



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Modulação do design animal: função dos alvos do Hoxd13 no desenvolvimento dos membros nos vertebrados.

Carla Vanessa Alves Beviano

Orientação: Doutora Renata Freitas

Doutor Paulo de Oliveira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Modulação do design animal: função dos alvos do Hoxd13 no desenvolvimento dos membros nos vertebrados.

Carla Vanessa Alves Beviano

Orientação: Doutora Renata Freitas

Doutor Paulo de Oliveira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

Esta dissertação foi realizada no âmbito do projeto EXPL/BEX-BID/0801/2013FCOMP-01-0124-FEDER-041095 , cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e do Fundo Europeu do Desenvolvimento Regional (FEDER) através do programa COMPETE.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta etapa do meu percurso acadêmico, não podia deixar de expressar a minha gratidão a todas as pessoas que, direta ou indiretamente me ajudaram e tornaram possível a elaboração deste trabalho.

A todos os docentes do 2º Ciclo em Bioquímica, pelo conhecimento transmitido e competências adquiridas que contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e científica.

À coordenação do 2º ciclo em Bioquímica, na pessoa do Professor Doutor Rui Ferreira, por terem aceitado o plano de trabalho aqui apresentado.

Ao Instituto de Biologia Molecular e Celular, o meu sincero agradecimento pela disponibilização dos meios necessários à realização desta dissertação, pelo acolhimento e apoio prestados.

Gostaria de agradecer especialmente à minha orientadora, Doutora Renata Freitas, por me ter aceite como sua orientanda, por ter acreditado em mim e por todos os conhecimentos transmitidos quer a nível profissional quer a nível pessoal. Agradeço todo o apoio e incentivo ao longo deste ano de trabalho, pela prontificação para esclarecer todas as minhas dúvidas e questões, por ter sido incansável e se ter tornado uma referência para mim. Obrigada por ter sido a minha ORIENTADORA a todos os níveis.

Ao meu coorientador, o Professor Doutor Paulo Guilherme de Oliveira, por ter aceitado prontamente a orientação da minha dissertação de mestrado. Agradeço toda a disponibilidade, simpatia e apoio demonstrados bem como pelos seus comentários construtivos e revisão da escrita desta dissertação.

Um enorme agradecimento ao mestre João Castro, que me acompanhou sempre no laboratório ao longo deste ano de trabalho. Agradeço toda a ajuda técnica prestada, todos os conhecimentos científicos transmitidos, a sua constante disponibilidade para responder a todas as minhas dúvidas, por todos os conselhos e apoio, mas principalmente por toda a amizade.

Aos meus amigos, estando longe ou perto, agradeço a vossa amizade e apoio ao longo de toda a minha formação académica. Um sincero e leal agradecimento a todos.

À família Carmo, pelo apoio e carinho demonstrado em todos os momentos do meu percurso académico e pessoal.

A todas as pessoas que tornaram tudo isto possível e que me têm vindo a apoiar em toda a minha vida académica e pessoal, *aos meus pais, ao meu irmão e a toda a minha família*. Agradeço tudo o que fizeram por mim e por todas as oportunidades que me deram.

Um agradecimento especial ao *Vitor Carmo*, por estar presente ao longo de todo o meu percurso académico, nos bons e maus momentos. Obrigada pelo carinho, amizade, incentivo, compreensão e encorajamento, mas essencialmente por tudo aquilo que representas.

A todos, o meu maior e sincero OBRIGADA!

RESUMO

O registo fóssil sugere que a transição morfológica entre os apêndices locomotores de peixes e tetrápodes envolveu expansão do endosqueleto e simultânea redução do dermoesqueleto distal (Shubin et al., 2009). Genes da extremidade 5' do complexo HoxD (ex. *Hoxd13*) podem ter sido fundamentais para esta transição morfológica (Sordino et al., 1995). De facto, a sobre-expressão de *Hoxd13* induzida durante o desenvolvimento dos apêndices do peixe-zebra provoca modificações fenotípicas que mimetizam o processo evolutivo proposto (Freitas et al., 2012). No presente trabalho exploraram-se com mais profundidade os processos moleculares associados ao *Hoxd13* que possam explicar as mudanças morfológicas associadas à evolução destas estruturas.

Os resultados obtidos sugerem que a intervenção do *Hoxd13* possa ter estado associada com: 1) indução do alongamento do tecido com potencial esqueletogénico; 2) indução de territórios celulares com identidade distal; 3) promoção do potencial esqueletogénico dentro desses territórios e 4) Inibição da formação do dermoesqueleto.

PALAVRAS-CHAVE: Hoxd13, Peixe-zebra, Desenvolvimento, Evolução, Apêndices locomotores, Membros, Barbatanas, Tetrápodes.

SHAPING ANIMAL DESIGN: ROLE OF HOXD13 TARGETS IN THE DEVELOPMENT OF VERTEBRATE APPENDAGES.

ABSTRACT

The fossil record suggests that the morphological transition between locomotory appendages of fish and tetrapods involved expansion of the endoskeleton and concomitant reduction of the distal dermoskeleton (Shubin et al., 2009). Genes at the 5' end of the HoxD complex (e.g. *Hoxd13*) may have been relevant for this morphological transition (Sordino et al., 1995). Indeed, *Hoxd13* over-expression induced during zebrafish appendage development causes phenotypic changes that mimic the proposed evolutionary process (Freitas et al., 2012). Here we explored in more depth the molecular processes associated with *Hoxd13* that may explain the morphological changes associated with the evolution of these structures.

The results suggest that *Hoxd13* intervention may have been associated with: 1) inducing elongation of the tissue with skeletogenic potential; 2) inducing formation of novel cell territories with distal identity; 3) promoting skeletogenic potential within these territories and 4) inhibiting dermoskeleton formation.

KEYWORDS: Hoxd13, Zebrafish, Development, Evolution, Locomotory appendages, limbs, fins, Tetrapods.

ÍNDICE

Resumo.....	I
Abstract.....	III
Índice.....	V
Índice de figuras.....	IX
Índice de tabelas.....	XVII
Lista de abreviaturas.....	XIX
Unidades de medida.....	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1 O modelo do “peixe-zebra”	3
1.1.1 Características gerais.....	3
1.1.2 As vantagens e desvantagens do peixe-zebra como modelo.....	5
1.2 Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.....	9
1.3 Desenvolvimento das barbatanas do peixe-zebra.....	15
1.4 O uso do peixe-zebra para estudos comparativos de evolução dos apêndices locomotores.....	16
1.5 Desenvolvimento e evolução dos apêndices locomotores nos vertebrados.....	20
1.6 Genes <i>Hox</i> e a evolução dos apêndices locomotores nos vertebrados.....	22
1.2 Malformações congénitas associadas aos genes <i>Hox</i>	27
2 Enquadramento teórico do projeto.....	31
3 Materiais e métodos.....	37
3.1 Manutenção e manipulação de peixe-zebra.....	39
3.2 Obtenção, recolha e seleção dos embriões.....	39
3.3 Protocolo de choque térmico (<i>Heat-shock</i>).....	41
3.4 Hibridação <i>in situ</i>	41

3.4.1	Obtenção e eluição das sondas.....	42
3.4.2	Técnicas aplicadas para ampliação do material genético usado na produção de sondas de RNA.....	42
a)	PCR-Reação em cadeia de polimerase convencional.....	42
b)	Eletroforese.....	44
c)	Purificação e aumento da concentração dos produtos de PCR.....	45
d)	Transcrição <i>in vitro</i>	45
e)	Purificação das sondas.....	47
3.4.3	Obtenção de sondas de RNA usando amplificação por bactérias competentes.....	47
a)	Transformação.....	47
b)	Extração e purificação do DNA plasmídico.....	48
c)	Linearização dos plasmídeos com enzimas de restrição.....	49
d)	Transcrição <i>in vitro</i> e purificação das sondas.....	49
3.4.4	Protocolo da hibridação <i>in situ</i>	50
3.5	Análise da expressão génica por PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	52
3.5.1	Método de RT-qPCR.....	52
3.5.2	Extrações de RNA.....	54
3.5.3	Síntese de cDNA.....	55
3.6	Produção de linhas de peixe-zebra transgênicas.....	55
3.6.1	Ligação dos fragmentos amplificados no Vector pCR™/GW/TOPO®	55
3.6.2	Clonagem em bactérias competentes <i>E. coli</i>	56
3.6.3	Inserção no Vector de destino para obtenção das construções finais.....	58

4. Resultados e discussão.....	61
4.1 Validação da sobre-expressão do Hoxd13 na linha transgênica <i>hsp70:hoxd13a</i> na geração F3.....	63
4.2 Estudo da expressão e função de diferentes alvos com a modulação do Hoxd13.....	65
a) Gene <i>HAND2</i>	66
b) Gene <i>FGF10a</i>	69
c) Genes <i>DACH</i>	72
d) Genes da família <i>BMP</i>	76
e) Genes <i>MEIS</i>	81
f) Gene <i>FBN1</i>	83
g) Gene <i>BARX1</i>	85
h) Gene <i>SFRP1</i>	86
i) Gene <i>EMX2</i>	88
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	91
6. Referências bibliográficas.....	95
7. Anexos.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diversidade de padrões de pigmentação no género *Danio*. Colunas da esquerda e do meio mostram fenótipos de várias espécies de *Danio*. Coluna da direita mostra fenótipos de híbridos selecionados entre *D. rerio* e outros *Danio* (Parichy, 2006).

Figura 2: Coleções históricas de peixe-zebra na Índia e nos países vizinhos desde 1868. Na atualidade parte destes habitats já foram destruídos (Engeszer et al., 2007).

Figura 3: Diferentes habitats naturais de peixe-zebra. **A.** Canais adjacentes a pequenos rios; **B.** Poças de água adjacentes a arrozais; **C.** Ribeiros com pouco caudal; **D.** Charcos, **E.** Zonas pantanosas (Engeszer et al., 2007).

Figura 4: Sistema aquático de peixe-zebra do IBMC. Este sistema tem capacidade para albergar inúmeras linhas transgênicas e proporciona a fácil manutenção dos parâmetros bioquímicos da água bem como a alimentação e manuseamento dos animais. *Imagem de Pedro Monteiro.*

Figura 5: Processo de microinjeção efectuado num embrião de peixe-zebra. *Imagem de David Mawdsle.*

Figura 6: Genes ortólogos que o Homem partilha com outras espécies. Cerca de 70% de genes humanos estão conservados no peixe-zebra e 84% dos genes associados a doenças humanas estão presentes nesse organismo (Howe et al., 2013).

Figura 7: Fases de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. Após o breve período *Zigoto* (painel a), quando o embrião está em fase de uma única célula, inicia-se a *Clivagem* (painéis b-g). Depois começa o período de *Blástula* (painéis h-p), a qual se segue o período de *Gástrula* (q-u). Finalmente, a *Segmentação* ocorre a partir das 10 hpf (v-z) (Webb and Miller, 2007).

Figura 8: Esquema representativo da Blastulação do peixe-zebra. A epibolia começa com o englobamento gradual do vitelo.

Figura 9: Movimentos celulares durante a Gastrulação do peixe-zebra. **A.** Blastoderme a 30% de conclusão de epibolia (cerca de 4,7 hpf). **B.** Formação de hipoblasto, quer por involução de células na margem da blastoderme quer por deslaminção de células do epiblasto (6 hpf). **C.** Região posterior do embrião onde se forma o escudo embrionário

D-Embrião a 90% epibolia (9 hpf), a mesoderme pode ser vista ao redor do vitelo, entre a endoderme e ectoderme. **E**. Conclusão da gastrulação (10.3 hpf) (*Gilbert., 2000*).

Figura 10: Embriões de peixe-zebra em fase de eclosão. A. Conjunto de embriões com o mesmo tempo de desenvolvimento, um deles já rompeu o corium. Fotografia de Dries Knapen **B.** Morfologia geral de uma barbatana peitoral durante este período de desenvolvimento embrionário. Fotografia de *Janelle Weaver*.

Figura 11: Início do período larvar em peixe-zebra.

Figura 12: Estrutura de desenvolvimento das barbatanas de peixe-zebra. A. Localização das barbatanas peitorais (pec) e pélvicas (pel) no adulto. Zona da cintura peitoral encontra-se demarcada e ampliada em **B**. **B-C** Esqueleto da barbatana peitoral (**B**) e pélvica (**C**). A verde assinalam-se elementos da cintura peitoral, a vermelho elementos de endoesqueleto, a amarelo elementos dermoesqueléticos. **D.** Lepidotriquia que forma o dermoesqueleto. **E.** Embrião com o primórdio da barbatana peitoral (Pfb) a formar-se a partir de células da mesoderme latero-ventral (LPM). **F.** Corte histológico mostrando o primórdio da barbatana peitoral. **G.** Formação da prega ectodérmica distal (AEF ou AF) a partir da AER, γ -yolk (vitelo). Adaptado de (*Grandel and Schulte-Merker, 1998a; Yano et al., 2012*).

Figura 13: Filogenia das linhagens dos vertebrados. *UCL- University College of London website.*

Figura 14: Posição relativa do peixe-zebra (*Danio*) dentro da linhagem dos gnatostómios (*Metscher and Ahlberg, 1999*)..

Figura 15: Esquema representativo da evolução dos apêndices locomotores. Nos sarcopterígeos desenvolveram-se novos elementos de endoesqueleto (verde) ao mesmo tempo que se foi reduzindo o dermoesqueleto (asterisco). Nos tetrápodes esta estrutura distal desaparece por completo e surgem extremidades multidigitadas (autopódios). Modificado de (*Davis, 2013*).

Figura 16: Esquema representativo do desenvolvimento dos apêndices locomotores. Modificado de (*Gilbert, 2000*).

Figura 17: Esquema representativo dos genes *Hox* em distintos metazoários. Na coluna da esquerda estão indicados os padrões de expressão desses genes a diferentes cores e à direita indica-se a respetiva organização genómica. O esquema salienta a existência de 4 grupos de genes *Hox* nos vertebrados, dando como exemplo o homem (*HoxA, HoxB, HoxC, HoxD*). Mostra ainda o efeito da colinearidade espacial destes genes em que genes sequencialmente

mais 5' no grupo são progressivamente expressos mais posteriormente no corpo. Modificado de (Hueber *et al.*, 2010).

Figura 18: Esquema representativo da função dos fatores de transcrição. Demonstra-se aqui que estas moléculas podem ajudar a ativar certos genes (ex. gene A) a reprimir outros (ex. gene D). Esquema de Brian E. Staveley (Memorial University, Canada).

Figura 19: Esquema representativo do impacto que os fatores de transcrição têm no ambiente das células. Neste exemplo o fator de transcrição A leva à ativação do próprio gene que o codifica (gene A). Simultaneamente ativa o gene C e reprime o gene B levando a que as células em que isto acontece tenham proteínas do tipo A e C mas não do tipo B. Esquema de Brian E. Staveley (Memorial University, Canada).

Figura 20: Esquema representativo dos distintos elementos do endoesqueleto e respetivos genes Hox envolvidos no seu desenvolvimento. a. Identidade do estilopódio é determinada pela expressão dos genes *Hoxd9* e *Hoxd10* durante a fase inicial da formação do primórdio do membro (Fase I). b. Identidade do zeugopódio é determinada pela expressão dos genes *Hoxd9*, *d10*, *d11*, *d12* e *d13* durante uma fase intermedia do desenvolvimento do membro (Fase II). c. Identidade do autopódio é determinada pela expressão de genes da extremidade 5' dos grupos HoxD e HoxA durante a fase terminal de formação do primórdio do membro (Fase III). Modificado de (Shubin *et al.*, 2000).

Figura 21: Esquema representativo do padrão de expressão do gene *Hoxd13* (azul) durante o desenvolvimento das barbatanas de peixe (tubarão, peixe-zebra) e dos membros dos tetrápodes (murganho). Verifica-se uma relação entre o aumento da expressão do domínio distal do gene *Hoxd13* e a transição morfológica entre os apêndices dos peixes e os membros dos tetrápodes. AER: região de ectoderme especializada (estrutura embrionária nos tetrápodes que atua como um centro de sinalização para assegurar o desenvolvimento correto destes apêndices). AEF: prega ectodérmica distal (estrutura embrionária de peixes que controla o desenvolvimento do dermoesqueleto). Modificado de (Freitas *et al.*, 2007).

Figura 22: Esquema representativo da hipótese atual para a transição evolutiva dos apêndices dos peixes e membros dos tetrápodes. A maior produção de proteínas *Hoxd13* (círculos amarelos) no tetrápode ancestral pode dever-se à aquisição de novas regiões enhancers (caixas vermelhas) que deram origem ao endoesqueleto distal e encurtamento do dermoesqueleto. Ensaio de sobre-expressão do gene *Hoxd13* realizado em embriões de peixe-zebra: nos painéis superiores encontram-se as barbatanas de controlo e nos painéis inferiores as barbatanas transgênicas. Modificado de (Freitas *et al.*, 2012).

Figura 23: Fotografias de um paciente com síndrome de braquidactilia/sindactilia. (a) Vista de frente mostra estatura baixa desproporcional. **(b)** Braquidactilia dos pés. **(c - f)** Braquidactilia das mãos mais pronunciada no lado direito **(c e f)** onde existe também sindactilia parcial entre o segundo/terceiro dedo e quarto/quinto dedo (Dauwese et al., 2007).

Figura 24: Braquidactilias tipo D e E. (a) Braquidactilia tipo D, fotografia de Rosa Lin/Medill News Service; **(b, c)** Braquidactilia tipo E mostrando redução de alguns metacarpus (asteriscos), fotografia de “Limb Malformations & Skeletal Dysplasia Clinic, MSU, NRC” (Temtamy and Aglan, 2008).

Figura 25: Alterações fenotípicas nos autopódios associados a modificações da cadeia de alaninas do HOXD13. (a) Sindactilia tipo V evidenciada pela fusão dos metacarpos (asterisco) (Ogino et al., 2012). **(b)** Polissindactilia com anomalias nos pés em que se observa dígitos supranumerários (asteriscos) além de sindactilia nas mãos e pés (Kan et al., 2003). **(c)** Polissindactilia tipo II caracterizada por diversas anomalias ósseas e cutâneas (Al-Qattan, 2011).

Figura 26: Estrutura do genoma do agrupamento de genes HOXD (do inglês “HOX D cluster”) e espectro de mutações no gene HOXD13 descritas até ao momento (triângulos) (Brison et al., 2014). A mutação *frameshift* corresponde à inserção ou deleção de pares de nucleótidos.

Figura 27: Sonda de RNA a hibridar com o RNA endogenamente expresso. Os nucleótidos de uracilo estão marcados com DIG que depois se ligam a um anticorpo conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina) que é a responsável pela produção de sinal de coloração (Nitzki, 2013).

Figura 28: Ensaios de RT-qPCR. A. Proporção de reagentes utilizados para as reações de RT-qPCR. **B.** Progressão da fluorescência ao longo dos ciclos de amplificação durante o RT-qPCR. Modificado de (Kubista et al., 2006).

Figura 29: Ensaio para modulação de organismos transgênicos. A. Componentes das reações de ligação para o Vector pCR™8/GW/TOPO®. **B.** Esquema do vetor pCR™8/GW/TOPO® utilizado para clonar os vários fragmentos de DNA.

Figura 30: Ensaio de expressão gênica para validar o efeito da sobre-expressão do *hoxd13a* na geração F3. A,B- Hibridação *in situ* para o gene *and1* realizado com barbatanas de peixe-zebra. **A.** Condição do tipo selvagem com AEF inalterada (*wt: do inglês wild-type*). **B.** Condição transgênica evidenciando encurtamento da AEF. **C.** RT-qPCR evidenciando

diminuição de *and1* e aumento de *hoxd13a* nos estádios 56, 85 e 115 hpf nas barbatanas da condição transgênica.

Figura 31: Principais interações moleculares reguladas pelo fator de transcrição Hand2 durante o desenvolvimento dos membros em murganho. O factor Hand2 está no núcleo de redes de regulação de transcrição que controlam o estabelecimento de compartimentos de identidade celular ao longo do eixo AP e PD. Além de ter um impacto direto na expressão de *Shh* e *Gli3*, *Hand2* reforça a ativação e repressão destes alvos via *ETS1/2* e *Tbx3*, respetivamente. As linhas contínuas indicam interações diretas e as linhas tracejadas indicam interações deduzidas a partir da análise genética.

Figura 32: Ação do fator de transcrição *hoxd13a* sobre o seu potencial alvo *hand2* durante o desenvolvimento das barbatanas de peixe-zebra. **A.** Esquema representativo da posição do Hand2 na cascata molecular que estabelece a identidade celular ao longo do eixo AP (Padronização do eixo AP). **B.** Barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) com AEF inalterado e expressão do *hand2* (setas) localizada na periferia do disco endoesquelético (DE). **C.** Barbatanas de peixe-zebra transgênicos *hsp70:hoxd13a* evidenciando encurtamento da AEF e maiores níveis de expressão de *hand2* no disco endoesquelético (DE).

Figura 33: Ensaio de expressão génica para o gene *fgf10a*. **A-D** Primórdios de barbatanas pares de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) evidenciando uma AEF inalterada (A,C) e do tipo transgênicos (***hsp70:hoxd13a***) evidenciando encurtamento da AEF (B,D) sujeitas a ensaios de hibridação *in situ*. **A.** Expressão do *fgf10a* detetada entre o disco endoesquelético (DE) e a AEF a 72 hpf na condição controlo (setas). **B.** Expressão do *fgf10a* detetado em toda a zona modificada mais distal, onde existe uma tendência para o desaparecimento ou diminuição da AEF nas barbatanas afetadas pela sobre-expressão do *hoxd13a* (setas). **C.** Ausência de expressão de *fgf10a* em barbatanas da condição controlo a 144 hpf. **D.** Manutenção da expressão do *fgf10a* nas barbatanas com claro fenótipo associado à sobre-expressão do *hoxd13a* (setas). **E.** Expressão de *fgf10a*, *and1* e *fgf8a* detetadas por RT-qPCR durante o desenvolvimento de barbatanas do tipo selvagem (wt) e barbatanas com sobre-expressão do *hoxd13a* (*hoxd13a+++*).

Figura 34: Ensaios de expressão génica para os genes *dach*. **A.** Esquema representativo da ação do fator de transcrição Hoxd13 nos genes que atuam na diferenciação próximo-distal dos membros (*proposto por Salsi e colaboradores, 2008*). **B. Ensaio de RT-qPCR para os genes *dachA*, *dachB* e *dachC*.** Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56 hpf e 85 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo

transgênico (*hoxd13a+++*). **C-J.** Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *dachA* (C-F) e *dachB* (G-J) realizados em embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (C,E,G,F) e *hsp70:hoxd13a* (G,H,I,J). Setas indicam expressão distal na zona alterada da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam expressão proximal nestas condições.

Figura 35: Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *bmp2a* e *bmp2b*. Embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (A, C, E, G) e *hsp70:hoxd13a* com AEF alterado (B, D, F, H). Setas indicam expressão distal na zona da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam maiores níveis de expressão no disco endoesquelético (DE).

Figura 36: Ensaio de hibridação *in situ* para os genes *bmp4*, *bmp7b* e *nog3*. Embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (A, C, E, G) e *hsp70:hoxd13a* com AEF alterado (B, D, F, H). Setas indicam expressão distal na zona da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam maiores níveis de expressão no disco endoesquelético (DE).

Figura 37: Influência da via de sinalização Bmp no alongamento da AEF. **A.** RT-qPCR para os genes *bmp2a*, *bmp2b*, *bmp7b* e *bmp4* realizado com primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56 hpf e 85 hpf do tipo selvagem (wt) e transgênico (*hoxd13a+++*). **B.** Estudos sobre o alongamento da AEF. **1-** Inibição de BMP leva a um alongamento da AER e aumento de transcritos de Noggin induz o mesmo fenótipo (Pizette and Niswander, 1999). **2,3-** Resultados hipotéticos de ensaios de sobre-expressão e *knockdown* por morfolidos. **2-** A sobre-expressão de BMP conduzirá a uma redução do crescimento da estrutura AER, enquanto que a de Noggin poderá provocar um alongamento de AEF. **3-** A técnica de *knockdown* poderá conduzir a um aumento no crescimento de AEF para os fatores BMP, e o efeito contrário no caso dos Noggin.

Figura 38: Ensaio de RT-qPCR para os genes *meis1b* e *dachA*, *dachB* e *dachC*. Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf provenientes de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgênico (*hoxd13a+++*).

Figura 39: Modelo de maturação dos osteoblastos mediado por microfibrilas. *fibrilina-1* e *fibrilina-2* medeiam a produção de osteoblastos regulando TGF- β e BMP que em conjunto calibram a taxa de formação de osso. Modificado de (Nistala et al., 2010).

Figura 40: Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *fbn1* realizados em embriões de peixe-zebra a 72 hpf. **A-**Barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem com AEF inalterada. **B-**Barbatanas de peixe-zebra transgênicos *hsp70:hoxd13a* evidenciando encurtamento da AEF e maiores níveis de expressão de *fbn1* nos tecidos mais distais (setas). À direita, expressão de

fbn1 detetada por RT-qPCR durante o desenvolvimento de barbatanas do tipo selvagem (wt) e barbatanas com sobre-expressão do *hoxd13a* (*hoxd13a+++*) nos estádios 56, 85 e 115 hpf.

Figura 41: Ensaio de RT-qPCR para o gene *barx1* e *bmp4*. Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, e 115 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgénico (*hoxd13a+++*).

Figura 42: Ensaio de expressão génica para o gene *sfrp1a*. A- Hibridação *in situ* de barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) a distintos estádios de desenvolvimento de 48, 72 e 144 hpf. B- Ensaio de RT-qPCR para o gene *sfrp1a* realizado em material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf provenientes de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgénico (*hoxd13a+++*).

Figura 43: Ensaio de expressão génica para *emx2*. A. Expressão endógena do gene a 72 hpf. B. Ensaio de RT-qPCR, realizado em material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgénico (*hoxd13a+++*).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados para a elaboração dos PCR com vista à obtenção de sondas para hibridação *in situ*.

Tabela 2: Ciclos de temperatura usados nos PCR e respetiva duração. O símbolo ∞ significa tempo indeterminado.

Tabela 3: Mistura de reação para a Transcrição *in vitro*.

Tabela 4: Listagem das sondas obtidas. A tabela fornece informações acerca das enzimas requeridas para linearizar o plasmídeo e efetuar a sua transcrição. O símbolo (-) foi utilizado para as sondas isoladas por PCR, nas quais foram utilizados *primers* que permitem transcrição direta a partir dos produtos do PCR.

Tabela 5: Reagentes utilizados para a elaboração do meio LB (Luria- Bertani)-Agar e do meio LB-broth.

Tabela 6: Tempos de digestão com Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) usados durante o protocolo de hibridação *in situ* nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra.

Tabela 7: Programa de amplificação por PCR em Tempo Real utilizado.

Tabela 8: Mistura de reação para a síntese de cDNA.

Tabela 9: Lista dos *primers* utilizados na PCR.

Tabela 10: Reagentes utilizados para a linearização dos vectores.

Tabela 11: Componentes das reações LR para a construção final *hsp70:nog3*.

Tabela 12: Componentes das reações LR para a construção final *hsp70:bmp2b*.

Tabela 13: Lista dos *primers* utilizados na RT-qPCR, a temperatura de *melting* de 62°C.

Tabela 14: Exemplo das tabelas utilizadas com os dados morfológicos e de reprodução semanal dos casais de peixe-zebra. A primeira coluna indica a localização dos peixes no Biotério de peixe-zebra do IBMC. A segunda coluna indica os acasalamentos realizados semanalmente. O símbolo ♀ é utilizado para as fêmeas e o símbolo ♂ é utilizado para os machos. Os indicadores ZF, Pearl e RR referem-se a diferentes tipos de padrões de pigmentação. São também usadas outras identificações para distinguir os organismos relativas a tamanho (ex. *small*) dimensão corporal (ex. *fat*) ou anomalias morfológicas (ex. *axial skeleton*).

Tabela 15: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56hpf.

Tabela 16: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 85 hpf.

Tabela 17: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 115hpf.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEF	Prega ectodérmica distal (do inglês <i>Apical Ectodermal Fold</i>)
AER	Região ectodérmica apical (do inglês <i>Apical Ectodermal Ridge</i>)
And1	Actinodina 1 (do inglês <i>Actinoidin 1</i>)
AP	Antero-posterior
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BMP	Proteína morfogenética de osso (do inglês <i>Bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CABD	Centro Andaluz de Biología do Desenvolvimento
cDNA	DNA complementar
CREs	Elementos reguladores de ação- <i>cis</i> (do inglês <i>cis-regulatory-elements</i>)
C_t	Ponto limiar de ciclo (do inglês <i>threshold cycle</i>)
Dach	Gene dachshund
DIC	Contraste de interferência diferencial (do inglês <i>Differential interference contrast</i>)
DIG	Digoxigenina
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
DV	Dorso-ventral
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eef1a1l1	Fator 1 de alongamento e tradução eucariótico alfa 1, tipo 1 (do inglês <i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1</i>)
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EVL	Camada envolvente (do inglês <i>Enveloping Layer</i>)

<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
Fbn	Fibrilina (do inglês <i>fibrillin</i>)
Fgf	Fator de crescimento fibroblasto (do inglês <i>fibroblast growth factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Green fluorescent protein</i>)
GOI	Gene de interesse (do inglês <i>Gene of interest</i>)
H₂O	Água
H₂O-DEPC	Água com 0.1% Dietilpirocarbonato
HCl	Ácido clorídrico
HKG	Genes endógenos (do inglês <i>Housekeeping genes</i>)
Hsp70	Proteína de choque térmico 70 (do inglês <i>heat shock 70</i>)
Hyb	Solução de hibridação
IBMC	Instituto de Biologia Molecular e Celular
LB	Meio de crescimento de culturas Luria Bertani (do inglês <i>Luria Bertani Broth</i>)
LPM	Mesoderme latero-ventral (do inglês <i>lateral plate mesoderm</i>)
MeOH	Metanol
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Cloreto de azul de 4-nitro-tetrazólio
NTMT	Solução tampão de fosfatase alcalina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PBT	PBS com detergente Tween20
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldeído
RNA	Ácido ribonucleico
Rpl13a	Proteína ribossômica l13
RT-qPCR	Transcrição reversa com PCR quantitativo (em tempo real)
Shha	Gene <i>sonic hedghog</i> de peixe-zebra

SPD	Polissindactilia
SSC	Solução salina de citrato de sódio (do inglês <i>saline-sodium citrate</i>)
TAE	Tris-Acetato- EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
tRNA	RNA de transferência
UV	Ultra-violeta
YSL	Camada Vitelina Sincicial (do inglês <i>Yolk Syncytial Layer</i>)
ZPA	Zona de atividade polarizadora (do inglês <i>Zone of polarizing activity</i>)

UNIDADES DE MEDIDA

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
dpf	Dias pós fertilização
g	Força centrífuga
g/L	Gramas por litro
h	Horas
hpf	Horas pós fertilização
L	Litro
Kb	Kilobase
M	Molar
mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto
T°C	Temperatura em graus celsius
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
V	Volts
X	Veze

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O modelo do “peixe-zebra”

1.1.1 Características gerais

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno Teleósteo de água doce que constitui atualmente um importante animal modelo usado na investigação (Fig. 1). O Género *Danio* integra 45 espécies pertencentes à grande Família dos *Ciprinídeos* e caracterizada por um padrão de pigmentação composta por riscas pretas longitudinais que se estendem até ao extremo da cauda e uma dimensão corporal que raramente ultrapassa os 3 cm de comprimento no adulto (Wixon, 2000).

Estes organismos são originários do Sul da Ásia tendo uma distribuição que abrange diferentes regiões da Índia, Bangladesh, Nepal, Mianmar e Paquistão (Fig. 2) (Barman, 1991; Bhat, 2003; Menon, 1999; Rahman, 1989; Talwar, 1991). Esta região geográfica tem um clima de Monção, com acentuados contrastes entre estações chuvosas e secas que têm um grande impacto sobre os parâmetros do habitat, tais como a química da água e a abundância de recursos alimentares (Lawrence, 2007).

Os habitats naturais do peixe-zebra são normalmente corpos de águas paradas ou pouco movimentadas, de pouca profundidade, protegidos por vegetação aquática e com substrato sedimentar (ex. lagoas, lagos, arrozais, Fig. 3) (Engeszer et al., 2007; McClure et al., 2006; Spence et al., 2006). Neste momento existe uma substancial degradação e perda destes habitats devido à intervenção humana. O cultivo intensivo do arroz, por exemplo, leva à construção de represas para irrigação, com consequente destruição de cursos naturais de água, que são os habitats naturais desta espécie. Embora o peixe-zebra possa subsistir em arrozais, estes representam comunidades bióticas alteradas a nível de competidores e predadores que facilmente dizimam as populações de peixe-zebra. Outra prática humana que afeta o peixe-zebra é a produção de juta, *Capsularis corchorus*, uma cultura que leva à acidificação da água provocando grande mortalidade piscícola. Finalmente, a conversão urbana e industrial destas zonas agrícolas tem-se tornado a maior ameaça que esta espécie enfrenta no seu estado natural (Engeszer et al., 2007).

Em termos alimentares, o peixe-zebra é omnívoro, sendo que a sua dieta natural consiste principalmente em zooplâncton e insetos mas também pode englobar fitoplâncton, algas filamentosas, plantas vasculares, esporos e ovos de invertebrados (Dutta, 1993; McClure et al., 2006; Spence et al., 2007). A nível de organização social, os peixes-zebra formam pequenos cardumes, constituídos por cerca de 5 a 20 indivíduos (Pritchard et al., 2001). Este

animal atinge a maturidade sexual por volta dos 3-6 meses de vida e é um reprodutor assíncrono, que geralmente produz grandes quantidades de ovos, o que se torna uma vantagem para os estudos científicos nomeadamente na área da Biologia do Desenvolvimento (Hill et al., 2005; Lawrence, 2007).

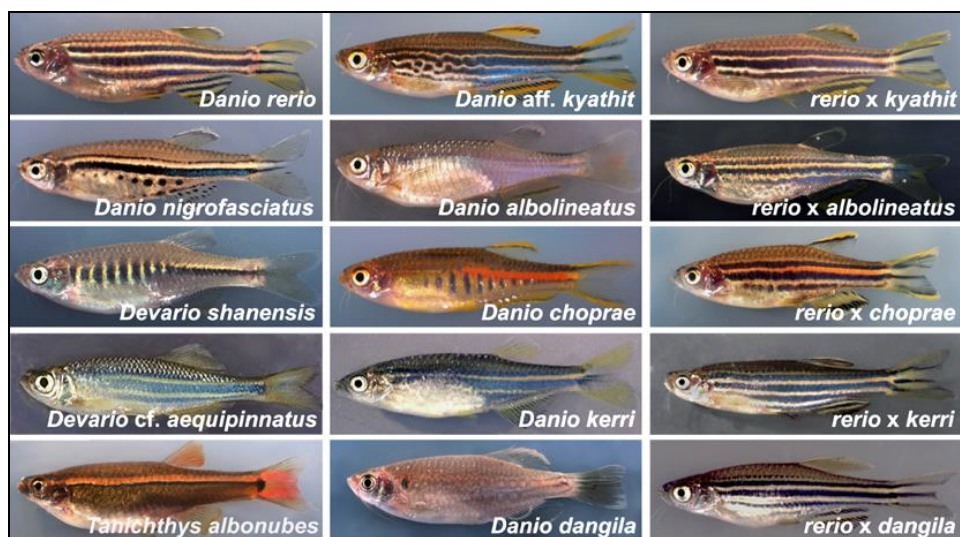


Figura 1: Diversidade de padrões de pigmentação no género *Danio*. Colunas da esquerda e do meio mostram fenótipos de várias espécies de *Danio*. Coluna da direita mostra fenótipos de híbridos selecionados entre *D. rerio* e outros *Danio* (Parichy, 2006).

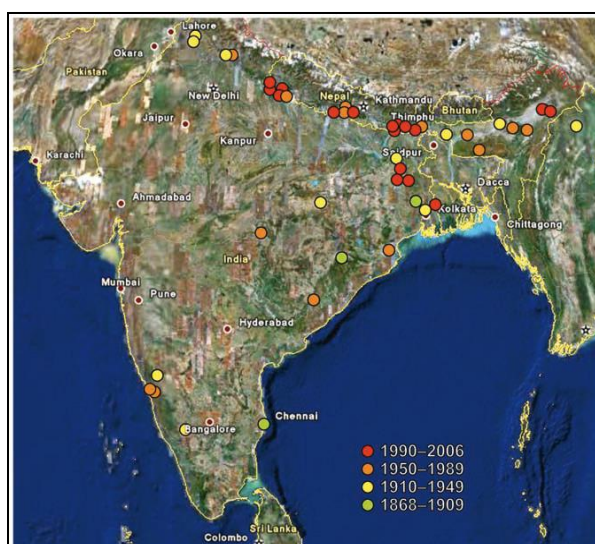


Figura 2: Coleções históricas de peixe-zebra na Índia e nos países vizinhos desde 1868. Na atualidade parte destes habitats já foram destruídos (Engeszer et al., 2007).



Figura 3: Diferentes habitats naturais de peixe-zebra. A. Canais adjacentes a pequenos rios; B. Poças de água adjacentes a arrozais; C. Ribeiros com pouco caudal; D. Charcos, E. Zonas pantanosas (Engeszer et al., 2007).

1.1.2 As vantagens e desvantagens do peixe-zebra como modelo

Como modelo de vertebrados para estudos científicos, o peixe-zebra apresenta inúmeras vantagens em relação a modelos como o murganho ou a galinha (Gemberling et al., 2013). Estes animais podem ser mantidos em espaços relativamente pequenos, com uma manutenção fácil e de baixo custo, contrariamente ao que acontece com os animais modelo de maiores dimensões, como os murganhos (Fig. 4). No entanto, o trabalho prático com este organismo modelo torna indispensável a instalação de um biotério com características específicas para o albergar (Guyon et al., 2007; Lele and Krone, 1996). Uma desvantagem relativamente ao murganho é o escasso conhecimento das melhores condições à sua manutenção em condições laboratoriais e dos cuidados veterinários requeridos para prevenir e tratar doenças, um campo ainda a ser explorado. Não obstante, o pequeno tamanho dos embriões/larvas e dos adultos, comparativamente ao de outros modelos biológicos de investigação, minimiza os custos através da utilização de pouca quantidade de soluções químicas, necessárias tanto para o tratamento e manutenção dos peixes, como para a realização dos ensaios, reduzindo consequentemente a quantidade de resíduos o que é claramente uma vantagem comparavelmente ao murganho (Hill et al., 2002; Hill et al., 2005).

