

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Análise do papel das V-ATPases na regeneração da barbatana
caudal de peixe-zebra**

Ana Rita Encarnação Aires

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Análise do papel das V-ATPases na regeneração da barbatana
caudal de peixe-zebra**

Ana Rita Encarnação Aires

**Dissertação orientada por:
Doutora Ana Catarina Caetano Certal Afonso
Professora Doutora Sólveig Thornsteinsdóttir**

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2009

Agradecimentos

Esta é a parte em que eu agradeço àqueles que, de alguma maneira, contribuíram para este pequeno calhamaço de conhecimento.

Ao Joaquín: obrigada, chefinho, por me teres recebido como uma Organogénica durante um ano fantástico e cheio de boa disposição. E por teres formado o grupo mais porreiro do IGC.

À Catarina, a minha orientadora e *second in command*: por me aturar, mesmo sendo eu um Ser um bocadinho desastrado por natureza. E por me mostrar como se faz Ciência. Fico-te a dever umas electroporações, sim senhora!

Aos restantes Organogénicos, tanto recentes como mais antigos: à Raquel, poço de sapiência de bancada e poço de sapiência no fabrico de outras soluções para uso no laboratório (cof, cof). À Joana, a nossa bióloga marinha disfarçada, pela enorme ajuda nas *in situs* e em tudo o resto. E aos caloiritos: Rita (II), Diana e Fernando. Para o ano estão cá vocês e eu vou ver!

Aos vizinhos do lado, especialmente à Isabel, ao Arnon e à Vanessa. Por terem feito com que o tempo no laboratório tenha sido tão bem passado.

Ao grupo de auto-ajuda, perdão, de estudo: Isabel e Célia (e, por vezes, o Tomás). Por me terem ajudado a manter a minha sanidade mental nestes tempos conturbados...

Aos pais, por 23 anos de FMI e por tudo, tudo o resto. Ao resto da família e às minhas miúdas.

Ao resto do Mestrado BED. Nós somos os próximos!

Ah, e claro: à Telepizza de Oeiras, e à máquina de café do Hall do IGC. Sem eles, este trabalho também não teria sido possível.

Resumo

As correntes e campos eléctricos endógenos são conhecidos desde o século XVIII. Surgem da acumulação diferencial de iões em ambos os lados de uma estrutura electricamente isolante, consequência de um transporte iónico direccionado e selectivo através dela. Isto resulta na formação de uma diferença de potencial que, se a estrutura for danificada, gera uma corrente eléctrica. A importância das correntes e campos eléctricos tem sido reconhecida em processos biológicos importantes, mas a sua influência na regeneração tem suscitado grande interesse devido às potenciais aplicações biomédicas. Observações prévias de fluxos iónicos realizadas pela equipa sugerem que as correntes protónicas poderão também estar envolvidas na regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra adulto. Reforçando estes dados, provou-se¹ que as correntes protónicas são necessárias e suficientes para induzir a regeneração em larvas de *Xenopus laevis*, e que eram mantidas activamente pela regulação positiva de transportadores iónicos específicos – as V-ATPases.

Este trabalho teve como objectivo a análise específica do papel das V-ATPases na regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra adulto. Os padrões de expressão génica obtidos confirmam localização deste gene nas células do blastema e revelam uma forte presença da proteína correspondente nas células mais exteriores do epitélio de ferida. O silenciamento génico específico da V-ATPase em barbatanas caudais em regeneração mostrou que este transportador parece ser especialmente importante no final da maturação do blastema e início do crescimento regenerativo. Em geral, os resultados obtidos neste estudo são consistentes com os dados de fluxos iónicos e com os perfis de expressão génica previamente obtidos, apontando para um possível papel da V-ATPase no estabelecimento e manutenção de correntes iónicas e campos eléctricos endógenos essenciais à regeneração.

Palavras-chave: Regeneração, V-ATPase, correntes iónicas, peixe-zebra.

Abstract

Endogenous electric fields and currents arise as a consequence of specific and directional ion transportation. Consequently, ions accumulate differentially and establish a voltage difference across an electrically resistant structure. Disrupting this barrier leads to an ion flow, which generates an electric field across the surrounding tissues. These phenomena have been shown to have an important role in various biological processes, including vertebrate regeneration. Previous results from the lab implicate proton fluxes and, in particular, V-ATPases in zebrafish caudal fin regeneration. These findings were further reinforced by a recent study that implicated these pumps on the onset and maintenance of electric currents during tail regeneration in *Xenopus laevis* larvae, which were proven to be necessary and sufficient to induce this process¹.

This work aimed to analyze the particular role of V-ATPases in the caudal fin regeneration of adult zebrafish. Gene and protein expression patterns showed that this proton pump is located in the blastema. In particular, the V-ATPase complex is essentially found in the most external cells of the wound epithelium. Gene silencing experiments revealed that V-ATPase appears to be important during the end of blastema maturation and in the beginning of regenerative outgrowth. In general, these results are consistent with those obtained before, suggesting a possible role for V-ATPase in the onset and maintenance of the observed proton fluxes during caudal fin regeneration.

Key words: Regeneration, V-ATPase, ion currents, zebrafish.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice	xi
I. Introdução	14
<i>I.1 A descoberta da bioelectricidade e do potencial de ferida</i>	14
<i>I.2 Origem biológica de correntes e campos eléctricos endógenos.....</i>	14
<i>I.3 Sinais bioeléctricos controlam processos celulares</i>	16
<i>I.3.1 Migração e orientação do eixo de polaridade celular.....</i>	16
<i>I.3.2 Polarização de componentes celulares</i>	16
<i>I.3.3 Crescimento celular orientado.....</i>	16
<i>I.3.4 Taxa de proliferação e orientação do eixo de divisão celular.....</i>	17
<i>I.3.5 Diferenciação e desdiferenciação celular.....</i>	17
<i>I.4 Sinais bioeléctricos no Desenvolvimento Embrionário</i>	18
<i>I.5 Regeneração</i>	19
<i>I.5.1 Modelos animais em regeneração</i>	19
<i>I.5.2 Regeneração de apêndices</i>	20
<i>I.5.3 Regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra.....</i>	20
<i>I.5.3.1 Fecho da ferida</i>	20
<i>I.5.3.2 Desorganização de tecidos mesenquimatosos e formação do blastema....</i>	21
<i>I.5.3.3 Maturação do blastema.....</i>	21
<i>I.5.3.4 Crescimento regenerativo</i>	21
<i>I.5.4 Conservação de factores genéticos intervenientes na regeneração</i>	22
<i>I.6 Mecanismos bioeléctricos da Regeneração</i>	22
<i>I.6.1 Correntes eléctricas endógenas na regeneração em Vertebrados.....</i>	22
<i>I.6.2 Hipótese biofísica da Regeneração.....</i>	24
<i>I.6.3 Correntes endógenas em organismos regenerantes vs não regenerantes</i>	24
<i>I.7 (H⁺)-ATPases vacuolares (V-ATPases).....</i>	25
<i>I.7.1 Estrutura e mecanismo de translocação de protões</i>	25
<i>I.7.2 Funções celulares.....</i>	27
<i>I.7.3 Regulação.....</i>	27
<i>I.7.4 V-ATPase e regeneração.....</i>	28
<i>I.8 Objectivos</i>	29
II. Materiais e Métodos	32
<i>II.1 Modelo animal utilizado: o peixe-zebra.....</i>	32
<i>II.2 Recolha de embriões e barbatanas caudais de peixe-zebra</i>	32
<i>II.2.1 Cruzamentos</i>	32
<i>II.2.2 Prevenção da formação de pigmentos endógenos.....</i>	32
<i>II.2.3 Amputação de barbatanas caudais.....</i>	33
<i>II.2.4 Recolha e conservação do material biológico.....</i>	33
<i>II.2.5 Remoção dos córions de embriões.....</i>	33
<i>II.3 Isolamento e clonagem dos genes em estudo</i>	33
<i>II.3.1 Isolamento do RNA total.....</i>	33
<i>II.3.2 Retrotranscrição</i>	34

