira et al., 1997) e, mais recentemente, em um outro modelo animal para SMF contendo uma mutação missense que leva à substituição da cisteína na posição 1039 por uma glicina (C1039G) (Judge et al., 2004). Esse modelo manifesta a doença em heterozigose, apresentando um fenótipo ósseo e vascular. Porém, além do fenótipo ósseo ser mais leve do que o do modelo 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$, o modelo C1039G tem sobrevida normal. Será importante realizar uma análise mais detalhada dos vasos dos animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$, que em geral apresentam um fenótipo mais grave do que os C1039G. É interessante notar que a mutação C1039G se encontra no *background* C57BL/6.

A análise histológica do pulmão de dois animais heterozigotos 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ com fenótipo muito grave e grave sacrificados três meses após o nascimento mostrou a presença de grandes alterações compatíveis com um quadro de enfisema. Dados semelhantes foram obtidos em um animal heterozigoto 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ com o fenótipo grave sacrificado com oito meses. Neste, constatou-se também a presença de células inflamatórias e/ou deposição de material róseo e amorfo, assemelhando-se a fibrose.

A patogênese do enfisema pulmonar ainda é motivo de discussão e está baseada em duas hipóteses. A primeira hipótese conhecida como protease/antiprotease, envolve um processo inflamatório inicial seguido de um mecanismo de reparo anormal do parênquima pulmonar (Shapiro et al., 1995). Na segunda hipótese, a apoptose de células do parênquima pulmonar é considerada como a causa primária no enfisema pulmonar (Kasahara et al., 2000). Essa questão pode ser investigada nos animais $mg\Delta^{loxPneo}$.

Os resultados da análise histológica do pulmão dos animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$ mostrou que as alterações são semelhantes àquelas observadas nos animais homozigotos $mg\Delta$ e mgR (Neptune et al., 2003), porém mais graves. Neptune et al. (2003) demonstraram que as

alterações pulmonares nos animais $mg\Delta$ e mgR estão associadas a um aumento de TGF- β ativo na matriz daquele órgão, o que por sua vez parece ser causado por uma menor quantidade de fibrilina-1 presente na matriz extracelular.

Através da administração de anticorpos anti-TGF- β *in útero* em fêmeas grávidas, os autores conseguiram reverter o fenótipo pulmonar na prole. Os resultados mostraram que a deficiência de fibrilina-1 normal pode levar a alterações no desenvolvimento pulmonar através de um mecanismo alterado de ativação e sinalização do fator de crescimento TGF- β (Neptune et al., 2003). Será interessante averiguar se a estratégia de neutralização de TGF- β ativo terá o mesmo efeito terapêutico nos animais heterozigotos $mg\Delta^{loxPneo}$, que são um modelo dominante da SMF mais próximos da doença em humanos.

5.5. Alelo $Fbn1^{mgCRE}$

A construção do vetor de recombinação homóloga $mg\Delta^{loxPneo}$ partiu da premissa que a presença do cassete *neo* no intron 18 do gene *Fbn1* de alguma forma interferia no processamento do seu mRNA levando à baixa expressão do alelo mutado, e que a eliminação desse cassete restauraria o nível de expressão deste (Pereira et al., 1997; Pereira et al., 1999). Para isso, as células USP1/19 foram tratadas com a proteína Cre dando origem a 15 subclones onde o cassete *neo* foi eliminado.

A análise citogenética dos subclones identificou aqueles que possuíam uma grande proporção de células com número cromossômico normal [subclones 7 (94%), 12 (79%) e 14 (85%)]. Todos eles foram capazes de formar corpos embrióides complexos após 8 dias de diferenciação *in vitro*. Em conjunto, esses dados indicam que esses subclones são adequados para a geração de quimeras.

A expressão dos alelos $mg\Delta^{loxPneo}$ e $mg\Delta^{CRE}$ foi comparada nos clones de células ES heterozigotos para cada alelo. Como o gene *Fbn1* não se expressa em células ES

indiferenciadas, a diferenciação dessas foi induzida através da formação de corpos embrióides. Tendo em vista o fato da população celular presente nesses corpos não ser homogênea, ou seja, em um clone pode ter ocorrido a diferenciação de 70% das células enquanto em outro ocorreu uma diferenciação de 40%, utilizou-se o alelo normal do gene *Fbn1* como normalizador. Desta forma, apenas as células que estão expressando a fibrilina-1 foram incluídas na análise. Os resultados do PCR em tempo real mostraram que após a eliminação de *neo* pela recombinação mediada por Cre, o nível de expressão do alelo mutado aumentou em aproximadamente 50% em células diferenciadas de dois subclones recombinantes, confirmando *in vitro* aquela hipótese.