Além das características vantajosas acima mencionadas, esta espécie apresenta também uma elevada taxa de reprodução. As fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias e uma única desova podem conter várias centenas de ovos. A fertilização é externa, o que faz com que os embriões vivos permitam o estudo das influências ambientais sobre o seu desenvolvimento, bem como, um acesso fácil à sua manipulação durante todas as fases do seu desenvolvimento (Krone et al., 2003; Lopez-Olmeda and Sanchez-Vazquez, 2011). Conjuntamente, estes recursos permitem que os utilizadores obtenham um grande número de embriões para a manipulação experimental, sem quaisquer limitações sazonais (Krone et al., 2003).

Adicionalmente, a transparência dos ovos permite a produção eficiente de animais transgênicos onde são introduzidas moléculas associadas a genes repórter através da técnica de microinjeção (Fig. 5). A monitorização da expressão desses repórteres é frequentemente feita usando microscopia de fluorescência. Esta característica dos embriões permite ainda a fácil identificação de alterações morfológicas mesmo em camadas mais internas do corpo bem como a realização de filmagens *in vivo* (Krone et al., 2003).

O rápido desenvolvimento do peixe-zebra constitui outra vantagem deste animal modelo que permite a realização de observações do desenvolvimento e experiências em poucas horas ou dias (Dahm and Geisler, 2006). A sua embriogénese tem a duração de cerca de 24h e o seu processo de organogénese completa-se em grande medida após tão só 5 dias de desenvolvimento (Sumanas and Lin, 2004). Um embrião com 1 dia tem todos os principais tecidos e muitos precursores de órgãos formados, sendo possível observar ao microscópio o coração a bater, o sangue em circulação, o sistema nervoso, os olhos e os primórdios dos ouvidos (Sumanas and Lin, 2004). Até cinco dias de desenvolvimento, a larva de peixe-zebra possui formados órgãos internos tais como o fígado, pâncreas e uma rede vascular complexa (Sumanas and Lin, 2004).

Em relação a outros organismos modelo usados na investigação como é o caso da *Drosophila* ou *C. elegans*, o peixe-zebra apresenta a vantagem de ser um vertebrado partilhando inúmeras características estruturais e fisiológicas com os seres humanos (van Heyningen, 1997). A sequenciação do seu genoma revelou uma elevada taxa de conservação, tantos dos genes como das regiões reguladoras associadas, entre estes organismos (Meeker and Trede, 2008). Assim, os ortólogos da maioria dos genes humanos podem ser encontrados no peixe-zebra e mostram padrões de expressão e funcionalidade bastante semelhante (Sivasubbu et al., 2013). Isto faz com o peixe-zebra seja de extrema utilidade para realizar ensaios de função génica para caracterizar a função de certos genes relevantes para espécie

humana no que respeita ao seu desenvolvimento, a malformações e situações de doença (Fig. 6).

O modelo do peixe-zebra permite a utilização de técnicas extremamente úteis para abordar questões relacionadas com a função dos genes, o que constitui mais uma vantagem do uso destes animais para fins experimentais. Damos como exemplo a técnica de knock-down com oligonucleótidos morfolinos desenvolvida para estes organismos (Hill et al., 2005). Os oligonucleótidos morfolinos são moléculas estáveis, sem carga, solúveis em água que se ligam a sequências complementares de RNA, inibindo assim a tradução do mRNA, o splicing do mRNA, e maturação de miRNA, podendo contudo inibir outras interações entre macromoléculas e RNA (Moulton and Yan, 2008). Na técnica de knock-down com oligonucleótidos morfolinos, estes são injetados nos embriões de peixe-zebra, desde o estágio de uma célula, e ligam-se a moléculas de mRNA produzidas por um gene determinado bloqueando a sua tradução em proteína (Dahm and Geisler, 2006; Hill et al., 2005). O efeito resultante deste procedimento é idêntico ao produzido através do silenciamento de genes pela produção de mutantes em murganho, que demora consideravelmente mais tempo (Dahm and Geisler, 2006; Nasevicius and Ekker, 2000).

Expostas estas vantagens, não podemos deixar de salientar o facto deste modelo ser ainda assim bastante distinto da espécie humana, comparado com o modelo murganho, por exemplo. De facto, o peixe-zebra apresenta diferenças anatómicas consideráveis tais como a ausência de pulmões, de tecido mamário, da próstata, e das articulações sinoviais (Ali et al., 2011; Delvecchio et al., 2011; Wager et al., 2014). Além disso, é um organismo poiquilotérmico e os embriões em desenvolvimento não possuem uma placenta. Por conseguinte, os fármacos testados no peixe-zebra podem ser metabolizados de forma diferente ou, pelo menos, a uma velocidade diferente em comparação com os mamíferos alterando a sua função. No entanto, os embriões de peixes-zebra expostos a fármacos no seu meio de crescimento absorvem estes diretamente, sem sofrer quaisquer modificações pelo metabolismo da mãe ou da placenta, o que pode ser vantajoso para certos estudos.

Outro aspeto a ter em conta é o facto de no peixe-zebra se frequente encontrar genes em número duplicado o que é explicado pelo facto do antepassado comum dos Teleósteos ter sofrido uma duplicação completa do seu genoma há aproximadamente 100-420 milhões (Meeker and Trede, 2008). A este evento seguiram-se fenómenos de perda de algumas cópias, durante a história evolutiva do peixe-zebra em particular. Atualmente pensa-se que cerca de 20 a 30% dos pares de genes duplicados, designados de parálogos, foram preservados neste organismo (Force et al., 1999; Spitsbergen and Kent, 2003). Outro processo que parece ter acontecido após a duplicação do genoma dos teleósteos foi a

chamada sub-funcionalização das duas cópias resultantes. Isto é, alguns dos genes duplicados parecem ter adquirido uma nova função, expressando-se em territórios distintos quando comparados com os genes homólogos de organismos que não sofreram este evento de duplicação do genoma (Force et al., 1999; Hill et al., 2005). Também foram descritas circunstâncias que apontam para a função dos genes duplicados se ter tornado redundante. Ou seja, pensa-se que em peixe-zebra alguns parálogos têm uma função tão semelhante entre si que inclusivamente têm a capacidade de se substituir ou compensar em situações de perda de função de um dos parálogos. Isto quer dizer que, por exemplo, uma mutação num mamífero pode acarretar uma anomalia grave ou mesmo a morte enquanto que se ocorrer apenas num dos parálogos do peixe-zebra causa um fenótipo pouco severo sem consequências de maior para o organismo (Hill et al., 2005). Este facto torna mais complexa a caracterização funcional génica neste modelo animal (Delvecchio et al., 2011). Por exemplo, o uso de técnicas de deleção ou de silenciamento da atividade génica (do inglês *knockouts*, *knockdowns*) são difíceis por vezes de interpretar nestes organismos dado que um gene pode compensar a perda de função produzida no seu parálogo (Leong et al., 2012). No entanto, esta duplicação de genes observada no peixe-zebra pode fornecer em situações muito específicas a possibilidade de estudar o impacto de formas duplicadas para melhor entender a potencialidades das proteínas codificadas por estes genes. Este é um campo ainda pouco explorado mas que pode ter implicações para futuras terapias génicas.



Figura 4: Sistema aquático de peixe-zebra do IBMC. Este sistema tem capacidade para albergar inúmeras linhas transgênicas e proporciona a fácil manutenção dos parâmetros bioquímicos da água bem como a alimentação e manuseamento dos animais.

Imagem de Pedro Monteiro

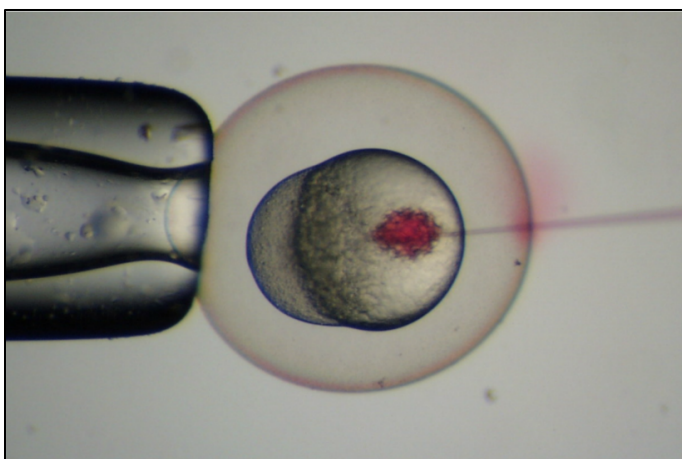


Figura 5: Processo de microinjeção efectuado num embrião de peixe-zebra. Imagem de David Mawdsle.

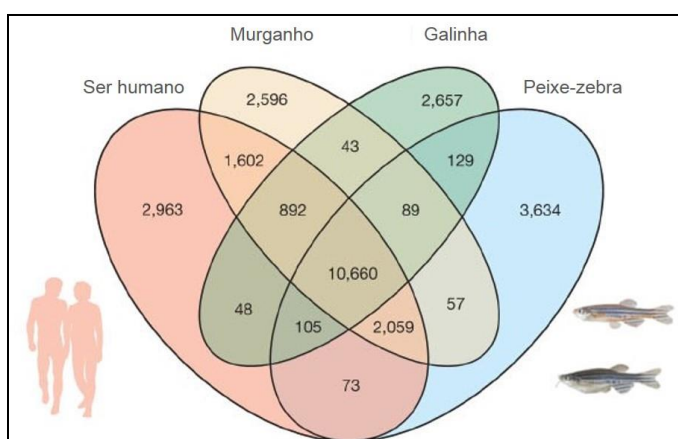


Figura 6: Genes ortólogos que o Homem partilha com outras espécies. Cerca de 70% de genes humanos estão conservados no peixe-zebra e 84% dos genes associados a doenças humanas estão presentes nesse organismo (Howe et al., 2013).

1.2 Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra

De forma a padronizar o desenvolvimento do peixe-zebra foram estabelecidos estádios que têm em conta as horas pós fertilização (hpf) em condições de temperatura padrão (28,5°C) e nos quais de podem facilmente distinguir determinadas características morfológicas tais como número de células e sómitos(Kimmel et al., 1995).

Durante a embriogénese ocorrem as transformações mais importantes que vão definir todas as estruturas do peixe e divide-se em sete períodos de desenvolvimento: zigoto, clivagem, blastulação, gastrulação, segmentação, farínghula e eclosão (Fig.7) (Kimmel et al., 1995).

a) Zigoto

A fase de *Zigoto* (0-0.75hpf) compreende o período de 40 minutos entre a fertilização e a primeira divisão celular e foi designado como “one-cell stage” por Zimmel et al

(Kimmel et al., 1995). Os processos de micro-injeção de RNA e DNA são feitos durante este período para facilitar a difusão homogênea por todas as células provenientes desta célula primordial (Fig. 5, Fig.7).

b) Clivagem

A fase de *Clivagem* (0.75-2.25 hpf) tem a duração de 95 minutos e é caracterizada pela divisão da célula primordial gerando novas células (blastómeros). Estas divisões são consideradas meroblásticas, por ocorrerem apenas num dos pólos da célula (pólo animal, Fig. 7). As seis divisões que compõem este período frequentemente ocorrem em orientações regulares (síncronas). Existem vários estádios de *Clivagem* começando com o “estádio de 2 células” (do inglês *two-cell stage*) até ao “estádio de 64 células” (do inglês *64 cell-stage*) (Fig. 7).

c) Blastulação

Durante a *Blastulação* (2.25-5.25 hpf), os planos de divisão passam a ser irregulares e assíncronas designando-se do tipo meroblástico discoidal por levarem à formação de um blastodisco (Fig. 7). As células do blastodisco reorganizam-se e separam-se do saco vitelino, localizado no pólo oposto (pólo vegetativo) através do aparecimento da camada vitelina sincicial (do inglês *Yolk Syncytial Layer-YSL*, Fig. 7j-k). O início da *Epibolia* é marcado pelo estreitamento e alongamento tanto da YSL como do blastodisco, de modo a englobarem crescentemente as células vitelinas (Fig. 8). Nesta fase as divisões celulares cessam na YSL e os núcleos aumentam exponencialmente o seu tamanho, pensando-se que isto está relacionado com a transcrição ativa de RNA (Kimmel et al., 1995; Webb and Miller, 2006). Pensa-se também que a YSL desempenha uma função importante na difusão dos nutrientes desde o vitelo.

d) Gastrulação

No período de *Gastrulação* (5,25 – 10 hpf) prossegue o movimento de epibolia, involução e extensão convergente que produzem os folhetos germinativos primários (Fig. 9A) (Gilbert., 2000; Kimmel et al., 1995). Destes fazem parte a *ectoderme* que tem origem nas células mais superficiais (do inglês *Enveloping Layer-EVL*); a *mesoderme* que tem origem nas camadas mais profundas (do inglês *Deep cells*); e a *endoderme* que tem origem na célula de vitelo (do inglês *Yolk cell*). Com o decorrer da *Gastrulação*, ocorre uma diferenciação das *Deep cells* o que origina duas camadas distintas: uma mais interna designada de *hipoblasto* e outra mais externa designada de epiblasto (Fig. 9B). Pensa-se que o hipoblasto se origina por

delapidação das células mais superficiais ou por movimentos de involução (Fig. 9C). A parte que durante o desenvolvimento origina a região caudal do embrião é onde o espessamento do hipoblasto é mais pronunciado. Nesta zona forma-se uma estrutura organizadora do desenvolvimento designada de escudo embrionário (do inglês *Embryonic shield*). A formação do escudo embrionário é um passo fundamental para o desenvolvimento do embrião, pois permite a diferenciação dorso-ventral (DV) através da expressão de genes que proporcionam um desenvolvimento assimétrico nestes domínios (Fig. 9C). No final deste período conclui-se a epibolia e é possível diferenciar que parte do anel germinativo vai dar origem à região da cabeça, tronco e cauda do embrião (Fig. 9D-E).

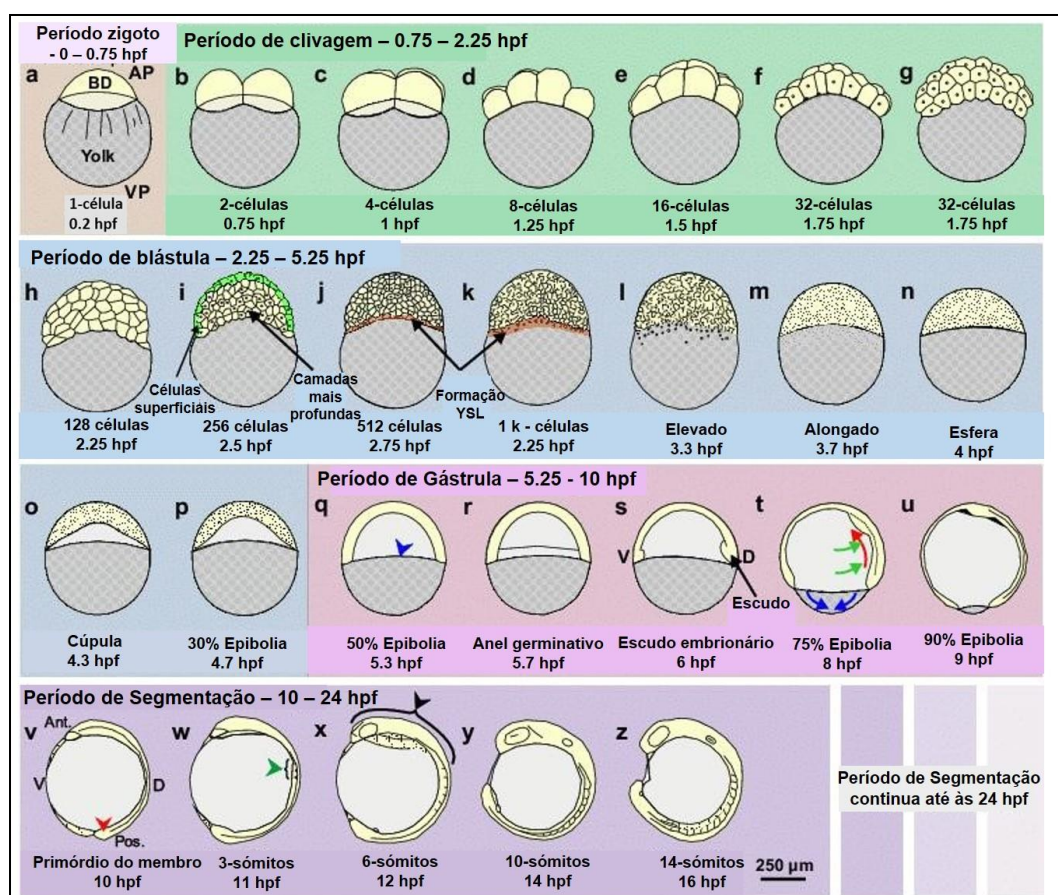


Figura 7: Fases de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. Após o breve período *Zigoto* (painel a), quando o embrião está em fase de uma única célula, inicia-se a *Clivagem* (painéis b-g). Depois começa o período de *Blástula* (painéis h-p), a qual se segue o período de *Gástrula* (q-u). Finalmente, a *Segmentação* ocorre a partir das 10 hpf (v-z) (Webb and Miller, 2007)

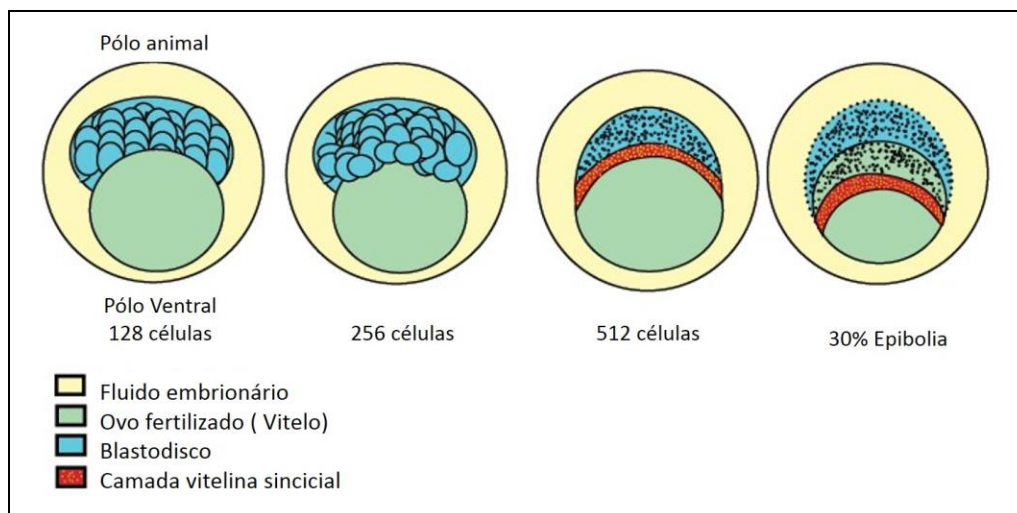


Figura 8: Esquema representativo da Blastulação do peixe-zebra. A epibolia começa com o englobamento gradual do vitelo.

e) Segmentação

O período de segmentação (10-24 hpf) é definido por uma variedade de modificações que irão ocorrer no embrião e que englobam uma regionalização ao longo do eixo antero-posterior (AP) levando à formação dos sómitos e ao posicionamento dos órgãos internos (Fig. 7) (Kimmel et al., 1995). Esta fase do desenvolvimento embrionário é facilmente caracterizável pela presença de uma extremidade posterior lobosa (tail bud) formada por tecido mesodérmico que ainda não se organizou em sómitos.

f) Larva faríngula

Neste período do desenvolvimento (24-48 hpf) os embriões de peixe-zebra já possuem as características básicas, com o corpo dividido em sómitos que se estendem até à extremidade posterior envolvendo estruturas como o tubo nervoso e o notocórdio (Kimmel et al., 1995). No entanto é no período de larva faríngula que se inicia o desenvolvimento das barbatanas peitorais, a pigmentação do corpo, a formação do sistema circulatório e o batimento cardíaco (Kimmel et al., 1995).

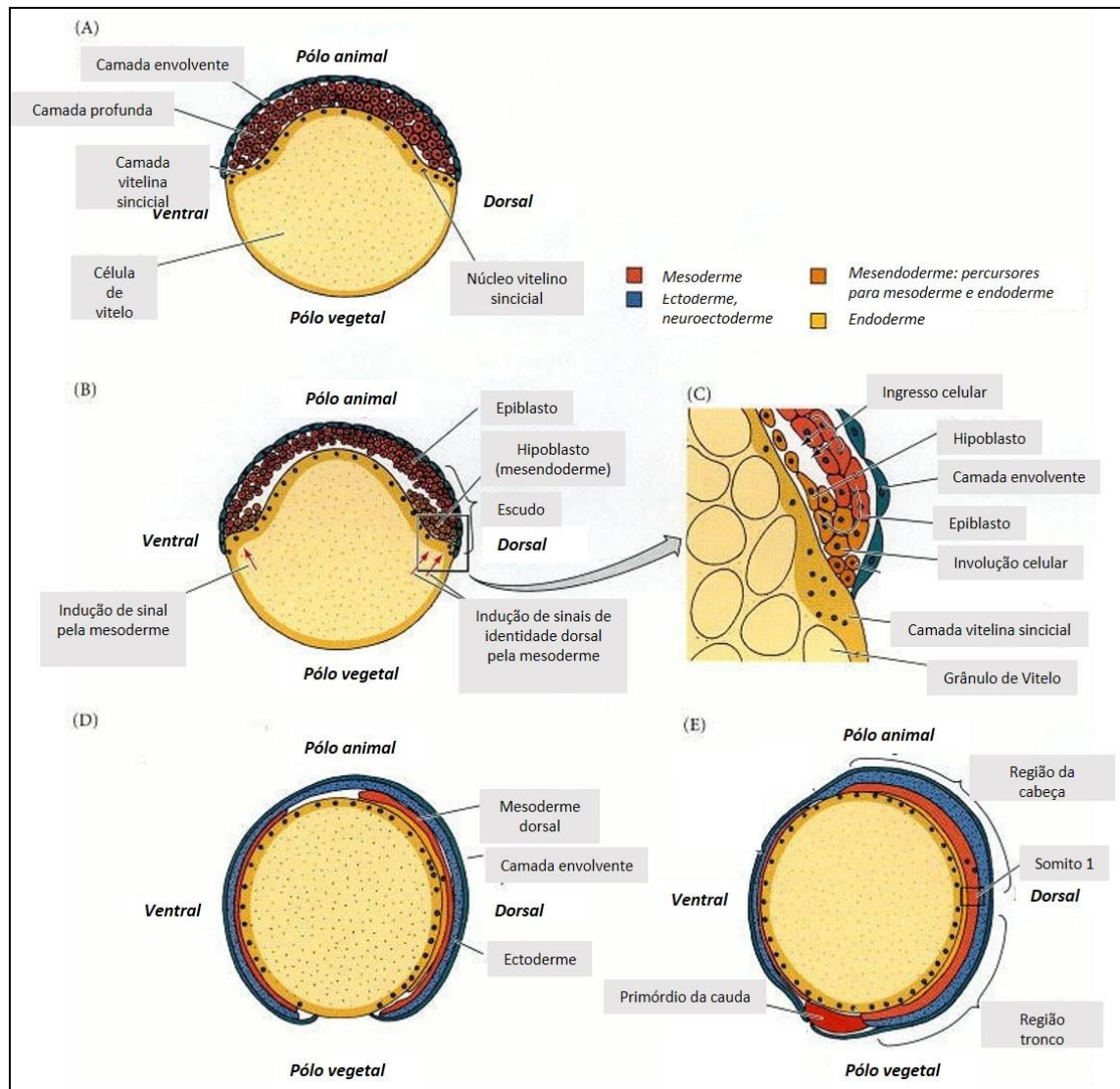


Figura 9: Movimentos celulares durante a gastrulação do peixe-zebra. A. Blastoderme a 30% de conclusão de epibolia (cerca de 4,7 hpf). **B.** Formação de hipoblasto, quer por involução de células na margem da blastoderme quer por deslaminação de células do epiblasto (6 hpf). **C.** Região posterior do embrião onde se forma o escudo embrionário. **D.** Embrião a 90% epibolia (9 hpf), a mesoderme pode ser vista ao redor do vitelo, entre a endoderme e ectoderme. **E.** Conclusão da gastrulação (10.3 hpf) (Gilbert., 2000).

g) Eclosão

O período de *Eclosão* é facilmente identificável como o momento em que os embriões saem do *corium* e iniciam a natação (48-72 hpf), no entanto este processo não é totalmente sincronizado em todos os embriões de uma mesma postura (Fig. 10). Nesta altura a morfogénese da maioria dos órgãos encontra-se concluída, com exceção do intestino e

órgãos anexos (Kimmel et al., 1995). Este período é também caracterizado pelo rápido desenvolvimento das barbatanas peitorais, mandíbulas e brânquias (Kimmel et al., 1995).

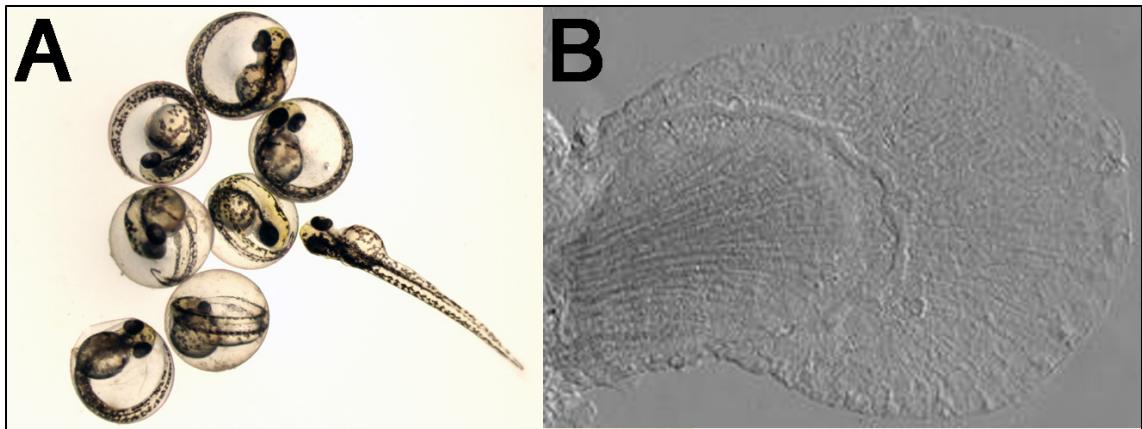


Figura 10: Embriões de peixe-zebra em fase de eclosão. A. Conjunto de embriões com o mesmo tempo de desenvolvimento, um deles já rompeu o corium. Fotografia de *Dries Knapen* **B.** Morfologia geral de uma barbatana peitoral durante este período de desenvolvimento embrionário. Fotografia de *Janelle Weaver*.

h) Larva primordial

O período *larvar* do peixe-zebra (72 hpf) é bastante extenso podendo durar cerca de um mês (Kimmel et al., 1995). Os principais eventos que ocorrem durante este período são o crescimento do corpo, o inflar da bexiga natatória e a abertura da boca torna-se mais proeminente. Adicionalmente, o vitelo vai desaparecendo visivelmente e o animal inicia a alimentação autônoma (Fig. 11). As larvas de peixe-zebra caracterizam-se também por uma maior mobilidade nadando ativamente, movendo as mandíbulas, os opérculos, as barbatanas peitorais e os olhos. Estes desenvolvimentos promovem respostas rápidas de fuga ou predação.

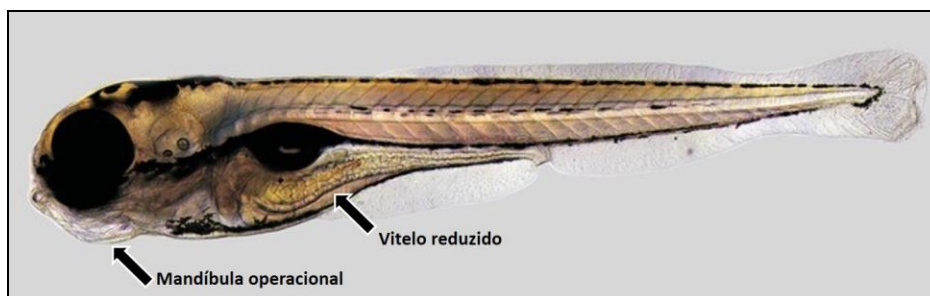


Figura 11: Início do período larvar em peixe-zebra.

1.3 Desenvolvimento das barbatanas do peixe-zebra

O peixe-zebra, tal como a esmagadora maioria dos gnatostómios, caracterizam-se por possuírem dois pares de apêndices locomotores localizados na parede ventrolateral do corpo: um par de barbatanas peitorais (homólogas aos membros anteriores dos tetrápodes) e um par de barbatanas pélvicas (homólogas aos membros posteriores dos tetrápodes (Fig. 12A). Estes apêndices contêm dois tipos de elementos ósseos. Na parte mais proximal possuem elementos endoesqueléticos formados por cartilagem e osso mineralizado (Fig. 12B,C). Estas estruturas suportam a massa muscular e, tal como ela, são derivados da mesoderme embrionária. Na parte mais distal os apêndices do peixe-zebra possuem elementos dermoesqueléticos, formados por estruturas ossificadas designadas de lepidotriquias e actinotriquias (Fig. 12B,C). Pensa-se que estas fibras se diferenciam a partir de células da ectoderme embrionária (Sordino and Duboule, 1996). As lepidotriquias são estruturas ósseas segmentadas que aparecem pareadas bilateralmente e se desenvolvem à volta das fibras actinotriquias (Fig. 12D).

No peixe-zebra, tal como no geral dos gnatostómios, os apêndices locomotores formam-se pela proliferação de um tipo específico de tecido mesodérmico (LPM-mesoderme latero ventral, Fig. 12 E,F). Logo a seguir a este processo de indução do território dos apêndices a ectoderme dessas zonas torna-se mais espessa formando uma pequena crista, a região ectodérmica apical (do inglês *apical ectodermal ridge*: AER Fig. 12G). Esta estrutura atua como um centro de sinalização para assegurar o desenvolvimento correto destes apêndices.

Durante o desenvolvimento dos primórdios das barbatanas peitorais, estimulado pela atividade da AER, assiste-se à diferenciação dos elementos do endoesqueleto a partir de células mesodérmicas (Fig. 12G). Este processo começa por volta das 36 hpf e dá origem a um disco cartilágneo que mais tarde se divide em diferentes segmentos (Grandel and Schulte-Merker, 1998b).

O processo de divisão destes segmentos inicia-se aos 21 dpf (dias pós fertilização) e só se completa a 30 dpf. Nesta fase, a AER sofre alongamento e origina uma prega de ectodérmica distal (do inglês *apical ectodermal fold*: AEF) onde se desenvolvem os elementos dérmicos da barbatana, ou actinotriquias (Schneider and Shubin, 2013) (Fig.12G). Também por volta dos 30 dpf, forma-se a lepidotriquia ao redor das fibras de actinotriquia.

A barbatana pélvica desenvolve-se mais tarde do que a barbatana peitoral, e só é detetada após 18 dias de desenvolvimento. Ao contrário da barbatana peitoral, a barbatana

pélvica forma diretamente os elementos de endoesqueleto, sem primeiro criar uma barbatana larvar intermédia formada pelo disco cartilágneo (Grandel and Schulte-Merker, 1998b).

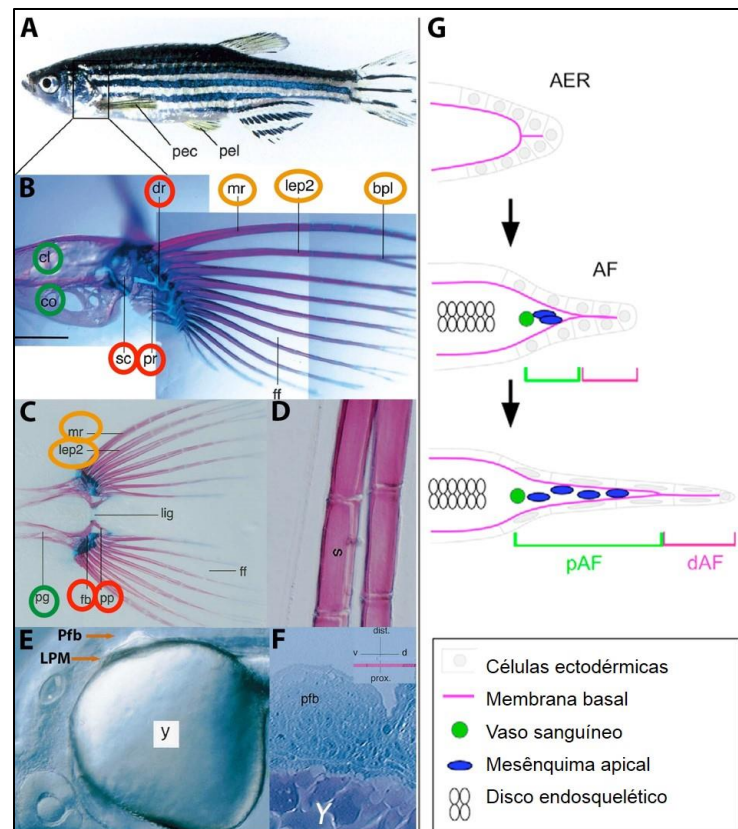


Figura 12: Estrutura de desenvolvimento das barbatanas de peixe-zebra. A. Localização das barbatanas peitorais (pec) e pélvicas (pel) no adulto. Zona da cintura peitoral encontra-se demarcada e ampliada em B. B-C Esqueleto da barbatana peitoral (B) e pélvica (C). A verde assinalam-se elementos da cintura peitoral, a vermelho elementos de endoesqueleto, a amarelo elementos dermoesqueléticos. D. Lepidotriquia que forma o dermoesqueleto. E. Embrião com o primórdio da barbatana peitoral (Pfb) a formar-se a partir de células da mesoderme latero-ventral (LPM). F. Corte histológico mostrando o primórdio da barbatana peitoral. G. Formação da prega ectodérmica distal (AEF ou AF) a partir da AER. Adaptado de (Grandel and Schulte-Merker, 1998b; Yano et al., 2012). y- yolk (vitelo).

1.4 O uso do peixe-zebra para estudos comparativos de evolução dos apêndices locomotores.

Dentro do grupo dos vertebrados, os animais tem vindo a ser classificados de acordo com importantes características que surgiram sequencialmente durante a evolução. Estas análises, baseadas fundamentalmente em características morfológicas, foram depois

validadas por estudos filogenéticos que usam comparações moleculares (Brazeau and Friedman, 2015). Assim, a primeira grande divisão que foi estabelecida tem em conta a origem da mandíbula (Fig. 13), que parece ter ocorrido há cerca de 419 milhões de anos atrás (Zhu et al., 2013), dividindo os vertebrados em agnatas (sem mandíbula) e gnatostómios (com mandíbulas). Até aos nossos dias, apenas sobreviveram dois grupos de vertebrados agnatas: as lampreias e as enguias-de-muco (do inglês *hagfish*). Os gnatostómios atuais têm todos uma característica que foi bastante importante em termos evolutivos, a existência de dois pares de membros posicionados no corpo de forma bastante conservada. Os representantes dos animais mais ancestrais deste grupo, ainda encontrado nos nossos dias, são os tubarões, raias e quimeras. Nos gnatostómios existem também dois grandes grupos a considerar, os animais de esqueleto cartilágneo (*Chondrichthyes*), que são precisamente os acima referidos, e os animais de esqueleto ósseo (*Osteichthyes*).

O grupo dos *Osteichthyes* sofreu uma enorme radiação por todo o planeta ocupando habitats muito diversificados, tanto terrestres como aquáticos, e aqui se englobam animais tão diversos como os peixes e os seres humanos. Isto significa que o uso de peixes ósseos como modelos experimentais, como é o caso do peixe-zebra, é extremamente relevante para entender mecanismos moleculares que também existem nos humanos dada a relativa proximidade filogenética que ainda assim possuem (Fig. 14).

Dentro dos *Osteichthyes* diferenciam-se duas categorias de animais, os actinoptérgios e os sarcopterírgios (Fig.13-14). Os actinoptérgios caracterizam-se por barbatanas que terminam distalmente com uma prega de origem ectodérmica suportada por espinhas finas (também se usa a designação do inglês *ray-finned fish*). Deste grupo fazem parte a esmagadora maioria dos peixes atuais. Em contraste, os sarcopterírgios, possuem membros mais lobados, com mais elementos de endoesqueleto, e em que a parte distal de dermoesqueleto se encontra bastante reduzida ou mesmo ausente (também se usa a designação do inglês *lobe-finned fish*). Constata-se assim que no grupo dos sarcopterírgios, do qual os humanos fazem parte, houve uma drástica modificação dos apêndices locomotores (Fig. 15). Tem-se especulado que isto pode ter facilitado a colonização de ambientes terrestres por parte de um grupo em particular dentro dos sarcopterírgios, designado de tetrápodes, no qual os humanos se incluem (Shubin et al., 2009). Os apêndices locomotores dos tetrápodes caracterizam-se pela total ausência da estrutura de dermoesqueleto distal e possuem, em sua substituição, extremidades multidigitadas designadas de mãos e pés na espécie humana (Fig. 15). Este processo de modificação entre os apêndices dos peixes e dos tetrápodes parece ter-se completado há cerca de 350 milhões de anos atrás (Fig.14). De forma a entender as mudanças na biologia do desenvolvimento que operaram durante esta

transição morfológica, tem-se vindo a usar o peixe-zebra como modelo caracterizando o que leva à produção ou à repressão do dermoesqueleto distal ou que mecanismos podem estar na origem de significantes mudanças nos seus ossos, músculos e nervos (Freitas et al., 2012; Neyt et al., 2000; Sordino et al., 1995).