II.3.3 Amplificação da subunidade H da V-ATPase.....	34
II.3.4 Preparação de géis de agarose e electroforese DNA/RNA	34
II.3.5 Extracção e purificação de banda em gel de agarose	34
II.3.6 Ligação	34
II.3.7 Transformação bacteriana.....	35
II.3.8 Análise de transformantes.....	35
II.3.8.1 Expressed Sequence Tags (ESTs)	35
II.3.8.2 Extracção de DNA plasmídico.....	35
II.3.8.3 Digestão de plasmídeos	35
II.3.8.4 Sequenciação	36
II.3.9 Amplificação da quantidade de DNA	36
II.4 Linearização do vector, transcrição in vitro e produção de sonda de RNA	36
II.4.1 Subclonagem de <i>zatp6v1e1</i>	37
II.4.2 Linearização do vector plasmídico	37
II.4.3 Transcrição in vitro para síntese de sonda de RNA	37
II.5 Hibridação in situ	38
II.5.1 Hibridação in situ em embriões de peixe-zebra	38
II.5.2 Hibridação in situ em barbatanas caudais de peixe-zebra	38
II.6 Inclusão em gelatina e obtenção de cortes histológicos.....	38
II.7 Detecção imunohistoquímica em amostras seccionadas	38
II.8 Manipulação experimental de embriões e barbatanas caudais de peixe-zebra ...	39
II.8.1 Morfolinos.....	39
II.8.2 Injecção e electroporação de morfolinos	40
II.8.3 Curva dose-resposta para embriões de peixe-zebra.....	41
II.9.4 Análise estatística	42
III. Resultados.....	44
III.1 Padrões de expressão génicos da V-ATPase	44
III.1.1 Expressão génica da subunidade E_1 em barbatanas caudais	44
III.1.2 Expressão génica da subunidade E_1 em embriões	44
III.2 Localização da subunidade E_1 da V-ATPase	47
III.3 Análise funcional da V-ATPase	48
III.3.1 Validação da especificidade do morfolino em embriões.....	48
III.3.2 Knockdown de <i>zatp6v1e1</i> durante a regeneração.....	48
IV. Discussão	52
IV.1 Expressão da V-ATPase	52
IV.2 Silenciamento da V-ATPase em barbatanas caudais	54
IV.3 Conclusões e direcções futuras	55
V. Referências Bibliográficas.....	58
ANEXOS	I

Capítulo I:

Introdução

I. Introdução

I.1 A descoberta da bioelectricidade e do potencial de ferida

A existência de correntes e campos eléctricos em organismos vivos é, simultaneamente, um tema velho e novo na Biologia. Luigi Galvani (1737-1798) foi pioneiro na investigação deste fenómeno de “electricidade animal”. As suas experiências com preparações de pernas de rãs demonstraram, pela primeira vez, que a contracção muscular era dependente de condução eléctrica e que os próprios tecidos eram capazes de gerar electricidade, desde que danificados². No entanto, só mais tarde foi conhecida a explicação física para a bioelectricidade.

I.2 Origem biológica de correntes e campos eléctricos endógenos

Numa célula normal, a existência de proteínas transportadoras específicas faz com que o transporte iónico através da membrana plasmática seja direccionado e selectivo. Assim, a acumulação diferencial de cargas entre os dois lados da membrana gera um potencial electroquímico – o potencial de membrana (V_m)³.

Algo semelhante acontece a um nível de organização superior (Fig. 1A). Muitos epitélios têm como função a regulação osmótica dos tecidos subjacentes, transportando (tal como na célula) iões selectiva e direccionalmente. Geralmente, isto é conseguido através da polarização das células que constituem o epitélio, para que estas contenham diferentes tipos de transportadores na região apical e basal. Isto faz com que a composição iónica do meio intraepitelial seja diferente da do meio exterior o que resulta, mais uma vez, numa segregação de cargas entre os dois lados do epitélio. As células epiteliais estão fortemente ligadas entre si por *tight junctions*, o que não permite a movimentação dos iões de volta aos seus compartimentos de origem. Desta forma, o epitélio intacto é uma estrutura electricamente resistente e a diferença de potencial electroquímico gerada é mantida. Como esta diferença de potencial é estabelecida através de um epitélio, é denominada de potencial transepitelial (*TEP – transepithelial potential*)^{2,4}.

Quando o epitélio ou a membrana plasmática são danificados (Fig. 1B), e a sua integridade estrutural comprometida, deixa de haver qualquer impedimento ao movimento dos iões. Assim, estes passam a mover-se segundo o seu gradiente electroquímico, o que gera uma corrente eléctrica - que, ao contrário do que se passa num circuito eléctrico convencional, é veiculada não por electrões mas sim por iões. O desaparecimento da barreira electricamente resistente no local da ferida provoca o colapso do potencial transepitelial nesse local. No entanto, o potencial transepitelial não é afectado nas regiões circundantes, não danificadas, em que o transporte iónico se dá normalmente. Forma-se assim um gradiente de diferença de potencial lateral desde o local da ferida (em que o TEP