Apesar do alelo *Fbn1*^{mgAloxPneo}, contendo *neo* no intron 18, exercer um efeito dominante-negativo causando um fenótipo grave quando em heterozigose nos animais 129/Sv, nos animais C57BL/6 heterozigotos ele não parece ter nenhum efeito fenotípico, como era esperado. Nesses animais, a eliminação do cassete *neo* por recombinação mediada por Cre poderá levar a uma maior expressão do alelo mutado, como demonstrado *in vitro*, e ao surgimento de fenótipos nos heterozigotos. Esse sistema permitirá também a indução da recombinação mediada por Cre em tecidos específicos, através do cruzamento do modelo C57BL/6 mgΔ^{loxPneo} com animais transgênicos com expressão tecido-específica de Cre (uma lista desses animais pode ser acessada em <http://nagy.mshri.on.ca/PubLinks/indexmain.php>). Assim, os diferentes fenótipos associados àquela mutação no gene *Fbn1* poderão ser estudados separadamente nos modelos animais. Isso pode ser particularmente interessante para o estudo da progressão prolongada das manifestações ósseas sem envolvimento cardiovascular ou pulmonar.

VI. CONCLUSÕES

- Através da recombinação homóloga em células ES, foi gerado um modelo animal dominante para a SMF, $mg\Delta^{loxPneo}$, que apresenta manifestações ósseas e pulmonares da síndrome nos heterozigotos. Este é um modelo adequado para o estudo da progressão dessas manifestações e para o teste de novas estratégias terapêuticas para a SMF;
- Em contraste com animais 129/Sv $mg\Delta^{loxPneo}$, animais C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$ não apresentam fenótipo, reproduzindo assim a variabilidade clínica intra-familiar característica da SMF. Isso torna o modelo $mg\Delta^{loxPneo}$ um sistema experimental adequado para a identificação de genes modificadores do fenótipo Marfan;
- A eliminação de *neo* do alelo $Fbn1^{mg\Delta loxPneo}$ leva ao aumento de expressão desse, e poderá ser induzida em tecidos específicos nos animais C57BL/6 $mg\Delta^{loxPneo}$, permitindo a análise de fenótipos isolados.

VII. REFERÊNCIAS

Abraham, P. A., Perejda, A.J., Carnes, W.H., and Uitto, J. Marfan syndrome. Demonstration of abnormal elastin in aorta. . J. Clin. Invest. 1982, 70, 1245

Ades LC, Holman KJ, Brett MS, Edwards MJ, Bennetts B. Ectopia lentis phenotypes and the FBN1 gene. Am J Med Genet A. 2004 Apr 30;126(3):284-9. Review.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K e Watson JD. Biologia Molecular da Célula 3ª ed. (Artes Médicas)

Alper J. Stem cells profile. A man in a hurry. Science. 1999 Mar 5;283(5407):1434-5.

Alvarez J, Serra R. Unique and redundant roles of Smad3 in TGF-beta-mediated regulation of long bone development in organ culture. Dev Dyn. 2004 Aug;230(4):685-99.

Appel, A., Horwitz, A.L., and Dorfman, A. . Cell-free synthesis of hyaluronic acid in Marfan syndrome. J. Biol. Chem, 1979. 254, 12199.

Baumgartner WA, Cameron DE, Redmond JM, Greene PS, Gott VL. Operative management of Marfan syndrome: The Johns Hopkins experience. Ann Thorac Surg. 1999 Jun;67(6):1859-60; discussion 1868-70.

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM. Genealogies of mouse inbred strains. Nat Genet. 2000 Jan;24(1):23-5.

Beighton P, de Paepe A, Danks D, Finidori G, Gedde-Dahl T, Goodman R, Hall JG, Hollister DW, Horton W, McKusick VA, et al. International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue, Berlin, 1986. Am J Med Genet. 1988 Mar;29(3):581-94.

Besser TE, Potter KA, Bryan GM, Knowlen GG. An animal model of the Marfan syndrome. Am J Med Genet. 1990 Sep;37(1):159-65.

Biery NJ, Eldadah ZA, Moore CS, Stetten G, Spencer F, Dietz HC. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. Genomics. 1999 Feb 15;56(1):70-7.