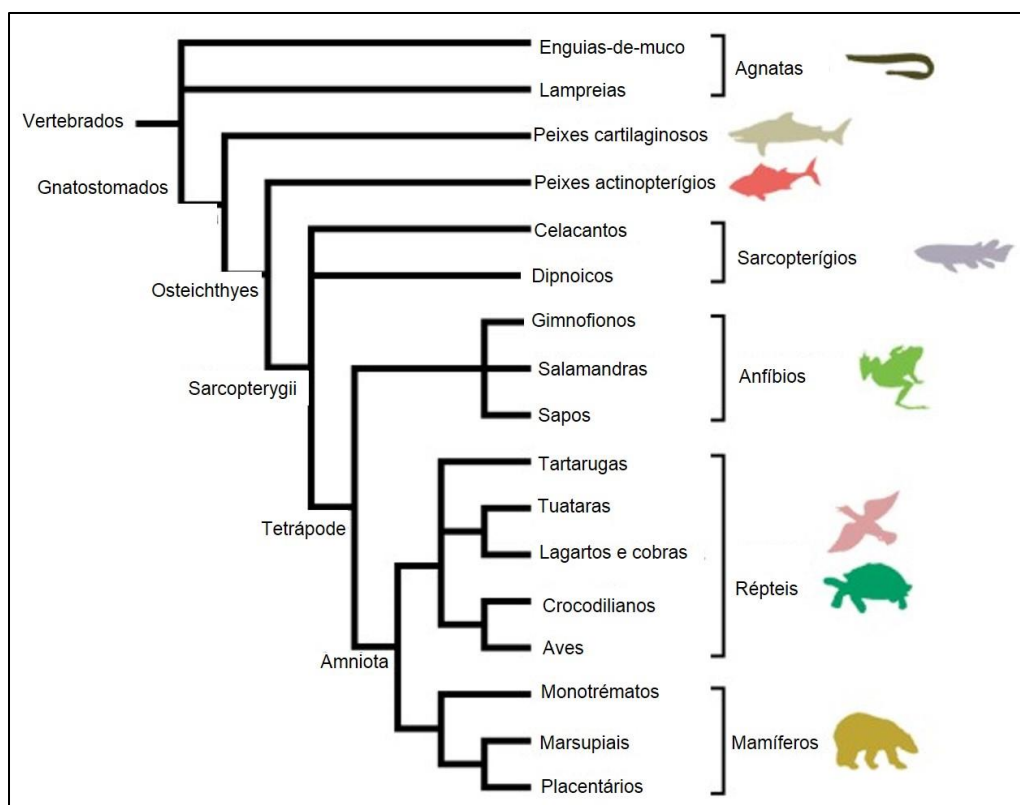


Figura 13: Filogenia das linhagens dos vertebrados. UCL- University College of London website.

Conclui-se assim que a posição filogenética do peixe-zebra, sendo um representante dos primeiros animais que desenvolveram esqueleto ósseo (Osteichthyes), faz com que este seja útil para entender os mecanismos moleculares ancestrais que levaram ao aparecimento desta característica. Adicionalmente como são animais em que ainda não apareceram os membros caracterizados por extremidades multidigitadas, permitem também estudar os mecanismos moleculares envolvidos na origem desta importante característica. É de salientar também que, mesmo não sendo dentro dos vertebrados o representante mais ancestral destes animais, é o organismo modelo em que mais facilmente se podem obter embriões, fazer ensaios funcionais e estudos de comparação génica. Como tal, o peixe-zebra é o organismo modelo de eleição nos laboratórios que desenvolvem trabalho no sentido de compreender a

evolução dos vertebrados, nomeadamente dos seus apêndices locomotores (Metscher and Ahlberg, 1999). Nesta dissertação usamos este modelo para caracterizar o desenvolvimento dos apêndices (barbatanas) dos peixes e realizar comparações com animais que evoluíram mais recentemente. Para este fim tiramos vantagem do seu potencial como animal de laboratório realizando ensaios funcionais em que nomeadamente se manipulou a expressão génica para simular o que se pensa ter ocorrido durante a evolução.

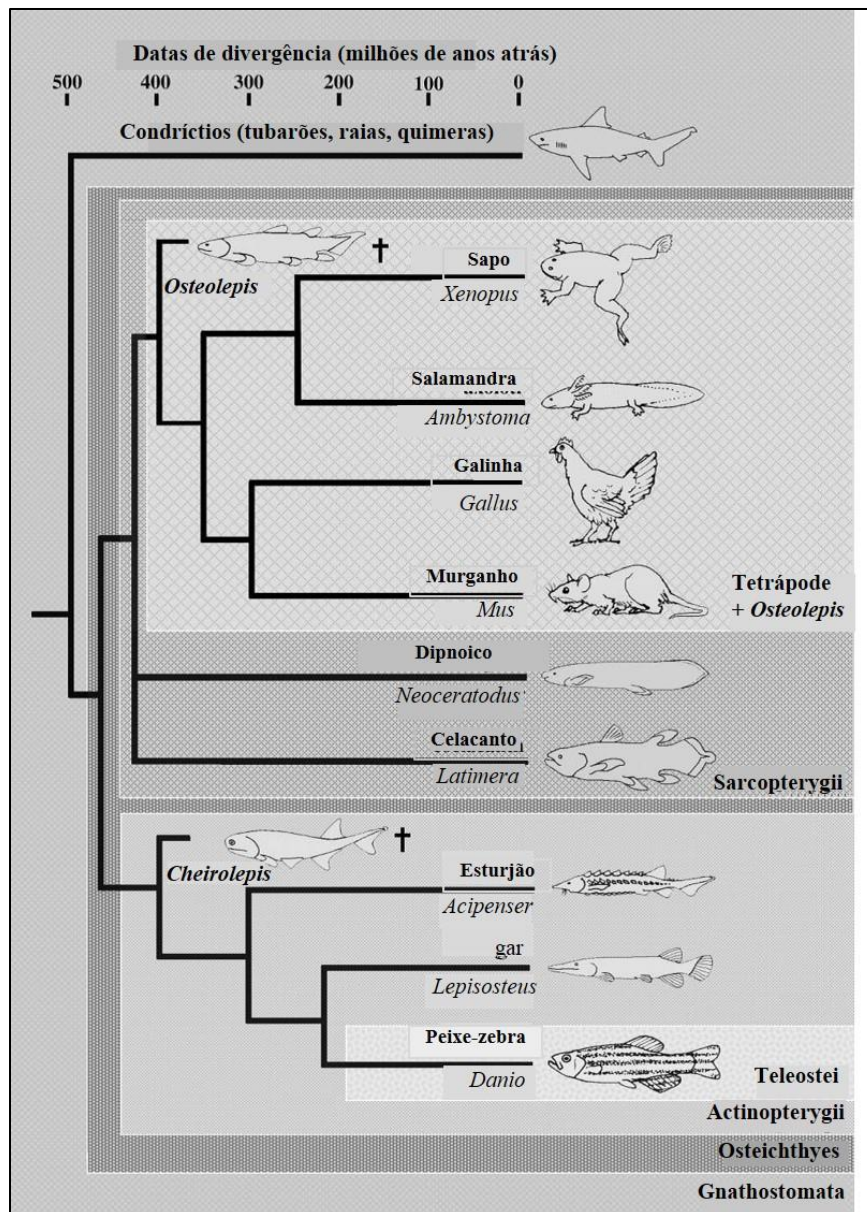


Figura 14: Posição relativa do peixe-zebra (*Danio*) dentro da linhagem dos gnatostómios (Metscher and Ahlberg, 1999).

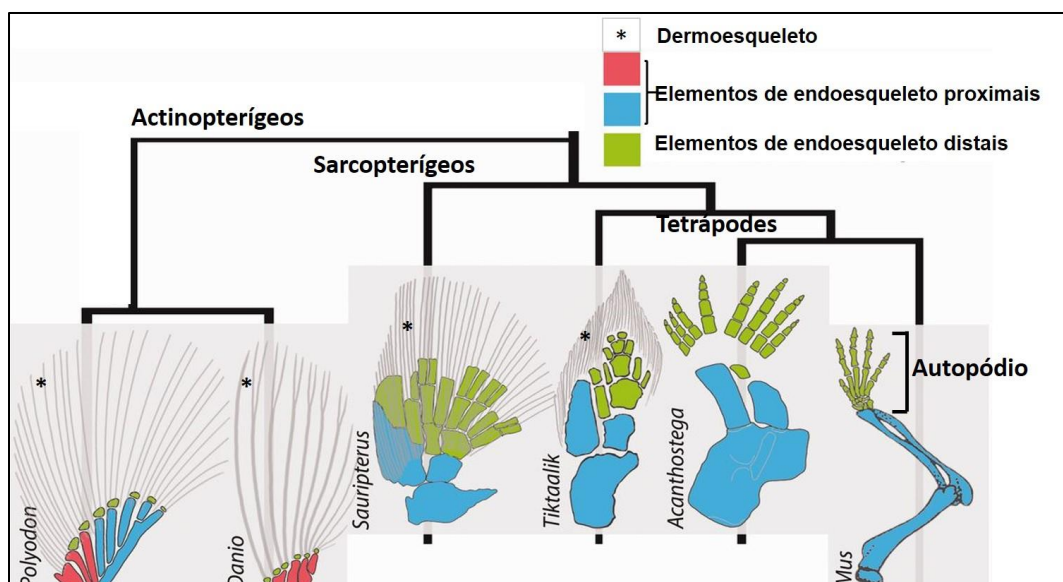


Figura 15: Esquema representativo da evolução dos apêndices locomotores. Nos sarcoptérgios desenvolveram-se novos elementos de endoesqueleto (verde) ao mesmo tempo que se foi reduzindo o dermoesqueleto (asterisco). Nos tetrápodes esta estrutura distal desaparece por completo e surgem extremidades multidigitadas (autopódios). Modificado de (Davis, 2013).

1.5 Desenvolvimento e evolução dos apêndices locomotores nos vertebrados

O registo fóssil sugere que as barbatanas nos peixes sofreram sucessivos passos de elaboração do seu endoesqueleto distal que culminou com o aparecimento dos autopódios nos tetrápodes (Fig. 15). Estas estruturas funcionaram como importantes adaptações morfológicas que facilitaram a transição dos tetrápodes do meio aquático para o meio terrestre (Wagner and Chiu, 2001).

Os primeiros processos de desenvolvimento dos apêndices locomotores são semelhantes tanto nos peixes como nos tetrápodes. Iniciam-se pela proliferação da mesoderme latero-ventral (LPM) e a indução de uma região ectodérmica apical (AER). Esta estrutura produz moléculas que atuam como fatores de crescimento (do inglês *fibroblast growth factors*-fgfs), entre outras proteínas que especificam um domínio distal do membro e mantêm a proliferação celular conducente ao crescimento ao longo do eixo proximal distal (PD) (Schneider and Shubin, 2013; Sordino and Duboule, 1996; Zeller, 2010). Simultaneamente, as células do mesênquima posterior formam a zona de atividade de polarizadora (ZPA), caracterizadas pela produção da proteína *sonic hedgehog* (*Shh*), que depois se difunde pelo resto do primórdio dos apêndices locomotores levando à diferenciação ao longo do eixo antero-posterior (AP) (Schneider and Shubin, 2013). Um ciclo de feedback positivo entre *Shh*

(produzido na ZPA) e Fgf (produzido na AER) ajuda a manter o crescimento e polaridade no membro em desenvolvimento (Fig. 16) (Schneider and Shubin, 2013).

Com o decorrer do desenvolvimento dos apêndices começam-se a detetar diferenças claras entre o desenvolvimento das barbatanas dos peixes e os membros dos tetrápodes. Em primeiro lugar, nos peixes, a AER alonga de forma a gerar uma prega ectodérmica distal que dá origem ao dermoesqueleto da barbatana (AEF, Fig. 12). Este processo não ocorre nos tetrápodes, no qual a AER permanece até à fase de diferenciação dos dígitos (Mariani and Martin, 2003; Schneider and Shubin, 2013). Em segundo lugar durante a diferenciação do endoesqueleto nos peixes não se formam as estruturas terminais digitadas características dos tetrápodes (autopódios). Os peixes teleósteos atuais têm barbatanas com pouco endoesqueleto, em comparação com o dermoesqueleto (Fig. 15). Nestes animais foi sugerido que, a ausência de uma estrutura homóloga ao autopódio dos tetrápodes foi sugerido poder resultar da interrupção precoce da proliferação e simultâneo crescimento da AEF (Sordino and Duboule, 1996). Assim, a barbatana pode ser considerada como um membro reduzido, na qual o grau de desenvolvimento de elementos esqueléticos parece estar associado com o alongamento distal da AEF (Sordino and Duboule, 1996).

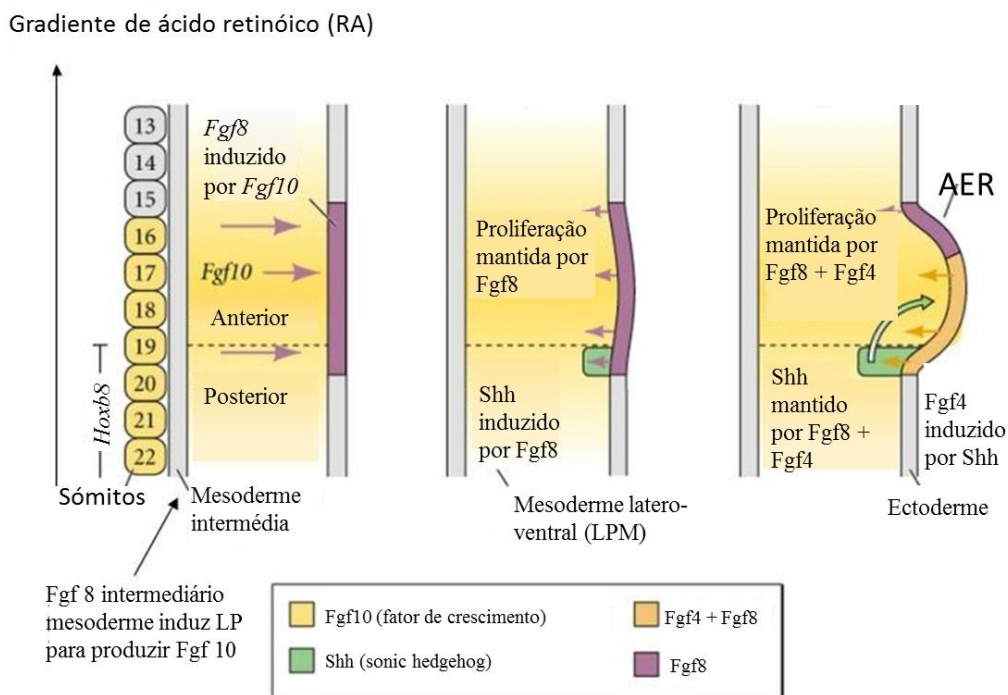


Figura 16: Esquema representativo do desenvolvimento dos apêndices locomotores. Modificado de (Gilbert, 2000).

1.6 Genes *hox* e a evolução dos apêndices locomotores nos vertebrados

A família de genes *Hox* está presente no genoma de todos os animais metazoários (Fig. 17) e é essencial para o desenvolvimento completo dos organismos, especialmente na definição de identidade regional ao longo do eixo antero-posterior (AP) (Gilbert, 2000). Em alguns grupos de animais eles também regulam a formação de tipos celulares específicos e a formação de órgãos ou estruturas, como é o caso do endoesqueleto. Estes genes codificam fatores de transcrição que regulam a expressão de muitos outros genes presentes no genoma. Desta forma eles conseguem influenciar o “ambiente” celular, em termos de quantidade e tipo de transcritos, o que condiciona a atividade e a identidade das células (Fig. 18-19).

Nos vertebrados existem 4 grupos distintos destes genes no genoma (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, *HoxD*) (Fig. 17). Cada grupo de genes *Hox* (do inglês *cluster*), possui cerca de 13 genes organizados de forma específica. Dando como exemplo o grupo *HoxD*, o primeiro gene na extremidade 3' recebe o nome de *Hoxd1*, os genes subsequentes vão recebendo numeração crescente, terminando com o *Hoxd13* no final do grupo. Curiosamente verificou-se que os genes são expressos temporalmente e espacialmente de acordo com o seu posicionamento no grupo (Fig. 17). Assim, o primeiro gene na extremidade 3' é o que se expressa mais cedo durante o desenvolvimento e em territórios mais anteriores do embrião. Os genes que se lhe seguem são sequencialmente expressos em territórios cada vez mais posteriores do embrião. A este fenómeno chama-se colinearidade temporal e espacial e dele depende a capacidade dos genes *Hox* coordenarem a diferenciação ao longo do eixo AP. Isto deve-se ao facto das células expressarem os genes *Hox* diferencialmente ao longo deste eixo, o que se designa de código *Hox*.

Os genes localizados no grupo *HoxD* são essenciais para o desenvolvimento dos membros nos tetrápodes, e a sua expressão divide o primórdio do membro em vários territórios celulares (Fig. 20). A região proximal do membro é onde se diferencia o úmero e o fémur (estilopódio) e caracteriza-se pela expressão do *Hoxd9* e *Hoxd10*. A região intermédia dá origem aos ossos intermédios tais como a tíbia (zeugopódio) e caracteriza-se pela expressão dos genes *Hoxd9*, *Hoxd10*, *Hoxd11*, *Hoxd12* e *Hoxd13*. Estes genes são expressos em padrões sobrepostos em que os transcritos do *Hoxd9* aparecem em todo o primórdio do membro enquanto os de outros genes aparecem sequencialmente em territórios mais posteriores. A região terminal dá origem ao autopódio e caracteriza-se pela expressão dos genes *Hoxd10*, *Hoxd11*, *Hoxd12* e *Hoxd13* em todo esse domínio. Assim, constata-se que os

genes da extremidade 5' do *grupo* HoxD são essenciais para a formação apropriada do autopódio e foi proposto estarem envolvidos na transição evolucionária de barbatanas de peixe para membros de tetrápode (Kmita et al., 2002; Sordino et al., 1995).

De facto, estudos realizados em vários peixes, incluindo o peixe-zebra mostraram, que estes genes não são expressos tão fortemente nos territórios mais distais das barbatanas em desenvolvimento (Ahn and Ho, 2008; Davis et al., 2007; Freitas et al., 2007; Johanson et al., 2007) (Fig. 21). Estas observações renovam a ideia de que a modulação da transcrição de genes HoxD da extremidade 5' pode ter sido um mecanismo evolutivo chave para a formação de novos elementos endosqueléticos distais em peixes, conduzindo lentamente à formação dos autopódios que ocorreu nos tetrápodes há cerca de 350 milhões de anos atrás (Freitas et al., 2012; Freitas et al., 2007) (Fig. 22). Deste modo, a caracterização dos mecanismos de desenvolvimento associados com a modulação de genes Hoxd pode vir a contribuir para uma melhor compreensão da evolução destas estruturas. Adicionalmente estes estudos podem contribuir para entender de que forma mutações destes genes causam malformações nos membros em humanos, permitindo a identificação dos intervenientes moleculares responsáveis por estes fenótipos (Brison et al., 2012).

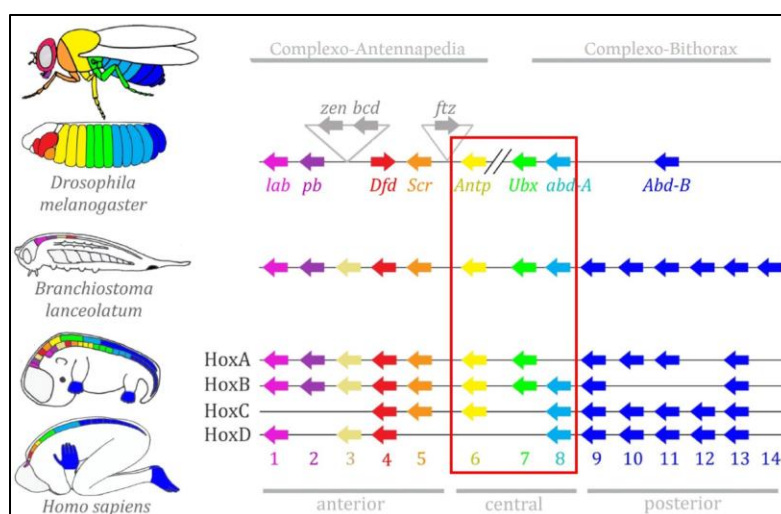


Figura 17: Esquema representativo dos genes *Hox* em distintos metazoários. Na coluna da esquerda estão indicados os padrões de expressão desses genes a diferentes cores e à direita indica-se a respetiva organização genómica. O esquema salienta a existência de 4 grupos de genes *Hox* nos vertebrados, dando como exemplo o homem (*HoxA*, *HoxB*, *HoxC*, *HoxD*). Mostra ainda o efeito da colinearidade espacial destes genes em que genes sequencialmente mais 5' no grupo são progressivamente expressos mais posteriormente no corpo. Modificado de (Hueber et al., 2010).

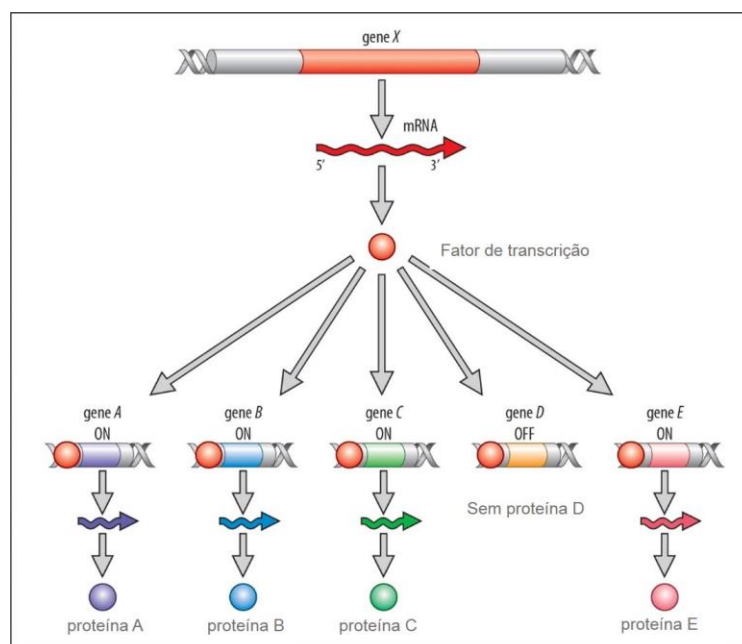


Figura 18: Esquema representativo da função dos fatores de transcrição. Demonstra-se aqui que estas moléculas podem ajudar a ativar certos genes (ex. gene A) a reprimir outros (ex. gene D). Esquema de *Brian E. Staveley (Memorial University, Canada)*.

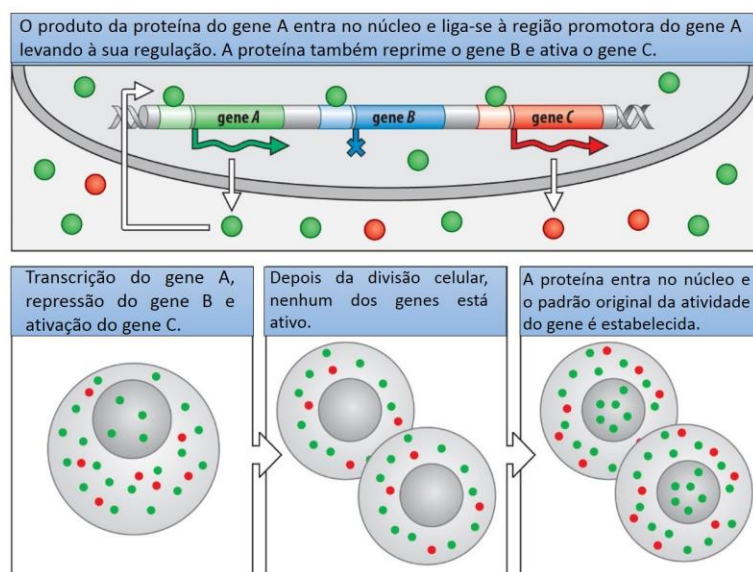


Figura 19: Esquema representativo do impacto que os fatores de transcrição têm no ambiente das células. Neste exemplo o fator de transcrição A leva à ativação do próprio gene que o codifica (gene A). Simultaneamente ativa o gene C e reprime o gene B levando a que as células em que isto acontece tenham proteínas do tipo A e C mas não do tipo B. Esquema de *Brian E. Staveley (Memorial University, Canada)*.

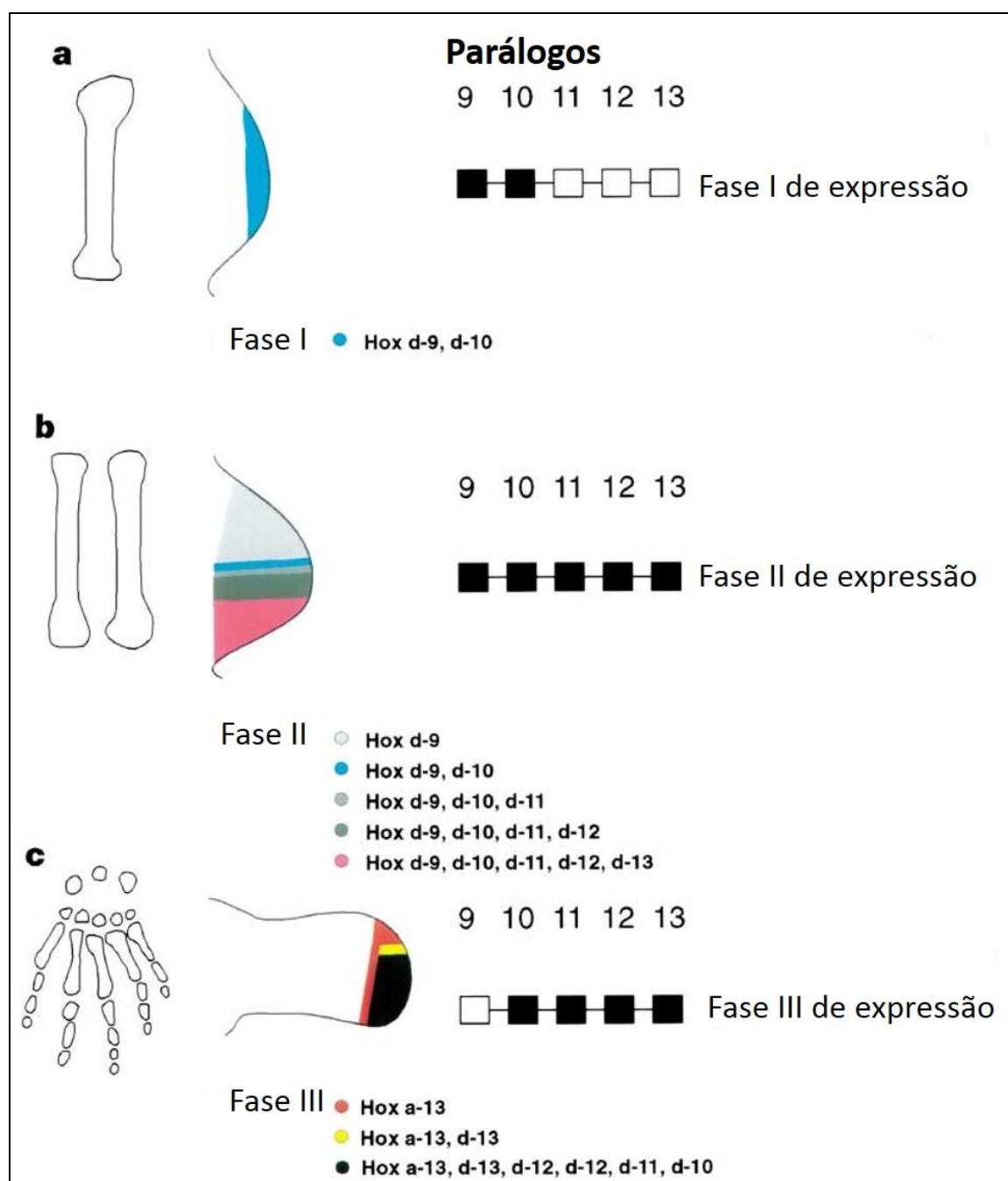


Figura 20: Esquema representativo dos distintos elementos do endoesqueleto e respetivos genes *Hox* envolvidos no seu desenvolvimento. a. Identidade do estilópodio é determinada pela expressão dos genes *Hoxd9* e *Hoxd10* durante a fase inicial da formação do primórdio do membro (Fase I). b. Identidade do zeugopódio é determinada pela expressão dos genes *Hoxd9*, *d10*, *d11*, *d12* e *d13* durante uma fase intermedia do desenvolvimento do membro (Fase II). c. Identidade do autopódio é determinada pela expressão de genes da extremidade 5' dos grupos HoxD e HoxA durante a fase terminal de formação do primórdio do membro (Fase III). Modificado de (*Shubin et al., 2000*).

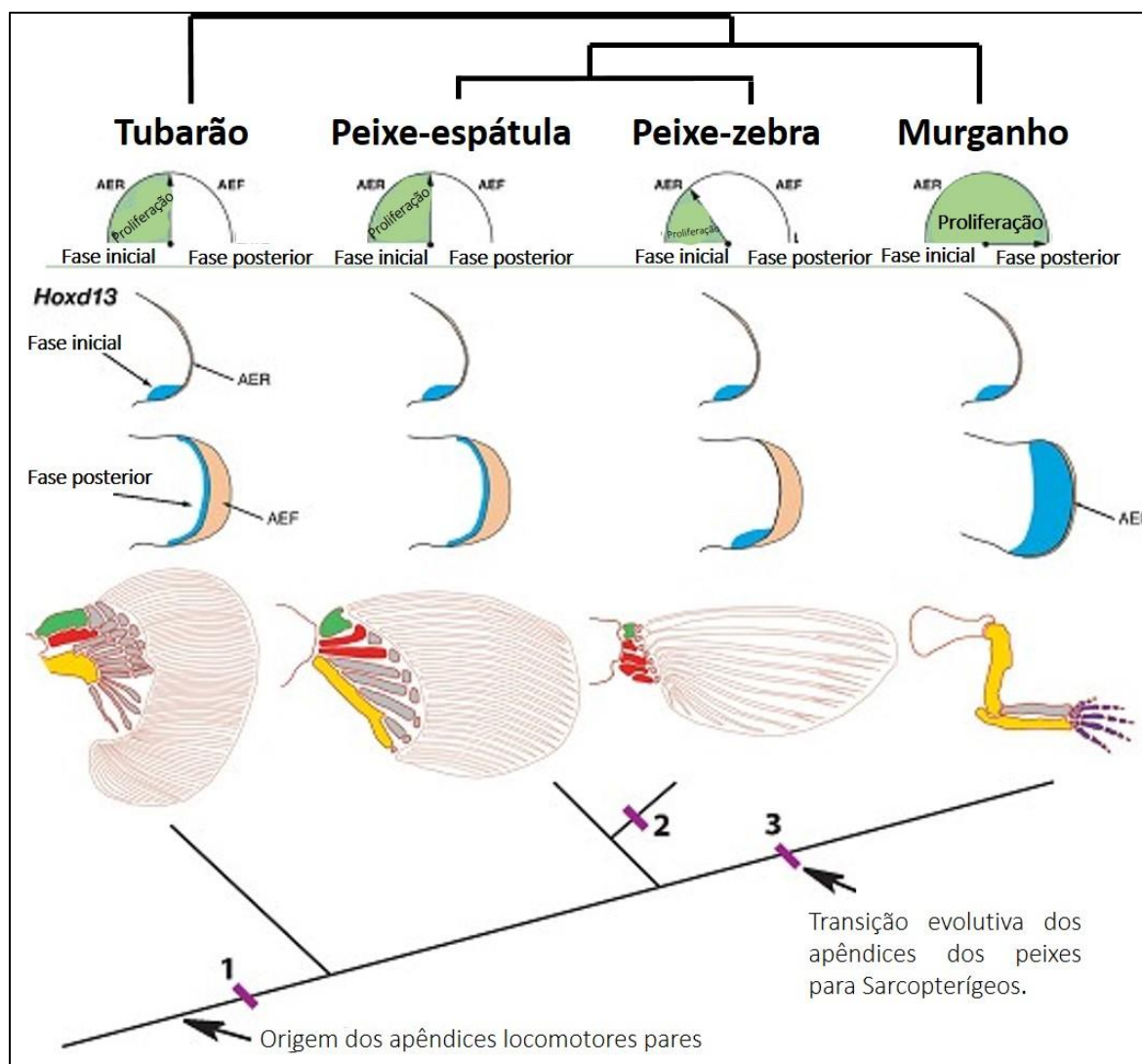


Figura 21: Esquema representativo do padrão de expressão do gene *Hoxd13* (azul) durante o desenvolvimento das barbatanas de peixe (tubarão, peixe-zebra) e dos membros dos tetrápodes (murganho). Verifica-se uma relação entre o aumento da expressão do domínio distal do gene *Hoxd13* e a transição morfológica entre os apêndices dos peixes e os membros dos tetrápodes. AER: região de ectoderme especializada (estrutura embrionária nos tetrápodes que atua como um centro de sinalização para assegurar o desenvolvimento correto destes apêndices). AEF: prega ectodérmica distal (estrutura embrionária de peixes que controla o desenvolvimento do dermoesqueleto). Modificado de (Freitas et al., 2007)

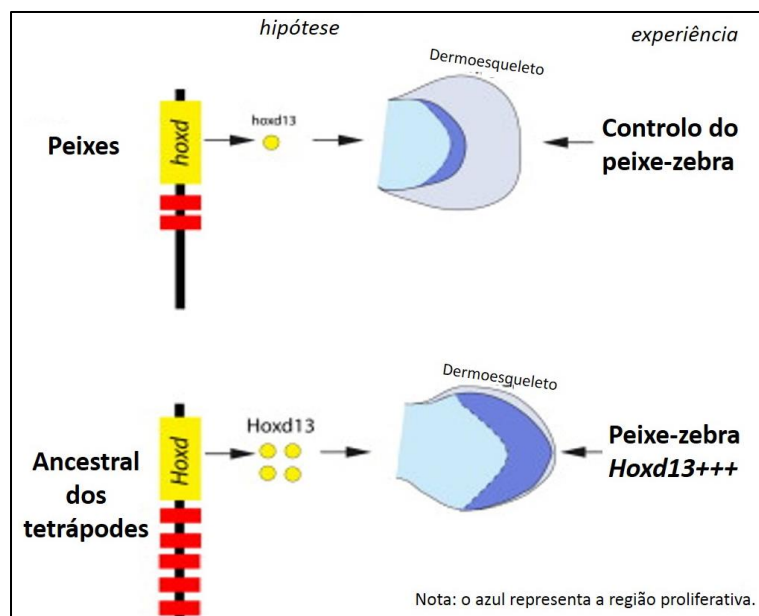


Figura 22: Esquema representativo da hipótese atual para a transição evolutiva dos apêndices dos peixes e membros dos tetrápodes. A maior produção de proteínas Hoxd13 (círculos amarelos) no tetrápode ancestral pode dever-se à aquisição de novas regiões enhancers (caixas vermelhas) que deram origem ao endoesqueleto distal e encurtamento do dermoesqueleto. Ensaio de sobre-expressão do gene *Hoxd13* realizado em embriões de peixe-zebra: nos painéis superiores encontram-se as barbatanas de controlo e nos painéis inferiores as barbatanas transgênicas. Modificado de (Freitas *et al.*, 2012).

1.7 Malformações congênitas associadas aos genes *hox*

Durante o desenvolvimento embrionário humano, a expressão do gene *HOXD13* em níveis apropriados é de extrema importância para a formação dos autopódios, tanto superiores (mãos) como inferiores (pés). São conhecidos vários casos em que mutações neste gene causam anomalias na estrutura destes apêndices. De acordo com a base de dados mundial de mutações humanas (<http://www.omim.org>) existem 6 tipologias associadas às mutações deste gene: síndrome de braquidactilia/sindactilia; braquidactilia tipo D; braquidactilia tipo E; sindactilia tipo V; Polissindactilia com anomalias nos pés; Polissindactilia tipo II. Os defeitos morfológicos que estão descritos caracterizam-se sobretudo pelo alterado número ou tamanho dos dígitos e ou pela fusão da sua componente óssea e muscular.

O síndrome de braquidactilia/sindactilia é causada por a deleções no gene *HOXD13* e parece ser congénita sendo descrito numa família chinesa na qual 23 elementos foram afetados ao largo de 6 gerações (Zhao et al., 2007). Estes indivíduos possuíam encurtamento dos dedos das mãos e dos pés (braquidactilia) e união cutânea de alguns dígitos (sindactilia). Análises radiográficas detectaram redução ou ausência de algumas falanges entre outras alterações na estrutura óssea dos autopódios.

As braquidactilias tipo D e E caracterizam-se pelo encurtamento de determinados ossos dos autopódios e parecem ser anomalias congénitas causadas por mutações na região do homeodomínio do gene *HOXD13*. A braquidactilia tipo D é caracterizada por falanges terminais curtas e amplas nos polegares e dedos grandes dos pés recebendo no passado designações pitorescas como “polegar de oleiro” ou “polegar de assassino”. Na braquidactilia tipo E, em contraste, o encurtando dos dedos é principalmente nos metacarpos e metatarsos.

A sindactilia tipo V é também uma anomalia congénita mas está associada à expansão da cadeia de alaninas do *HOXD13*. Caracteriza-se pela fusão dos metacarpos (nas mãos) e ou metatarsos (nos pés). Os fenótipos sindactilos aparecem por vezes associados à polidactilia (número acrescido de dígitos) originando síndromes designados de polissindactilia (SPD). Estes casos estão frequentemente associados também a modificações na cadeia de alaninas do *HOXD13* e caracterizam-se pela conexão entre segundo/terceiro dedos e quarto/quinto dedos, variavelmente associados com polidactilia pós-axial nos mesmos dígitos.