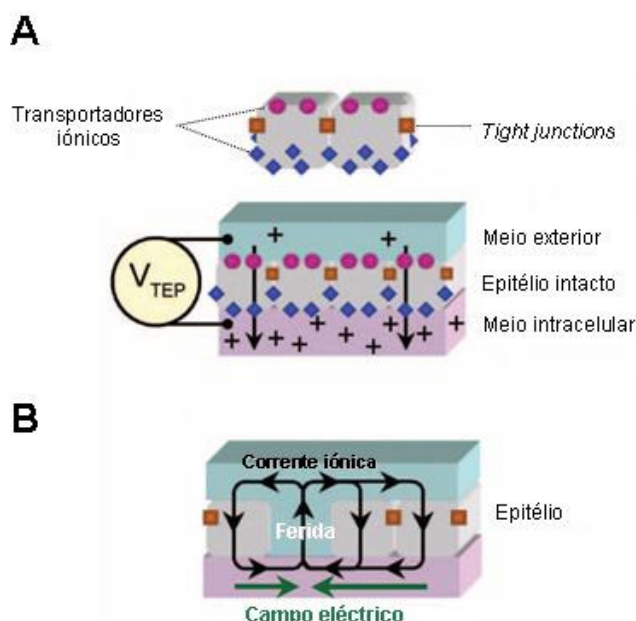


Figura 1 Origem biológica de correntes e campos eléctricos endógenos. A) A existência de transportadores iónicos específicos localizados nos domínios apicais e basais das células epiteliais resulta no transporte selectivo e direccionado de iões. Deste modo, é gerada uma diferença de concentração de cargas eléctricas que é mantida pela ligação física das células por *tight junctions*. Forma-se assim uma diferença de potencial eléctrico através do epitélio, designado por potencial transepitelial ou TEP. B) Um ferimento provoca a perda da integridade do epitélio, o que gera o movimento de cargas segundo o seu gradiente electroquímico. A formação desta corrente iónica faz com que o TEP colapse localmente; no entanto, o transporte iónico continua normalmente nas partes não danificadas do epitélio. Forma-se assim um gradiente de diferença de potencial lateral desde o local da ferida (em que o TEP é nulo) até ao local em que a diferença de potencial normaliza. Este acontecimento, por sua vez, gera um gradiente de campo eléctrico – mais forte no local da ferida, e progressivamente mais fraco à medida que a distância à ferida aumenta. Ao campo eléctrico resultante do gradiente de diferença de potencial nos tecidos, dá-se o nome de potencial de ferida. (Adaptado de McCaig *et al.*, 2005²).

é nulo) até ao local em que o TEP normaliza; o que, por sua vez, gera um gradiente de campo eléctrico – mais forte no local da ferida, e progressivamente mais fraco à medida que a distância à ferida aumenta^{4,5}. Ao campo eléctrico resultante do gradiente de diferença de potencial nos tecidos dá-se o nome de potencial de ferida.

Os campos eléctricos endógenos têm características muito específicas que os distinguem de outros acontecimentos eléctricos no organismo como, por exemplo, os potenciais de acção observados nas células nervosas. Ao contrário destes, os campos eléctricos endógenos (que incluem os potenciais de ferida) são gradientes de diferença de potencial estáveis e de longa duração³. Como são gerados por correntes iónicas, podem também ser resultado da acção de proteínas transportadoras⁶. Para além disso, a maioria dos campos eléctricos com papéis fisiológicos têm valores que variam entre os 1 a 100mV/mm^{2,7}, cerca de 3 a 4 ordens de magnitude inferior aos usados para estimulação de um potencial de acção (1-2 V/mm)². Mas, mais importante, tanto a corrente eléctrica como o campo eléctrico gerado têm magnitude e direcção - um pólo positivo (ânodo) e um pólo negativo (cátodo) -, o que lhes confere a capacidade de actuarem como organizadores espaciais⁶. O facto é que um campo eléctrico exerce uma força sobre qualquer outro objecto com carga desde que este esteja dentro dos seus limites⁸. Tendo em conta que a maioria dos constituintes celulares não são electricamente neutros, conclui-se que também poderão

estar sujeitos à influência do campo eléctrico e de outros sinais bioeléctricos. Na realidade, pensa-se que todos os comportamentos celulares num raio de, aproximadamente, 500 μm a partir do local da ferida acontecem inevitavelmente sob a influência de um gradiente de diferença de potencial eléctrico².

Embora tenha sido negligenciada ou mal entendida desde o século XVIII, o interesse na bioeléctricidade tem vindo a ressurgir e muitos estudos revelam um papel importante desses campos e correntes eléctricas em diversos processos celulares.

1.3 Sinais bioeléctricos controlam processos celulares

1.3.1 Migração e orientação do eixo de polaridade celular

Muitos tipos celulares, embrionários e somáticos, reagem à presença de campos eléctricos, movendo-se de acordo com a sua polaridade. A este fenómeno de movimento direccionado dá-se o nome de galvanotaxia ou electrotaxia⁹.

Na maioria dos casos estudados, as células parecem migrar em direcção ao cátodo¹⁰. Outros tipos celulares são atraídos pelo ânodo¹¹. O mais importante é o facto de que a inversão do campo eléctrico a que essas células estão sujeitas resulta na concomitante inversão da direcção de migração². Células derivadas do mesmo tecido¹², ou populações de células iguais, mas provindas de locais ligeiramente diferentes do tecido¹³ podem também responder de forma diferente ao mesmo sinal eléctrico. Esta movimentação mais tarde condicionará a morfologia e função dessas células.

Os campos eléctricos endógenos têm ainda a capacidade de reorientar as células. Estas alteram a sua forma, de modo a que o seu eixo longitudinal seja perpendicular ao vector do campo eléctrico².

1.3.2 Polarização de componentes celulares

A migração celular está intimamente relacionada com a sua polarização. Durante a migração as células tornam-se dinamicamente polarizadas adquirindo características distintas, nomeadamente a formação de protrusões na zona que lidera o movimento (*leading edge*) e a reorganização de estruturas intracelulares de acordo com a direcção do movimento¹⁴. Os campos eléctricos endógenos foram implicados no fenómeno de polarização celular, especialmente durante a migração electrotáctica das células. Foi demonstrado que influenciam o posicionamento de componentes celulares tais como o complexo de Golgi e o centróssoma¹⁵; e que, por sua vez, a polarização destes componentes reforça e mantém o comportamento galvanotrópico.

1.3.3 Crescimento celular orientado

Um tipo extremo de polarização celular é o crescimento celular orientado. Este processo é observado na extensão de neurites e cones de crescimento de células nervosas em

desenvolvimento. Em todos estes modelos reconhece-se o envolvimento de campos eléctricos endógenos.

Tal como na maioria das células, as projecções nervosas crescem, tendencialmente, em direcção ao cátodo quando sujeitas a um campo eléctrico fisiológico. As neurites expostas ao cátodo são em maior quantidade e apresentam uma taxa de crescimento maior face àquelas expostas ao ânodo¹⁶; estas últimas chegam inclusivamente a retrair¹⁷ em presença do pólo positivo do campo eléctrico. Todos estes comportamentos são repolarizados assim que a direcção do campo eléctrico é invertida². Desta forma, a presença de campos eléctricos endógenos é capaz de modificar a arquitectura neuronal, influenciando o crescimento, orientação e ramificação de neurites e cones de crescimento¹⁶. Inclusivamente, poderá fazê-lo *in vivo*, uma vez que o epitélio do tubo neural é capaz de criar um campo eléctrico endógeno (o potencial trans-tubo neural, ou TNTP) durante o desenvolvimento embrionário² (ver secção **I.4**).

1.3.4 Taxa de proliferação e orientação do eixo de divisão celular

O controlo da divisão celular é fundamental para um desenvolvimento normal. Tanto a taxa proliferação como a regulação do plano de clivagem têm, reconhecidamente, um impacto morfogenético considerável.

Quando cultivadas em presença de um campo eléctrico com valores fisiológicos, as células epiteliais da córnea alinham o eixo de divisão celular paralelamente ao vector desse campo¹⁸. Para além do controlo do plano de clivagem, o campo eléctrico também se mostrou capaz de influenciar a taxa de proliferação dessas células¹⁹. Tanto num como noutro caso, quanto maior a intensidade do campo eléctrico, maior a sua influência nestes dois aspectos.