Bonadio J, Saunders TL, Tsai E, Goldstein SA, Morris-Wiman J, Brinkley L, Dolan DF, Altschuler RA, Hawkins JE Jr, Bateman JF, et al. Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Sep;87(18):7145-9.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature. 1984 May 17-23;309(5965):255-6.

Boerger, F. : Ueber zwei Falle von Arachnodaktylie. Z. Kinderheilk. 12: 161-184, 1914.

- Boileau C, Jondeau G, Babron MC, Coulon M, Alexandre JA, Sakai L, Melki J, Delorme G, Dubourg O, Bonaiti-Pellie C, et al. Autosomal dominant Marfan-like connective-tissue disorder with aortic dilation and skeletal anomalies not linked to the fibrillin genes. *Am J Hum Genet.* 1993 Jul;53(1):46-54.
- Boileau C, Jondeau G, Mizuguchi T, Matsumoto N. Molecular genetics of Marfan syndrome. *Curr Opin Cardiol.* 2005 May;20(3):194-200. Review.
- Buoni S, Zannolli R, Macucci F, Ansaldi S, Grasso M, Arbustini E, Fois A. The FBN1 (R2726W) mutation is not fully penetrant. *Ann Hum Genet.* 2004 Nov;68(Pt 6):633-8.
- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989a Mar;5(3):70-6.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 1989b Jun 16;244(4910):1288-92.
- Chambers CA. TKO'ed: lox, stock and barrel. *Bioessays.* 1994 Dec;16(12):865-8.
- Collod G, Babron MC, Jondeau G, Coulon M, Weissenbach J, Dubourg O, Bourdarias JP, Bonaiti-Pellie C, Junien C, Boileau C. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):264-8.
- Collod-Beroud G, Le Bourdelles S, Ades L, Ala-Kokko L, Booms P, Boxer M, Child A, Comeglio P, De Paepe A, Hyland JC, Holman K, Kaitila I, Loeys B, Matyas G, Nuytinck L, Peltonen L, Rantamaki T, Robinson P, Steinmann B, Junien C, Beroud C, Boileau C. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. 2003 *Hum Mutat.* Sep;22(3):199-208.
- Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics.* 2004 Mar;83(3):461-72.
- Davis CG. The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol.* 1990 May;2(5):410-9. Review.
- De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet.* 1996 Apr 24;62(4):417-26.
- Dietz HC, Pyeritz RE, Hall BD, Cadle RG, Hamosh A, Schwartz J, Meyers DA, Francomano CA. The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15-q21.3. *Genomics.* 1991a Feb;9(2):355-61.
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991b Jul 25;352(6333):337-9.

- Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, Corson GM, Chalberg SC, Pyeritz RE, Francomano CA. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics*. 1993 Aug;17(2):468-75.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
- Faivre L, Dollfus H, Lyonnet S, Alembik Y, Megarbane A, Samples J, Gorlin RJ, Alswaid A, Feingold J, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. Clinical homogeneity and genetic heterogeneity in Weill-Marchesani syndrome. *Am J Med Genet A*. 2003a Dec 1;123(2):204-7.
- Faivre L, Gorlin RJ, Wirtz MK, Godfrey M, Dagonneau N, Samples JR, Le Merrer M, Collod-Beroud G, Boileau C, Munnich A, Cormier-Daire V. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal dominant Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet*. 2003b Jan;40(1):34-6.
- Fedorov LM, Haegel-Kronenberger H, Hirchenhain J. A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res*. 1997 May;6(3):223-31.
- Fourie DT, Colyn EL, Van der Vyver JD, Tunnessen WW Jr. Picture of the month. Infantile Marfan syndrome. *Am J Dis Child*. 1993 Mar;147(3):313-4.
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):9065-9.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Dec;77(12):7380-4.
- Goto Y, Takagi N. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse. *Development*. 1998 Sep;125(17):3353-63.
- Gott VL, Cameron DE, Pyeritz RE, Gillinov AM, Greene PS, Stone CD, Alejo DE, McKusick VA. Composite graft repair of Marfan aneurysm of the ascending aorta: results in 150 patients. *J Card Surg*. 1994 Sep;9(5):482-9.
- Gott VL, Greene PS, Alejo DE, Cameron DE, Naftel DC, Miller DC, Gillinov AM, Laschinger JC, Pyeritz RE. Replacement of the aortic root in patients with Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 1999 Apr 29;340(17):1307-13.
- Green MC, Sweet HO and Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1975, 82:493-512
- Hardouin SN, Nagy A. Mouse models for human disease. *Clin Genet*. 2000 Apr;57(4):237-44.
- Hoess RH, Abremski K. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Mol Biol*. 1985 Feb 5;181(3):351-62.

- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. and Lacy, E. manipulating the mouse Embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY., 1994
- Hollister DW, Godfrey M, Sakai LY, Pyeritz RE. Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome. *N Engl J Med.* 1990 Jul 19;323(3):152-9.
- Hutchinson S, Furger A, Halliday D, Judge DP, Jefferson A, Dietz HC, Firth H, Handford PA. Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype? *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 15;12(18):2269-76. Epub 2003 Jul 22.
- Illmensee K, Hoppe PC, Croce CM. Chimeric mice derived from human-mouse hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Apr;75(4):1914-8.
- Illmensee K, Stevens LC. Teratomas and chimeras. *Sci Am.* 1979 Apr;240(4):120-32.
- Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Apr;71(4):1250-4.
- Jaenisch R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Apr;73(4):1260-4.
- Jones KB, Sponseller PD, Hobbs W, Pyeritz RE. Leg-length discrepancy and scoliosis in Marfan syndrome. *J Pediatr Orthop.* 2002 Nov-Dec;22(6):807-12.
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(2):172-81.
- Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, Kaitila I, Peltonen L. Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *N Engl J Med.* 1990 Oct 4;323(14):935-9.
- Karttunen L, Ukkonen T, Kainulainen K, Syvanen AC, Peltonen L. Two novel fibrillin-1 mutations resulting in premature termination codons but in different mutant transcript levels and clinical phenotypes. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S34-7.
- Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106(11):1311-9.
- Kelly D, Scholtz B, Orten DJ, Hinrichs SH, Rizzino A. Regulation of the transforming growth factor-beta 2 gene promoter in embryonal carcinoma cells and their differentiated cells: differential utilization of transcription factors. *Mol Reprod Dev.* 1995 Feb;40(2):135-45.
- Khillan JS, Bao Y. Preparation of animals with a high degree of chimerism by one-step coculture of embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Biotechniques.* 1997 Mar;22(3):544-9.

Kielty CM, Sherratt MJ, Marson A, Baldock C. Fibrillin microfibrils. *Adv Protein Chem.* 2005;70:405-36. Review.

Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature.* 1991 Jul 25;352(6333):330-4.

Li X, Pereira L, Zhang H, Sanguineti C, Ramirez F, Bonadio J, Francke U. Fibrillin genes map to regions of conserved mouse/human synteny on mouse chromosomes 2 and 18. *Genomics.* 1993 Dec;18(3):667-72.

Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Disteché CM, Bornstein P, Jaenisch R. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn.* 1997 May;209(1):85-91.

Loeys B, De Backer J, Van Acker P, Wettinck K, Pals G, Nuytinck L, Coucke P, De Paepe A. Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *2004 Hum Mutat.* Aug;24(2):140-6.

Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005 Mar;37(3):275-81. Epub 2005 Jan 30.

Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res.* 1997 Sep;6(5):321-8.

Maclean N. *Animals with novel Genes*, 1^a ed. (Cambridge University Press.)

Marfan AB. La dolichosténomélie (dolichomélie arachnodactylie). *Ann. Méd.* 44:5-29.

Marfan AB. Un cas de déformation congénitale des quatre membres plus prononcée aux extrémités caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Bull. Mém. Sci. Méd. Hop. Paris.* 1896; (Ser. 3) 13:220-226.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-8.

Maslen CL, Corson GM, Maddox BK, Glanville RW, Sakai LY. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature.* 1991 Jul 25;352(6333):334-7.

Manusov EG, Martucci E. The Marfan syndrome. An underdiagnosed killer. *Arch Fam Med.* 1994 Sep;3(9):822-6.

McKusick VA. *Heritable Disorders of Connective Tissue*. 1st ed. CV Mosby. St Louis, 1956.

Milewicz DM, Grossfield J, Cao SN, Kielty C, Covitz W, Jewett T. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2373-8.

Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Furukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2004 Aug;36(8):855-60. Epub 2004 Jul 4.

Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, McKusick VA. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med.* 1972 Apr 13;286(15):804-8.

Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar;2(3):165-74. Review.

Nadeau JH. Modifier genes and protective alleles in humans and mice. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Jun;13(3):290-5. Review.