Estas são as anomalias congénitas associadas ao *HOXD13* que estão melhor estudadas havendo até ratinhos mutante que mimetizam esta condição (em inglês *spd-mutant mice*) (Zákány and Duboule, 1996). Este modelo animal possui uma deleção cromossómica que abrange os genes *Hoxd11*, *Hoxd12* e *Hoxd13* e exige um fenótipo nos autopódios que se assemelham aos casos de polissindactilia humanos. Assim, o uso desta estirpe de ratinho tem permitido aprofundar as consequências deste tipo de mutações durante o desenvolvimento dos autopódios. Até à data, foram descritos dois tipos de polissindactilia associados com alterações na função deste gene: polissindactilia com anomalias nos pés e polissindactilia tipo II.

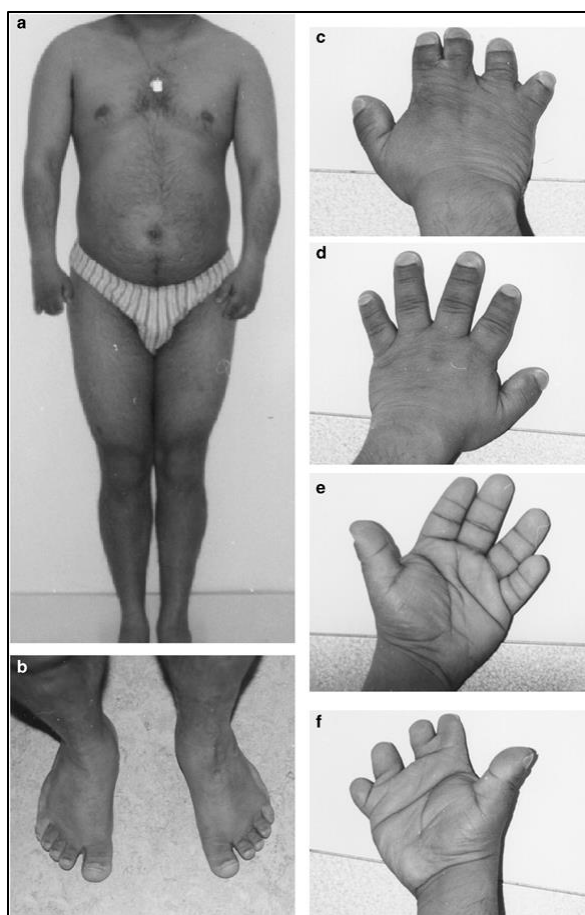


Figura 23: Fotografias de um paciente com síndrome de braquidactilia/sindactilia. (a) Vista de frente mostra estatura baixa desproporcional. (b) Braquidactilia dos pés. (c - f) Braquidactilia das mãos mais pronunciada no lado direito (c e f) onde existe também sindactilia parcial entre o segundo/terceiro dedo e quarto/quinto dedo (Dauwerse et al., 2007).

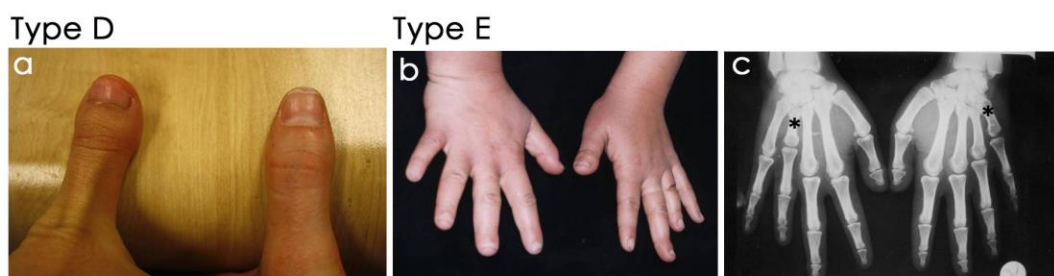


Figura 24: Braquidactilias tipo D e E. (a) Braquidactilia tipo D, fotografia de Rosa Lin/Medill News Service; (b, c) Braquidactilia tipo E mostrando redução de alguns metacarpus (asteriscos), fotografia de "Limb Malformations & Skeletal Dysplasia Clinic, MSU, NRC" (Temtamy and Aglan, 2008).

Sindactilia tipo V



Simpolidactilia com anomalias nos pés



Simpolidactilia Tipo II



Figura 25: Alterações fenotípicas nos autopódios associados a modificações da cadeia de alaninas do *HOXD13*. **(a)** Sindactilia tipo V evidenciada pela fusão dos metacarpos (asterisco) (Ogino et al., 2012). **(b)** Polissindactilia com anomalias nos pés em que se observa dígitos supranumerários (asteriscos) além de sindactilia nas mãos e pés (Kan et al., 2003). **(c)** Polissindactilia tipo II caracterizada por diversas anomalias ósseas e cutâneas (Al-Qattan, 2011).

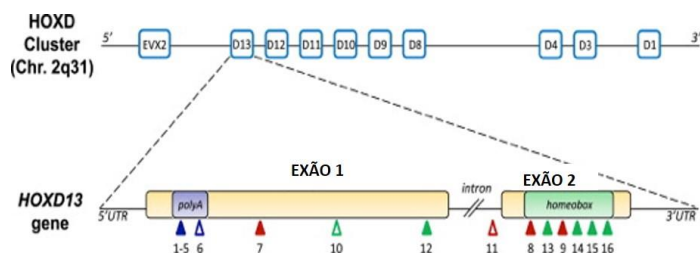


Figura 26: Estrutura do genoma do agrupamento de genes *HOXD* (do inglês “HOX D duster”) e espectro de mutações no gene *HOXD13* descritas até ao momento (triângulos). A mutação *frameshift* corresponde à inserção ou deleção de pares de nucleótidos (Brison et al., 2014).

Tipo de mutação	Mutação -Gene HOXD13-	Mutação -Proteína HOXD13-
▶ Expansões polialanina	+ 21 bp	+ 7 Ala
	+ 24 bp	+ 8 Ala
	+ 27 bp	+ 9 Ala
	+ 30 bp	+ 10 Ala
	+ 42 bp	+ 14 Ala
◀ Contrações polialanina	- 21 bp	- 7 Ala
▶ Mutações de truncação	23-336 del	frameshift
	834 delG	frameshift
	921-924 del	frameshift
▶ Mutação non-sense	541 G>T	E181X
▶ Mutação de recomposição	58 -2 delA	splice mutant
▶ Mutações missense	659 G>T	G220V
	892 C>T	R298W
	923 C>G	S308C
	940 A>C	I314L
	950 A>G	Q317R

2. Enquadramento teórico do projeto

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO DO PROJETO

O registo fóssil sugere que os primeiros vertebrados a colonizar ambientes terrestres apareceram no final do período Devoniano, há cerca de 359 milhões de anos atrás (Anderson et al., 2011). Estes animais possuíam diversas características que lhes permitiam a sobrevivência em habitats não aquáticos como por exemplo 4 extremidades multi-digtadas que lhes facilitavam a locomoção (autopódios). Esta característica esteve na base da atribuição da designação de “tetrápodes” a este grupo particular de vertebrados (quatro autopódios), dos quais fazem parte os atuais anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Clack, 2012). Os ancestrais dos tetrápodes parecem ter sido peixes sarcopterígeos, nos quais os apêndices locomotores adquiriram novos elementos de endoesqueleto distais e, simultaneamente, foram perdendo as espinhas finas de dermoesqueleto, típicas das barbatanas dos peixes (Boisvert et al., 2008; Daeschler et al., 2006; Shubin et al., 2009) (Fig.15).

Os genes da extremidade 5' do grupo *HoxD* são essenciais para a adequada formação do autopódio em modelos animais como o murganho, e pensa-se terem estado envolvidos na transição evolutiva entre os apêndices dos peixes e dos tetrápodes (Kmita et al., 2002; Sordino et al., 1995) (Fig.21). Durante o desenvolvimento embrionário, estes genes expressam-se em determinados territórios mesodérmicos posteriores tanto nos membros de tetrápodes como nos apêndices dos peixes. No entanto, nos tetrápodes estes genes são re-expressos ao longo de toda a região que irá dar origem ao futuro autopódio (Nelson et al., 1996). Estas duas fases de expressão devem-se a diferentes ondas de ativação da transcrição controladas por elementos reguladores conservados evolutivamente de ação em *cis* (do inglês *cis-regulatory-elements: CREs*). A primeira fase é regulada por elementos situado no lado 3' do grupo de genes *HoxD*, enquanto a segunda fase é controlada por elementos no lado 5' deste mesmo grupo de genes (Montavon et al., 2011).

Numa primeira avaliação da expressão destes genes no peixe-zebra, realizada em 1995 (Sordino et al., 1995), não foi identificada uma segunda fase de expressão dos genes *HoxD* da extremidade 5', o que levantou a hipótese de que a ativação desta segunda onda de expressão pode ter desencadeado a origem do autopódio nos tetrápodes (Sordino et al., 1995). Os estudos desenvolvidos posteriormente mostraram, contudo, que estes genes se expressam em territórios mais distais nas barbatanas em formação de peixe-zebra e de outros peixes ocupando diferentes posições filogenéticas, tais como: peixes cartilagíneos, peixes ósseos basais e peixes pulmonados (Ahn and Ho, 2008; Davis et al., 2007; Freitas et al., 2007; Johanson et al., 2007a). No entanto, os padrões de expressão encontrados nestes

peixes nunca coincidiram integralmente com os padrões encontrados em tetrápodes, mostrando-se em territórios mais restritos na parte distal das barbatanas em formação. Estas observações sugeriram que a modulação da transcrição dos genes da extremidade 5' do agrupamento *HoxD* pode ter sido um importante mecanismo evolutivo envolvido na formação de novos elementos de endosqueleto distais durante a evolução dos vertebrados (Freitas et al., 2012; Freitas et al., 2007). Assim sendo, os padrões descritos nos peixes podem representar diferentes fases deste mecanismo em que os níveis de transcrição produzidos podem ainda não ser suficientes para gerar a formação de uma estrutura semelhante ao autopódio (Freitas et al., 2012).

Denis Duboule e colegas têm vindo a caracterizar nos últimos anos as regiões reguladoras (CREs) que controlam a expressão dos *HoxD* da extremidade 5' (Duboule and Dolle, 1989). Estes autores, propõem que a interação entre várias CREs é necessária para ativar a forte expressão dos genes 5'*HoxD* em toda a presumível região do autopódio em animais como os murganhos (Montavon et al., 2011). Curiosamente um desses CREs, a CSC, é específico do genoma dos tetrápodes e não foi detetado nos genomas sequenciados dos peixes cartilagíneos, teleósteos ou mesmo nos celacantos (Amemiya et al., 2013; Howe et al., 2013; Venkatesh et al., 2006).

Num trabalho finalizado em 2012, Renata Freitas e colegas investigaram de que forma a aquisição de novas regiões reguladoras (CREs) podem ter conduzido à evolução dos padrões de expressão dos genes *HoxD* da extremidade 5'. Para tal, estes autores geraram-se linhas de peixes-zebra transgênicos possuindo a região CsC exclusiva de tetrápode e verificaram que o seu território de atividade era semelhante ao descrito nos membros de murganhos (Freitas et al., 2012). Isto sugere que os mecanismos de regulação *trans* que operam através deste enhancer já existiam nos peixes, mesmo antes do aparecimento dos tetrápodes. Como tal, a aquisição de região CsC na linhagem tetrápode poderia ter sido suficiente para reforçar a transcrição de genes 5'*HoxD* e ativar a formação de elementos de endosqueleto adicionais (Freitas et al., 2012).

Estes autores foram depois de testar de que forma níveis aumentados de transcritos destes genes podem potenciar a formação de mais endosqueleto distalmente, levando a alterações fenotípicas nas barbatanas que as faz assemelharem-se mais a membros de tetrápodes (Freitas et al., 2012). Com este fim, estes autores desenvolveram mais linhas transgênicas de peixe-zebra em que é possível causar a sobre-expressão destes genes recorrendo a promotores específicos que controla a expressão espacial ou temporalmente. Estas experiências levaram a concluir que o aumento de transcritos de *Hoxd13* (o gene posicionado no extremo 5' do agrupamento *HoxD*) provoca a produção distal de tecido condrogénico

adicional (Freitas et al., 2012). Os potenciais marcadores do autopódio, tais como *hoxa13b*, *cyp26b1*, e *pea3* foram observados nestes novos territórios condrogénicos em expansão. Adicionalmente, ocorre simultaneamente o encurtamento da estrutura embrionária a partir da qual se desenvolve o dermoesqueleto (AEF ou do inglês *finfold*), indicado pelos reduzidos níveis de expressão dos típicos marcadores desta estrutura (*and1* e *fgf8a*). Estes resultados sugerem a substituição do dermoesqueleto por um território de elementos endoesqueléticos distais nas barbatanas após a modulação do *Hoxd13*, sendo este processo representativo da hipótese da transição evolutiva entre os apêndices dos peixes e dos tetrápodes (Sordino et al., 1995).

Tendo em conta estes resultados, é agora necessário perceber como este fenómeno ocorreu, tendo em conta os mecanismos moleculares envolvidos após modulação do *Hoxd13*. Um recente ensaio de *Chip-to-Chip* levou à identificação de 10 genes que se revelam como alvos do *Hoxd13 in vitro* e que estão descritos como relevantes no desenvolvimento dos membros e/ou formação de cartilagem/osso (Salsi et al., 2008). A função destes genes foi avaliada através de ensaios em embriões de galinha que provaram que a diminuição dos níveis de expressão do gene *Hoxd13* perturba a expressão, da maioria deles, sugerindo que *Hoxd13* os regula diretamente (Salsi et al., 2008).

Neste presente trabalho, utilizamos a linha de peixes-zebra transgênicos *hsp70:hoxd13a* que permite a sobre-expressão do gene correspondente ao *Hoxd13* em peixe-zebra (*hoxd13a*) através de tratamentos por choque térmico dos seus embriões. Esta linha permitiu-nos caracterizar a função dos potenciais alvos do *hoxd13a* durante o desenvolvimento das barbatanas do peixe-zebra, o que foi feito qualitativamente por ensaios de hibridação *in situ* e quantitativamente por RT-qPCR.

OBJETIVOS

O trabalho realizado nesta dissertação tem como objetivo a obtenção de um melhor conhecimento sobre a função do fator de transcrição *Hoxd13* e identificação de genes que possam ter tido impacto na transição evolutiva entre os apêndices dos peixes e dos tetrápodes. Tal como foi referido previamente, num recente ensaio de *Chip-to-Chip* identificaram-se 10 alvos do *Hoxd13* que são relevantes para a formação do endosqueleto nos membros de tetrápodes. Assim, durante este projeto utilizamos a linha de peixe-zebra transgênica, *hsp70:hoxd13a* (Freitas et al., 2012), para investigar como potenciais alvos do *hoxd13a* se alteram com a modulação de genes a diferentes estádios do seu desenvolvimento.

3. Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção e manipulação de peixe zebra

Os peixes-zebra utilizados neste estudo são mantidos no Biotério de peixes do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC). A manutenção dos animais foi feita de acordo com a legislação em vigor na União Europeia que regulamenta o uso de animais com fins experimentais. O design experimental do projeto foi também aprovado pela Comissão de Ética do IBMC e pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). O Biotério de peixe-zebra é composto por 100 tanques de crescimento e por 22 tanques de indivíduos transgênicos com propósitos de reprodução. Este biotério funciona com um sistema de recirculação de água (Tecniplast-Zebtec), que mantém a água a 26°C e com um pH de 6,8-7,0 e encontra-se instalado numa sala com controlo de temperatura e ciclo de luz. Os tanques que albergam estes animais são limpos diariamente e estes são alimentados em média 3 vezes ao dia, com uma dieta que varia entre artémia (do latim *Artemia nauplii*) e ração seca comercial.

Para este estudo em particular os organismos adultos são utilizados unicamente para fins reprodutivos no sentido de obter ovos fecundados e posteriormente embriões. Não houve portanto necessidade de comprometer o bem-estar animal nem de proceder à eutanásia com vista a obter embriões, como acontece com o modelo murganho. Os ovos obtidos podem servir dois objetivos: 1) dar origem a embriões em diferentes estádios de desenvolvimento para efetuar variados ensaios experimentais; 2) criar novos organismos com fins reprodutivos. Nestes ovos fecundados que permanecerão a crescer com vista à obtenção de adultos torna-se fundamental adotar um procedimento no sentido de eliminar potenciais agentes patogénicos que comprometam a saúde, capacidade reprodutiva e longevidade dos peixes mantidos no biotério. Assim, uma vez atingidas as 24 horas de desenvolvimento (hpf) os embriões foram desinfetados através da passagem dos embriões, por NaOH e água em 5 tinas diferentes (5 minutos em cada etapa) seguindo o seguinte sentido: $\rightarrow\text{NaOH}\rightarrow\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{NaOH}\rightarrow\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{H}_2\text{O}$. Este tratamento é indispensável para que estes embriões possam mais tarde, na fase larvar, ser colocados no sistema de circuito fechado.

3.2 Obtenção, recolha e seleção dos embriões

Para se proceder ao estudo da modulação de *hoxd13a*, foram obtidos semanalmente embriões através do cruzamento dos peixes-zebra da nossa linha transgênica e de peixes-

zebra de tipo “selvagem” (do inglês “*wild-type*”) para serem utilizados como controlo nos ensaios experimentais.

Para a obtenção de embriões de peixe-zebra em estádios de desenvolvimento equivalentes, os machos e fêmeas reprodutores são separados no dia anterior à reprodução. Para tal, usa-se um aquário que contém uma barreira de plástico removível central que permite que os machos sejam mantidos de um lado e as fêmeas do outro. Na manhã seguinte esta barreira era removida promovendo o contato entre os reprodutores e a consequente fertilização. A exposição deste aquário a luz fluorescente intensa parece ser determinante para estimular a postura de ovos. Estes aquários têm também uma estrutura com rede na parte inferior que impede que, depois da desova, os peixes reprodutores ingiram os ovos. Após cerca de 10 minutos os embriões são recolhidos com o auxílio de uma rede e imediatamente incubados numa estufa a 28.5°C durante o tempo recomendado para a obtenção de embriões a diferentes estágios de desenvolvimento. Este procedimento garante que o desenvolvimento se processe a uma temperatura estável desde o estágio de uma célula (do inglês *one-cell stage*) (Kimmel et al., 1995). Os embriões são depois acondicionados em placas de Petri contendo um meio de crescimento adequado que evita a proliferação de fungos e que é constituído por 300 µL de Azul de metileno e 10 mL de 100x E3 para cada litro de água (Solução E3).

Convencionalmente, os ovos de peixe-zebra são postos a crescer a 28.5°C para que 24 horas depois eles estejam no estágio 24 hpf descrito por Kimmel (Kimmel et al., 1995). No entanto, segundo o mesmo autor, é possível manipular a temperatura de forma a abrandar ou acelerar o desenvolvimento. No caso em concreto deste projeto recorreu-se inúmeras vezes à temperatura de 31°C para que 24 horas depois os embriões estivessem a cerca de 27 hpf. Isto fazia com que, antes do estágio estipulado para os tratamentos por choque térmico da linha transgénica *hsp70:hoxd13a*, ainda se tivesse tempo de fazer uma seleção dos embriões verdadeiramente transgénicos tendo-se em conta a presença de fluorescência no coração dos embriões transgénicos. Isto é possível uma vez que esta linha transgénica foi gerada usando um Vector contendo promotores específicos de desenvolvimento de coração que conseguem induzir a expressão de um repórter, neste caso GFP (GFP-*Green fluorescence protein*) neste órgão. Assim, nos organismos onde de facto foi feita a integração do vector levando o gene de interesse (*hoxd13a*) observa-se o coração verde, designado originalmente de “*Bleeding Heart*”.

3.3 Protocolo de choque térmico (*heat-shock*)

Os tratamentos por choque térmico realizados em embriões transgênicos (*hsp70:hoxd13a*) e embriões controlo selvagens tiveram como objetivo ativar o promotor da proteína *hsp70* (do inglês *heat-shock protein 70*), de forma a que este pudesse levar à ativação do nosso gene de interesse (*hoxd13a*). De forma a promover a sobre-expressão deste gene durante a fase do desenvolvimento da barbatana em que os genes *HoxD* da extremidade 5' são re-expressos na zona marginal (Freitas et al., 2012), estes tratamentos foram efetuados a 32 hpf. Este procedimento começava com um primeiro choque térmico de 40°C durante 1h, seguindo-se o segundo choque térmico de 37°C durante 18 horas. Este protocolo foi substancialmente alterado em relação ao protocolo original (Freitas et al., 2012) de forma a conseguir uma quantidade significativa de embriões com fenótipos alterados nas barbatanas em embriões da terceira geração (F3). Findo este procedimento, os embriões foram deixados a crescer entre 28.5°C e 31°C, de acordo com os estádios de desenvolvimento pretendidos para as subseqüentes experiências.

O processo de fixação dos embriões teve uma duração média de 16 horas a 4°C e utilizou-se uma solução de paraformaldeído a 4% (PFA) (Merck KGaA). Após a fixação, os embriões foram desidratados através de lavagens com soluções contendo concentração crescentes de Metanol. Cada uma destas lavagens teve a duração média de 5 minutos e obedeceu à seguinte sequência: 3X PBT 100% (PBS1x, 0,1%Tween-20); 1X MeOH 25% PBT, 1X MeOH 50% PBT, 1X MeOH 75% PBT; 2X 100% MeOH (Merck KGaA). Este processo possibilita o armazenamento dos embriões a -20°C, o que é mais vantajoso para preservar o RNA endógeno. Adicionalmente o processo de desidratação dos embriões auxilia na permeabilização do tecido para que sejam eficientes os ensaios de hibridação *in situ*.

3.4 Hibridação *in situ*

A técnica de hibridação *in situ* permite a deteção de fragmentos de RNA específicos recorrendo à utilização de sondas de RNA complementares sintetizadas *in vitro*. Neste trabalho, esta técnica teve como objetivo a localização do RNA transcrito pelas células através de uma sonda complementar à qual se adicionou uma molécula “repórter”, que no nosso caso foi a Digoxigenina (DIG). Este “repórter” reage com o substrato formado aquando das reações químicas de complementarização dando assim sinal do local onde é expressa a sequência de interesse.

3.4.1 Obtenção e eluição das sondas

As sondas necessárias para o projeto, foram obtidas através do contacto com diversos laboratórios, cujos estudos tinham em questão os genes de interesse. Para este estudo foram angariados um total de 16 plasmídeos, tendo sido necessária uma pesquisa bibliográfica para identificar os principais grupos de investigação a trabalhar com estes genes e confirmar os seus padrões de expressão. A pesquisa para este efeito, foi feita através de duas plataformas *online*, uma delas dedicada exclusivamente ao peixe-zebra (ZFIN-ORG), e outra mais generalista (NCBI). Os plasmídeos obtidos foram enviados em papel de filtro e a sua eluição foi obtida pela adição de 50 μ L de solução TE (Tris+EDTA), subsequente centrifugação durante 30 segundos e isolamento do sobrenadante. Este procedimento permite a solubilização do DNA protegendo-o de eventuais degradações. O material genético obtido foi conservado a -20°C para ser posteriormente amplificada por PCR convencional (Reação em cadeia de polimerase).

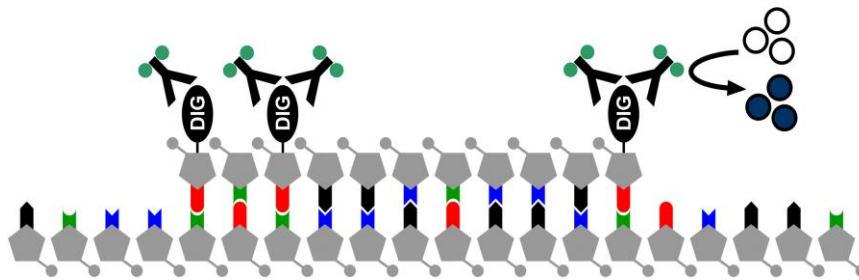


Figura 27: Sonda de RNA a hibridar com o RNA endogenamente expresso. Os nucleótidos de uracilo estão marcados com DIG que depois se ligam a um anticorpo conjugado com uma enzima (fosfatase alcalina) que é a responsável pela produção de sinal de coloração (Nitzki, 2013).

3.4.2 Técnicas aplicadas para ampliação do material genético usado na produção de sondas de RNA

a) PCR- reação em cadeia de polimerase convencional

A técnica de PCR possibilita a geração de milhares a milhões de cópias de uma sequência de DNA em particular (Joshi and Deshpande, 2011). Esta técnica baseia-se no uso de ciclos térmicos, que consistem em ciclos de aquecimento e de arrefecimento que permitem a desnaturação seguida da replicação do DNA através da atividade de uma enzima DNA-Polimerase. Esta técnica divide-se em 3 etapas realizadas em ciclos repetidos (normalmente

25 a 35 ciclos): 1) Desnaturação do DNA, 2) Hibridação dos oligonucleótidos iniciadores (do inglês *primers*) e 3) Extensão do DNA.

Na desnaturação do DNA, a dupla cadeia de DNA separa-se em duas cadeias simples, permitindo a ligação de primers específicos também eles de cadeia simples. Estes “primers” são complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA que se pretende amplificar. A DNA polimerase liga-se à extremidade livre 3’ OH dos “primers”, sintetizando a cadeia complementar do fragmento de DNA no sentido 5’→3’. Cada uma das cadeias simples de DNA do fragmento serve assim como molde para a síntese das cadeias complementares.

De forma a conseguir quantidade suficiente de DNA para elaboração das sondas de RNA, realizamos reações de PCR com volume final de 25 µL, usando os reagentes indicadas na Tabela 1. As reações foram efetuadas num termociclador com as condições de temperatura e tempo descritas na Tabela 2. Em todas as reações foi incluído um controlo negativo (Branco) no qual se substituiu o DNA por água ultra pura, de forma a detetar a presença de alguma contaminação de DNA não desejado. Os resultados do PCR são avaliados recorrendo à eletroforese de forma a avaliar se a ampliação do DNA foi bem sucedida.

Reagentes	Quantidade (µL)
Plasmídeo	1
Tampão para PCR (10x) (Invitrogen)	2,5
Mistura de nucleótidos: dNTPs (10 mM)	0,5
<i>Primer M13 Forward</i> 10 µM	0,25
<i>Primer M13 Reverse</i> 10 µM	0,25
MgCl ₂ 50 mM	0,75
H ₂ O DEPC	19,75
DNA polimerase (<i>Taq Platinum</i>) (Invitrogen)	0,1
Volume final	25

Tabela 1: Reagentes utilizados para a elaboração dos PCR com vista à obtenção de sondas para hibridação *in situ*.

Etapas do PCR	Temperatura (°C)	Duração (Segundos)	Repetições (Número)
Desnaturação inicial	95	120	1
Desnaturação	95	60	30
Hibridação	58	45	
Extensão	72	60	
Extensão final	72	420	1
	4	∞	1

Tabela 2: Ciclos de temperatura usados nos PCR e respetiva duração. O símbolo ∞ significa tempo indeterminado.

b) Eletroforese

A técnica de eletroforese consiste na separação de moléculas através da sua migração numa matriz sólida, um gel, durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico (Lee et al., 2012). O princípio da técnica baseia-se na carga do DNA que, por ser negativa, promove a migração do DNA para o ânodo, quando é aplicada uma diferença de potencial elétrico. Como o DNA tem uma relação de massa/carga uniforme, os fragmentos de DNA são separados por tamanho num gel de agarose, em que velocidade de migração destes é inversamente proporcional ao seu tamanho (Lee et al., 2012). Através de um marcador de tamanho molecular é possível estimar o tamanho dos fragmentos e verificar a correta amplificação do fragmento esperado, usando um trans-iluminador (Lee et al., 2012).

No nosso trabalho, a eletroforese foi efetuada a 120 Volts (V) num gel de agarose contendo 1,5% de agarose em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE). Para produzir o gel dissolveu-se a agarose usando um forno de micro-ondas e de seguida adicionou-se 3 µL de um corante de ácidos nucleicos (Safe-Green, NZYTech) por 100 mL de volume final. Esta solução foi depois deixada a polimerizar dentro de um molde com o número de poços necessários para posteriormente adicionar os produtos de PCR. Para a realização da eletroforese adicionaram-se aos poços do gel de agarose 5 a 8 µL dos produtos de PCR combinados com 1 µL de tampão de carga. No primeiro poço do gel colocou-se 3,5 µL de DNA Ladder 1 Kb (NZYTech), que possibilita estimar o peso molecular dos fragmentos de DNA.

c) Purificação e aumento da concentração dos produtos de PCR

Após se verificar a amplificação dos produtos de PCR através da eletroforese em gel de agarose, foi necessário proceder à sua purificação usando um “kit” comercial “DNA Clean & Concentrator™-5” (Zymo Research), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Inicialmente, adicionou-se o tampão “DNA Binding Buffer” às amostras e transferiram-se as soluções para as respectivas colunas inseridas num tubo coletor fornecido com o “kit”. Estas amostras foram centrifugadas, sendo de seguida descartados os sobrenadantes e feitas duas lavagens com “DNA Wash Buffer”. Após a centrifugação da última lavagem, transferiram-se as colunas tubos de 1,5 mL e adicionaram-se a estas o tampão “DNA Elution Buffer”, ficando a incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente. Por fim, efetuou-se uma centrifugação de 30 segundos, recolheram-se os produtos finais e procedeu-se à sua quantificação no Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer, “software” ND-1000 V3.1.2, Nanodrop Technologies).

d) Transcrição *in vitro*

A transcrição é o processo molecular que visa a produção de RNA a partir de uma sequência de DNA linearizada. Este RNA funcionará como uma sonda que durante o processo de hibridação *in situ* se liga ao RNA complementar produzido pelo embrião. Durante o processo de produção da sonda, esta é marcada com um nucleótido sintético designado por Dig-UTP, dado possuir uma molécula de Digoxigenina ligada a Uridina-5'-trifosfato. O fragmento DIG é introduzido pela RNA polimerase em funcionamento sempre que se esteja a proceder à transcrição do nucleótido uracilo (Fig.27). Esta marcação permitiu a deteção do RNA usando um anticorpo específico para a Digoxigenina e conjugado como uma fosfatase alcalina (anti-DIG-AP), o que origina uma reação de coloração no tecido do embrião está a ser transcrito o RNA de interesse. As RNA-polimerase usadas estão descritas na Tabela 4 e a mistura de reação utilizada neste procedimento está ilustrada na Tabela 3. A transcrição *in vitro* decorreu a 37°C durante 2 horas, sendo posteriormente feita uma digestão com DNase durante 20 minutos a 37°C para remover fragmentos de DNA não transcritos. No final desta reação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose de forma a detetar se ocorreu produção de RNA e eliminação total do DNA.

Componentes	Volume (μL)
Tampão de transcrição 10x (Roche)	2,5
10 mM DTT	2,5
Dig UTP (Roche)	2,5
Riboblock	2
Enzima	1
DNA	10
H ₂ O DEPC	Perfazer até 25 μL

Tabela 3: Mistura de reação para a Transcrição *in vitro*.

Gene	Sonda	Enzimas		Instituições
		Linearização	Transcrição	
<i>and1</i>	Anti-sense	Sall	T7	CABD, Universidade Pablo De Olavide
<i>barx1</i>	Anti-sense	XhoI	Sp6	Universidade de Ottawa, Canadá
<i>bmp2a</i>	Anti-sense	XhoI	Sp6	Universidade de Toulouse, França
<i>bmp2b</i>	Anti-sense	EcoRI	T3	
<i>bmp4</i>	Anti-sense	XbaI	T7	University of Ottawa
<i>dachA</i>	Anti-sense	EcoRI	T7	Laboratório Whitfield, Reino Unido
<i>dachB</i>	Anti-sense	PstI	T7	University of Sheffield
<i>dachC</i>	Anti-sense	EcoRI	T7	
<i>emx2</i>	Anti-sense	XhoI	T7	Instituto de biologia, Universidade Freiburg
<i>fgf8</i>	Anti-sense	EcoRV	Sp6	CABD, Universidade Pablo De Olavide
<i>fgf10</i>	Anti-sense	HindIII	T7	Isolado por PCR
<i>fgf24</i>	Anti-sense	-	-	Isolado por PCR
<i>hand2</i>	Anti-sense	BamHI	T7	Duke University
<i>meis1b</i>	Anti-sense	-	-	Isolado por PCR
<i>nogin3</i>	Anti-sense	-	-	Isolado por PCR
<i>sfrp1</i>	Anti-sense	SnaBI	SP6	Uoregon University

Tabela 4- Listagem das sondas obtidas. A tabela fornece informações acerca das enzimas requeridas para linearizar o plasmídeo e efetuar a sua transcrição. O símbolo (-) foi utilizado

para as sondas isoladas por PCR, nas quais foram utilizados *primers* que permitem a sua transcrição direta a partir dos produtos do PCR.

e) Purificação das sondas

A purificação da reação de transcrição *in vitro* tem como princípio a remoção dos nucleótidos não incorporados. Para o efeito, utilizaram-se as Mini-colunas Quick Spin (Roche). Estas colunas dependem da cromatografia de filtração em gel, que separa as moléculas com base no seu tamanho relativo. O protocolo aqui aplicado teve por base as instruções do fabricante que consistiu na adição das amostras no centro da respetiva coluna, inserida num tubo coletor seguida de centrifugação durante 4 minutos a 1,000xg. Durante a centrifugação, as colunas permitem que as moléculas de maiores dimensões (DNA, RNA ou oligonucleótidos) a atravessem rapidamente, enquanto retém as moléculas de menores dimensões (tais como nucleótidos não incorporados). A sonda recolhida do tubo coletor é quantificada no Nanodrop e conservada a -80°C até à sua utilização.

3.4.3 Obtenção de sondas de RNA usando amplificação por bactérias competentes

a) Transformação

A transformação em bactérias competentes é uma técnica alternativa ao PCR convencional visando replicar o DNA de forma a produzir uma quantidade significativa de sonda de RNA para posteriores ensaios de hibridação *in situ*. Nesta técnica, os plasmídeos são integrados em bactérias competentes (*E. Coli*) de modo que, com a multiplicação destas, aumentem também as cópias de plasmídeo.

O protocolo de transformação começou com a adição de cerca de 1 µL de plasmídeo eluído em 50 µL de bactérias competentes, seguindo-se uma incubação em gelo durante 20 minutos. Procedeu-se depois a um choque térmico a 42°C durante 30 segundos e subsequente incubação em gelo durante cerca de 2 minutos. Este passo do choque térmico fragiliza a parede bacteriana, o que permite a introdução do plasmídeo nas bactérias.

No passo seguinte, adicionou-se aos tubos meio LB líquido e foram mantidas as bactérias a crescer durante 1 hora sob agitação a 37°C. No final deste período plaquearam-se diferentes diluições das células transformadas, de modo a obter um melhor número de colónias isoladas, em placas de petri contendo meio sólido de LB-agar com antibiótico (ex. ampicilina).

As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Nesta etapa, apenas as bactérias transformadas com o plasmídeo crescem na placa com o antibiótico, pois os plasmídeos transformados possuem um gene que lhes confere resistência ao mesmo. A composição do meio LB líquido e LB-agar estão indicados na Tabela 5.

Depois de cerca de 18 horas de crescimento em placa foram selecionadas as colónias bacterianas para crescimento. Cada colónia foi colocada num tubo *Falcon* de 15 mL com 10 mL de meio de crescimento líquido composto por LB e apropriada concentração de antibiótico e foram incubados a 37°C sob agitação durante a noite. Neste passo pretende-se aumentar exponencialmente a quantidade de plasmídeo.

Meio LB-Agar

Reagentes	Volume
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
H₂O destilada	Perfazer até ao volume desejado
Antibióticos	Spectinomomicina
	Ampicilina
Agar	15 g

Meio LB

Reagentes	Volume
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	5 g/L
H₂O destilada	Perfazer até ao volume desejado

Tabela 5-Reagentes utilizados para a elaboração do meio LB (Luria- Bertani)-Agar e do meio LB-broth.

b) Extração e purificação do DNA plasmídico

A purificação do DNA plasmídico foi efetuada com recurso ao “kit” “ZR Plasmid Miniprep™” (Zymo Research). Este “kit” permite o isolamento eficiente de DNA plasmídico a partir de *E. Coli* usando 3 soluções tampão (P1, P2,P3), tendo por base o método de lise alcalina.

Este procedimento iniciou-se com a centrifugação dos tubos contendo as culturas bacterianas, retirando-se posteriormente todo o sobrenadante. As bactérias isoladas no

fundo dos tubos foram ressuspensas no tampão P1, seguindo-se a adição dos tampões P2 e P3 para uma rápida lise celular e posterior neutralização. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes recolhidos e transferidos para as suas respectivas colunas inseridas em tubos coletores. As amostras foram submetidas a uma centrifugação seguindo-se a adição de mais dois tampões de lavagem intercalados por centrifugações. Por fim, as colunas foram transferidas para um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 mL ao qual se adicionou Tampão de eluição de DNA. O DNA plasmídico foi recolhido usando a centrifugação e as concentrações obtidas foram avaliadas no Nanodrop.

c) Linearização dos plasmídeos com enzimas de restrição

A linearização dos plasmídeos purificados foi efetuada por hidrólise/digestão enzimática com endonucleases de restrição. As endonucleases de restrição são enzimas bacterianas que reconhecem e cortam o DNA de cadeia dupla em sequências alvo específicas, produzindo fragmentos, designados por fragmentos de restrição (Smith, 1993). Para a obtenção de sequências lineares de DNA, adicionou-se a cada uma das amostras uma enzima de restrição apropriada, que corte exclusivamente o plasmídeo num só local (Tabela 4). O local de corte da enzima deve ser do lado oposto àquele a que se liga a RNA-polimerase a usar na transcrição *in vitro*.