1.3.5 Diferenciação e desdiferenciação celular

O potencial proliferativo da célula e o seu estado de diferenciação estão intrinsecamente relacionados. O potencial de membrana (V_m) constitui um factor bioeléctrico capaz de influenciar o estado proliferativo das células, bem como a sua diferenciação e desdiferenciação⁶.

Células terminalmente diferenciadas, geralmente hiperpolarizadas, tendem a ser quiescentes. Contrariamente, células mais indiferenciadas (como, por exemplo, células estaminais e precursoras) ou tumorais, cujo V_m é, normalmente, menos polarizado revelam-se consideravelmente mais activas mitoticamente³. Muitos estudos comprovam que esta relação é causal, e que a modulação do potencial de membrana tem a capacidade de estimular ou inibir a proliferação de forma previsível (revisto por Sundelacruz e colaboradores²⁰). Este tipo de alterações electrofisiológicas tem também um papel funcional e instrutivo no processo de diferenciação²⁰. A hiperpolarização parece funcionar

como um estímulo para a diferenciação celular e para a apoptose, constituindo não só um dos primeiros indícios destes acontecimentos como também parecem ser essenciais para que ocorram⁶. A despolarização do potencial de membrana parece ter o efeito contrário: neurónios completamente desenvolvidos podem, inclusivamente, reentrar no ciclo celular (e, assim, adquirir um certo grau de desdiferenciação) ao serem despolarizados durante longos períodos de tempo²¹. Em suma, observa-se que, no geral, a despolarização da célula favorece um estado menos diferenciado e proliferativo, enquanto a sua hiperpolarização faz com que toda a actividade mitótica cesse e com que a diferenciação seja promovida.

Se os campos eléctricos endógenos e outros sinais bioeléctricos afectam toda esta variedade de processos celulares, naturalmente também afectarão acontecimentos de larga-escala em que todos eles tenham que ser integrados e coordenados. O desenvolvimento embrionário é um desses acontecimentos.

1.4 Sinais bioeléctricos no Desenvolvimento Embrionário

A assimetria esquerda-direita é estabelecida cedo no desenvolvimento. Em anfíbio e galinha, para que esta ocorra, são necessárias assimetrias de diferenças de potencial na membrana nas células de ambos os lados do embrião, tal como a presença de *gap junctions* entre elas. A diferença de potencial observada provoca o movimento dirigido de pequenas moléculas entre a metade esquerda e direita que, posteriormente, dará origem à expressão génica assimétrica característica deste fenómeno morfogenético²².

Ainda nos mesmo modelos, medições em embriões de anfíbios e galinha² durante a neurulação (nêurulas) revelam que a diferença de potencial através da ectoderme não é uniforme. Estes gradientes de diferenças de potencial geram, inevitavelmente, um campo eléctrico ao qual as células do embrião estão sujeitas. A perturbação desses campos eléctricos endógenos gera deficiências no desenvolvimento do embrião que afectam, principalmente, o sistema nervoso central². A aparente sensibilidade do sistema nervoso a estas perturbações deve-se, provavelmente, ao facto do próprio tubo neural conseguir gerar um potencial transepitelial: o potencial trans-tubo neural (TNTP – *trans-neural tube potential*)²³. Desta forma, os neuroblastos migram, diferenciam-se e desenvolvem neurites sob a influência de um forte campo eléctrico que os atravessa. De facto, o colapso do TNPT resulta também em defeitos grosseiros do sistema nervoso central, enquanto o aspecto exterior do embrião se mantém inalterado².

A importância dos sinais bioeléctrico observa-se também no desenvolvimento dos membros em anfíbios e mamíferos^{24,25}. Uma semana antes do aparecimento do primórdio do membro são observadas correntes de saída estáveis no flanco do embrião que aumentam de intensidade imediatamente antes, e exactamente sobre, a região onde o primórdio se desenvolve²⁴. A anulação ou reversão artificial destas correntes resulta na

formação anormal do membro. Assim, o efluxo de corrente parece prever a futura localização do membro, aparentando ter um papel importante no seu desenvolvimento²⁵.

Todas estas experiências demonstram que campos eléctricos endógenos com polaridade e intensidades normais são essenciais no desenvolvimento embrionário. Estes factos apontam para um papel importante dos campos eléctricos endógenos durante a morfogénese, funcionando como pistas gerais de padronização durante o desenvolvimento².

1.5 Regeneração

O segundo acontecimento em larga escala envolvendo a integração e coordenação de comportamentos celulares diversos é a regeneração epimórfica (ou, simplesmente, regeneração). Este fenómeno consiste na restituição completa de estruturas tridimensionais complexas após dano ou ferimento destas. Esta definição contrasta com a auto-renovação de certos órgãos e tecidos, por vezes também designada por regeneração ou regeneração homeostática²⁶. Uma resposta regenerativa bem sucedida requer a orquestração da proliferação, migração e diferenciação celular, para que se restabeçam as grandes quantidades de tecido necessárias sem risco de descontrolo desses processos³. O processo de regeneração pode dar-se por diferenciação ou transdiferenciação de células noutros tipos celulares, ou então por proliferação e diferenciação de populações residentes de células estaminais²⁷. No final, todas estas estratégias resultam no restabelecimento da polaridade, estrutura e forma dos tecidos.

1.5.1 Modelos animais em regeneração

Os primeiros estudos de regeneração foram feitos em invertebrados e remontam ao século XVIII²⁷. No entanto, a capacidade de regeneração é relativamente comum, ocorrendo na maioria das taxa incluindo Vertebrados²⁷. Neste último grupo há grandes variações no potencial regenerativo: no geral, os Vertebrados Inferiores (Peixes e Anfíbios) regeneram mais e melhor do que os Vertebrados considerados Superiores (Répteis, Aves e Mamíferos). De todos os Vertebrados, os Anfíbios são o modelo de eleição para o estudo da regeneração, conseguindo regenerar completamente membros, cauda, estruturas oculares, nervos, e, embora parcialmente, o coração²⁸.

Embora não sejam os modelos clássicos para o estudo da regeneração, este processo tem sido estudado em diversas espécies de peixes teleósteos. O peixe-zebra (*Danio rerio*) foi o modelo animal usado neste trabalho. Esta espécie tem vindo a afirmar-se como um organismo promissor no estudo do processo regenerativo, especialmente devido ao seu estatuto de organismo modelo em estudos de desenvolvimento^{27,29}. O peixe-zebra é capaz de regenerar várias estruturas como as barbatanas, o nervo óptico, escamas, coração e espinal medula.

1.5.2 Regeneração de apêndices

Os membros têm sido, desde sempre, órgãos apetecíveis para a investigação em regeneração. Para além do seu potencial biomédico, estes são órgãos externos, não vitais, algo complexos – dado que são constituídos por variados tipos de tecidos –, e de fácil acesso e manipulação²⁹.