Nagase T, Kikuno R, Hattori A, Kondo Y, Okumura K, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2000 Dec 31;7(6):347-55.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8424-8.

Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):407-11. Epub 2003 Feb 24.

Ng CM, Cheng A, Myers LA, Martinez-Murillo F, Jie C, Bedja D, Gabrielson KL, Hausladen JM, Mecham RP, Judge DP, Dietz HC. TGF-beta-dependent pathogenesis of mitral valve prolapse in a mouse model of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(11):1586-92.

Nijbroek G, Sood S, McIntosh I, Francomano CA, Bull E, Pereira L, Ramirez F, Pyeritz RE, Dietz HC. Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul;57(1):8-21.

Orimo A, Tominaga N, Suzuki M, Kawakami T, Kuno J, Sato M, Minowa O, Inoue S, Kato S, Noda T, Muramatsu M. Successful germ-line transmission of chimeras generated by coculture aggregation with J1 ES cells and eight-cell embryos. *Anal Biochem.* 1999 Apr 10;269(1):204-7.

Panthier, J.J., Montagutelli, X, Guénet, J. L. Les Organismes modèles Genetique de la souris. Ed. BELIN. 2003. 283pp.

Palz M, Tiecke F, Booms P, Goldner B, Rosenberg T, Fuchs J, Skovby F, Schumacher H, Kaufmann UC, von Kodolitsch Y, Nienaber CA, Leitner C, Katzke S, Vetter B, Hagemeyer C, Robinson PN. 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 Mar 20;91(3):212-21.

Pearson H. Surviving a knockout blow. *Nature.* 2002 Jan 3;415(6867):8-9.

Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4489-94. Epub 2002 Mar 19.

Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F, Lynch JR, Sykes B, Pangilinan T, Bonadio J. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet.* 1993 Oct;2(10):1762.

Pereira L, Levrán O, Ramirez F, Lynch JR, Sykes B, Pyeritz RE, Dietz HC. A molecular approach to the stratification of cardiovascular risk in families with Marfan's syndrome. *N Engl J Med.* 1994 Jul 21;331(3):148-53.

Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, Lee SY, Keene DR, Ono R, Reinhardt DP, Sakai LY, Biery NJ, Bunton T, Dietz HC, Ramirez F. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet.* 1997 Oct;17(2):218-22.

Pereira L, Lee SY, Gayraud B, Andrikopoulos K, Shapiro SD, Bunton T, Biery NJ, Dietz HC, Sakai LY, Ramirez F. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3819-23.

Prelle K, Zink N, Wolf E. Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol.* 2002 Jun;31(3):169-86.

Pearson H. Surviving a knockout blow. *Nature.* 2002 Jan 3;415(6867):8-9.

Pyeritz RE, McKusick VA. The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med.* 1979 Apr 5;300(14):772-7.

Pyeritz RE. The Marfan syndrome. *Annu Rev Med.* 2000;51:481-510.

Ramirez F, Pereira L. The fibrillins. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Feb;31(2):255-9.

Reinhardt DP, Ono RN, Notbohm H, Muller PK, Bachinger HP, Sakai LY. Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome.

Revencu N, Quenum G, Demaille T, Verellen G, De Paepe A, Verellen-Dumoulin C. Congenital diaphragmatic eventration and bilateral uretero-hydronephrosis in a patient with neonatal Marfan syndrome caused by a mutation in exon 25 of the FBN1 gene and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2004 Jan;163(1):33-7. Epub 2003 Oct 30.

Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, Moore A, Forstner J, Durie P, Nadeau J, Bear C, Tsui LC. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):280-7. Erratum in: *Nat Genet* 1996 May;13(1):129.

Saito S, Nishimura H, Brumeanu TD, Casares S, Stan AC, Honjo T, Bona CA. Characterization of mutated protein encoded by partially duplicated fibrillin-1 gene in tight skin (TSK) mice. *Mol Immunol.* 1999 Feb;36(3):169-76.

Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 1):2499-509.

Sambrook, J., Fritsch, EF and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5166-70.

Shapiro SD. The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later. *Proc Assoc Am Physicians.* 1995 Oct;107(3):346-52. Review.

Shores J, Berger KR, Murphy EA, Pyeritz RE. Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term beta-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N Engl J Med.* 1994 May 12;330(19):1335-41.