A mistura de reação continha 10 µL do plasmídeo purificado, solução tampão, a enzima adequada e H₂O DEPC até perfazer um volume de 25 µL. Esta reação decorreu durante 2 horas a 37°C e a linearização correta das amostras foi verificada, através de eletroforese em gel de agarose. O plasmídeo linearizado neste processo vai ser utilizado como DNA molde para a transcrição *in vitro*. Após este procedimento, as amostras foram purificadas com o “kit” comercial “DNA Clean & Concentrator™-5” (Zymo Research), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante de forma a extrair as proteínas. Seguiram-se quantificações por Nanodrop, tal como descrito anteriormente.

d) Transcrição *in vitro* e purificação das sondas

O protocolo aplicado para a transcrição *in vitro* foi o mesmo que citado anteriormente para o método de produção de sondas baseado na amplificação por PCR. De igual modo, procedeu-se também à eliminação do DNA pela ação da enzima DNase e à eliminação dos nucleótidos usando “Mini Quick Spin Columns” (Roche). O RNA resultante foi quantificado por Nanodrop e conservado a -80°C até à sua aplicação na técnica de hibridação *in situ*.

3.4.4 Protocolo da hibridação *in situ*

Este protocolo inicia-se procedendo à reidratação dos embriões previamente armazenados em 100% MeOH a -20°C e consiste numa sequência de lavagens com soluções com concentração progressivamente menor de metanol em PBT (MeOH 75% em PBT; MeOH 50% em PBT; 25% MeOH em PBT, 2X 100% PBT). Estas lavagens contam com tempos de incubação curtos de cerca de 2 a 3 minutos e são realizados à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à digestão e permeabilização dos tecidos com Proteinase K diluída em PBT para atingir uma concentração de 10 µg/mL. O tempo de digestão variou consoante o estágio de desenvolvimento em que os embriões se encontravam e este procedimento foi executado à temperatura ambiente (Tabela 6).

Estádio de desenvolvimento (hpf)	Tempo de digestão com Proteinase K (minutos)
48	15
72	20
82	25
102	25

Tabela 6: Tempos de digestão com Proteinase K (10 µg/mL) usados durante o protocolo de hibridação *in situ* nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra.

Depois do processo de digestão, os embriões foram sujeitos a duas lavagens em PBT com a duração de 2 minutos e novamente fixados em PFA 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se novamente lavagens em PBT, 4 vezes durante 5 minutos à temperatura ambiente de forma a retirar o fixador

Após estas lavagens, os embriões foram incubados em solução de hibridação (Hyb) constituída por 50% Formamida, 5x SSC, 0,1% Tween-20, 0.2 mM Ácido Cítrico pH=6, 50 µg/mL Heparina, 500 mg/ml tRNA de levedura e restante volume de H₂O DEPC. Esta incubação teve a duração de 2 horas e foi realizada à temperatura de 70°C. Seguidamente, os embriões foram incubados a 70°C cerca de 16 a 24 horas emersos em solução de hibridação contendo 1 ng/ µL de sonda de RNA.

No segundo dia do protocolo, procedeu-se à remoção da solução de hibridação com a sonda e foram feitas lavagens com as soluções de SSC aquecidas durante a noite a 70°C de forma a ir eliminando fragmentos de sonda que não tenham hibridizado com o RNA

endógeno de interesse. Assim começa por se substituir a solução de hibridação com a sonda por uma solução semelhante mas sem tRNA nem heparina (Hyb-) e depois sequencialmente vai-se mudando para 75% Hyb-/2x SSC 10 min.; 50% Hyb-/2x SSC 10 min.; 25% Hyb-/2x SSC 10 min.; 2x SSC 10 min. Seguidamente realizam-se duas lavagens com duração de 30 minutos em 0.05x SSC ainda a 70°C e depois prossegue-se com lavagens à temperatura ambiente em 0.05x SSC/50% PBT 5 min.; 2x PBT 5 min.

Depois deste procedimento, os embriões foram colocados numa solução constituída por: 2% de soro de cabra, 2 mg/mL BSA (Albumina de soro bovino) diluídos em PBT durante um mínimo de 1 hora à temperatura ambiente. Este procedimento visa bloquear possíveis locais de ligação do anticorpo aumentando a sua especificidade para Digoxigenina presente nos ácidos nucleicos marcados das sondas de RNA.

Os embriões foram depois emersos na mesma solução de bloqueio, mas à qual se adicionou o anticorpo anti-DIG-AP e foram seguidamente incubados por um mínimo de 16 horas. Findo este período efetuaram-se 6 lavagens de cerca de 10 minutos com PBT à temperatura ambiente, tendo por objetivo a lavagem de anticorpo em excesso que não se ligou à sonda.

De forma a realizar a reação de coloração para detetar o padrão de expressão dos genes em estudo, realizaram-se 3 incubações de 10 minutos numa solução que funciona como substrato da fosfatase alcalina (NTMT). Esta solução é constituída por 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 diluídos em água autoclavada. De seguida, removeu-se esta solução e adicionou-se aos embriões a solução de coloração NBT/BCIP (Roche) previamente diluída de acordo com as instruções do fabricante. Os embriões foram depois incubados à temperatura ambiente, no escuro e monitorizados regularmente de forma a avaliar a progressão da reação até surgir sinal de expressão inequívoco (cor azul). Quando se considera que a revelação se completou, remove-se a solução de coloração, são feitas duas lavagens em NTMT durante 10 minutos, seguidas de fixação com PFA 4% durante 2 horas e depois armazenamento em 80% glicerol/20% PBT a 4°C até a altura de proceder às dissecações e montagens sobre lâmina e lamela de forma a prosseguir para a aquisição de imagens documentando os resultados obtidos.

A visualização e registo de imagens foi feito com um microscópio Zeiss Axio Imager Z1 usando iluminação DIC (do inglês *Differential interference contrast*).

3.5 Análise da expressão génica por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

3.5.1 Técnica de RT-qPCR

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica variante de PCR que permite a deteção e medição de produtos gerados durante cada ciclo de PCR, em tempo real, devido à incorporação de uma molécula repórter fluorescente na mistura de reação (Logan et al., 2009). Para este trabalho, o fluoróforo utilizado foi o SYBR Green, uma cianina com elevada afinidade para o DNA de cadeia dupla. Para cada amostra foram utilizados reagentes nas proporções indicadas na figura 28A. Esta técnica divide-se em três fases de amplificação: *basal*, *exponencial* e *estacionária* (Fig. 28B). Durante os primeiros ciclos de amplificação os produtos de PCR duplicam a cada ciclo. Isto faz com que, após cerca de 18 ciclos, haja acumulação suficiente de produtos de PCR para que a deteção da fluorescência passe de níveis basais (fase basal) para níveis exponencialmente crescentes (fase exponencial). Após cerca de 28 ciclos os componentes necessários para se fazer a amplificação dos fragmentos de DNA começam a ser consumidos acabando por se limitantes para a progressão da reação. Esta fase é por isso designada de estacionária e caracteriza-se por uma estabilização dos níveis de fluorescência detetados.

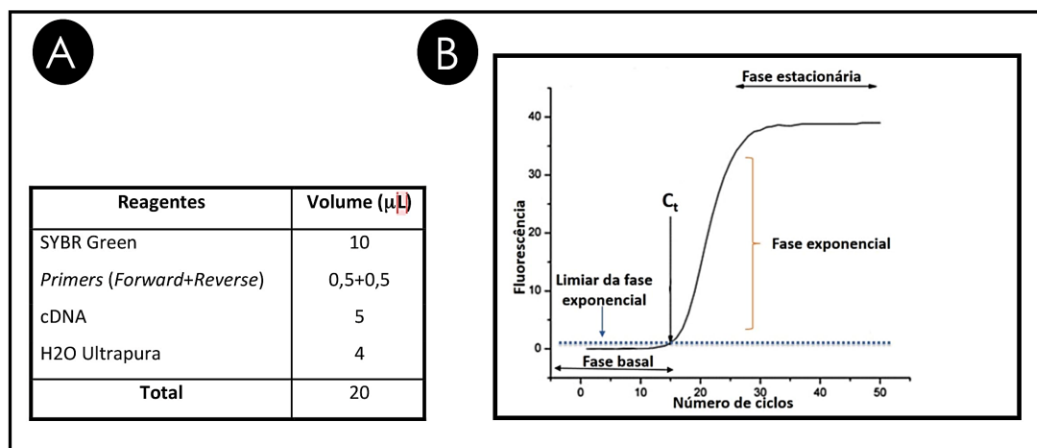


Figura 28: Ensaios de RT-qPCR. A. Proporção de reagentes utilizados para as reações de RT-qPCR. **B.** Progressão da fluorescência ao longo dos ciclos de amplificação durante o RT-qPCR. Modificado de (Kubista et al., 2006).

As leituras com relevância para o estudo da expressão génica, durante o RT-qPCR centra-se na fase exponencial, uma vez que é nesta fase que são fornecidos dados mais precisos

para quantificação sem haver ainda limitações nos reagentes para formar produto de PCR (Fig. 28 B). Esta é efetuada segundo o método de *quantificação relativa* que se baseia na expressão relativa de um gene alvo em comparação com um gene de referência (Pfaffl, 2001). O processo de quantificação começa no que é considerado o primeiro ciclo da fase exponencial (C_t). Este método consiste na comparação dos valores do ponto limiar de ciclo C_t (do inglês, *threshold cycle*) das amostras com um controlo, sendo que os valores de C_t correspondem ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detetável (Heid et al., 1996). Os valores de C_t de ambos (amostra e controlo) são normalizados por comparação com genes endógenos regularmente expressos (do inglês *Housekeeping genes*) padrão. Neste trabalho foram utilizados como genes endógenos controlo Rpl13a e Eef1|1, cuja expressão é teoricamente constantes, e a expressão génica de cada amostra foi determinada em triplicado.

Os dados foram analisados com o software *Bio-Rad iQ5 Optial System Software Version 2.0*, sujeitos a tratamento estatístico através do software *GraphPad Prism 6* e o tipo de análise aplicado foi o *Unpaired T-test* que mede a diferença entre as duas amostras, ou seja determina se dois conjuntos de dados são significativamente diferentes entre si. A quantificação da expressão génica foi obtida através do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e as fórmulas matemáticas utilizadas encontram-se apresentadas a seguir:

$$\text{Quantificação relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}, \text{ onde } \Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Amostra/Controlo} - \Delta C_t \text{ Gene endógeno}$$

	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3
	Passo 1	Passo 1	Passo 2	Passo 1	
Repetições	1	40		81	
Temperatura	95°C	95°C	62°C	55°C	
Tempo	3 minutos	30 segundos	20 segundos	10 segundos	
Processo	Ativação da polimerase	Desnaturação das cadeias duplas	Hibridação dos primers	Determinação ponto limiar de ciclo	

Tabela 7-Programa de amplificação por PCR em Tempo Real utilizado.

3.5.2 Extrações de RNA

Para se realizar a técnica de RT-qPCR é necessária a obtenção de RNA total a partir de barbatanas embrionárias de peixe-zebra que posteriormente é convertido em cDNA. Para tal, utilizaram-se embriões recolhidos nos estádios de desenvolvimento de 56, 85 e 115 hpf. Os embriões são primeiramente descorionados com o auxílio de pinças de dissecação no próprio meio de crescimento (E3) e depois anestesiados por adição de Triclaína. O objetivo das dissecações foi isolar barbatanas peitorais de forma a avaliar a expressão génica nestas estruturas em particular. Uma vez, isoladas do corpo, as barbatanas eram recolhidas com pontas de pipeta finas e armazenadas coletivamente em RNA *Later* (Fisher) que estabiliza e protege o RNA celular nas amostras de tecido.

A extração de RNA foi realizada com recurso ao “kit” *PureLink® RNA Mini Kit* (Life Technologies) de acordo com as especificações do fabricante. Neste protocolo adicionou-se H₂O-DEPC às amostras até perfazer um volume de 1,8 mL e procedeu-se a uma centrifugação a 3000g durante 3 minutos. Posteriormente removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de reagente TRIzol procedendo-se à lise celular por pipetagem. Adicionou-se novamente 500 µL de reagente TRIzol e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, juntou-se 200 µL de Clorofórmio e agitou-se vigorosamente as amostras durante 15 segundos sendo este um passo crítico para uma eficaz extração do RNA. As amostras foram depois deixadas a incubar cerca de 2 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, realizou-se uma centrifugação destas a 12000g a 4°C durante 15 minutos para separação de fases. Após a extração da fase aquosa (fase em que o RNA se encontra eluído) e o da fase fenólica (onde o DNA e restos de outros componentes celulares se encontram) adicionou-se 1 volume de etanol a 100% e homogeneizou-se por inversão. Depois deste passo as amostras foram transferidas para uma coluna inserida num tubo coletor e foram centrifugadas a 12000g durante 1 minuto, sendo descartado o sobrenadante. De seguida foram efetuadas duas lavagens sucessivas com solução tampão intercaladas por centrifugações de 15 segundos finalizadas pela descarga de sobrenadante. Por fim, realizou-se uma centrifugação da coluna a 12000g durante 1 minuto à temperatura ambiente e transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor à qual se adicionou H₂O livre de RNases (entre 30 a 100 mL). As amostras de RNA obtidas foram quantificadas no Nanodrop e conservadas a -80°C até posterior utilização.

3.5.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA das amostras foi feita a partir do RNA extraído e para tal foi utilizado o “kit” comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis kit* (NZYTech). Os reagentes para a mistura de reação foram adicionados a um tubo de microcentrifugação livre de nucleases, colocado em gelo e para cada amostra foram utilizados os reagentes e respetivos volumes indicados na Tabela 8. De seguida, as amostras foram colocadas num termociclador *BioRad T100* com o seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C, e 4°C até se retirarem as amostras. No passo seguinte, adicionou-se 1 µL de solução NZY RNase H (*E.coli*) às amostras e foram deixadas a incubar a 37°C durante 20 minutos. No fim deste procedimento, as amostras foram guardadas a -20°C até à sua posterior utilização.

Reagentes	Volume (µL)
NZYRT 2× Master Mix	10
NZYRT Enzyme Mix	2
RNA (a partir de 5 µg)	6
H ₂ O DEPC	2

Tabela 8-Mistura de reação para a síntese de cDNA.

3.6 Produção de linhas de peixe-zebra transgênicas

De forma a estudar potenciais efeitos da modulação dos genes *bmp2* e *nog3* durante o desenvolvimento das barbatanas e explorar isto como um mecanismo envolvido na transição evolutiva entre peixes e tetrápodes, estão a ser organizados ensaios de sobre-expressão usando o peixe-zebra como modelo. Isto exige a criação de animais transgênicos à qual é adicionado o gene de interesse sob a influência de um promotor que permita o controlo temporal da sua expressão. Neste caso em concreto foi escolhido o promotor da proteína *Heat-Shock 70 (hsp70)* para causar a sobre-expressão dos genes *bmp2* e *nog3* em tempos específicos durante o desenvolvimento embrionário através de tratamentos de choque térmico.

3.6.1 Ligação dos fragmentos amplificados no Vector pCR™/GW/TOPO®

Para produzir as construções moleculares *hsp70:bmp2b* e *hsp70:nog3* para os estudos de sobre-expressão, foi necessário proceder à integração dos genes de interesse dentro de um primeiro Vector (Vector de entrada) que permita a sua clonagem em bactérias competentes e possibilita a entrada desses genes num segundo Vector (Vector de destino). Este Vector de

destino tem locais de ligação para a enzima transposase Tol2, (Kawakami, 2007) que depois se encarrega de inserir os fragmentos de interesse no genoma embrionário.

Para a inserção no Vector de entrada, os genes *bmp2b* e *nog3* de peixe-zebra foram isolados por PCR com cDNA proveniente de animais selvagens. Os *primers* já estavam disponíveis no laboratório e possuíam nas suas extremidades locais de ligação para enzimas de restrição de forma a facilitar ligação de vários fragmentos nos passos finais da construção (Tabela 9). Foi aplicado o protocolo de PCR anteriormente descrito mas tendo em conta as temperaturas específicas que permitem aos primers ligar-se com o DNA (do inglês *Annealing Temperature*). A amplificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel e os produtos de PCR foram purificados com o “kit” *DNA Clean & Concentrator™-5* (Zymo research). Os fragmentos de DNA foram integrados no Vector de entrada usando o “kit” comercial *pCR™8/GW/TOPO®TA Cloning Kit* (Invitrogen) que usa uma ligase T4 para inserir os fragmentos de interesse entre os locais attL1 e attL2 do Vector de entrada. O protocolo aplicado teve por base as instruções fornecidas pelo fabricante e os componentes utilizados na reação estão descritos na tabela da figura 29.

3.6.2 Clonagem em bactérias competentes *E. coli*

O produto da reação de ligação foi depois integrado em bactérias competentes *One Shot®Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) por choque térmico como descrito anteriormente (ponto 3.4.3 a). Durante este processo pretende-se que as bactérias usadas para a clonagem incorporem o plasmídeo com o inserto de modo a que, com a replicação destas, se obtivesse um grande número de clones recombinantes transformados.

Para efetuar este procedimento, a cada alíquota de 50 µL de bactérias competentes adicionou-se 2 µL do produto de reação da ligação anteriormente descrita e efetuou-se uma incubação de 30 minutos em gelo. Em seguida, estas foram sujeitas a um choque térmico durante 30 segundos a 42°C, sendo posteriormente adicionados 700 µL de meio líquido de crescimento SOC (do inglês *Super Optimal broth with Catabolite repression*, Invitrogen). As bactérias foram incubadas a 37°C durante 1 hora com agitação constante e depois plaqueadas em placas de petri contendo meio LB sólido com 100 µg/mL de antibiótico Spectinomomicina e incubadas numa estufa a 37°C durante a noite (\pm 16 horas). O Vector *pCR™8/GW/TOPO®* contém na sua estrutura uma sequência que permite a síntese de uma proteína que confere resistência à Spectinomomicina, de forma a serem selecionados apenas as bactérias transformadas com o Vector que contém o fragmento de interesse.

Após a obtenção de colónias de bactérias transformadas, estas foram selecionadas para a extração de DNA plasmídico. Na preparação das suspensões celulares, foi inoculada uma colónia isolada num tubo contendo 10 mL de meio LB líquido com o antibiótico Spectinomomicina que depois foi encubado com agitação constante a 37°C durante 16 horas aproximadamente.

Estas bactérias foram depois sujeitas a um processo de lise celular e purificação de forma a extrair o DNA plasmídico, ação realizada com recurso ao “kit” *ZR Plasmid Miniprep™* (Zymo Research) seguindo-se o protocolo fornecido pelo fornecedor. O procedimento aplicado nesta etapa encontra-se descrito no ponto 3.4.3 b).

De forma a confirmar a presença e orientação dos fragmentos clonados dentro do Vector de entrada, procedeu-se a análises de restrição utilizando as enzimas apropriadas. Assim, para avaliar a presença dos fragmentos usou-se EcoRI, uma enzima com dois locais de corte no próprio Vector, nos lados 3' e 5' do fragmento inserido. Regra geral os clones identificados como tendo os fragmentos (ou insertos) foram usados em reações de PCR standard (como descrito no ponto 3.4.2 a) de forma a eliminar falsos positivos, que possam ter integrado material genético não desejado. A orientação dos fragmentos positivamente identificados quer por análise de restrição quer por PCR foi avaliada então com uma segunda análise de restrição. Neste passo, para o gene *bmp2b* utilizou-se a enzima Apal e para o gene *nog3* a enzima EcoRV. A mistura de reação para efetuar as análises de restrição (Tabela 10) foi incubada durante 2 horas a 37°C e os resultados avaliados em gel de agarose 1%.

Gene	Forward Primer (5')	Reverse Primer (5')	Tamanho (bp)
bmp2b	CGGAACTGACTGATCATGGTC	GGAGATTGTTCTCATCGGCAC	1262
nog3	CTTAAGCGAACACTCAAGATGGATA	ATGAGTGCGGAGCTTATTTTCAG	708

Tabela 9: Lista dos *primers* utilizados na PCR.

Reagentes	Volume (µL)
Solução tampão de enzima	2,5
Enzima de restrição	1
H ₂ O ultrapura	13,5
DNA plasmídico (<i>Miniprep 1</i>)	8
Volume total	25

Tabela 10: Reagentes utilizados para a linearização dos vectores.

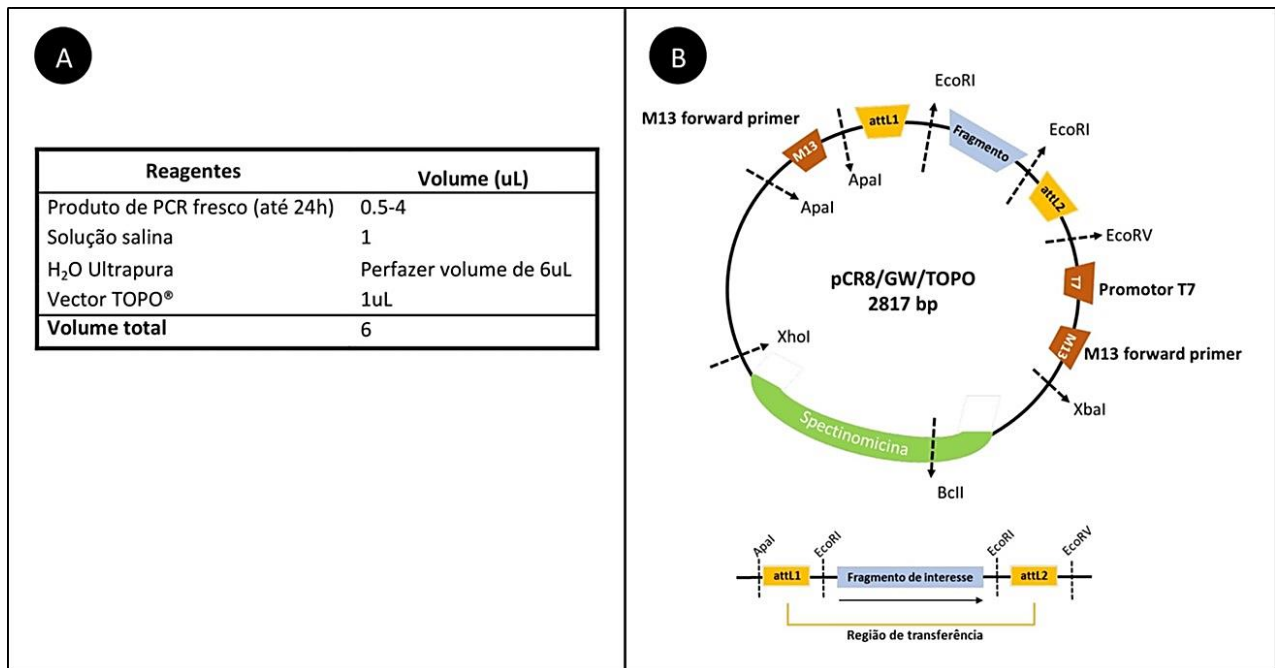


Figura 29: Ensaios para modulação de organismos transgênicos. A. Componentes das reações de ligação para o Vector pCR™8/GW/TOPO®. **B.** Esquema do vetor pCR™8/GW/TOPO® utilizado para clonar os vários fragmentos de DNA.

3.6.3 Inserção no Vector de destino para obtenção das construções finais

Na obtenção das construções finais *hsp70: bmp2b* e *hsp70: nog3* foi utilizado o “kit” Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen) aplicando o protocolo fornecido pelo fabricante. Com este fim, foram elaboradas misturas de reação (Tabelas 11 e 12) que catalisam a recombinação *in vitro* entre o Vector de Entrada (contendo os genes de interesse flanqueados por locais attL) e o Vector Destino (contendo locais de reconhecimento attR) de forma a gerar o que se designa por Vector de Expressão. Nestas reações introduziu-se não só o DNA plasmídico contendo os genes de interesse (*Miniprep 1*) mas também o promotor do gene *hsp70* (Kwan et al., 2007) e um fragmento PolyA. Estes dois fragmentos também continham locais de recombinação que permitiram que, relativamente ao genes de interesse, a integração do promotor *hsp70* se efetuasse na extremidade 5' e o fragmento poly A na extremidade 3'. As reações de clonase duraram cerca de 16 horas a 25°C e a seus componentes estão descritos nas Tabelas 11 e 12. A reação foi interrompida pela adição de 1µL da solução de Proteinase K (2 ug/µL: Invitrogen) seguida de incubação a 37°C durante 10 minutos.

A seguir, procedeu-se à transformação em bactérias competentes *One Shot®Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) seguindo os mesmos procedimentos referidos no ponto 3.4.3 a). Estas bactérias foram sujeitas depois a um *spin* de 6,000 rpm, das quais se removeu 180µL do sobrenadante e o restante foi utilizado para re-suspender as bactérias, que foram depois plaqueadas em placas de petri contendo meio LB sólido com antibiótico ampicilina e incubadas numa estufa a 37°C durante a noite (\pm 16 horas).

Após a preparação das suspensões celulares e linearização dos vectores como descrito nos pontos 4.4.3 (alíneas b e c) foi possível verificar a presença e a correta orientação dos fragmentos através de análise de restrição e PCR. A este procedimento seguiu-se o envio das amostras de DNA plasmídico para sequenciação (STAB VIDA).

	Reagentes	Volume (µL)
Vectores de Entrada	pSE-hsp70 (promotor do gene <i>hsp70</i>)	1
	pCR8/GW/TOPO-nog3	1.9
	p3E-polyA (cadeia de polialanina A)	1
Vector de destino	pDest tol2 CG	1,25
Solução Tampão (TE, pH 8)		2,85
LR Clonase II enzyme mix		2
Volume total		10

Tabela 11: Componentes das reações LR para a construção final *hsp70:nog3*.

	Reagentes	Volume (µL)
Vectores de Entrada	pSE-hsp70 (promotor do gene <i>hsp70</i>)	1
	pCR8/GW/TOPO- <i>bmp2b</i>	1
	p3E-polyA (cadeia de polialanina A)	1
Vector de destino	pDest tol2 CG	1,25
Solução Tampão (TE, pH 8)		3,75
LR Clonase II enzyme mix		2
Volume total		10

Tabela 12: Componentes das reações LR para a construção final *hsp70:bmp2b*.

4. Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação da sobre-expressão do *hoxd13a* na linha transgênica *hsp70:hoxd13a*, geração F3

A linha transgênica de peixe-zebra *hsp70:hoxd13a* foi obtida em 2012 num trabalho conduzido por Renata Freitas em Espanha no laboratório do Dr. JL Gomez-Skarmeta localizado no Centro Andaluz de Biologia do Desenvolvimento (CABD). O objetivo foi estudar o impacto da sobre-expressão do *hoxd13* na morfologia dos apêndices dos peixes e nas cascatas moleculares associadas à sua formação (Freitas et al., 2012).

No sentido de prosseguir com a avaliação deste impacto a nível dos fatores expressos a jusante do *hoxd13*, tema em que se centra esta tese, foi requisitado um casal da geração F1 ao laboratório de origem em 2013. Estes animais resultaram do cruzamento de um peixe-zebra transgênico, proveniente da primeira microinjeção, com um peixe-zebra do tipo selvagem, representando por isso uma condição de heterozigotia que se pensou ser mais favorável para aumentar a taxa de sobrevivência dos organismos desta linha.

Estes animais foram recebidos no recentemente criado Biotério de peixe-zebra do IBMC e, de forma a evitar a propagação de agentes patogénicos nos sistemas de aquários, houve necessidade de os manter num sistema separado de quarentena. Estes organismos deram depois origem a novas posturas (F2) que, após esterilização dos ovos, foram colocadas nos sistemas de aquários do Biotério. Os embriões da geração F2 foram avaliados para a emissão de fluorescência no coração de forma a averiguar se havia uma quantidade significativa de animais transgênicos. Isto levou à seleção de organismos específicos da geração F2 capazes de produzir um elevado número de embriões transgênicos e inclusivamente cruzá-los entre si para mimetizar a condição de homozigotia inicial. Estes casais eram identificados por características visualmente reconhecíveis (ex. forma das barbatanas, mandíbula, pigmentação, dimensão corporal) e mantidos em grupos constituídos no máximo por dois machos e duas fêmeas, permitindo desta forma uma fácil distinção e identificação. Os dados sobre a identificação dos casais, bem como os seus dados de reprodução semanais eram esquematizados em tabelas (Anexos: Tabela 14).

Uma vez atingidas as condições necessárias para produzir organismos transgênicos na geração F3, verificou-se se os resultados da sobre-expressão provocados pelos tratamentos de choque térmico eram ainda consistentes com os resultados iniciais publicados (Freitas et al., 2012). Após alguns ensaios, constatou-se que era essencial modificar o protocolo dos choques térmicos de forma a aumentar o número de embriões com fenótipos alterados nos

apêndices. A solução encontrada foi aumentando o tempo de exposição ao calor de forma a também aumentar as chances de alcançar uma situação de sobre-expressão do gene que se reflita num fenótipo claro e consistente com o anteriormente obtido.

Os embriões obtidos após os tratamentos de choque térmico eram deixados a crescer até atingirem os estádios de desenvolvimento apropriados e depois processados para a técnica de hibridação *in situ*, para verificar se a prega ectodérmica distal (do inglês *Apical Ectodermal Fold: AEF*) reduzia nesta geração de peixes apurada geneticamente. Para proceder a esta verificação utilizou-se a sonda de RNA relativa ao gene *and1* (actinodina 1), que codifica para proteínas envolvidas na construção de fibras constituintes da AEF, mais especificamente na construção da parte não-colagénica das actinotriquiás (Zhang et al., 2010). A expressão deste gene observa-se às 24 hpf em células epiteliais distais nas barbatanas do peixe-zebra e é depois detetada na totalidade das células da AEF a partir 48 hpf (Heude et al., 2014) sendo por isso um eficiente marcador molecular do desenvolvimento desta estrutura no peixe-zebra (Freitas et al., 2012).

No ensaio de hibridação *in situ* para as 72 hpf (Fig.30), verificou-se que as barbatanas dos peixes-zebra transgénicos apresentavam a prega ectodérmica distal (AEF) bastante reduzida comparativamente às barbatanas dos peixes-zebra do tipo selvagem, indicando assim que a nossa linha transgénica era capaz de gerar os fenótipos inicialmente publicados (Freitas et al., 2012).

Adicionalmente realizaram-se também RT-qPCR utilizando como material biológico barbatanas dissecadas nos estádios 56, 85 e 115 hpf e *primers* para os genes *and1* e *hoxd13a* (Fig.30). Isto permitiu validar que, de facto, os apêndices da condição transgénica apresentavam reduzidos níveis de expressão de *and1* e aumentados níveis de *hoxd13a* em comparação com a condição controlo do tipo selvagem.

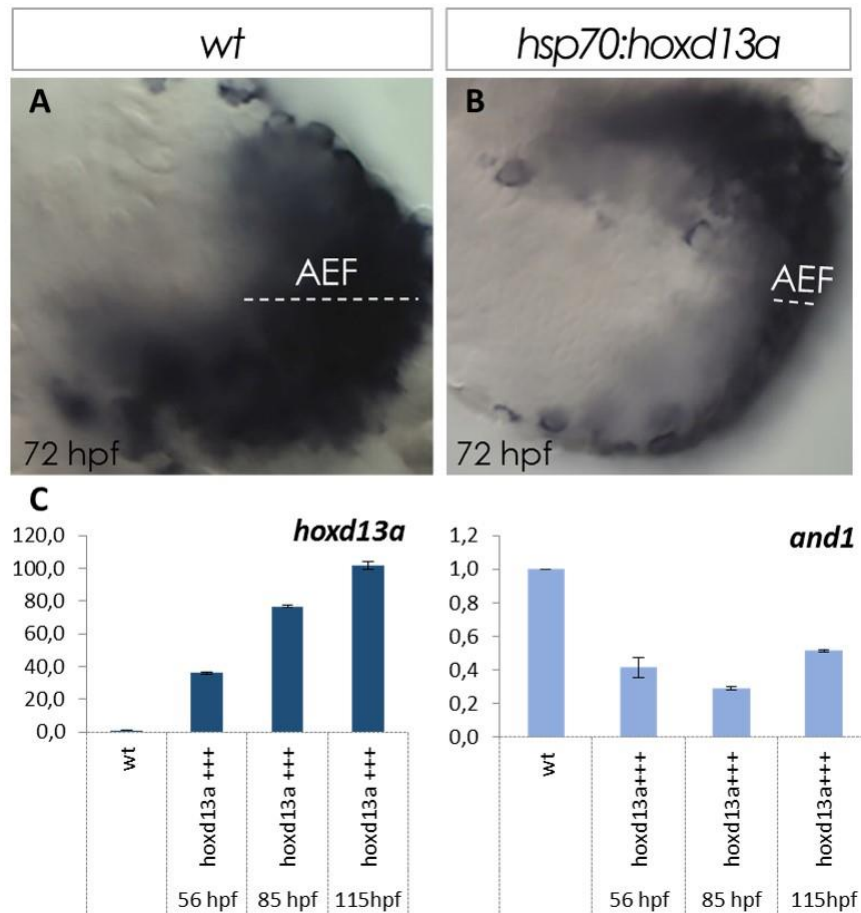


Figura 30: Ensaio de expressão gênica para validar o efeito da sobre-expressão do *hoxd13a* na geração F3. A,B- Hibridação *in situ* para o gene *and1* realizado com barbatanas de peixe-zebra. **A.** Condição do tipo selvagem com AEF inalterada (*wt: do inglês wild-type*). **B.** Condição transgênica evidenciando encurtamento da AEF. **C.** RT-qPCR evidenciando diminuição de *and1* e aumento de *hoxd13a* nos estádios 56, 85 e 115 hpf nas barbatanas da condição transgênica.

4.2 Estudo da expressão e função de diferentes alvos com a modulação do Hoxd13.

Uma vez confirmada a eficiência da linha de peixe-zebra transgênica *hsp70:hoxd13a* para gerar fenótipos nos apêndices locomotores associados à sobre-expressão do *hoxd13*, avançou-se para a avaliação do impacto desta modulação nos fatores expressos a jusante deste gene. Curiosamente, apesar da importância deste gene para o desenvolvimento destas estruturas e o envolvimento de formas mutadas no aparecimento de malformações humanas, continuam pouco conhecidos os alvos diretos do fator de transcrição Hoxd13 em diferentes contextos embrionários. Em 2008, surgem as primeiras indicações de quais podem ser de facto os genes influenciados por este importante fator de transcrição (Salsi et al., 2008).

Através de um ensaio de *Chip-on-Chip* realizado numa linha celular gerada a partir de condroblastos provenientes do úmero humano, estes autores conseguiram detetar cerca de 248 genes que se ligam *in vivo* ao fator de transcrição HOXD13. Deste conjunto de genes, foram selecionados elementos com extrema importância no desenvolvimento dos membros, para efetuar estudos funcionais no modelo de galinha visando caracterizar a ação do *Hoxd13* na sua regulação transcricional: *Hand2*, *Meis1*, *Meis2*, *Sfrp1*, *Barx1*, *Fbn1*, *Dach1*, *Bmp2*, *Bmp4* e *Emx2*. Estes estudos mostraram que a expressão da maioria destes genes é de facto afetada durante o desenvolvimento dos membros como consequência de redução nos níveis de transcritos de *Hoxd13*, apontando para uma função durante a sua regulação transcricional.

Durante este trabalho, e no sentido de avaliar o impacto da sobre-expressão do *hoxd13a* de peixe-zebra nos genes potencialmente expressos a jusante durante o desenvolvimento das barbatanas, foram produzidas sondas de RNA *in vitro* para os 10 genes ortólogos dos acima mencionados presentes no genoma do peixe-zebra de forma a realizar ensaios de expressão génica. Adicionalmente foi também estudada a expressão do gene *fgf10* para melhor compreender os fenótipos causados pela sobre-expressão de *hoxd13a*. Estes ensaios recorreram às técnicas de hibridação *in situ* e RT-qPCR e foram realizados durante o desenvolvimento de animais transgênicos da linha *hsp70:hoxd13a* e controlos do tipo selvagem sujeitos a tratamentos de choque térmico.

a) Gene *HAND2*

O gene *Hand2* (do inglês *Heart and neural crest derivatives expressed 2*) codifica um fator de transcrição da família *helix-loop-helix* que desempenha um papel crucial na identidade AP e PD tanto durante a formação dos membros de murganho e galinha como nas barbatanas pares de peixe-zebra (Fernandez-Teran et al., 2000; Osterwalder et al., 2014; Yelon et al., 2000). A sua ação parece estar relacionada com a ativação da expressão de *Shh* (do inglês *Sonic Hedgehog*), um importante agente para estabelecer a identidade das células ao longo do eixo antero-posterior dos apêndices em formação (Fig.31). A apropriada expressão deste gene reveste-se de extrema importância para o desenvolvimento embrionário humano estando documentados vários casos em que a overdose destes transcritos devido a situações de trissomia causam defeitos nos membros e coração (Tamura et al., 2013).

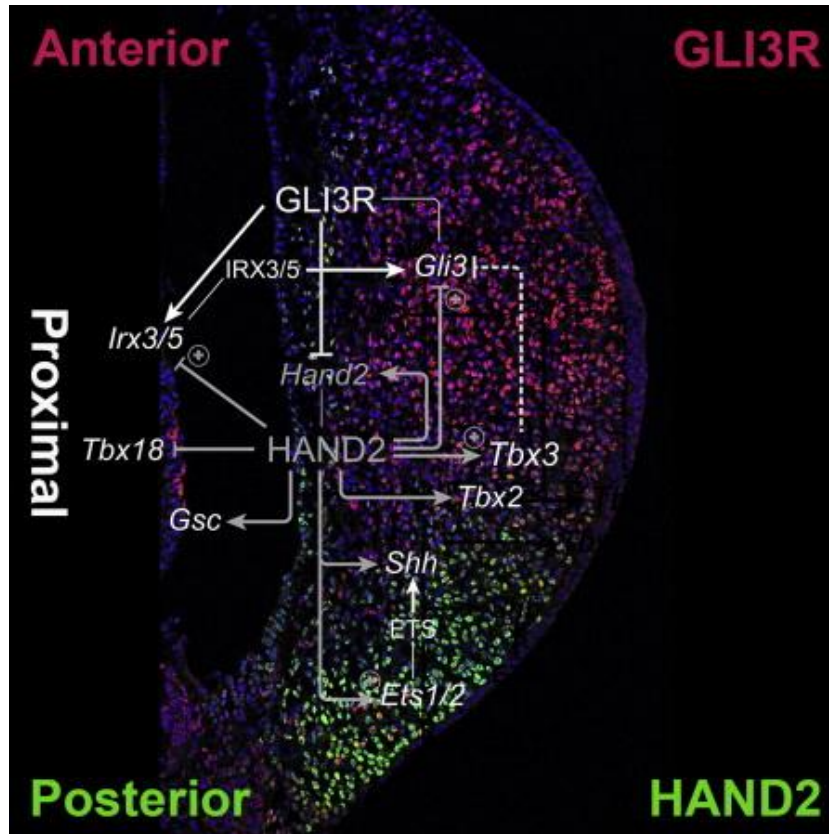


Figura 31: Principais interações moleculares reguladas pelo fator de transcrição Hand2 durante o desenvolvimento dos membros em murganho. O fator Hand2 está no núcleo de redes de regulação de transcrição que controlam o estabelecimento de compartimentos de identidade celular ao longo do eixo AP e PD. Além de ter um impacto direto na expressão de *Shh* e *Gli3*, *Hand2* reforça a ativação e repressão destes alvos via *ETS1/2* e *Tbx3*, respectivamente. As linhas contínuas indicam interações diretas e as linhas tracejadas indicam interações deduzidas a partir da análise genética.