Embora os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no seu desenvolvimento sejam relativamente conservados, as respostas regenerativas dos apêndices diferem grandemente de espécie para espécie e consoante a fase do ciclo de vida do organismo³⁰. Em Mamíferos, a regeneração dos apêndices pares parece estar limitada aos estádios mais precoces do ciclo de vida (embriões e recém-nascidos)³⁰. Dentro do taxa dos Anfíbios, os Urodelos (tritões e salamandras) conseguem regenerar os seus membros independentemente do estágio de Desenvolvimento, enquanto os Anuros (sapos e rãs) só o conseguem fazer antes do início da metamorfose³⁰. Em Peixes, a regeneração de apêndices também tem sido extensivamente estudada. As barbatanas são um modelo de estudo vantajoso, uma vez que têm uma estrutura relativamente simples e simétrica, contendo uma quantidade limitada de tipos celulares²⁸ (secção **I.5.3**). Todas as barbatanas de peixe-zebra regeneram, mas a barbatana caudal tem sido a mais usada. Mesmo não sendo um apêndice par, a sua popularidade deve-se ao facto de ser a barbatana mais acessível e mais facilmente manipulável.

1.5.3 Regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra

As barbatanas de peixe-zebra consistem num exosqueleto protuberante e visível, constituído por raios ósseos de origem dérmica ligados ao endosqueleto por meio de ligamentos²⁹. Só o exosqueleto é capaz de regenerar. Os lepidotrichia, ou raios ósseos, são formados por dois hemiraios côncavos e simétricos, rodeados de uma monocamada de escleroblastos (Fig. 2D). O espaço interno gerado no cilindro alberga vasos sanguíneos, fibras nervosas, células do tecido conjuntivo, e células pigmentares. Estes tecidos também se encontram na região entre os raios ósseos, ligando os lepidotrichia entre si. A regeneração de uma barbatana amputada de peixe-zebra demora cerca de uma a duas semanas, sendo um processo altamente dependente da temperatura²⁸. Considera-se que decorre em 4 fases (Fig. 2).

1.5.3.1 Fecho da ferida

A regeneração da barbatana amputada começa com o rápido fecho da ferida (Fig. 2A). Uma a três horas após a amputação, a ferida é coberta com uma fina camada de células epiteliais, o epitélio de ferida (*wound epithelium*), constituído por células epiteliais que migram a partir do epitélio adjacente²⁸. A 33°C, esta fase de migração celular termina 12 horas após a amputação. Nas horas seguintes o epitélio de ferida sofre um processo de maturação em que se torna estratificado, ao ganhar novas camadas por migração adicional

de células epiteliais²⁸. A parte mais distal desse epitélio designa-se então por cobertura epitelial apical ou AEC (*apical epithelial cap*). Considera-se que o AEC corresponde funcionalmente à crista apical epitelial, ou AER (*apical epithelial ridge*), que existe durante o desenvolvimento do membro e que é essencial para o crescimento do botão embrionário em amniotas^{28,31}.

1.5.3.2 Desorganização de tecidos mesenquimatosos e formação do blastema

Após o fecho da ferida, o tecido mesenquimatoso abaixo do epitélio de ferida começa a desorganizar-se e a desdiferenciar (Fig. 2B1)²⁸. Pensa-se que tanto células desdiferenciadas como algumas células estaminais residentes migram para a zona imediatamente abaixo da AEC (Fig. 2D)^{28,29}. No final, o processo de desorganização e migração culmina com a formação do blastema. O blastema é uma estrutura temporária e muito conservada evolutivamente, sendo uma das principais características da regeneração²⁷⁻²⁹. É constituído por uma população de células mesenquimatosas e indiferenciadas de grande potencial proliferativo, estando localizado entre o epitélio de ferida e a superfície de amputação em cada raio na barbatana. É da proliferação e diferenciação do blastema que surgem os novos tecidos²⁸. Todos estes processos ocorrem entre as 12 e 24 horas após a amputação²⁸.

1.5.3.3 Maturação do blastema

A terceira fase do processo regenerativo decorre entre as 24 e as 48 horas pós-amputação e caracteriza-se pela maturação do blastema. Formam-se assim duas populações distintas de células no blastema – a zona proximal e a zona distal – com diferentes características celulares e moleculares²⁸ (Fig. 2B2). O blastema distal parece consistir em células indiferenciadas que proliferam pouco ou não proliferam de todo. Pelo contrário, o blastema proximal está em proliferação activa.

1.5.3.4 Crescimento regenerativo

Finalmente, a última fase é de crescimento regenerativo (ou redesenvolvimento³⁰) e acontece a partir das 48 horas após a amputação²⁸ (Fig. 2C). Nesta etapa, as células do blastema distal entram para a zona do blastema proximal onde proliferam. Mais tarde diferenciam-se numa terceira zona, a mais proximal de todas, denominada zona de padronização. No final, a barbatana regenerada tem exactamente o mesmo tamanho da barbatana inicial²⁸.

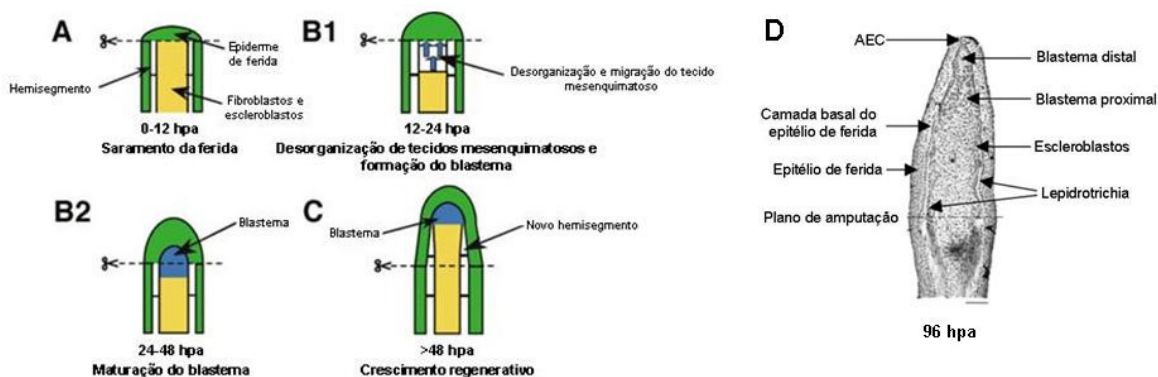


Figura 2 Estádios de regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra. Representação esquemática de um raio ósseo em secção longitudinal, com a extremidade mais distal no topo. A) Fechamento da ferida. A ferida é fechada em 12 horas por células epiteliais que migram para o local. B1) Desorganização dos tecidos mesenquimatosos e formação do blastema. Das 12 às 24 horas após a amputação a epiderme de ferida aumenta de espessura, o tecido mesenquimatoso entre os dois hemi-raios desorganiza-se e as células migram distalmente. B2) Formação do blastema. Esta massa de células mesenquimatosas em estado proliferativo forma-se distalmente em relação ao plano de amputação. C) Crescimento Regenerativo. Durante este estágio, as células do blastema proliferam e diferenciam-se de forma a substituir as estruturas danificadas. (Adaptado de Poss *et al.*, 2003²⁸). D) Secção longitudinal de um raio ósseo de barbatana caudal com 96 hpa. O blastema está subdividido em blastema distal (imediatamente sob a AEC) e blastema proximal. Na parte mais proximal, a diferenciação celular já teve início: os escleroblastos revestem os lepidotrichia, depositando nova matriz óssea. (Adaptado de Akimenko *et al.*, 2003²⁹) A linha tracejada representa o plano de amputação.