Schrijver I, Liu W, Odom R, Brenn T, Oefner P, Furthmayr H, Francke U. Premature termination mutations in FBN1: distinct effects on differential allelic expression and on protein and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2002 Aug;71(2):223-37. Epub 2002 Jun 14.

Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet.* 2004 Feb;20(2):59-62. Review.

Serra R, Karaplis A, Sohn P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 1999 May 17;145(4):783-94.

Silverman DI, Burton KJ, Gray J, Bosner MS, Kouchoukos NT, Roman MJ, Boxer M, Devereux RB, Tsipouras P. Life expectancy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* 1995 Jan 15;75(2):157-60.

Singleton AC, Mitchell AL, Byers PH, Potter KA, Pace JM. Bovine model of Marfan syndrome results from an amino acid change (c.3598G > A, p.E1200K) in a calcium-binding epidermal growth factor-like domain of fibrillin-1. *Hum Mutat.* 2005 Apr;25(4):348-52.

Smallridge RS, Whiteman P, Werner JM, Campbell ID, Handford PA, Downing AK. Solution structure and dynamics of a calcium binding epidermal growth factor-like domain pair from the neonatal region of human fibrillin-1. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):12199-206. Epub 2003 Jan 2.

- Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1468-70.
- Sponseller, P. D.; Hobbs, W.; Riley, L. H., III; Pyeritz, R. E. The thoracolumbar spine in Marfan syndrome. *J. Bone Joint Surg.* 77-A: 867-876, 1995.
- Stacey A, Bateman J, Choi T, Mascara T, Cole W, Jaenisch R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro-alpha 1(I) collagen gene. *Nature*. 1988 Mar 10;332(6160):131-6.
- Sukoyan MA, Kerkis AY, Mello MR, Kerkis IE, Visintin JA, Pereira LV. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2002 May;35(5):535-42.
- Suzuki H, Kamada N, Ueda O, Jishage K, Kurihara Y, Kurihara H, Terauchi Y, Azuma S, Kadowaki T, Kodama T, Yazaki Y, Toyoda Y. Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and in vitro differentiation ability. *Exp Anim*. 1997 Jan;46(1):17-23.
- Svensson LG, Crawford ES, Coselli JS, Safi HJ, Hess KR. Impact of cardiovascular operation on survival in the Marfan patient. *Circulation*. 1989 Sep;80(3 Pt 1):I233-42.
- Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H, Buckingham M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev Dyn*. 1996 Jul;206(3):291-300.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987 Nov 6;51(3):503-12.
- Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*. 1989 Jan 27;56(2):313-21.
- Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mouton T, Herrup K, Harris RC, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*. 1995 Jul 14;269(5221):230-4.
- Tiecke F, Katzke S, Booms P, Robinson PN, Neumann L, Godfrey M, Mathews KR, Scheuner M, Hinkel GK, Brenner RE, Hovels-Gurich HH, Hagemeyer C, Fuchs J, Skovby F, Rosenberg T. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. *Eur J Hum Genet*. 2001 Jan;9(1):13-21.
- Tsipouras P, Sarfarazi M, Devi A, Weiffenbach B, Boxer M. Marfan syndrome is closely linked to a marker on chromosome 15q1.5---q2.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15;88(10):4486-8.
- Yin W, Smiley E, Germiller J, Sanguineti C, Lawton T, Pereira L, Ramirez F, Bonadio J. Primary structure and developmental expression of Fbn-1, the mouse fibrillin gene. *J Biol Chem*. 1995 Jan 27;270(4):1798-806.

- Vogel G. Harnessing the power of stem cells. *Science*. 1999a Mar 5;283(5407):1432-4.
- Vogel G. Mice cloned from cultured stem cells. *Science*. 1999b Dec 24;286(5449):2437.
- Wave H. Über Arachnodaktylie. (Dystrophia mesodermmalis congenital, Typus Marfan). *Arch. Augenheilkd.* 104:1-46.
- Wheeler VS. Gene therapy: current strategies and future applications. *Oncol Nurs Forum*. 1995 Mar;22(2 Suppl):20-6. Review.
- Wight DC, Wagner TE. Transgenic mice: a decade of progress in technology and research. *Mutat Res*. 1994 Jun 1;307(2):429-40.
- Wong GT. Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides*. 2002 Apr-Jun;36(2-3):230-6.
- Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, Davis EC, Sanguineti C, Bonadio J, Mecham RP, Ramirez F. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol*. 1994 Mar;124(5):855-63.
- Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*. 1995 May;129(4):1165-76.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)