O fator de transcrição Hand2, sendo um regulador essencial da ativação de *Shh*, está indiretamente envolvido não só no estabelecimento da identidade antero-posterior e proximo-distal mas também na manutenção da atividade da região ectodérmica apical (do inglês *Apical Ectodermal Ridge: AER*) responsável pela produção de fatores de crescimento tais como o *Fgf8* (Bueno et al., 1996). Assim sendo, alterações nos níveis de expressão deste gene durante a evolução, relacionados com um maior número de transcritos de *Hoxd13*, pode ter influenciado a morfologia tanto da componente mesodérmica que dá origem aos elementos de endoesqueleto como da componente ectodérmica apical que dá origem ao dermoesqueleto.

No presente trabalho avaliou-se de que forma a expressão do gene *hand2* do peixe-zebra se alterava em situações de sobre-expressão do *hoxd13a* usando a linha transgênica já mencionada e utilizando ensaios de hibridação *in situ* em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig.32). Os resultados obtidos evidenciam um aumento significativo da expressão deste gene em barbatanas provenientes de indivíduos transgênicos sujeitos a tratamentos por choque térmico e possuindo modificações fenotípicas anteriormente associadas à sobre-expressão do *hoxd13a* (Freitas et al., 2012).

Estas observações sugerem que a regulação do *Hand2* pelo fator de transcrição *Hoxd13* durante a formação dos apêndices locomotores parece ter sido estabelecida nos peixes, antes da origem dos tetrápodes. Adicionalmente, estes resultados levantam novas hipóteses relativas aos processos moleculares envolvidos na transição evolutiva entre os apêndices de peixes e de tetrápodes, apontando para o envolvimento do *hand2* como potenciador destas modificações morfológicas.

Estes resultados serão aprofundados nomeadamente com a realização de Chip-qPCR para confirmar a ligação direta entre o *hand2* e o *hoxd13a* durante a formação das barbatanas de peixe-zebra. Também se realizará um estudo mais detalhado da expressão génica dos genes associados à expressão de *hand2* em condições de sobre-expressão do *hoxd13* de forma a melhor caracterizar as alterações produzidas pela modulação deste gene.

Existem já evidências de que a expressão de *shh* é mantida por um período mais longo num cenário de sobre-expressão de *hoxd13* usando esta linha transgênica em particular (Freitas et al., 2012), o que pode ser causado pela sobre-expressão paralela de *hand2*. No entanto, desconhece-se o impacto que a modulação deste factor de transcrição possa ter em genes como *tbx3* (ver Fig.31) que em animais como os morcegos parece estar associado com o alongamento dos dígitos (Dai et al., 2014). Assim, o crescimento adicional de tecido ósseo observado em barbatanas de peixe-zebra apresentando sobre-expressão de *hoxd13* pode ter sido causado por alterações dos níveis de *tbx3* mediadas por *hand2* que fomentaram o alongamento dos elementos de endoesqueleto.

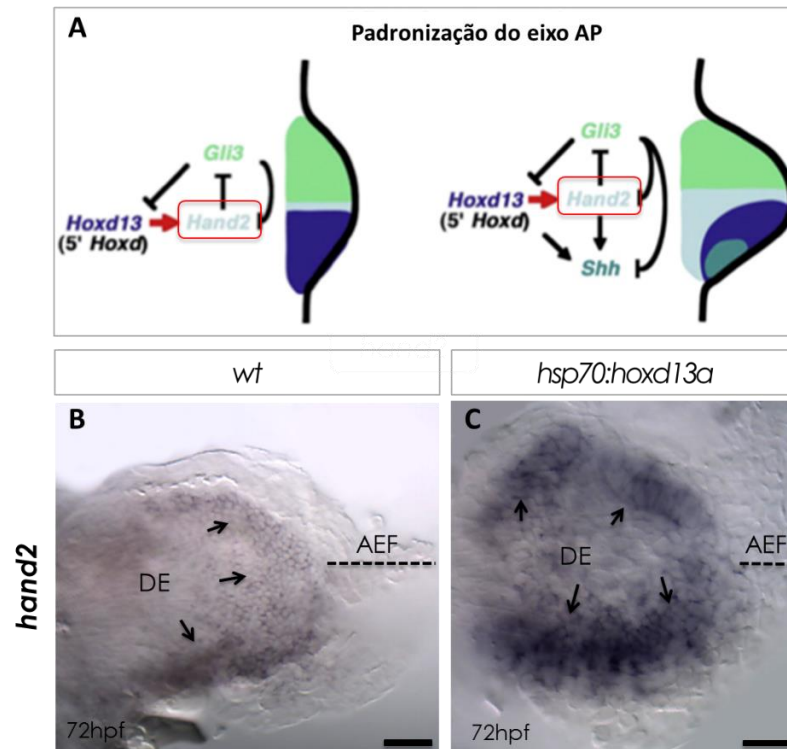


Figura 32: Ação do fator de transcrição *hoxd13a* sobre o seu potencial alvo *hand2* durante o desenvolvimento das barbatanas de peixe-zebra. A. Esquema representativo da posição do *Hand2* na cascata molecular que estabelece a identidade celular ao longo do eixo AP (Padronização do eixo AP). **B.** Barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) com AEF inalterado e expressão do *hand2* (setas) localizada na periferia do disco endoesquelético (DE). **C.** Barbatanas de peixe-zebra transgênicos *hsp70:hoxd13a* evidenciando encurtamento da AEF e maiores níveis de expressão de *hand2* no disco endoesquelético (DE).

b) Gene *FGF10*

Os fatores de crescimento de fibroblastos (Fgfs) são uma família de proteínas envolvidas em importantes processos de desenvolvimento, regeneração e cicatrização dos tecidos. Estas proteínas têm locais de ligação que interatuam com receptores transmembranares, associados a proteoglicanos extracelulares, que desencadeiam uma série de processos de sinalização dentro da célula (Ornitz and Itoh, 2001).

A expressão do gene *Fgf10* foi detetada durante o desenvolvimento embrionário de vários animais na mesoderme lateral do tronco, precisamente nos territórios onde depois começa o crescimento dos membros locomotores (Sekine et al., 1999). Pensa-se que a sua função é manter as células num estado proliferativo, o que é essencial para o crescimento destas

estruturas. Adicionalmente este gene leva à expressão de *Wnt3* na região mais apical da ectoderme do primórdio do membro levando a alterações morfológicas destas células conducentes à formação da AER e à indução da produção de Fgf8. Estas proteínas são necessárias para manter as células mesodérmicas adjacentes à AER em estado mitótico e sustêm a contínua produção de Fgf10. Este processo de regulação cruzada entre a componente mesodérmica e ectodérmica dos membros em formação (do inglês *feedback*) mantém o crescimento destas estruturas (Liu and Saint, 2002).

Curiosamente, este mecanismo parece estar conservado durante a formação das barbatanas dos peixes detetando-se a expressão de *Fgf8* na estrutura equivalente à AER, designada de AEF como anteriormente referido. De facto, deteta-se a expressão do gene ou a produção da proteína Fgf8 nas barbatanas em formação tanto de teleósteos, como é o caso do peixe-zebra, como de peixes cartilagíneos, como é o caso dos tubarões (Freitas et al., 2007; Sekine et al., 1999). Pode-se mesmo detetar a proteína Fgf8 na região mais apical da ectoderme dos primórdios das barbatanas ímpares dos tubarões evidenciando a forma generalista como este fator atual para promover o crescimento de apêndices locomotores (Freitas et al., 2006).

Num trabalho realizado anteriormente, no qual se produziu a linha de peixe-zebra *hsp70:hoxd13a* (Freitas et al., 2012), já se tinha observado que a sobre-expressão do gene *hoxd13a* levava a um aumento da proliferação na zona mesodérmica distal apoiando a hipótese de que a manutenção da proliferação mediada pelo factor Hoxd13 possa ter sido um mecanismo potenciador da formação de novos elementos de endoesqueleto. Neste trabalho, estudou-se se esta proliferação poderia estar associada à produção crescente de Fgf10, um importante factor envolvido na manutenção desse estado proliferativo. Para tal recorreu-se à técnica de hibridação *in situ* para analisar a expressão do *fgf10a* do peixe-zebra nos estádios de desenvolvimento de 72 e 144 hpf, recorrendo tanto à condição do tipo selvagem como à linha transgénica após tratamento com choque térmico. Os resultados obtidos indicam que nas barbatanas dos peixes-zebra transgénicos às 72 hpf, a expressão de *fgf10a* é detetada em células mais distais relativamente à condição do tipo selvagem usada como controlo (Fig.33 A-B). Isto ocorre concomitantemente com o encurtamento da AEF, um fenótipo igualmente detetado em barbatanas a 144 hpf (Fig.33 C-D). Neste último estádio, é notória a manutenção da expressão de *fgf10a* na condição transgénica o que reforça a hipótese de que a sobre-expressão do gene *hoxd13a* podem ter mantido as células com potencial condrogénico mais distais num estado proliferativo potenciando a formação de novos elementos de endoesqueleto.

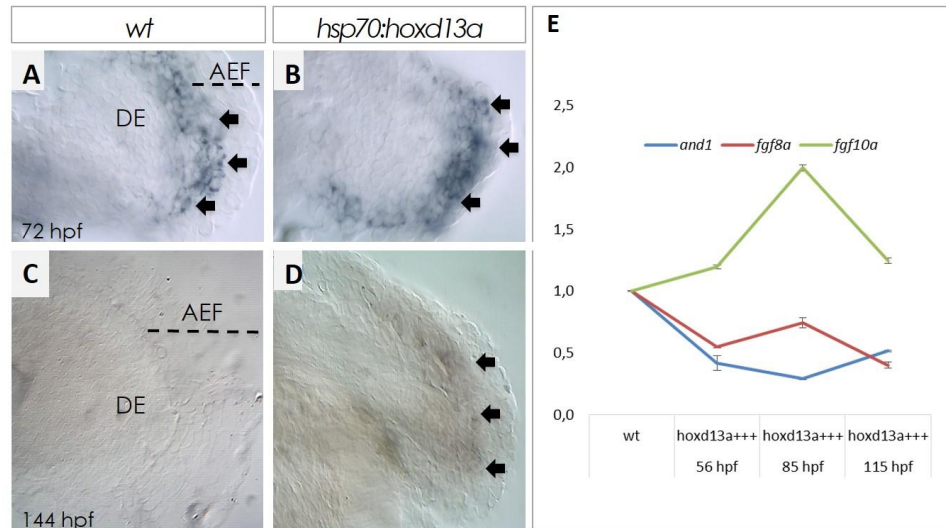


Figura 33: Ensaio de expressão génica para o gene *fgf10a*. A-D Primórdios de barbatanas pares de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) evidenciando uma AEF inalterada (A,C) e do tipo transgênicos (**hsp70:hoxd13a**) evidenciando encurtamento da AEF (B,D) sujeitas a ensaios de hibridação *in situ*. **A.** Expressão do *fgf10a* detetada entre o disco endoesquelético (DE) e a AEF a 72 hpf na condição controlo (setas). **B.** Expressão do *fgf10a* detetado em toda a zona modificada mais distal, onde existe uma tendência para o desaparecimento ou diminuição da AEF nas barbatanas afetadas pela sobre-expressão do *hoxd13a* (setas). **C.** Ausência de expressão de *fgf10a* em barbatanas da condição controlo a 144 hpf. **D.** Manutenção da expressão do *fgf10a* nas barbatanas com claro fenótipo associado à sobre-expressão do *hoxd13a* (setas). **E.** Expressão de *fgf10a*, *and1* e *fgf8a* detetadas por RT-qPCR durante o desenvolvimento de barbatanas do tipo selvagem (wt) e barbatanas com sobre-expressão do *hoxd13a* (*hoxd13a+++*).

Adicionalmente, realizou-se RT-qPCR para avaliar a dinâmica de expressão do *fgf10a* relativamente a genes associados com a formação ou atividade da AEF, tais como *and1* e *fgf8a* (Fig.33 E). Para tal usou-se como material biológico barbatanas dissecadas das condições transgênica e selvagem após os tratamentos de choque térmico e crescimento até três estádios distintos: 56 hpf, 85 hpf e 115 hpf. Com estas análises verificou-se que a expressão do *fgf10a* aumenta significativamente com a sobre-expressão do *hoxd13a* atingindo um pico às 85 hpf, o que ocorre em simultâneo com a diminuição dos indicadores de formação e atividade do AEF (*and1*, *fgf8*).

Assim, estes resultados sugerem que o aumento de transcritos do gene *Hoxd13* durante a evolução possa ter potenciado a manutenção de um estado proliferativo nas células mesodérmicas mais distais dos apêndices mediado pelo fator Fgf10. A questão que agora se coloca é de que forma o *Hoxd13* afetou a transcrição e/ou tradução do Fgf10. Tendo em

conta os resultados de *Chip-to-Chip* que levaram à caracterização dos alvos do Hoxd13 não parece claro haver uma associação direta entre estas duas moléculas (Salsi et al., 2008). No entanto, seria interessante explorar se genes envolvidos na produção de Fgf10 podem ser alvos diretos do Hoxd13. A abordagem desta questão é no entanto complexa uma vez que existem poucos estudos sobre a regulação do gene *Fgf10* no contexto do desenvolvimento dos membros que ofereçam vias alternativas ou complementares à regulação pelo fator Fgf8. Curiosamente, nos ensaios realizados verifica-se que, a par com o aumento da expressão do *fgf10*, existe redução dos níveis de *fgf8a* o que de alguma forma contraria a hipótese de regulação cruzada positiva (em inglês “*positive feedback loop*”). Assim, parece sugestivo um cenário em que um aumento dos níveis de produção de Hoxd13 levem à indução de vias de sinalização alternativas de forma a promover a manutenção da expressão do *fgf10* e consequente proliferação celular.

c) Genes *DACH*

Os genes *dachshund* (*dach*) codificam proteínas que se associam à cromatina e a outros fatores de transcrição para regular a expressão de genes e determinar o destino celular durante o desenvolvimento. Nos vertebrados existem duas formas pertencentes a esta família de genes: *Dach1* e *Dach2*. O *Dach1* desempenha um papel na proliferação e diferenciação de células precursoras e o *Dach2* desempenha um papel específico na miogénese (Wu et al., 2003).

Durante o desenvolvimento dos membros, o gene *Dach1* assume vários papéis importantes de acordo com o estágio de desenvolvimento em distintos modelos animais. Por exemplo, durante a formação inicial do primórdio do membro, este gene parece ser essencial para a formação da AER interagindo com o complexo *Smad* e *Sin3a* de forma a modular a sinalização intracelular protagonizada por BMPs, que são essenciais para controlar a formação da AER (Kida et al., 2004). Depois, ele é expresso em amplos domínios mesodérmicos do primórdio do membro contribuindo para a regulação do seu crescimento ao longo do eixo próximo-distal (Kida et al., 2004). Finalmente, a sua expressão restringe-se à cartilagem que dá origem aos dígitos (Horner et al., 2002). Aqui, *Dach1* está presente fundamentalmente em condrócitos pós-mitóticos, pré-hipertrofos, na fase inicial de hipertrofia e durante o início da ossificação.

Vários estudos têm proposto um papel relevante deste gene para a formação do autopódio. Embriões de galinha demonstraram que diminuição da fusão *VP16-Dach1*, que se

comporta como um ativador transcricional que anula a repressão mediada por *Dach1*, causa desenvolvimento incompleto no autopódio distal, mimetizando o que acontece com a diminuição de um receptor constitutivo ativo de Bmps (Kida et al., 2004). Por outro lado, a repressão da expressão de *Dach1*, pela atividade da forma dominante negativa *DD2*, induziu a expansão proximal de *Meis2*, sugerindo que *Dach1* pode estar envolvido na inibição da expressão de genes *Meis* funcionando como um repressor da identidade proximal (Kida et al., 2004; Salsi et al., 2008).

O gene *Dach1* foi um dos alvos do *Hoxd13* descobertos através de ensaios de *Chip-to-Chip* realizado por Salsi e colaboradores (Salsi et al., 2008). Ensaios funcionais realizados por estes autores demonstraram que o *Hoxd13* em galinha promove o aumento dos níveis de *Dach1* (Fig.34 A). Assim, a regulação que o fator de transcrição *Hoxd13* exercer sobre o *Dach1* pode revelar-se de extrema importância tanto para promover indiretamente a antagonização da ação dos genes *Meis* reprimindo a identidade proximal em células mais distais dos primórdios do membro, como para ativar a expressão de *Dach* nas regiões onde irá decorrer a diferenciação dos dígitos (Salsi et al., 2008).

No peixe-zebra estes genes podem ser de 3 tipos distintos (*dachA*, *dachB* e *dachC*), que têm como locais de expressão conhecidos os órgãos sensoriais, sistema nervoso central e barbatanas peitorais (Hammond et al., 2002). A expressão do gene *dachA* está documentada na zona mais distal do primórdio da barbatana até as 48 hpf. Os genes *dachB* e *dachC* estão similarmente documentados como sendo expressos em zonas mais distais destes apêndices em desenvolvimento, sugerindo-se que *dachC* participa no desenvolvimento muscular (Hammond et al., 2002).

De forma a explorar o impacto que a modulação do *Hoxd13* possa ter tido nos seus potenciais alvos foram realizados ensaios de RT-qPCR utilizando, como material biológico, primórdios de barbatanas provenientes dos tratamentos de choque térmico realizados na condição dos tipos selvagem e transgênica (*hsp70:hoxd13a*) de forma a avaliar o impacto da sobre-expressão do *hoxd13a* nos níveis de expressão dos genes *dach* do peixe-zebra (Fig.34 B). Os resultados obtidos confirmam um aumento da expressão destes genes resultante dos níveis elevados de *hoxd13a*, particularmente significativo para os genes *dachA* e *dachC* a 85 hpf.

Adicionalmente avaliou-se de que forma a expressão dos genes *dachA* e *dachB* se alterava em consequência de ensaios de sobre-expressão realizados com a linha transgênica *hsp70:hoxd13a* (Fig.34 C-J). Assim, foram realizadas hibridações *in situ* com recurso a embriões provenientes desta linha e controlos do tipo selvagem após tratamentos

semelhantes de choque térmico de forma a provocar a sobre-expressão do *hoxd13a* na condição transgênica.

Os resultados obtidos demonstram que a sobre-expressão do gene *hoxd13a* provoca a expressão ectópica de ambos os genes *dach* nas regiões mais distais das barbatanas fenotipicamente alteradas. Assim, quando nos primórdios das barbatanas da condição do tipo selvagem (85 hpf) já se deteta redução significativa dos níveis de expressão do *dachA*, continua a detetar-se a expressão deste gene na condição transgênica, sobretudo na parte mais distal, claramente afetada pela sobre-expressão do *hoxd13a* (Fig.34 C,D). É também possível detetar um domínio de expressão na parte proximal na condição transgênica que é sugestivo do envolvimento deste gene na repressão de sinais de identidade proximais. Os resultados da hibridação *in situ* sugerem ainda que a expressão deste gene é mantida distalmente na região dos apêndices com fenótipo alterado na condição transgênica com o subsequente desenvolvimento destas estruturas (Fig.34 E,F). Um cenário semelhante é observado para o gene *dachB*, detetado exclusivamente em apêndices com fenótipos alterados associados à expressão do *hoxd13a* tanto a 96 hpf como a 144 hpf, estádios em que já não é detetada expressão deste nas condições controlo (Fig.34 G-J).

Estes resultados serão aprofundados nomeadamente com a realização de Chip-PCR para confirmar a ligação direta entre o *dachA/dachB* e o fator *hoxd13a* durante a formação das barbatanas de peixe-zebra. Também se realizará um estudo mais detalhado dos genes associados à expressão de *dachA* e *dachB* em condições de sobre-expressão do *hoxd13* de forma a caracterizar com crescente profundidade alterações produzidas pela modulação deste gene.

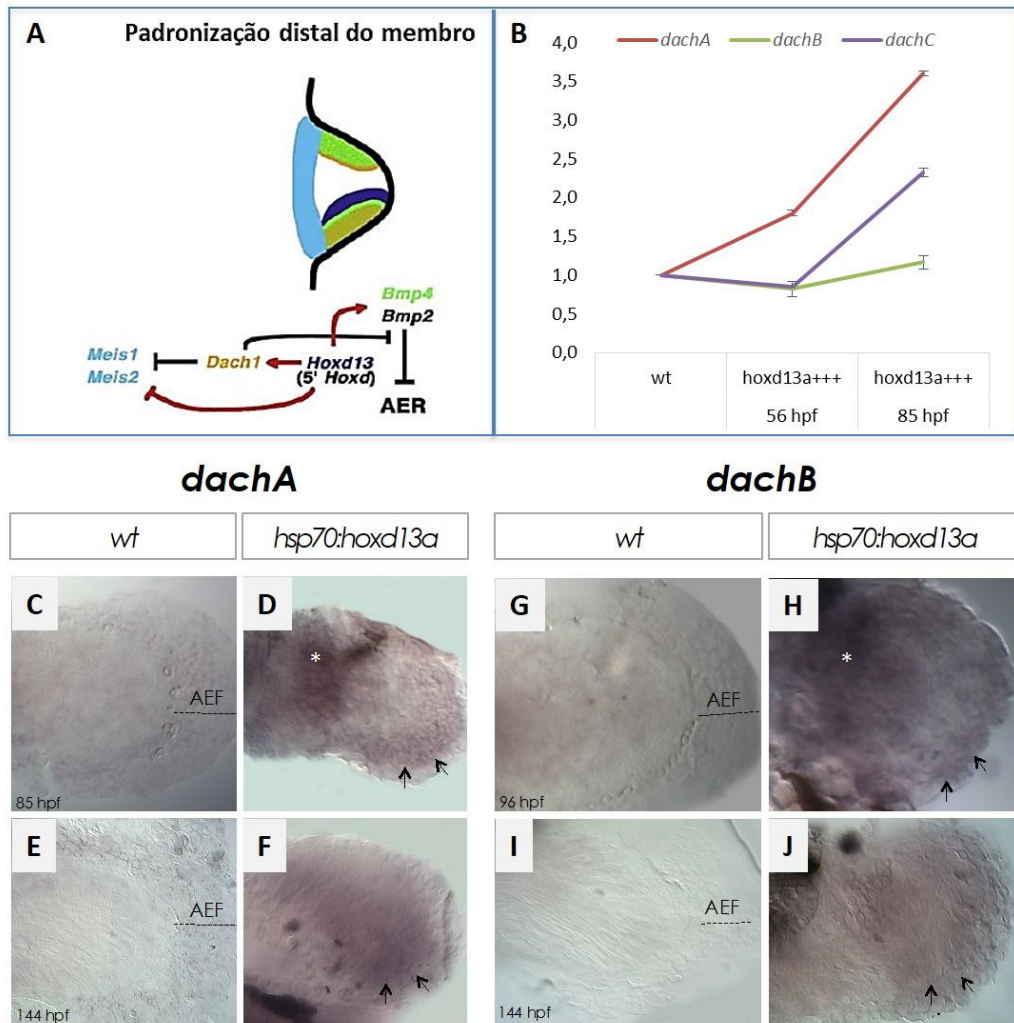


Figura 34: Ensaios de expressão gênica para os genes *dach*. **A.** Esquema representativo da ação do fator de transcrição *Hoxd13* nos genes que atuam na diferenciação próximo-distal dos membros (*proposto por Salsi e colaboradores, 2008*). **B.** Ensaio de RT-qPCR para os genes *dachA*, *dachB* e *dachC*. Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56 hpf e 85 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgênico (*hoxd13a+++*). **C-J.** Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *dachA* (C-F) e *dachB* (G-J) realizados em embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (C,E,G,F) e *hsp70:hoxd13a* (G,H,I,J). Setas indicam expressão distal na zona alterada da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam expressão proximal nestas condições.

d) Genes da família BMP

As proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*-BMP) pertencem à superfamília de fatores de transcrição TGF- β e codificam proteínas que estão envolvidas em vias de sinalização conducentes ao desenvolvimento do esqueleto. Inicialmente foram identificadas pela sua capacidade de formação de osso e/ou cartilagem sendo atualmente referidas como estando envolvidas em vários processos de crescimento e de diferenciação celular (Li and Ge, 2011).

As proteínas BMP2, BMP4 e BMP7 têm sido implicados em vários aspetos do desenvolvimento dos membros (Salsi et al., 2008) e sabe-se que a perda da função de BMP2 e BMP4 tem como consequência a ausência de dígitos posteriores (Bandyopadhyay et al., 2006; Salsi et al., 2008). Isto deve-se, a um provável bloqueio nas células mesenquimais, que tem como consequência a perda da capacidade de dar início à condrogénese, e consequentemente o impedimento da osteogénese endocondral. Simultaneamente, pode ocorrer ausência de apoptose interdigital, o que induz o aparecimento de membrana entre os dígitos (Bandyopadhyay et al., 2006; Salsi et al., 2008).

O estudo realizado em embriões de galinha, indicam que a expressão dos genes *Bmp4* e *Bmp2* é regulada diretamente pelo fator de transcrição *Hoxd13* (Salsi et al., 2008). Neste trabalho os autores também demonstraram que estes genes *Bmp* são alvos diretos do factor de transcrição *Hoxd13*. Durante o desenvolvimento dos membros, o *Bmp2* e o *Bmp4* são expressos na AER, sendo importantes para a manutenção deste importante centro de sinalização, fundamental para o crescimento e diferenciação destas estruturas (Choi et al., 2012). No entanto, depois da especificação das células progenitoras de esqueleto ocorre a regressão da AER, um processo que também parece estar associado com as proteínas BMP (Pizette and Niswander, 1999). De facto, o uso de inibidores da via de sinalização protagonizada por BMPs, tais como *Noggin*, revelou um papel insuspeito para BMPs na regulação negativa da expressão *Fgf* e função da AER. Assim, quando os níveis de BMPs se reduzem nos membros assiste-se à persistência e aumento de tamanho da AER acompanhada de maior crescimento de tecidos moles. Adicionalmente a sobre-expressão de *Noggin* causa um fenótipo semelhante.

Tendo em conta estes dados, a ligação do *Hoxd13* com os promotores destes BMPs, desvendada pelos ensaios de Chip-to-Chip (Salsi et al., 2008), sugere que este fator de transcrição pode estar indiretamente envolvido na regulação da AER. Isto torna apelativa a hipótese de que a regressão da AEF durante a transição entre peixes e tetrápodes, pode ter

sido induzida por um mecanismo semelhante associado a um aumento da expressão de BMPs, eventualmente induzido pelo aumento dos níveis de *Hoxd13*. De forma a explorar esta hipótese, foi caracterizada a expressão dos homólogos destes BMPs num cenário de sobre-expressão do *hoxd13a* usando a linha de peixe-zebra transgênica *hsp70:hoxd13a*.

Relativamente ao *Bmp2*, consideramos na nossa análise as duas cópias presentes no genoma do peixe-zebra resultantes da duplicação extra do genoma: *bmp2a* e *bmp2b* (Meyer and Van de Peer, 2005). Destes genes, aquele que demonstra maior homologia com os genes equivalentes de uma ampla variedade de tetrápodes, é o *bmp2a*. O *bmp2b*, no entanto, parece ter sofrido maior derivação na sua sequência (Martínez-Barberá et al., 1997). No entanto a caracterização da sua estrutura tridimensional aponta para uma grande similaridade entre estas moléculas sugerindo uma função conservada entre elas (Marques et al., 2015). Os resultados obtidos com ensaios de hibridação *in situ* sugerem que tanto o *bmp2a* como o *bmp2b* aparecem na zona distal dos primórdios das barbatanas em desenvolvimento quando estas possuem fenótipos alterados em consequência da sobre-expressão do *hoxd13a* (Fig.35).

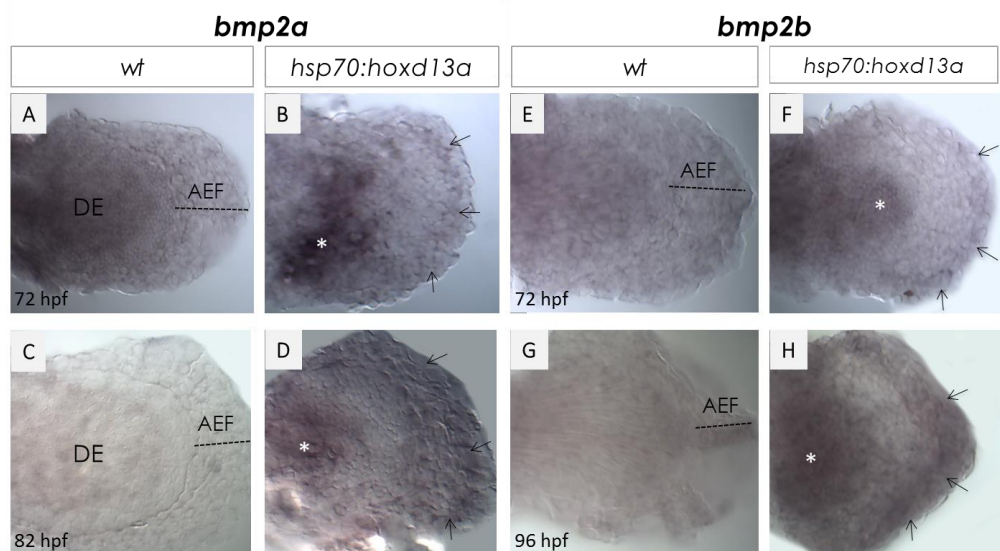


Figura 35: Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *bmp2a* e *bmp2b*. Embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (A, C, E, G) e *hsp70:hoxd13a* com AEF alterado (B, D, F, H). Setas indicam expressão distal na zona da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam maiores níveis de expressão no disco endoesquelético (DE).

Isto ocorre em estádios de desenvolvimento nos quais já é impercetível a expressão destes genes nas condições de controlo do tipo selvagem. Adicionalmente foi também detetada expressão persistente de *bmp2a* e *bmp2b* em zonas do disco endoesquelético, que

não são observadas nos controlos nos mesmos estádios de desenvolvimento. Tendo em conta que em modelos de tetrapódes o gene *Bmp2* foi descrito como indutor de formação de cartilagem (Healy et al., 1999), estes resultados sugerem que o processo de formação de endoesqueleto é mantido por mais tempo quando existe sobre-expressão do *hoxd13a* corroborando resultados anteriores obtidos (Freitas et al., 2012).

No caso do gene *Bmp4*, o genoma do peixe-zebra parece ter retido uma cópia única (*bmp4*). O padrão de expressão deste gene nos primórdios das barbatanas, após os ensaios de sobre-expressão do *hoxd13a*, é similar ao observado para os genes *bmp2a* e *bmp2b* detetando-se expressão prevalente nas zonas distais com fenótipo alterado (Fig.36). Para este gene também se observa mudanças no padrão de expressão na zona do disco endoesquelético na condição transgénica, onde aparecem várias células fortemente marcadas com a sonda *bmp4* a 72 hpf. Tendo em conta o que está descrito sobre a função deste gene noutros modelos animais, em que se provou ser capaz de induzir formação de cartilagem (Buckland et al., 1998), estes resultados sugerem que a formação de endoesqueleto pode ser reforçada com a sobre-expressão do *Hoxd13* tal como sugerido anteriormente (Freitas et al., 2012).

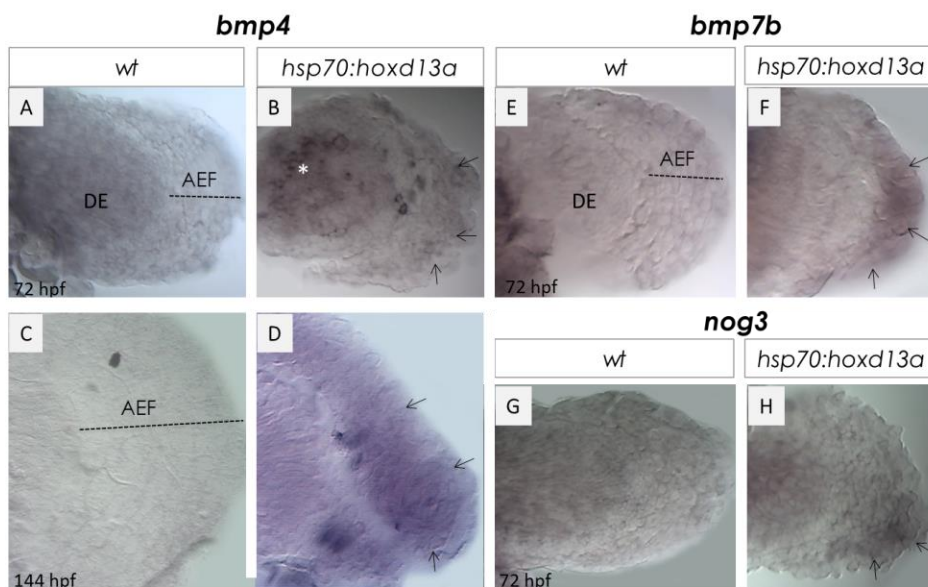


Figura 36: Ensaio de hibridação *in situ* para os genes *bmp4*, *bmp7b* e *nog3*. Embriões de peixe-zebra do tipo selvagem (A, C, E, G) e *hsp70:hoxd13a* com AEF alterado (B, D, F, H). Setas indicam expressão distal na zona da barbatana causada pela sobre-expressão do *hoxd13a* e asteriscos indicam maiores níveis de expressão no disco endoesquelético (DE).

Existe um outro gene da família dos Bmps, designado de *Bmp7*, que juntamente com *Bmp2* e *Bmp4* é requerido para manter a atividade da AER (Choi et al., 2012). Embora não tenha sido provada a ligação direta entre este gene *Bmp* e o factor de transcrição *Hoxd13* (Salsi et al., 2008), foram também aqui caracterizadas as variações na sua expressão num cenário de sobre-expressão do *hoxd13a* em peixe-zebra. Nesta espécie, são detetadas duas cópias do gene *Bmp7*, designadas de *bmp7a* e *bmp7b*. No entanto, só está documentada a expressão da variante *bmp7b* nos primórdios das barbatanas do peixe-zebra (Shawi and Serluca, 2008), o que fez com que se centrassem as análises neste gene em concreto. Os resultados obtidos nas hibridizações *in situ* revelam que a sua expressão também prevalece na região mais distal dos primórdios das barbatanas expostas à sobre-expressão do *hoxd13a*. Isto sugere que durante este processo em particular, o *bmp7b* acompanha a expressão de outros genes da mesma família podendo estar a reforçar o papel inibidor que exercem sobre a AEF.

Dados obtidos por RT-qPCR a partir de primórdios de barbatana dissecados a distintos estádios apontam para uma subida significativa dos transcritos de todos os Bmps estudados às 85 hpf sugerindo que a sobre-expressão do *hoxd13a* parece ter de facto um impacto nos seus níveis de expressão (Fig.37 A). Subsequentes análises que se irão realizar através de Chip-PCR demonstrarão no futuro se a influência que o *hoxd13a* exerce sobre estes genes é direta ou indireta.

Complementarmente, foi também explorado o possível envolvimento do *Noggin* como modulador da função dos BMPs no sistema em estudo. O peixe-zebra tem até agora documentada a expressão de três genes deste tipo: *nog1*, *nog2* e *nog3*. No entanto como só *nog3* apresenta expressão descrita durante a formação das barbatanas, as análises centraram-se neste gene em particular. Similarmente ao que acontece com os genes *bmp* estudados, deteta-se expressão de *nog3* na zona distal do primórdio das barbatanas, correspondente à região da AEF que sofreu redução em consequência da sobre-expressão do *hoxd13a* (Fig.37 B). Estes resultados sugerem que este gene pode ser ativado também, de forma direta ou indireta, pelo *hoxd13a* de forma a regular os níveis dos BMPs, o que terá também de ser investigado com ensaios de Chip-PCR.

De uma forma geral, os resultados acima obtidos são bastante sugestivos do envolvimento dos genes BMP na aquisição dos fenótipos detetados nos ensaios de sobre-expressão do *hoxd13a*, caracterizados por redução da AEF. Assim, é possível que durante a evolução um aumento dos níveis de *Hoxd13* possa ter levado a um aumento da transcrição de BMPs, coincidente com a redução da AEF. Esta ideia começou a ser explorada ainda no decorrer desta tese através da produção de construções moleculares visando a produção de

transgênicos de peixe-zebra onde irá ser possível causar a sobre-expressão de genes BMPs e também do *nog3* (Fig.37 B). Paralelamente serão também realizados ensaios de *knockdown* com morfolidos para os mesmos genes esperando-se fenótipos contrários. Os resultados esperados vão mimetizar os fenótipos obtidos com a sobre-expressão do *hoxd13a* nestes novos organismos transgênicos confirmando o envolvimento da via de sinalização dos BMPs nas transformações que levaram ao aparecimento dos membros nos tetrápodes.