1.5.4 Conservação de factores genéticos intervenientes na regeneração

Quase todas as principais vias de sinalização têm sido implicadas na regeneração²⁸. Muitos destes genes foram implicados na regeneração de diferentes órgãos e em vários modelos animais de regeneração, o que sugere que os mesmos mecanismos são usados para regenerar diferentes estruturas e que estes são conservados entre espécies³⁰. O facto de a grande maioria destes genes se observar também durante o desenvolvimento embrionário reforça a ideia de que os mecanismos usados na ontogenia poderão também ser usados para a regeneração³¹.

1.6 Mecanismos bioeléctricos da Regeneração

Vimos na secção I.3 que campos eléctricos endógenos e outros sinais bioeléctricos influenciam uma grande variedade de comportamentos celulares. Tendo em conta que todos esses comportamentos foram já implicados no processo regenerativo, é natural que também já tenha sido demonstrado o envolvimento de sinais bioeléctricos na regeneração.

1.6.1 Correntes eléctricas endógenas na regeneração em Vertebrados

Em anfíbios, a influência das correntes iónicas e campos eléctricos endógenos na regeneração está bem demonstrada. Sendo um epitélio transportador de iões, a pele do tritão é capaz de gerar um potencial transepitelial³² (Fig. 3A). Após a amputação do membro, é gerado um potencial de ferida que, por sua vez, gera uma corrente iónica que sai pela superfície de amputação. Esta corrente é estável, intensa (10-100 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) e permanece até 10 dias após a amputação, persistindo assim até muito depois da formação

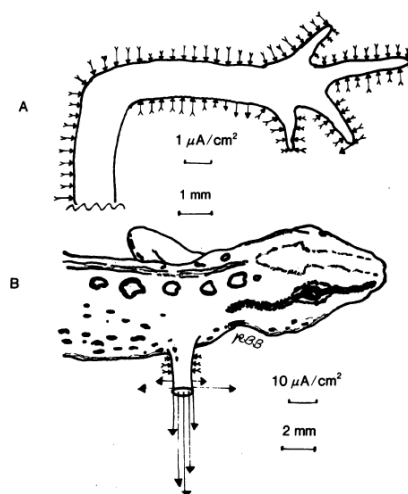


Figura 3 Padrão e intensidade das correntes iónicas observadas em membros de tritão. A) Membro intacto. B) Membro amputado. As setas indicam a intensidade da corrente. De notar que a escala de intensidade em B é 10 vezes superior que em A. (Adaptado de Borgens *et al.*, 1977³³)

do epitélio de ferida³³ (Fig. 3B). A corrente iónica assim estabelecida é crucial para a regeneração nestes animais, dado que a sua inibição gera membros que regeneram anormalmente (regeneração hipomórfica) ou que não regeneram de todo³⁴. Em Anuros (e, especificamente, Ranídeos) que normalmente não regeneram, a corrente de ferida é muito inferior à observada em tritão. No entanto, a aplicação de uma corrente artificial da mesma magnitude e direcção à observada nestes últimos organismos consegue induzir um certo grau de regeneração em membros de rãs²⁵. Conclui-se assim que embora seja necessária para o seu início, a corrente iónica de ferida não é suficiente para completar o processo de regeneração. Estas correntes não só foram medidas em anfíbios, como também foram encontradas e implicadas na regeneração da córnea de rato e pele humana².

Na realidade, os sinais bioeléctricos parecem ser os factores principais durante o fecho de ferida, dominando todos os outros⁹. No caso da regeneração da córnea (*in vivo* e *in vitro*), uma diminuição na intensidade desse campo eléctrico provoca uma diminuição na taxa de migração celular, na taxa de proliferação celular, randomiza o eixo de divisão celular e diminui também o enervamento do órgão⁹. Consequentemente, a taxa de fecho da ferida é também diminuída e a regeneração é atrasada. Por sua vez, o aumento da intensidade do campo eléctrico observado (desde que mantido em valores fisiológicos) aumenta a taxa de regeneração⁵. Porém, a inversão total do campo eléctrico da córnea, face à direcção observada naturalmente tem a capacidade de redireccionar completamente a migração celular⁹. Assim, a ferida abre em vez de fechar e sarar, independentemente de outros factores que também se pensam ser importantes para a migração celular⁹ (nomeadamente gradientes de quimioattractores²). Também em córnea foi demonstrado que a presença de campos eléctricos é importante para a proliferação e orientação da divisão celular^{10,18}; para além de dirigir a migração e posicionamento das células nervosas,

sem as quais a regeneração não é possível¹. Estas correntes parecem ser também críticas para a regeneração da ponta do dedo em crianças humanas, sendo apenas possível quando a amputação é feita acima da primeira falange e se a ferida não for tratada e for mantida húmida³⁵. Possivelmente, estas condições, propícias à regeneração, são aquelas que permitem a subsistência das correntes eléctricas endógenas.

1.6.2 Hipótese biofísica da Regeneração

A hipótese biofísica para a Regeneração tem sido sustentada durante décadas pelo tipo de estudos fisiológicos acabados de mencionar. Esta hipótese postula que sinais bioeléctricos - especialmente correntes e campos eléctricos endógenos - são importantes para o processo regenerativo uma vez que³⁶:

- i. Fortes correntes acompanham, de forma consistente, os processos de fecho de ferimentos e de regeneração;
- ii. A inibição de correntes endógenas interrompe especificamente estes eventos;
- iii. A indução artificial de correntes é capaz de aumentar a taxa de regeneração.

Ou seja, não só há indução de correntes endógenas imediatamente após a amputação (potencial de ferida), como estas parecem ser activamente mantidas durante todo o processo regenerativo. A interferência com estas correntes durante a regeneração do membro faz com que este processo seja inibido^{34,37}. Assim, é razoável assumir que os sinais bioeléctricos poderão constituir factores importantes para a indução e regulação da regeneração, intervindo em acontecimentos relevantes neste processo.

1.6.3 Correntes endógenas em organismos regenerantes vs não regenerantes

A verdade é que as correntes iónicas observadas em animais que regeneram são muito diferentes das encontradas em animais que não regeneram. Nestes últimos, a amputação gera uma corrente de ferida positiva (saída de iões dos tecidos), que decresce progressivamente à medida que a ferida sara. Já em organismos com capacidade de regeneração, a corrente começa também por ser positiva, mas rapidamente inverte a sua polaridade, tornando-se numa forte corrente de entrada (influxo de iões)³.

A manutenção das correntes iónicas endógenas e este seu comportamento peculiar poderá ser um dos fenómenos-chave para a compreensão do que mudou entre os organismos com capacidade de regeneração e os que regeneram pouco ou não regeneram de todo, como os Mamíferos²⁷. De facto, um estudo recente foi capaz de correlacionar o padrão de comportamento da corrente com o estado regenerativo do tecido³⁸. Os autores demonstraram que a corrente iónica observada durante o período refractário em larvas de *Xenopus laevis* era semelhante à observada em organismos não-regenerantes, enquanto o padrão verificado nos períodos permissivos era idêntico ao característico das espécies que

regeneram. Inclusivamente, a reversão da corrente é coincidente com o início da regeneração. No entanto, embora tenha já sido demonstrado que as correntes iónicas estão envolvidas na regeneração, tanto a sua natureza (que tipos de iões as constituem) como os mecanismos moleculares que as originam (que bombas, transportadores iónicos, etc.) ainda são largamente desconhecidos⁶.

1.7 (H⁺)-ATPases vacuolares (V-ATPases)

O pH é um parâmetro crítico na maioria dos sistemas biológicos, sendo por isso cuidadosamente regulado em todas as células. A V-ATPase é um dos principais efectores usados nesta regulação, uma vez que transloca protões desde o citoplasma para o lúmen ou espaço extracelular, às custas da hidrólise de ATP³⁹. Por ter sido pela primeira vez descoberta e estudada em vacúolos recebeu a designação de ATPase vacuolar⁴⁰. Mas na realidade, encontra-se não só na membrana do vacúolo em células vegetais como também na membrana de vários outros componentes celulares e, inclusivamente, na membrana plasmática de células mais especializadas³⁹.

1.7.1 Estrutura e mecanismo de translocação de protões

As V-ATPases são grandes complexos proteicos, compostas por 14 polipéptidos diferentes organizados em dois domínios⁴⁰ (Fig. 4). O domínio V₀ é o domínio transmembranar responsável pela translocação de protões. É constituído por seis subunidades diferentes – designadas de a, d, e, c, c', c'' (embora em eucariotas superiores não exista a subunidade c') - em que existem 4 ou 5 cópias da subunidade c e apenas 1 cópia das demais. Estas proteínas (c, c' e c'') são altamente hidrofóbicas, e formam um anel inserido na membrana plasmática. A translocação de protões é feita pela rotação deste anel proteolipídico, no qual também participa directamente a subunidade a, ao formar dois hemi-canais por onde são transportados os protões. O domínio V₀ também contém a subunidade d e e. A segunda é muito hidrofóbica; enquanto a primeira está fortemente ligada à superfície citoplasmática do anel proteolipídico e serve como local de ligação às subunidades estruturais do domínio V₁⁴⁰. O domínio V₁ é o mais periférico e está localizado na face citoplasmática da membrana⁴⁰. Este está encarregue da hidrólise de ATP, sendo composto por oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G, H), algumas das quais presentes repetidamente. Existem 3 cópias das subunidades A e B, 2 cópias das subunidades E e G, 1 ou 2 cópias da subunidade H, e apenas 1 cópia das restantes (C, D e F). As subunidades A e B formam um arranjo hexamérico alternado, no qual se encontram os 3 locais de hidrólise de ATP. As outras subunidades deste domínio (C, E, G e H) têm funções estruturais e regulatórias⁴⁰.

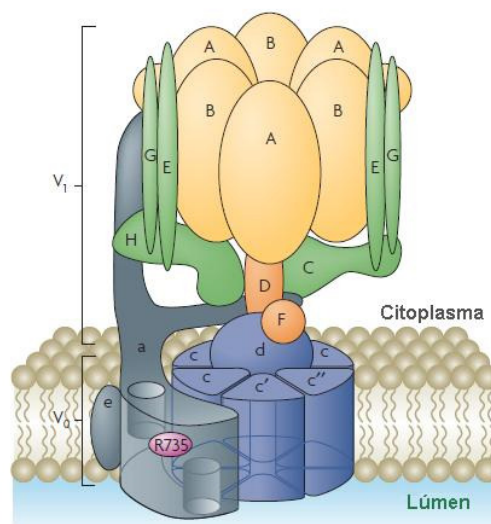


Figura 4 Estrutura da V-ATPase. O complexo da (V-) ATPase vacuolar é composto por um domínio periférico, responsável pela hidrólise de ATP (V_1); e um domínio integral de membrana (V_0) que está envolvido na translocação de prótons através da membrana. (Adaptado de Forgac, 2007⁴⁰)

Na V-ATPase, a maioria das suas subunidades formam elementos de suporte, ligando os dois domínios. O suporte central (constituído pelas subunidades d, D e F) serve de rotor, que acopla a energia libertada da hidrólise de ATP no domínio V_1 à rotação do domínio V_0 . O suporte periférico (formado pelas subunidades C, E, G, H e domínio N-terminal da subunidade a) tem como função prevenir a rotação do complexo formado pelas subunidades A e B durante o funcionamento da bomba, servindo, desta forma, como estator⁴⁰. O estator não só estabiliza todo o complexo durante o processo de rotação como também participa na regulação da V-ATPase⁴¹.

Nos organismos superiores, as subunidades da V-ATPase podem ter múltiplas isoformas. A maioria destas isoformas é expressa em tecidos diferentes; no entanto, para muitas delas, a sua função é ainda desconhecida. Porém, pensa-se que possam ter papéis reguladores, controlando, por exemplo, a eficiência e localização da bomba⁴⁰.

O transporte de prótons através da V-ATPase é feito através de um mecanismo rotacional⁴² (Fig. 5): a hidrólise de ATP no complexo A_3B_3 induz alterações conformacionais na subunidade A, o que gera uma força rotacional. Entretanto os prótons entram no complexo V_0 através de um dos hemi-canais na subunidade a, ligando-se a um dos locais de ligação existentes no anel proteolipídico. À medida que este roda, os prótons atravessam a bicamada lipídica e regressam à subunidade a, mas desta vez ao hemi-canal de saída. Como existem três locais de ligação para o ATP no domínio V_1 e 6-10 locais disponíveis para protonação no domínio V_0 , a estequiometria deste processo (H^+/ATP) é, aproximadamente, 2 para 3,3⁴⁰.

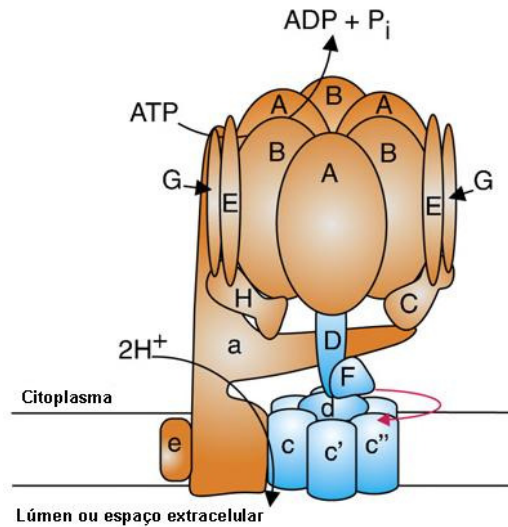


Figura 5 Mecanismo rotacional de translocação de prótons da V-ATPase. A hidrólise de ATP provoca alterações conformacionais nas subunidades A do domínio V_1 , que gera a rotação do rotor. Entretanto, os prótons entram no complexo V_0 através de um dos hemi-canais na subunidade a, ligando-se a um dos locais de ligação existentes no anel proteolípido e saindo para o lúmen ou espaço extracelular através do segundo hemi-canal (Adaptado de Cipriano *et al.*, 2008⁴²).