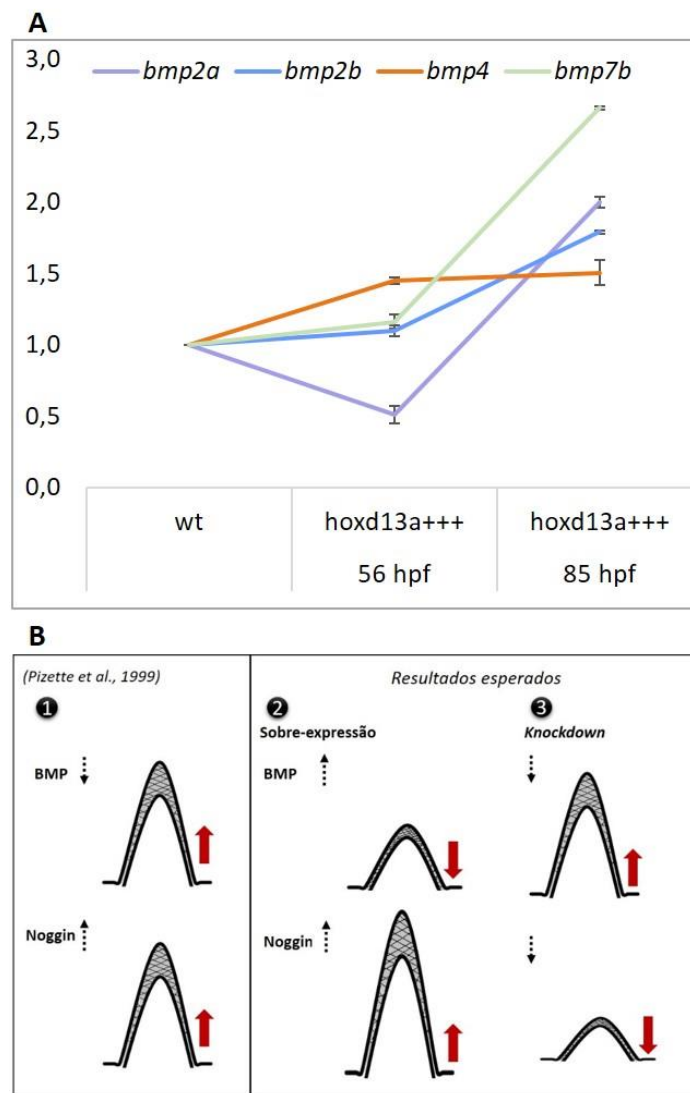


Figura 37: Influência da via de sinalização Bmp no alongamento da AEF. A. RT-qPCR para os genes *bmp2a*, *bmp2b*, *bmp7b* e *bmp4* realizado com primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56 hpf e 85 hpf do tipo selvagem (wt) e transgênico (*hoxd13a+++*). **B.** Estudos sobre o alongamento da AEF. **1**- Inibição de BMP leva a um alongamento da AER e aumento de transcritos de Noggin induz o mesmo fenótipo (Pizette and Niswander, 1999). **2,3**- Resultados hipotéticos de ensaios de sobre-expressão e *knockdown* por morfolidos. **2**- A sobre-expressão de BMP conduzirá a uma redução do crescimento da estrutura AER, enquanto que a de

Noggin poderá provocar um alongamento da AER. 3- A técnica de knockdown poderá conduzir a um aumento no crescimento de AEF para os fatores BMP, e o efeito contrário no caso dos Noggin.

e) Genes *MEIS*

Os genes *Meis* ou genes de local de integração viral ecotrópico mielóide (do inglês *Myeloid ecotropic viral integration site*) estão envolvidos em muitos processos do desenvolvimento e morfogénese dos vertebrados (Sanchez-Guardado et al., 2011). Sabe-se que existem pelo menos quatro sub-famílias independentes destes genes, *Meis1*, *Meis2*, *Meis3* e *Prep1* que foram identificadas em murganho, humano e sapo (Moskow et al., 1995; Nakamura et al., 1996; Salzberg et al., 1999; Waskiewicz et al., 2001).

Os genes *Meis* intervêm na especificação do destino das células ao longo do eixo próximo-distal do primórdio do membro em vertebrados (Capdevila et al., 1999; Mercader et al., 1999; Mercader et al., 2000; Sanchez-Guardado et al., 2011). A produção das proteínas *Meis1* e *Meis2* parecem fomentar os processos de diferenciação proximal no primórdio dos membros. A expressão ectópica distal de *Meis1* ou *Meis2* provoca a eliminação de estruturas distais dos membros, com uma proximalização da identidade destas células (Capdevila et al., 1999; Mercader et al., 1999; Salsi et al., 2008). O fator de transcrição *Hoxd13* tem sido referido como um regulador negativo da expressão de genes *Meis* que permite a repressão da identidade proximal (Capdevila et al., 1999; Salsi et al., 2008). Os estudos de Salsi e colaboradores permitiram demonstrar que, de facto, *Hoxd13* se liga *in vivo* aos genes *Meis1* e *Meis2* durante o desenvolvimento dos 5 primórdios dos membros do murganho (estádio E11.5), o que de certa forma explica a repressão que *Hoxd13* exerce sobre estes genes (Salsi et al., 2008).

No peixe-zebra estes genes podem ser de 5 tipos distintos (*meis1a*, *meis1b*, *meis2a*, *meis2b*, *meis3*), sendo que apenas os *meis1a*, *meis1b* e *meis3* foram descritos como sendo expressos durante a formação das barbatanas. Neste trabalho procedeu-se à avaliação da expressão dos genes *meis1b* após os ensaios de sobre-expressão na linha transgénica de forma a estudar o impacto que a modulação do fator de transcrição *Hoxd13* possa ter tido neste potencial alvo. Para tal, recorreu-se à sua análise qualitativa através da técnica de hibridação *in situ* e à sua análise quantitativa por RT-qPCR. Os dados obtidos nos ensaios de hibridação *in situ* não permitem detetar diferenças na expressão deste gene relacionadas com a sobre-expressão do *hoxd13a*. No entanto os resultados obtidos por RT-qPCR

permitiram-nos detetar diferenças efetivas nos níveis de expressão (Fig. 38). Estes ensaios foram realizados utilizando como material biológico, barbatanas da linha transgénica de peixe-zebra (*hsp70:hoxd13a*) e do tipo selvagem provenientes dos tratamentos de choque térmico e nos estádios de desenvolvimento de 56 hpf, 85 hpf e 115 hpf. A análise dos resultados do RT-qPCR, demonstraram que a expressão de *meis1b* diminui significativamente com a sobre-expressão de *hoxd13a*. Curiosamente a diminuição da expressão do gene *meis1b* ocorre nos estádios de desenvolvimento nos quais a expressão dos genes *dach* aumenta. Como se sabe que os genes *dach* podem estar envolvidos na inibição da expressão de genes *meis* e conseqüentemente distalização da identidade das células (Salsi et al., 2008), os resultados obtidos podem ser uma consequência indireta da sobre-expressão do *hoxd13a* devido a um aumento da expressão dos genes *dach*.

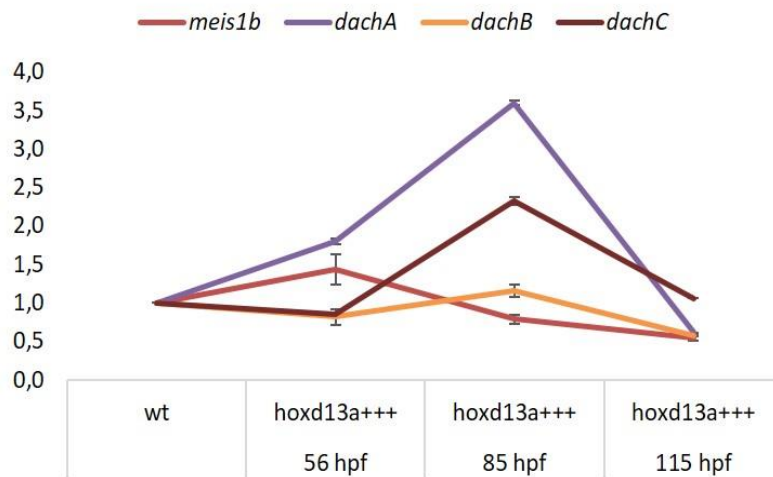


Figura 38: Ensaio de RT-qPCR para os genes *meis1b* e *dachA*, *dachB* e *dachC*. Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf provenientes de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgénico (*hoxd13a+++*).

Assim, os nossos resultados sugerem que, tal como em estudos anteriormente realizados (Salsi et al., 2008), o aumento da expressão de genes *dach* do peixe-zebra podem levar a repressão de sinais de identidade proximal em células mais distais dos primórdios do membro, promovendo indiretamente a antagonização da ação de genes *Meis*.

Em trabalho futuro é necessário aprofundar os resultados, nomeadamente com a realização de Chip-PCR para confirmar a ligação direta entre o *meis1b* e o *hoxd13a* durante a formação das barbatanas de peixe-zebra. Será também essencial proceder a uma

caraterização mais detalhada da função dos genes *meis* durante a formação dos apêndices destes animais nomeadamente explorando os fenótipos gerados em linhas de peixe-zebra com mutações pontuais nestes genes ou através de ensaios com morfolinos. Finalmente, será de grande interesse analisar a expressão génica dos genes associados às modificações na expressão dos genes *meis* de forma a entender como a sua atividade está integrada com a de outros módulos regulatórios em condições de sobre-expressão do gene *hoxd13a*.

g) Gene *FBN1*

A *fibrilina 1*, ou *Fbn1*, codifica para uma proteína que constitui um componente importante de microfibrilas extracelulares (Salsi et al., 2008). Esta molécula distribui-se por uma grande variedade de tecidos desempenhando um papel crítico na manutenção da arquitetura do tecido conjuntivo através da sua participação na formação de fibra de elastina, por exemplo (Ramirez et al., 2004; Yoshiba et al., 2015). As mutações no gene *Fbn1* são responsáveis pela origem do Síndrome de Marfan (MFS), um distúrbio autossómico dominante do tecido conjuntivo que afeta principalmente o sistema cardíaco, ocular e esquelético (Salsi et al., 2008). Os pacientes com MFS exibem um alongamento anormal dos membros (dolicostenomelia) e dígitos (aracnodactilia), sendo indicativos de uma maior formação de elementos ósseos (Robinson et al., 2006; Salsi et al., 2008).

Em murganho (Fig.39), demonstrou-se que as *fibrilinas 1 e 2* controlam a formação óssea regulando a diferenciação dos osteoblastos através da modulação de sinais endógenos dos fatores de transformação de crescimento β (TGF- β) e da biodisponibilidade de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) no osso (Nistala et al., 2010). A inativação do gene *Fbn2* dá origem à sindactilia e isto demonstrou afetar a sinalização de BMP nas regiões interdigitais dos membros em desenvolvimento (Arteaga-Solis et al., 2001; Salsi et al., 2008).

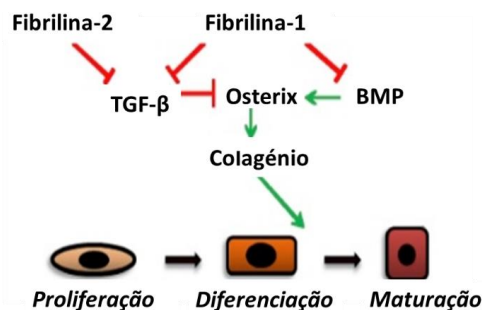


Figura 39: Modelo de maturação dos osteoblastos mediado por microfibrilas. *fibrilina-1* e *fibrilina-2* medeiam a produção de osteoblastos regulando TGF- β e BMP que em conjunto calibram a taxa de formação de osso. Modificado de (Nistala et al., 2010).

Neste trabalho, foi realizado o estudo da expressão do gene *fbn1* de peixe-zebra através da técnica de hibridação *in situ* de forma a avaliar o seu impacto nos fenótipos resultantes da modulação de *hoxd13a*. Nesta análise utilizaram-se embriões provenientes da linha de peixe-zebra transgênica e embriões de peixe-zebra do tipo selvagem às 72 hpf. Verificou-se que as barbatanas provenientes de indivíduos transgênicos sujeitos a choque térmico apresentam uma forte expressão na zona mais distal, onde se observa diminuição da AEF e desenvolvimento de mais tecido ósseo distal (Freitas et al., 2012). Adicionalmente foram realizados ensaios de RT-qPCR, seguindo as metodologias anteriormente referidas, e com esta estratégia foi também possível detetar um aumento significativo da expressão do gene *fbn1* nas barbatanas de peixe-zebra transgênicas sujeitas a choque térmico, a 56 hpf (Fig.40). Estas modificações nos padrões de expressão genética evidenciam um aumento significativo da sua expressão, sugerindo que o gene *fbn1* é regulado pelo fator de transcrição *hoxd13* provavelmente induzindo a formação óssea durante o desenvolvimento dos apêndices locomotores. Como para casos anteriores, a ligação direta entre *fbn1* e *hoxd13a* no contexto da formação das barbatanas de peixe-zebra será confirmada no futuro através de ensaios de Chip-PCR.

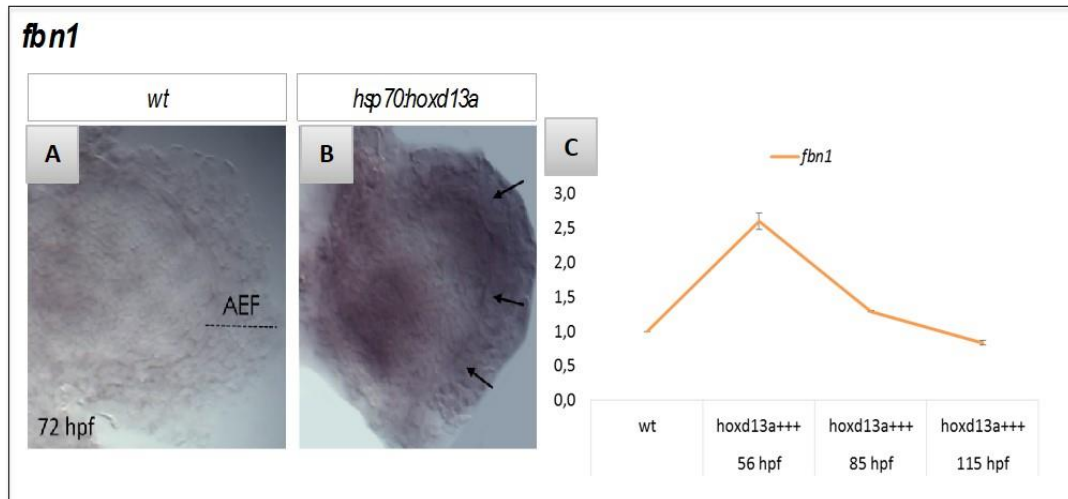


Figura 40: Ensaio de hibridação *in situ* para o gene *fbn1* realizados em embriões de peixe-zebra a 72 hpf. A-Barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem com AEF inalterada. **B-**Barbatanas de peixe-zebra transgênicos *hsp70:hoxd13a* evidenciando encurtamento da AEF e maiores níveis de expressão de *fbn1* nos tecidos mais distais (setas). À direita, expressão de *fbn1* detetada por RT-qPCR durante o desenvolvimento de barbatanas do tipo selvagem (wt) e barbatanas com sobre-expressão do *hoxd13a* (*hoxd13a+++*) nos estádios 56, 85 e 115 hpf.

h) Gene *BARX1*

O gene *Barx1* codifica uma proteína da subclasse Bar de fatores de transcrição homeobox, que se expressa nomeadamente durante o desenvolvimento da cartilagem e articulações dos membros (Salsi et al., 2008). Numa primeira fase, *Barx1* é expresso em regiões discretas proximais que correspondem às zonas de formação de cartilagem articular (Barlow et al., 1999; Salsi et al., 2008). Mais tarde, durante a formação do autopódio, *Barx1* é expresso nos condrócitos que formam a zona de crescimento epifiseal, situada entre o osso e a cartilagem articular. A expressão de *Hoxd13* parece ser complementar à do *Barx1*, uma vez que marca a camada celular mesenquimal adjacente ao pericôndrio das condensações de dígitos, sugerindo que estes genes podem desempenhar papéis opostos na diferenciação/maturação dos condrócitos dentro das condensações (Salsi et al., 2008; Suzuki and Kuroiwa, 2002).

Os estudos funcionais que sucederam o Chip-to-Chip realizado pela equipa de Salsi sugerem que o fator de transcrição *Hoxd13* regula a expressão do gene *Barx1*, especialmente nos dígitos (Salsi et al., 2008). No decorrer deste trabalho foi caracterizada a expressão de *Barx1* num cenário de sobre-expressão do *hoxd13a* em peixe-zebra através das técnicas de hibridação *in situ* e RT-qPCR. Os resultados da análise qualitativa através de hibridação *in situ* não foram informativos sobre potenciais diferenças na expressão do *barx1* em consequência da sobre-expressão do *hoxd13a*. No entanto, os resultados obtidos por RT-qPCR a partir de primórdios de barbatana dissecados a distintos estádios, provenientes dos tratamentos de choque térmico realizados na condição do tipo selvagem e transgênica (*hsp70:hoxd13a*) indicam uma diminuição da expressão deste gene resultante do aumento dos níveis de expressão de *hoxd13a* (Fig.41).

Estudos realizados em peixe-zebra evidenciam que a sinalização *bmp4* inibe a expressão de *barx1* (Nichols et al., 2013; Sperber and Dawid, 2008), e curiosamente os nossos resultados de RT-qPCR indicam aumento de expressão *bmp4* e simultânea redução de *barx1* em barbatanas a 56 hpf sujeitas à sobre-expressão do *hoxd13a* (Fig.41).

Assim, no futuro será importante a realização de Chip-PCR para perceber se a influência que o *hoxd13a* exerce sobre este gene é direta ou indireta. Será também importante caracterizar a expressão do *barx1* em linhas de peixe-zebra com mutações na sequência codificante do *bmp4* bem com usar morfolidos para este gene e perceber se isto afeta a expressão do *barx1*.

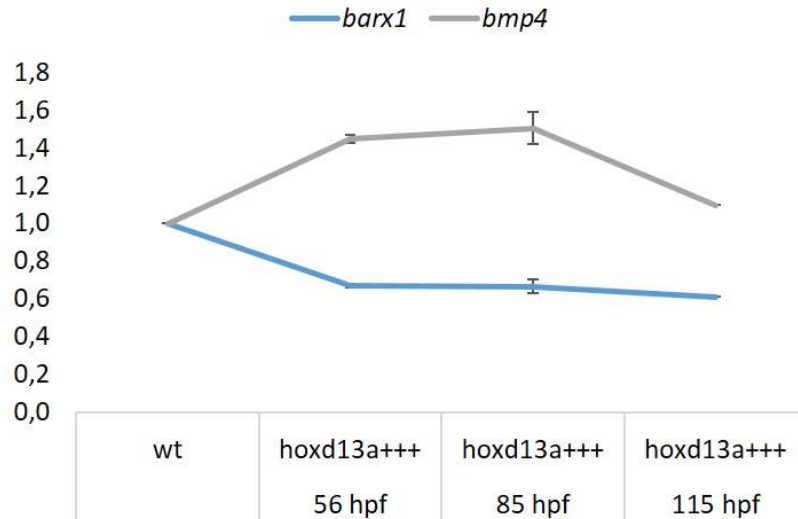


Figura 41: Ensaio de RT-qPCR para o gene *barx1* e *bmp4*. Material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgênico (*hoxd13a+++*).

i) Gene *SFRP1*

Os genes *Sfrp* (do inglês *secreted frizzled-related proteins*) codificam para proteínas secretadas com uma importante função na sinalização extracelular. Existe um total de 5 membros desta família descritos no genoma humano: *Sfrp1*, *Sfrp2*, *Sfrp3*, *Sfrp4* e *Sfrp5*. Estas moléculas têm a capacidade de se ligar a proteínas Wnt e/ou a receptores Fz, fazendo com que estas moléculas não estabeleçam ligações entre si (Chim et al., 2007; Veeck et al., 2006). Assim, sendo as proteínas *Sfrp* importantes antagonistas da sinalização Wnt, elas são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário (Bovolenta et al., 2008; Esteve et al., 2011).

Estas moléculas parecem ter uma função muito relevante durante o desenvolvimento dos membros. Estudos de expressão génica revelaram que os genes *Sfrp1* e *Sfrp2* são expressos nas células mesenquimais que rodeiam a cartilagem que dá origem aos dígitos (Terry et al., 2000). Numa fase mais tardia, transcritos destes genes acumulam-se em regiões adjacentes às articulações entre os dígitos (Salsi et al., 2008; Terry et al., 2000). Quando as regiões codificantes de *Sfrp1* e *Sfrp2* são mutadas em murganho ocorrem alterações no crescimento dos membros e na formação dos dígitos sendo observados fenótipos semelhantes em ensaios de sobre-expressão de Wnt (Sato et al., 2006). Estas observações sugerem que, de facto, os

genes *Sfrp1* e *Sfrp2* participam na regulação da sinalização de Wnt durante a formação do esqueleto (Salsi et al., 2008; Satoh et al., 2006).

Em primórdios dos membros de galinha, o gene *Sfrp1* foi identificado como sendo alvo do Hoxd13 por Salsi e colaboradores, que adicionalmente demonstraram que existe uma subida dos níveis de transcritos deste gene em células com sobre-expressão de Hoxd13 (Salsi et al., 2008).

Estes dados sugerem que, o fator de transcrição Hoxd13, regulando diretamente a expressão de *Sfrp1*, podem de alguma forma afetar a via de sinalização Wnt durante a formação dos elementos esqueléticos do autopódio (Salsi et al., 2008).

No sentido de verificar se esta relação entre os níveis de expressão do *Hoxd13* e do *Sfrp1a* está conservada nos peixes, usamos a linha transgênica *hsp70:hoxd13a* para induzir a sobre-expressão do *hoxd13a* e posteriormente avaliamos o impacto na expressão de *sfrp1a*, com recurso à técnica de RT-qPCR. Estes ensaios foram realizados recorrendo a material biológico proveniente da dissecação de barbatanas a três estádios de desenvolvimento distintos: 56 hpf; 85 hpf; 115 hpf (Fig.42).

Os resultados obtidos indicam apenas uma ligeira subida da expressão do gene a 85 hpf. Isto pode sugerir que a sobre-expressão do *hoxd13a* não produz um impacto significativamente positivo na expressão deste gene durante os estádios analisados. Adicionalmente, foram realizados ensaios de hibridação *in situ* desde as 48 até às 144 hpf não se detetando diferenças significativas no padrão de expressão, até porque os níveis de expressão detetados tanto na condição transgênica como na condição do tipo selvagem foram muito baixos e circunscritos à região mais proximal das barbatanas em formação (Fig.42).

Tendo em conta estes resultados, estes estudos serão repetidos durante estádios mais avançados de desenvolvimento aproveitando para descrever a expressão do gene *sfrp1a* durante a fase larvar na qual se finaliza o processo de formação dos raios a partir do disco endoesquelético (Grandel and Schulte-Merker, 1998a).

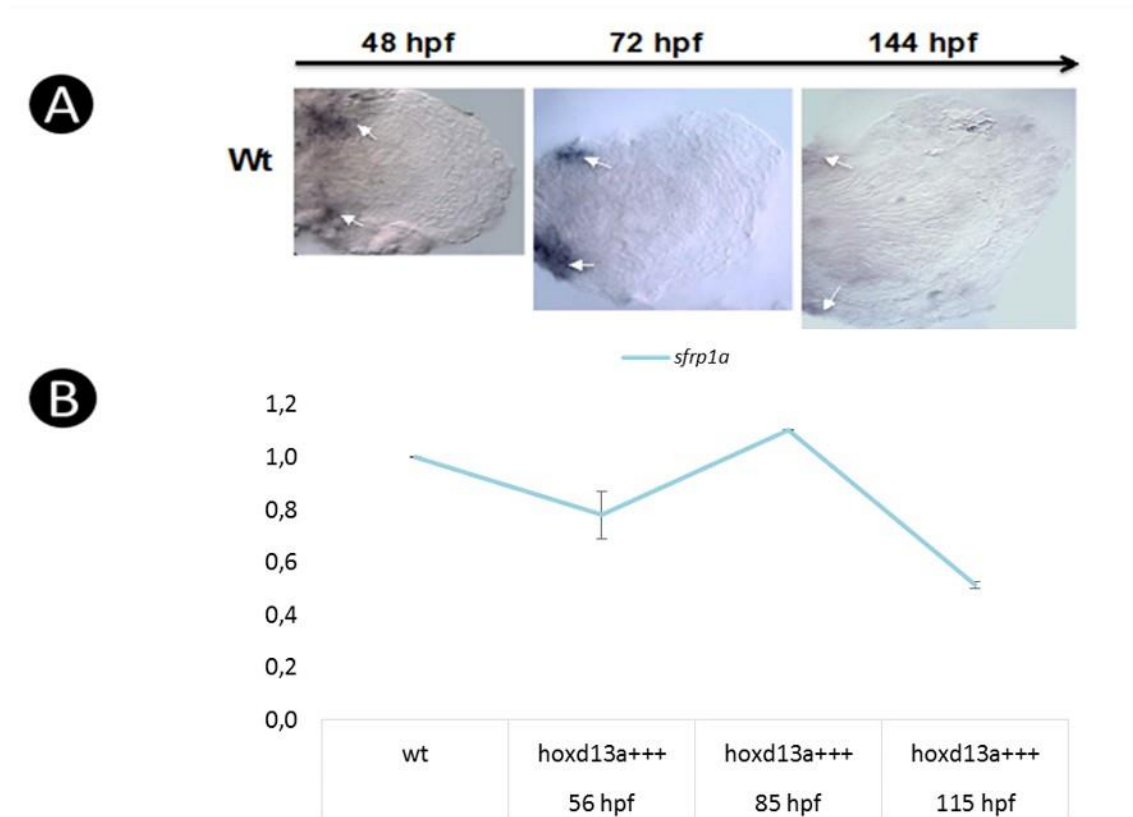


Figura 42: Ensaio de expressão gênica para o gene *sfrp1a*. A- Hibridação *in situ* de barbatanas de peixe-zebra do tipo selvagem (wt) a distintos estádios de desenvolvimento de 48, 72 e 144 hpf. B- Ensaio de RT-qPCR para o gene *sfrp1a* realizado em material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf provenientes de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgênico (*hoxd13a+++*).

j) Gene *EMX2*

A família de genes *Emx* é responsável pela codificação de dois fatores de transcrição homeobox, *Emx1* e *Emx2*, que são críticos sobretudo para o desenvolvimento do cérebro e sistema urogenital (Cecchi and Boncinelli, 2000). Em termos do desenvolvimento dos membros, verificou-se que o gene *Emx2* em modelos de tetrápodes é importante para especificar o local de diferenciação dos ossos proximais de ligação ao tronco, as cinturas escapulares e pélvicas (Pellegrini et al., 2001). Desde que este gene foi caracterizado, pensa-se que enquanto os genes *Hox* são responsáveis pela especificação do esqueleto dentro do primórdio do membro, o gene *Emx2* tem a seu cargo a especificação dos elementos mais proximais (Pellegrini et al., 2001).

Surpreendentemente, os ensaios de Chip-to-Chip realizados pela equipa de Salsi revelaram que o gene *Emx2* pode ser regulado diretamente pelo fator de transcrição *Hoxd13*

(Salsi et al., 2008). No entanto quando provocaram a diminuição dos níveis de *Hoxd13* durante o desenvolvimento dos membros de galinha não detetaram alterações na expressão do *Emx2*. Isto sugere que durante o desenvolvimento dos membros o *Emx2* parece não ser alvo do *Hoxd13*.

No entanto sobre-expressão do gene *Emx2* leva ao desenvolvimento de um dígito posterior adicional na margem anterior do membro de galinha (Pröls et al., 2004). Isto pode significar que este gene tem o potencial de interferir na formação de estruturas ósseas também nos territórios de domínio Hox, o que talvez não ocorra em condições normais por um efeito repressor que *Hoxd13* exerça sobre ele.

No sentido de explorar esta ideia, foi também avaliado durante o decorrer deste trabalho de que forma a expressão do gene *emx2* do peixe-zebra é afetado pela sobre-expressão do *hoxd13a* induzido na linha transgénica *hsp70:hoxd13a*. Para tal usaram-se as técnicas de hibridação *in situ* e RT-qPCR, como para o estudo dos genes anteriormente mencionados.

Os resultados das hibridações *in situ* demonstraram que o território de expressão deste gene se circunscribe à zona onde se formam as cinturas peitorais (Fig.43), não sendo possível detetar diferenças nas condições com sobre-expressão do *hoxd13a*, sobretudo porque esta zona é muitas vezes destruída no processo de dissecação das barbatanas para efetuar montagens histológicas. No entanto os resultados de RT-qPCR indicam que quando *hoxd13a* está sobre-expresso existe um aumento da expressão de *emx2* às 85 hpf seguido de uma redução drástica às 115 hpf (Fig.43).

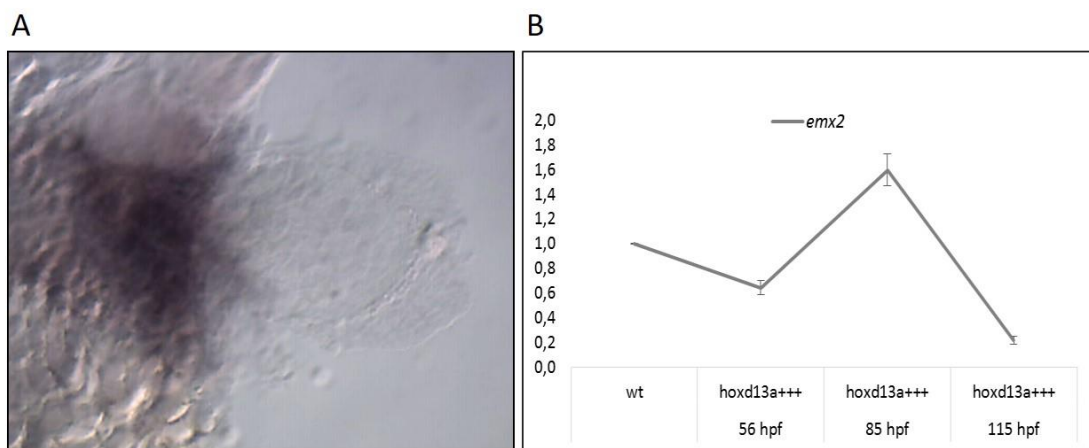


Figura 43: Ensaio de expressão génica para *emx2*. **A.** Expressão endógena do gene a 72 hpf. **B.** Ensaio de RT-qPCR, realizado em material biológico proveniente de dissecações de primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56, 85 e 115 hpf de embriões do tipo selvagem (wt) e do tipo transgénico (*hoxd13a+++*).

Isto sugere que durante este estágio tardio, em que parece estar a desenhar-se um território com identidade distal (Freitas et al., 2012), o gene *emx2* que confere uma identidade a elementos de endoesqueleto proximal pode, de facto, estar a ser fortemente reprimido pelo *hoxd13a*.

Em estudos futuros analisando as variações deste gene num contexto de sobre-expressão do *hoxd13a* durante o desenvolvimento das barbatanas, será importante a realização cuidada das dissecações para montagem histológica de forma que seja possível a visualização da zona de expressão na região das cinturas peitorais. Estes resultados serão também aprofundados nomeadamente com a realização de Chip-qPCR para confirmar a ligação direta entre o *emx2* e o *hoxd13* durante a formação das barbatanas de peixe-zebra.

5. Conclusão e perspectivas futuras

5. Conclusão e perspectivas futuras

Este trabalho permitiu aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares associados à expressão do gene *Hoxd13* que, eventualmente, possam explicar as mudanças morfológicas que operaram durante a transição evolutiva entre os apêndices locomotores dos peixes e dos tetrápodes.

De forma a explorar esta questão, foram realizados ensaios de sobre-expressão do gene *hoxd13a* durante o desenvolvimento das barbatanas do peixe-zebra fazendo uso da linha transgênica *hsp70:hoxd13a*. Posteriormente, estes embriões foram usados para se proceder à caracterização da expressão de genes reiteradamente envolvidos no desenvolvimento dos membros em modelos tetrápodes e que, na sua maioria, são considerados alvos diretos do fator de transcrição Hoxd13.

Os resultados obtidos apontam para uma grande conservação relativamente aos potenciais alvo do Hoxd13 nos peixes, questão que irá ser agora explorada através da realização de Chip-PCR para demonstrar, de facto, uma ligação direta entre estes no decorrer do desenvolvimento das barbatanas.

Tendo em conta a questão evolutiva que inspirou este trabalho, relativamente à função do *Hoxd13* na evolução dos apêndices locomotores, os nossos resultados sugerem que o aumento da expressão deste gene pode ter proporcionado:

- 1) A promoção de um estado proliferativo das células mais distais dos apêndices que facilitou o alongamento destas estruturas, nomeadamente favorecendo o aumento da expressão de *fgf10*;
- 2) A promoção de uma identidade distal nestas células através da repressão da informação para gerar identidade proximal, nomeadamente reprimindo a expressão de genes *meis*;
- 3) A indução da formação de novo tecido endoesquelético neste domínio distal, como se constata pelo aumento da expressão de genes associados à esqueletogénese em determinados estádios (ex. *fbn1 a 56 hpf*)
- 4) A inibição do alongamento da estrutura embrionária de peixe que controla o desenvolvimento do dermoesqueleto, a partir da prega ectodérmica distal (AEF), como se constata pela redução da expressão de *and1* e *fgf8* bem e aumento de *bmps* potencialmente repressores desta estrutura.

Em estudos futuros, estes resultados serão aprofundados nomeadamente através da caracterização de outros genes associados a cada via de sinalização abordada neste trabalho usando a condição de sobre-expressão do *hoxd13a* em peixe-zebra. Por exemplo serão

caracterizados genes com relevância na padronização dos tecidos ao longo do eixo antero-posterior e próximo-distal e que influenciam ou são influenciados por *fgf10*, *hand2* ou *dach* de forma a melhor entender o impacto da sobre-expressão do *hoxd13a* nestes processos.

A influência que o *Hoxd13* pode ter tido na redução da AEF começou já a ser abordada no decorrer deste estudo. Nesta caso a estratégia passa pela produção de linhas de peixe-zebra transgênicos que permitam a sobre-expressão de genes *nog3* e *BMPs* e inferir quais as consequências para a formação da AEF. Adicionalmente, serão também usados morfólino que visem o efeito contrário. Com estas experiências pretendemos obter resultados que mimetizem os fenótipos da sobre-expressão do *hoxd13a* na linha *hsp70:hoxd13a*, confirmando o envolvimento da via de sinalização dos BMPs reguladas por *Hoxd13* nas transformações que levaram ao aparecimento dos membros nos tetrápodes.

As nossas análises serão também complementadas através de uma mais profunda caracterização da função dos genes que mostraram alterações com a sobre-expressão do *hoxd13a*. Assim, será por exemplo realizada uma revisão bibliográfica no sentido de inventariar os fenótipos em linhas de peixe-zebra transgênicas com mutações pontuais nestes genes, através da consulta da base de dados Zfin.org. O objetivo será avaliar se a sua perda de função, por exemplo dos genes *bmp2*, gera morfologias que, de alguma forma, possam contribuir para entender o seu contributo e o contributo do *master* *hoxd13* na evolução dos autopódios. Paralelamente poderão também ser usados inúmeros morfólino já disponíveis de forma a melhor caracterizar a função dos potenciais alvo do *Hoxd13*.

Os resultados obtidos para determinados genes, tais como o *sfrp1*, revelam a necessidade de repetir as análises em estádios mais avançados nos quais se efetiva o desenvolvimento do endoesqueleto apendicular. Isto prende-se com o facto de estes terem uma função associada à diferenciação dos dígitos nos tetrápodes e, por isso, poderem estar envolvidos em processos de desenvolvimento do endoesqueleto mais tardios no peixe-zebra. Relativamente a genes com padrões de expressão predominantemente proximais, como o *emx2*, serão melhoradas as dissecações de forma a não perder a informação sobre a sua expressão pela técnica de hibridação *in situ*. Isto são exemplos de como este trabalho foi também importante no sentido de gerar resultados preliminares essenciais para tomar decisões mais assertivas relativamente aos estádios a utilizar e à otimização dos procedimentos experimentais.

De uma forma geral, este trabalho abre uma série de novos caminhos no sentido de explorar a função do gene *Hoxd13* no desenvolvimento embrionário e também explorar o seu potencial como modulador da morfologia dos apêndices locomotores durante a evolução dos Vertebrados.

6. Referências bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, D., and Ho, R.K. (2008). Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: Implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Developmental biology* 322, 220-233.
- Al-Qattan, M.M. (2011). Type II familial synpolydactyly: report on two families with an emphasis on variations of expression. *European Journal of Human Genetics* 19, 112-114.
- Ali, S., Champagne, D.L., Spaink, H.P., and Richardson, M.K. (2011). Zebrafish Embryos and Larvae: A New Generation of Disease Models and Drug Screens. *Birth Defects Res C* 93, 115-133.
- Amemiya, C.T., Alföldi, J., Lee, A.P., Fan, S., Philippe, H., MacCallum, I., Braasch, I., Manousaki, T., Schneider, I., and Rohner, N. (2013). The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496, 311-316.
- Anderson, P.S., Friedman, M., Brazeau, M.D., and Rayfield, E.J. (2011). Initial radiation of jaws demonstrated stability despite faunal and environmental change. *Nature* 476, 206-209.
- Arteaga-Solis, E., Gayraud, B., Lee, S.Y., Shum, L., Sakai, L., and Ramirez, F. (2001). Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *The Journal of cell biology* 154, 275-282.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., and Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2, e216.
- Barlow, A.J., Bogardi, J.P., Ladher, R., and Francis-West, P.H. (1999). Expression of chick Barx-1 and its differential-regulation by FGF-8 and BMP signaling in the maxillary primordia. *Dev Dynam* 214, 291-302.
- Barman, R. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces, Cyprinidae), Vol 137 (Zoological Survey of India).
- Bhat, A. (2003). Diversity and composition of freshwater fishes in river systems of Central Western Ghats, India. *Environmental Biology of Fishes* 68, 25-38.
- Boisvert, C.A., Mark-Kurik, E., and Ahlberg, P.E. (2008). The pectoral fin of *Panderichthys* and the origin of digits. *Nature* 456, 636-638.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737-746.
- Brazeau, M.D., and Friedman, M. (2015). The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. *Nature* 520, 490-497.
- Brisson, N., Debeer, P., and Tylzanowski, P. (2014). Joining the Fingers: A HOXD13 Story. *Dev Dynam* 243, 37-48.
- Brisson, N., Tylzanowski, P., and Debeer, P. (2012). Limb skeletal malformations—What the HOX is going on? *European journal of medical genetics* 55, 1-7.
- Buckland, R.A., Collinson, J.M., Graham, E., Davidson, D.R., and Hill, R.E. (1998). Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev* 71, 143-150.
- Bueno, D., Skinner, J., Abud, H., and Heath, J.K. (1996). Spatial and Temporal Relationships Between Shh, Fgf4, and Fgf8 Gene Expression at Diverse Signalling Centers During Mouse Development. *Dm Dyn* 207, 291-299.

- Capdevila, J., Tsukui, T., Esteban, C.R., Zappavigna, V., and Belmonte, J.C.I. (1999). Control of Vertebrate Limb Outgrowth by the Proximal Factor Meis2 and Distal Antagonism of BMPs by Gremlin. *Molecular Cell* 4, 839-849.
- Cecchi, C., and Boncinelli, E. (2000). Emx homeogenes and mouse brain development. *Trends in neurosciences* 23, 347-352.
- Chim, C.S., Fung, T.K., Pang, R., Choi, C.L., and Liang, R. (2007). Epigenetic dysregulation of WNT signaling pathway in multiple myeloma. *Haematol-Hematol J* 92, 114-114.
- Choi, K.-S., Lee, C., Maatouk, D.M., and Harfe, B.D. (2012). Bmp2, Bmp4 and Bmp7 Are Co-Required in the Mouse AER for Normal Digit Patterning but Not Limb Outgrowth. *Plos One* 7, e37826.
- Clack, J.A. (2012). *Gaining ground: the origin and evolution of tetrapods* (Indiana University Press).
- Daeschler, E.B., Shubin, N.H., and Jenkins, F.A., Jr. (2006). A Devonian tetrapod-like fish and the evolution of the tetrapod body plan. *Nature* 440, 757-763.
- Dahm, R., and Geisler, R. (2006). Learning from Small Fry: The Zebrafish as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. *Mar Biotechnol* 8, 329-345.
- Dai, M., Wang, Y., Fang, L., Irwin, D.M., Zhu, T., Zhang, J., Zhang, S., and Wang, Z. (2014). Differential Expression of Meis2, Mab21l2 and Tbx3 during Limb Development Associated with Diversification of Limb Morphology in Mammals. *Plos One* 9, e106100.
- Dauwerse, J.G., de Vries, B.B.A., Wouters, C.H., Bakker, E., Rappold, G., Mortier, G.R., Breuning, M.H., and Peters, D.J.M. (2007). A t(4;6)(q12;p23) translocation disrupts a membrane-associated O-acetyl transferase gene (MBOAT1) in a patient with a novel brachydactyly-syndactyly syndrome. *European journal of human genetics: EJHG* 15, 743-751.
- Davis, M.C. (2013). The deep homology of the autopod: insights from hox gene regulation. *Integrative and comparative biology, ict029*.
- Davis, M.C., Dahn, R.D., and Shubin, N.H. (2007). An autopodial-like pattern of Hox expression in the fins of a basal actinopterygian fish. *Nature* 447, 473-476.
- Delvecchio, C., Tiefenbach, J., and Krause, H.M. (2011). The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay and drug development technologies* 9, 354-361.
- Duboule, D., and Dolle, P. (1989). The Structural and Functional-Organization of the Murine Hox Gene Family Resembles That of Drosophila Homeotic Genes. *Embo J* 8, 1497-1505.
- Dutta, S. (1993). Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch) inhabiting Gadigarh Stream, Jammu. *Journal of Freshwater Biology* 5, 165-168.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., and Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21-40.
- Esteve, P., Sandonis, A., Ibañez, C., Shimono, A., Guerrero, I., and Bovolenta, P. (2011). Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/ β -catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* 138, 4179-4184.
- Fernandez-Teran, M., Piedra, M.E., Kathiriya, I.S., Srivastava, D., Rodriguez-Rey, J.C., and Ros, M.A. (2000). Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* 127, 2133-2142.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531-1545.
-

- Freitas, R., Gomez-Marin, C., Wilson, J.M., Casares, F., and Gomez-Skameta, J.L. (2012). Hoxd13 contribution to the evolution of vertebrate appendages. *Developmental cell* 23, 1219-1229.
- Freitas, R., Zhang, G., and Cohn, M.J. (2006). Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates. *Nature* 442, 1033-1037.
- Freitas, R., Zhang, G.J., and Cohn, M.J. (2007). Biphasic Hoxd Gene Expression in Shark Paired Fins Reveals an Ancient Origin of the Distal Limb Domain. *Plos One* 2.
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., and Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet* 29, 611-620.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*, 6th edition edn (Sunderland (MA): Sinauer Associates).
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology*, 6th edition, 6th edn (Sinauer).
- Grandel, H., and Schulte-Merker, S. (1998a). The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Develop* 79, 99-120.
- Grandel, H., and Schulte-Merker, S. (1998b). The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mechanisms of development* 79, 99-120.
- Guyon, J.R., Steffen, L.S., Howell, M.H., Pusack, T.J., Lawrence, C., and Kunkel, L.M. (2007). Modeling human muscle disease in zebrafish. *Bba-Mol Basis Dis* 1772, 205-215.
- Hammond, K.L., Hill, R.E., Whitfield, T.T., and Currie, P.D. (2002). Isolation of three zebrafish dachshund homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech Develop* 112, 183-189.
- Healy, C., Uwanogho, D., and Sharpe, P.T. (1999). Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* 215, 69-78.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research* 6, 986-994.
- Heude, E., Shaikho, S., and Ekker, M. (2014). The *dlx5a/dlx6a* genes play essential roles in the early development of zebrafish median fin and pectoral structures. *Plos One* 9, e98505.
- Hill, A., Howard, C., and Cossins, A. (2002). Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: zebrafish larvae. *Journal of microscopy* 206, 179-181.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences* 86, 6-19.
- Horner, A., Shum, L., Ayres, J., Nonaka, K., and Nuckolls, G. (2002). Fibroblast growth factor signaling regulates Dach1 expression during skeletal development. *Dev Dynam* 225, 35-45.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., *et al.* (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.
- Hueber, S.D., Weiller, G.F., Djordjevic, M.A., and Frickey, T. (2010). Improving Hox protein classification across the major model organisms. *PloS one* 5, e10820.
- Johanson, Z., Joss, J., Boisvert, C.A., Ericsson, R., Sutija, M., and Ahlberg, P.E. (2007). Fish fingers: digit homologues in sarcopterygian fish fins. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* 308, 757-768.
- Joshi, M., and Deshpande, J. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research* 2, 81-97.
-

- Kan, S.h., Johnson, D., Giele, H., and Wilkie, A.O. (2003). An acceptor splice site mutation in HOXD13 results in variable hand, but consistent foot malformations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 121, 69-74.
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8 Suppl 1, S7.
- Kida, Y., Maeda, Y., Shiraishi, T., Suzuki, T., and Ogura, T. (2004). Chick Dach1 interacts with the Smad complex and Sin3a to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development* 131, 4179-4187.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. *Dev Dynam* 203, 253-310.
- Kmita, M., Fraudeau, N., Heralut, Y., and Duboule, D. (2002). Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature* 420, 145-150.
- Krone, P.H., Evans, T.G., and Blechinger, S.R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 14, 267-274.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., *et al.* (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95-125.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Lele, Z., and Krone, P.H. (1996). The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 14, 57-72.
- Leong, I.U.S., Lan, C.-C., Skinner, J.R., Shelling, A.N., and Love, D.R. (2012). In Vivo Testing of MicroRNA-Mediated Gene Knockdown in Zebrafish. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 7.
- Li, C.W., and Ge, W. (2011). Spatiotemporal expression of bone morphogenetic protein family ligands and receptors in the zebrafish ovary: a potential paracrine-signaling mechanism for oocyte-follicle cell communication. *Biology of reproduction* 85, 977-986.
- Liu, W., and Saint, D.A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical biochemistry* 302, 52-59.
- Logan, J.M., Edwards, K.J., and Saunders, N.A. (2009). *Real-time PCR: current technology and applications* (Horizon Scientific Press).
- Lopez-Olmeda, J.F., and Sanchez-Vazquez, F.J. (2011). Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J Therm Biol* 36, 91-104.
- Mariani, F.V., and Martin, G.R. (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* 423, 319-325.
- Marques, C., Fernández, I., Viegas, M., Cox, C., Martel, P., Rosa, J., Cancela, M.L., and Laizé, V. (2015). Comparative analysis of zebrafish bone morphogenetic proteins 2, 4 and 16: molecular and evolutionary perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-17.
- Martínez-Barberá, J.P., Toresson, H., Da Rocha, S., and Krauss, S. (1997). Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4. *Gene* 198, 53-59.
- McClure, M., McIntyre, P., and McCune, A. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 69, 553-570.
-

- Meeker, N.D., and Trede, N.S. (2008). Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 745-757.
- Menon, A.G.K. (1999). Check List--fresh Water Fishes of India (Survey).
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, C., and Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402, 425-429.
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M.E., Martinez-A, C., Ros, M.A., and Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127, 3961-3970.
- Metscher, B.D., and Ahlberg, P.E. (1999). Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental biology* 210, 1-14.
- Meyer, A., and Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27, 937-945.
- Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., de Laat, W., Spitz, F., and Duboule, D. (2011). A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147, 1132-1145.
- Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I.O., and Buchberg, A.M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol* 15, 5434-5443.
- Moulton, J.D., and Yan, Y.L. (2008). Using Morpholinos to control gene expression. *Current protocols in molecular biology*, 26.28. 21-26.28. 29.
- Nakamura, T., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1996). Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes. *Oncogene* 13, 2235-2242.
- Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26, 216-220.
- Nelson, C.E., Morgan, B.A., Burke, A.C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L.C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L.F., and Tabin, C. (1996). Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* 122, 1449-1466.
- Neyt, C., Jagla, K., Thisse, C., Thisse, B., Haines, L., and Currie, P.D. (2000). Evolutionary origins of vertebrate appendicular muscle. *Nature* 408, 82-86.
- Nichols, J.T., Pan, L., Moens, C.B., and Kimmel, C.B. (2013). barx1 represses joints and promotes cartilage in the craniofacial skeleton. *Development (Cambridge, England)* 140, 2765-2775.
- Nistala, H., Lee-Arteaga, S., Smaldone, S., Sidiliano, G., Carta, L., Ono, R.N., Sengle, G., Arteaga-Solis, E., Levasseur, R., Ducey, P., *et al.* (2010). Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- β and BMP bioavailability during bone formation. *The Journal of Cell Biology* 190, 1107-1121.
- Nitzki, F., Herbig, E. (2013). "Ultrapure Water Drives RNA Technologies".
- Ogino, T., Ishigaki, D., Satake, H., and Iba, K. (2012). Free fat graft for congenital hand differences. *Clinics in orthopedic surgery* 4, 45-57.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2, reviews3005.3001-reviews3005.3012.
- Osterwalder, M., Speziale, D., Shoukry, M., Mohan, R., Ivanek, R., Kohler, M., Beisel, C., Wen, X.H., Scales, S.J., Christoffels, V.M., *et al.* (2014). HAND2 Targets Define a Network of Transcriptional
-

- Regulators that Compartmentalize the Early Limb Bud Mesenchyme. *Developmental cell* 31, 345-357.
- Parichy, D.M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity (Edinb)* 97, 200-210.
- Pellegrini, M., Pantano, S., Fumi, M.P., Lucchini, F., and Forabosco, A. (2001). Agenesis of the Scapula in Emx2 Homozygous Mutants. *Developmental biology* 232, 149-156.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29.
- Pizette, S., and Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126, 883-894.
- Pritchard, V.L., Lawrence, J., Butlin, R.K., and Krause, J. (2001). Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour* 62, 1085-1088.
- Pröls, F., Eehalt, F., Rodriguez-Niedenführ, M., He, L., Huang, R., and Christ, B. (2004). The role of Emx2 during scapula formation. *Developmental biology* 275, 315-324.
- Rahman, A.A. (1989). *Freshwater fishes of Bangladesh* (Zoological Soc. of Bangladesh).
- Ramirez, F., Sakai, L.Y., Dietz, H.C., and Rifkin, D.B. (2004). Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics* 19, 151-154.
- Robinson, P.N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Bérout, G., Booms, P., De Paepe, A., Dietz, H.C., Guo, G., Handford, P.A., and Judge, D.P. (2006). The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of medical genetics* 43, 769-787.
- Salsi, V., Vigano, M.A., Cocchiarella, F., Mantovani, R., and Zappavigna, V. (2008). Hoxd13 binds in vivo and regulates the expression of genes acting in key pathways for early limb and skeletal patterning. *Developmental biology* 317, 497-507.
- Salzberg, A., Elias, S., Nachaliel, N., Bonstein, L., Henig, C., and Frank, D. (1999). A Meis family protein caudalizes neural cell fates in *Xenopus*. *Mech Dev* 80, 3-13.
- Sanchez-Guardado, L.O., Irimia, M., Sanchez-Arrones, L., Burguera, D., Rodriguez-Gallardo, L., Garcia-Fernandez, J., Puelles, L., Ferran, J.L., and Hidalgo-Sanchez, M. (2011). Distinct and redundant expression and transcriptional diversity of MEIS gene paralogs during chicken development. *Dev Dyn* 240, 1475-1492.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., and Shimono, A. (2006). Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989-999.
- Schneider, I., and Shubin, N.H. (2013). The origin of the tetrapod limb: from expeditions to enhancers. *Trends Genet* 29, 419-426.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., and Itoh, N. (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature genetics* 21, 138-141.
- Shawi, M., and Serluca, F.C. (2008). Identification of a BMP7 homolog in zebrafish expressed in developing organ systems. *Gene Expression Patterns* 8, 369-375.
- Shubin, N., Tabin, C., and Carroll, S. (2000). Fossils, Genes and the Evolution of Animal Limbs. In *Shaking the Tree Readings from Nature in the History of Life*, H. Gee, ed. (Chicago: University of Chicago Press).
- Shubin, N., Tabin, C., and Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457, 818-823.
-

- Sivasubbu, S., Sachidanandan, C., and Scaria, V. (2013). Time for the zebrafish ENCODE. *Journal of genetics* 92, 695-701.
- Smith, D. (1993). Restriction Endonuclease Digestion of DNA. In *Transgenesis Techniques*, D. Murphy, and D. Carter, eds. (Humana Press), pp. 427-431.
- Sordino, P., and Duboule, D. (1996). A molecular approach to the evolution of vertebrate paired appendages. *Trends Ecol Evol* 11, 114-119.
- Sordino, P., Vanderhoeven, F., and Duboule, D. (1995). Hox Gene-Expression in Teleost Fins and the Origin of Vertebrate Digits. *Nature* 375, 678-681.
- Spence, R., Fatema, M., Ellis, S., Ahmed, Z., and Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 71, 304-309.
- Spence, R., Fatema, M., Reichard, M., Huq, K., Wahab, M., Ahmed, Z., and Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 69, 1435-1448.
- Sperber, S.M., and Dawid, I.B. (2008). *barx1* is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches. *Developmental biology* 321, 101-110.
- Spitsbergen, J.M., and Kent, M.L. (2003). The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations. *Toxicologic pathology* 31, 62-87.
- Sumanas, S., and Lin, S. (2004). Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: TARGETS* 3, 89-96.
- Suzuki, M., and Kuroiwa, A. (2002). Transition of Hox expression during limb cartilage development. *Mech Develop* 118, 241-245.
- Talwar, P.K. (1991). *Inland fishes of India and adjacent countries, Vol 2* (CRC Press).
- Tamura, M., Hosoya, M., Fujita, M., Iida, T., Amano, T., Maeno, A., Kataoka, T., Otsuka, T., Tanaka, S., and Tomizawa, S. (2013). Overdosage of Hand2 causes limb and heart defects in the human chromosomal disorder partial trisomy distal 4q. *Human molecular genetics* 22, 2471-2481.
- Temtamy, S.A., and Aglan, M.S. (2008). Brachydactyly. *Orphanet journal of rare diseases* 3, 15.
- Terry, K., Magan, H., Baranski, M., and Burrus, L.W. (2000). *Sfrp-1* and *sfrp-2* are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. *Mech Develop* 97, 177-182.
- van Heyningen, V. (1997). Model organisms illuminate human genetics and disease. *Molecular medicine* 3, 231-237.
- Veeck, J., Niederacher, D., An, H., Klopocki, E., Wiesmann, F., Betz, B., Galm, O., Camara, O., Durst, M., Kristiansen, G., *et al.* (2006). Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25, 3479-3488.
- Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., *et al.* (2006). Ancient noncoding elements conserved in the human genome. *Science* 314, 1892.
- Wager, K., Mahmood, F., and Russell, C. (2014). Modelling inborn errors of metabolism in zebrafish. *J Inherit Metab Dis* 37, 483-495.
- Wagner, G.R., and Chiu, C.H. (2001). The tetrapod limb: A hypothesis on its origin. *J Exp Zool* 291, 226-240.
-

- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., Hernandez, R.E., and Moens, C.B. (2001). Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* *128*, 4139-4151.
- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2006). Ca²⁺ signaling and early embryonic patterning during the Blastula and Gastrula Periods of Zebrafish and Xenopus development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1763*, 1192-1208.
- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2007). Ca²⁺ signalling and early embryonic patterning during zebrafish development. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *34*, 897-904.
- Wixon, J. (2000). Featured organism: Danio rerio, the zebrafish. *Yeast* *17*, 225-231.
- Wu, K., Yang, Y., Wang, C., Davoli, M.A., D'Amico, M., Li, A., Cveklova, K., Kozmik, Z., Lisanti, M.P., and Russell, R.G. (2003). DACH1 inhibits transforming growth factor- β signaling through binding Smad4. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 51673-51684.
- Yano, T., Abe, G., Yokoyama, H., Kawakami, K., and Tamura, K. (2012). Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development. *Development* *139*, 2916-2925.
- Yelon, D., Ticho, B., Halpern, M.E., Ruvinsky, I., Ho, R.K., Silver, L.M., and Stainier, D. (2000). The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development. *Development* *127*, 2573-2582.
- Yoshida, N., Yoshida, K., Ohkura, N., Takei, E., Edanami, N., Oda, Y., Hosoya, A., Nakamura, H., and Okiji, T. (2015). Correlation between Fibrillin-1 Degradation and mRNA Downregulation and Myofibroblast Differentiation in Cultured Human Dental Pulp Tissue. *J Histochem Cytochem* *63*, 438-448.
- Zákány, J., and Duboule, D. (1996). Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the HoxD complex.
- Zeller, R. (2010). The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. *Curr Opin Genet Dev* *20*, 384-390.
- Zhang, J., Wagh, P., Guay, D., Sanchez-Pulido, L., Padhi, B.K., Korzh, V., Andrade-Navarro, M.A., and Akimenko, M.-A. (2010). Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature* *466*, 234-237.
- Zhao, X., Sun, M., Zhao, J., Leyva, J A., Zhu, H., Yang, W., Zeng, X., Ao, Y., Liu, Q., Liu, G., *et al.* (2007). Mutations in HOXD13 Underlie Syndactyly Type V and a Novel Brachydactyly-Syndactyly Syndrome. *American journal of human genetics* *80*, 361-371.
- Zhu, M., Yu, X., Ahlberg, P.E., Choo, B., Lu, J., Qiao, T., Qu, Q., Zhao, W., Jia, L., Blom, H., *et al.* (2013). A Silurian placoderm with osteichthyan-like marginal jaw bones. *Nature* *502*, 188-193.
-

7. Anexos

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
and1	CTTGAGGAAGCCCCAAAGAAACTG	CATCTTGTAGGAGCGACGTGACT
barx1	CTGGCAGAGTCCTTAGGCTTGAGT	TCACTGGTGGGGATGGAGTTCTTTT
bmp2a	GCCAGCAGAGCCAACACTATC	GATGGAGGTCAGGTTGAAGAGGAA
bmp2b	CGCCCGAGGAGCACTATG	CAGGAATGGAGGTAAGGTTGAAGAA
bmp4	CACCGTGAGAGGATTCCAT	GTCTGAGAAGGCGTCACTATT
bmp7a	CCACAGAGGGTGCCAGCATAGA	GATCCAGTCCTGCCATCCCAGAT
bmp7b	GACCTCCGCATCAGCATCTACC	AAACCAGCCAGCCCTCTTCT
dacha	AGAGTCATCTCCTGGCTAAC	GGTGGTTCATCTGGTTCATT
dachb	CACAAGACTCACAAATGGCTCCGAAT	TGAAGCAGGTGATGAATGTTTCTCTCT
dachc	CCAGAGTGTCCTCCAGAATG	GACCTGCGACCGTCATCCAA
eef1a1l1	CTAGCGGTACTACTCTTCTTGATG	CCCACAGGTACAGTTCCAATAC
emx2	CGCACAGTCCGCACCCTCTT	TCCGCACCGACGACGTAATG
fbn1	GGTCTGTCTTCACTGGTCCTC	GTGTTGCGTTGGCGTCTC
fgf8a	TTGCGTTTTGCTACTATGCTCAGGTA	TTGCCACTGGTTCCGGCTGTA
fgf10a	TGGTCTACGGGGCGAGGGATTT	CCGAGGCATAGGTGTTGTACCTGTTCT
fgf24	GCAGGAATCTCACCAGAGTTCT	ATCGTCTCCATTGGCGTTAATCTT
hand2	GCCTTTCGAGAAGCTCAGGGAAT	CCTTCTTTCGCCTTCTTCTTTGG
hoxd13a	CGGAGCCCGCATATCTGGAA	CGATCCGCCGTCTGTTCTCC
nog3	GACCGAACTCAGAGCCATTCT	CCATTGGGACGCTGTTTCAT
meis1b	CAACCGAGCAGTAAGTCAAG	ATTCCCATCCCCTCATAGG
meis2a	CCCATCCCAATGTCATGCCACCAG	AAGACCAGAGCCAGGAGAGGAAACAGA
meis2b	CAGTGAAGTAGGAGATGGCTTGGATA	GGTGCCTGAGATGTTGGAAGA
rpl13a	CTCGGTGCTCTTCCGCTATTGTG	AAGATTCTGCTGGGGCTCTGAAG
sfrp1a	CCAATGATACTTCCACCTCCGA	CACCTTGCATCCATGTTCTC
shha	AGGATGAGGAGAACACGGGAG	TCTGTCACACGCAGCTTAACC

Tabela 13: Lista dos *primers* utilizados na RT-qPCR, a temperatura de *melting* de 62°C.

<i>Sistema</i>	<i>Casais</i>	<i>Postura</i>	<i>Hora</i>	<i>Nº de ovos</i>	<i>Nº de ovos com BH</i>	<i>Dia</i>
<i>S1</i>	♀ Pearl x ♂ ZF	x	x	x	x	16/03/2015
<i>S2</i>	♀ ZF x ♂ ZF def.	√	10:10	147	115	
<i>S3</i>	♀ Pearl x ♂ Pearl	√	10:10	83	59	
<i>S4</i>	♀ ZF big x ♂ Pearl	√	10:15	55	41	
<i>S5</i>	♀ ZF small x ♂ ZF fin def.	x	x	x	x	
<i>WT 1</i>	♀ ZF x ♂ ZF	√	10:20	52		
<i>WT 1</i>	♀ Pearl x ♂ Pearl	√	10:10	50		
<i>WT2</i>	♀ ZF x ♂ ZF	x	x	x		
<i>WT 2</i>	♀ Pearl x ♂ Pearl	x	x	x		
<i>Selected 1</i>	♀ ZF fat small x ♂ ZF coluna	x	x	x	x	
<i>Selected 2</i>	♀ ZF fat middle fin x ♂ ZF	x	x	x	x	
<i>Selected 3</i>	♀ ZF fat x ♂ ZF big	√	10:10	35	21	
<i>Quarentena</i>						
<i>C2</i>	♀ RR x ♂ RR (big)	√	10:20	145	100	
<i>C3</i>	♀ RR x ♂ RR (small)	√	10:10	181	105	

Tabela 14: Exemplo das tabelas utilizadas com os dados morfológicos e de reprodução semanal dos casais de peixe-zebra. A primeira coluna indica a localização dos peixes no Biotério de peixe-zebra do IBMC. A segunda coluna indica os acasalamentos realizados semanalmente. O símbolo ♀ é utilizado para as fêmeas e o símbolo ♂ é utilizado para os machos. Os indicadores ZF, Pearl e RR referem-se a diferentes tipos de padrões de pigmentação. São também usadas outras identificações para distinguir os organismos relativas a tamanho (ex. *small*) dimensão corporal (ex. *fat*) ou anomalias morfológicas (ex. *axial skeleton*).

Genes	Casal	GOI	HKG	Δ Ct	Δ Ct-R Δ Ct	Expressão	\pm SD	T-Test (P<0,05)
<i>hoxd13a</i>	wt	25,4863209	17,8868106	7,60	0,00	1,0000		
	c3	20,6814342	18,2531046	2,42832962	-5,17	36,0313	0,6158	0,0003
<i>and1</i>	wt	21,9536873	17,8868106	4,06687673	0,00	1,0000		
	c3	23,5836433	18,2531046	5,33053875	1,26	0,4165	0,0587	0,0101
<i>bmp2a</i>	wt	26,2464968	18,0584437	8,19	0,00	1,0000		
	c3	27,8482642	18,6832636	9,16500064	0,98	0,5081	0,0626	0,0161
<i>bmp2b</i>	wt	27,0561842	18,0584437	8,99774054	0,00	1,0000		
	c3	27,543625	18,6832636	8,86036145	-0,14	1,0999	0,03755	0,1157
<i>bmp4</i>	wt	24,7783235	17,8868106	6,89	0,00	1,0000		
	c3	24,6100042	18,2531046	6,35689966	-0,53	1,4486	0,0224	0,0025
<i>bmp7a</i>	wt	28,93276	17,5710493	11,3617107	0,00	1,0000		
	c3	29,6909222	18,4986139	11,1923082	-0,17	1,1246	0,003	0,0006
<i>bmp7b</i>	wt	25,3033578	17,5710493	7,73230848	0,00	1,0000		
	c3	26,0147032	18,4986139	7,51608927	-0,22	1,1617	0,04695	0,0742
<i>fgf8a</i>	wt	27,5825229	17,8868106	9,69571231	0,00	1,0000		
	c3	29,0845448	18,2531046	10,8314402	1,14	0,4551	0,01	0,0003
<i>fgf10a</i>	wt	25,8498116	18,0584437	7,79136789	0,00	1,0000		
	c3	26,2180309	18,6832636	7,53476731	-0,26	1,1947	0,01355	0,0048
<i>fgf24</i>	wt	25,3235507	17,8868106	7,43674005	0,00	1,0000		
	c3	25,7516194	18,2531046	7,49851488	0,06	0,9581	0,0067	0,0246
<i>shha</i>	wt	26,5668319	17,8868106	8,68002133	0,00	1,0000		
	c3	26,626733	18,2531046	8,37362845	-0,31	1,2366	0,026	0,0118
<i>dacha</i>	wt	25,4138622	18,0584437	7,35541855	0,00	1,0000		
	c3	25,1672906	18,6832636	6,48402702	-0,87	1,8294	0,04105	0,0024
<i>dachb</i>	wt	25,9180171	18,2606519	7,65736518	0,00	1,0000		
	c3	26,882364	18,9365284	7,94583556	0,29	0,8188	0,09845	0,2168
<i>dachc</i>	wt	24,422148	17,8868106	6,53533743	0,00	1,0000		
	c3	25,0309267	18,2531046	6,77782212	0,24	0,8453	0,0233	0,022
<i>meis1b</i>	wt	22,6857374	18,0584437	4,62729365	0,00	1,0000		
	c3	22,789035	18,6832636	4,10577136	-0,52	1,4355	0,1906	0,1431
<i>meis2b</i>	wt	23,1178124	17,8868106	5,23100177	0,00	1,0000		
	c3	22,7180279	18,2531046	4,46492334	-0,77	1,7006	0,1494	0,0418
<i>barx1</i>	wt	22,0582407	17,8868106	4,17143009	0,00	1,0000		
	c3	23,0019839	18,2531046	4,74887936	0,58	0,6701	0,01165	0,0012
<i>sfrp1a</i>	wt	21,7205612	17,8868106	3,83375057	0,00	1,0000		
	c3	22,4452637	18,2531046	4,19215913	0,36	0,7800	0,0886	0,136
<i>emx2</i>	wt	25,9393783	17,8868106	8,05256767	0,00	1,0000		
	c3	26,9425332	18,2531046	8,68942868	0,64	0,6431	0,05695	0,0249
<i>fbn1</i>	wt	27,1290788	17,8868106	9,24226818	0,00	1,0000		
	c3	26,1133805	18,2531046	7,86027597	-1,38	2,6063	0,1202	0,0055
<i>hand2</i>	wt	22,1006656	17,8868106	4,21385503	0,00	1,0000		
	c3	23,2697632	18,2531046	5,01665862	0,80	0,5732	0,00445	0,0001

Tabela 15: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 56hpf

Genes	Casal	GOI	HKG	Δ Ct	S Δ Ct-R Δ Ct	Expressão	\pm SD	T-Test (P<0,05)
<i>hoxd13a</i>	wt	28,322637	19,4612413	8,86	1,26	0,4170		
	c3	22,6574316	20,0596131	2,59781853	-5,00	32,0375	0,3885	< 0,0001
<i>and1</i>	wt	23,3421613	19,4612413	3,88091995	-0,19	1,1376		
	c3	25,7227187	20,0596131	5,66310557	1,60	0,3307	0,0088	0,0002
<i>bmp2a</i>	wt	27,6724756	19,4612413	8,21	0,02	0,9841		
	c3	28,6499966	20,0596131	8,59038349	0,40	0,7566	0,01985	0,0073
<i>bmp2b</i>	wt	28,8884452	19,4612413	9,42720381	0,43	0,7425		
	c3	28,646972	20,0596131	8,58735889	-0,41	1,3290	0,0105	0,0002
<i>bmp4</i>	wt	27,3582608	19,4612413	7,90	1,01	0,4981		
	c3	28,518376	20,0596131	8,45876292	1,57	0,3375	0,044	0,0183
<i>bmp7a</i>	wt	30,2507842	19,4612413	10,7895428	-0,57	1,4868		
	c3	30,8221769	20,0596131	10,7625638	-0,60	1,5148	0,0537	0,7418
<i>bmp7b</i>	wt	28,0815783	19,4612413	8,62033698	0,89	0,5404		
	c3	27,9619162	20,0596131	7,90230309	0,17	0,8888	0,0208	0,001
<i>fgf8a</i>	wt	29,6137871	19,4612413	10,1525458	0,46	0,7286		
	c3	30,6392038	20,0596131	10,5795906	0,88	0,5419	0,01635	0,0041
<i>fgf10a</i>	wt	27,116539	19,4612413	7,65529766	-0,14	1,0989		
	c3	27,9020057	20,0596131	7,84239261	0,05	0,9653	0,0164	0,0177
<i>fgf24</i>	wt	28,2155544	19,4612413	8,75431307	1,32	0,4012		
	c3	28,727524	20,0596131	8,66791086	1,23	0,4260	0,04615	0,3069
<i>shha</i>	wt	28,8968289	19,4612413	9,43558753	0,76	0,5923		
	c3	30,3676153	20,0596131	10,3080022	1,63	0,3235	0,0328	0,0052
<i>dacha</i>	wt	27,0191172	19,8152649	7,20385233	-0,15	1,1108		
	c3	27,3247472	19,0901459	8,23460132	0,88	0,5437	0,0275	0,0029
<i>dachb</i>	wt	26,1175319	19,8152649	6,30226702	-1,36	2,5581		
	c3	27,291225	19,0901459	8,20107916	0,54	0,6860	0,0237	0,0011
<i>dachc</i>	wt	26,5174025	19,8152649	6,70213766	0,17	0,8908		
	c3	26,6753612	19,0901459	7,58521529	1,05	0,4830	5,00E-05	< 0,0001
<i>meis1b</i>	wt	25,0835867	19,8152649	5,26832184	0,64	0,6413		
	c3	25,816161	19,0901459	6,72601513	2,10	0,2335	0,00625	< 0,0001
<i>meis2b</i>	wt	23,1699402	19,8152649	3,35467536	-1,88	3,6714		
	c3	23,5594884	19,0901459	4,46934251	-0,76	1,6954	0,00595	0,0001
<i>barx1</i>	wt	23,7833962	19,8152649	3,9681313	-0,20	1,1513		
	c3	25,1351218	19,0901459	6,04497589	1,87	0,2729	0,01005	0,0002
<i>sfrp1a</i>	wt	23,3499099	19,8152649	3,53464506	-0,30	1,2304		
	c3	24,7490089	19,0901459	5,65886302	1,83	0,2822	0,01875	0,0006
<i>emx2</i>	wt	27,7215866	19,8152649	7,90632173	-0,15	1,1067		
	c3	28,7859813	19,0901459	9,69583548	1,64	0,3201	0,0031	< 0,0001
<i>fbn1</i>	wt	25,2642263	19,8152649	5,44896139	-3,79	13,8643		
	c3	25,4044379	19,0901459	6,31429207	-2,93	7,6104	0,0225	0,0025
<i>hand2</i>	wt	23,397466	19,8152649	3,58220109	-0,63	1,5493		
	c3	24,4630678	19,0901459	5,3729219	1,16	0,4478	0,00225	< 0,0001

Tabela 16: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 85 hpf

Genes	Casal	GOI	HKG	Δ Ct	S Δ Ct-R Δ Ct	Expressão	\pm SD	T-Test (P<0,05)
<i>hoxd13a</i>	wt	27,686105	17,2069966	10,48	2,88	0,1359		
	c3	21,0190534	17,2075668	3,81148661	-3,79	13,8137	2,532	0,0006
<i>and1</i>	wt	22,2784772	17,2069966	5,07148066	1,00	0,4984		
	c3	23,2358645	17,2075668	6,02829773	1,96	0,2568	0,00815	0,0003
<i>bmp2a</i>	wt	26,5420424	18,2217099	8,32	0,13	0,9124		
	c3	27,0615141	17,8780226	9,18349148	1,00	0,5016	0,00495	0,0001
<i>bmp2b</i>	wt	26,8510157	18,2217099	8,62930574	-0,37	1,2910		
	c3	27,4012827	17,8780226	9,52326011	0,53	0,6947	0,00115	< 0,0001
<i>bmp4</i>	wt	26,2164866	18,2217099	7,99	1,10	0,4655		
	c3	25,7393172	17,8780226	7,86129462	0,97	0,5106	0,0008	< 0,0001
<i>bmp7a</i>	wt	29,9871651	18,2217099	11,7654551	0,40	0,7559		
	c3	30,9325273	17,8780226	13,0545047	1,69	0,3093	0,0176	0,0009
<i>bmp7b</i>	wt	26,1918045	18,2217099	7,97009454	0,24	0,8480		
	c3	25,5547039	17,8780226	7,6766813	-0,06	1,0393	0,05165	0,0482
<i>fgf8a</i>	wt	27,6466286	18,2217099	9,42491864	-0,27	1,2065		
	c3	28,6205921	17,8780226	10,7425694	1,05	0,4840	0,02755	0,0021
<i>fgf10a</i>	wt	27,0670151	18,2217099	8,84530514	1,05	0,4817		
	c3	26,4085584	17,8780226	8,53053574	0,74	0,5991	0,0217	0,0078
<i>fgf24</i>	wt	27,0610785	18,2217099	8,83936859	1,40	0,3782		
	c3	27,1729978	17,8780226	9,29497516	1,86	0,2758	0,01515	0,0031
<i>shha</i>	wt	27,3410906	18,2217099	9,11938066	0,44	0,7375		
	c3	28,2391797	17,8780226	10,3611571	1,68	0,3118	0,0064	0,0001
<i>dacha</i>	wt	25,4668247	17,4138678	8,05295685	0,70	0,6166		
	c3	26,0510601	17,2905305	8,7605296	1,41	0,3776	0,00315	< 0,0001
<i>dachb</i>	wt	25,1322293	17,4138678	7,71836147	0,06	0,9586		
	c3	25,7977678	17,2905305	8,50723724	0,85	0,5548	0,01675	0,0016
<i>dachc</i>	wt	24,6356992	17,4138678	7,22183134	0,69	0,6214		
	c3	24,4289527	17,2905305	7,13842217	0,60	0,6583	0,0009	0,0002
<i>meis1b</i>	wt	22,6429894	18,2217099	4,42127947	-0,21	1,1535		
	c3	23,1870399	17,8780226	5,30901727	0,68	0,6234	0,028	0,0037
<i>meis2b</i>	wt	22,6109316	17,4138678	5,19706373	-0,03	1,0238		
	c3	22,8367909	17,2905305	5,54626034	0,32	0,8037	0,0257	0,014
<i>barx1</i>	wt	24,6173014	17,4138678	7,20343353	3,03	0,1223		
	c3	25,2029676	17,2905305	7,91243706	3,74	0,0748	0,00195	< 0,0001
<i>sfrp1a</i>	wt	21,7086432	17,4138678	4,29477537	0,46	0,7265		
	c3	22,5449038	17,2905305	5,25437325	1,42	0,3736	0,0139	0,0008
<i>emx2</i>	wt	25,927052	18,2217099	7,70534203	-0,35	1,2721		
	c3	27,7757714	17,8780226	9,89774876	1,85	0,2783	0,03225	0,0017
<i>fbn1</i>	wt	24,5389628	17,4138678	7,12509499	-2,12	4,3384		
	c3	24,6718022	17,2905305	7,38127163	-1,86	3,6326	0,03325	0,0396
<i>hand2</i>	wt	24,6712617	18,2217099	6,44955176	2,24	0,2123		
	c3	24,1685025	17,8780226	6,29047989	2,08	0,2371	0,0315	0,0654

Tabela 17: Dados de RT-qPCR realizados em primórdios de barbatanas de peixe-zebra a 115hpf