1.7.2 Funções celulares

A V-ATPase pode estar presente tanto na membrana de compartimentos intracelulares como na membrana plasmática³⁹. No primeiro caso, estas membranas delimitam vesículas do complexo de Golgi, vesículas endossomais e lisossomais, vacúolos (no caso de células vegetais) e vesículas secretoras várias. Como tal, as V-ATPases participam em todos os passos do tráfico membranar normal da célula, desde a formação endossomas precoces até à acidificação de endossomas tardios e lisossomas³⁹. Este transportador também exerce funções importantes na membrana plasmática das células⁴⁰. Ao gerar potenciais de membrana, têm a capacidade de energizar processos de transporte acoplados, funcionando assim na importação e/ou exportação de várias moléculas. A V-ATPase tem também um papel muito importante na regulação do pH citoplasmático das células, no equilíbrio do esqueleto ósseo e na maturação e armazenamento do esperma no epidídimo e vaso deferente. Finalmente, esta bomba de prótons foi recentemente implicada em processos de mobilidade celular, tais como a migração de células durante a angiogénese e a invasividade de células tumorais, ao criar um pH extracelular ácido essencial para a degradação da matriz extracelular³⁹.

1.7.3 Regulação

Assim sendo, devido à sua importância na célula, é natural que a V-ATPase seja rigorosamente regulada usando uma variedade de mecanismos⁴².

Uma das formas de controlo mais importantes é a dissociação reversível dos domínios V_0 e V_1 . Este mecanismo é despoletado pela depleção de nutrientes e pela diminuição do pH, e, por isso, pensa-se que tenha como função a conservação de ATP da célula. Outro tipo de regulação envolve alterações na eficiência de acoplamento entre os dois domínios, ou seja, entre a hidrólise de ATP e o transporte de prótons. Uma série de alterações na fisiologia da célula (por exemplo, elevadas concentrações de ATP), tal como algumas mutações em subunidades específicas da V-ATPase, são capazes de alterar a eficiência de transporte de prótons. Esta bomba pode também ser reversivelmente inactivada, pela criação de ligações covalentes entre aminoácidos no local catalítico da subunidade A do domínio V_1 . O controlo da densidade da V-ATPase na membrana plasmática é, também, uma forma crítica de regulação. Neste caso, este tipo de modulação é conseguido através da fusão reversível de vesículas intracelulares com a membrana plasmática

1.7.4 V-ATPase e regeneração

Observações prévias de fluxos iónicos realizadas pela equipa sugerem que correntes de prótons poderão estar envolvidas na regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra adulto. Imediatamente após a amputação, é detectado um influxo de prótons ao nível dos raios ósseos da barbatana, que começa a inverter passadas três horas e que se torna um forte efluxo 24 horas após amputação (hpa). Este efluxo é mantido durante os primeiros acontecimentos da regeneração, até às 72 hpa. Uma semana depois, altura em que a padronização normal da barbatana é restabelecida, o efluxo de prótons cessa (Joana Monteiro, comunicação pessoal). Estes indícios foram reforçados por análises de *microarrays*, que mostram que a maioria das subunidades constituintes da V-ATPase são reguladas positivamente nas primeiras horas do processo de regeneração (Catarina Certal, comunicação pessoal). Assim, as V-ATPases parecem ser bons candidatos moleculares para a indução e manutenção de correntes iónicas (neste caso, de prótons) em peixe-zebra.

Estes dados estão de acordo com um estudo entretanto publicado, que revelou que a V-ATPase tem um papel essencial na regeneração¹. Usando larvas de *Xenopus laevis* como material de estudo, os autores demonstraram que a indução do fluxo de prótons no botão regenerativo da cauda é necessário para a regeneração desta estrutura. Essas correntes são mantidas especificamente através da regulação positiva da V-ATPase pouco depois da amputação da cauda. A actividade desta bomba gera alterações no potencial de membrana na zona em regeneração: de um estado despolarizado, este conjunto de células é hiperpolarizado por acção do efluxo de prótons, o que é necessário e suficiente para induzir a regeneração tanto em tecidos competentes para regenerar como naqueles que não o são. Para além disso, os autores demonstraram que a actividade da V-ATPase controla a expressão de genes precoces na regeneração de cauda de girino e é essencial à correcta

padronização dos nervos nesta estrutura. Assim, foi mostrado que a manutenção das correntes eléctricas é parte importante do processo de regeneração.

1.8 Objectivos

Este trabalho teve como objectivo avaliar especificamente o papel das V-ATPases e dos campos eléctricos endógenos por ela gerados na regeneração, usando a barbatana caudal de peixe-zebra adulto como modelo. Ao analisar o padrão de expressão génica de uma das suas subunidades, a localização da proteína correspondente e ao avaliar funcionalmente a sua acção durante a regeneração por silenciamento génico por morfólino, procurou-se complementar e validar os dados previamente obtidos pelo laboratório.

Capítulo II:

Material e Métodos

II. Materiais e Métodos

Todas as informações relativamente a reagentes e soluções sublinhados no texto encontram-se no Anexo 4.

II.1 Modelo animal utilizado: o peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo, dulçaquícola, pertencente à família dos ciprinídeos⁴³. A utilização desta espécie tem múltiplas vantagens. Para além de ser capaz de regenerar várias estruturas, tem uma ampla gama de ferramentas e reagentes genéticos disponíveis. Adicionalmente, são capazes de atingirem a idade adulta muito rapidamente, com cerca de 3 meses de idade^{28,43}. Neste trabalho serão utilizados peixes com cerca de 5 meses a 2 anos. Em todas as experiências foram utilizados peixes-zebra *wild-type*, da estirpe AB. A sua manutenção foi feita num sistema de aquários com água circulante a uma temperatura de 28,5°C, num regime de 14 h de luz (dia) e 10 horas de escuridão (noite).

II.2 Recolha de embriões e barbatanas caudais de peixe-zebra

II.2.1 Cruzamentos

Para a obtenção de embriões, peixes-zebra adultos de ambos os sexos foram colocados numa caixa especial de cruzamentos durante a noite anterior à recolha dos ovos. Isto permite a difusão de feromonas na água, o que facilitará o acasalamento dos peixes. A caixa contém uma divisória amovível usada para separar os dois peixes, o que permite o controlo do tempo de oviposição. Assim que as luzes se acendem, a água da caixa de cruzamentos é substituída e a divisória é retirada⁴⁴. A recolha dos embriões é feita com uma rede fina, e estes são colocados numa caixa de *petri* em meio embrionário. A postura é observada à lupa, limpa de ovos não fertilizados ou em mau estado e os restantes são incubados numa estufa a 28°C.

II.2.2 Prevenção da formação de pigmentos endógenos

A maioria das técnicas de processamento de amostra usadas neste trabalho implica a visualização de precipitados coloridos ou de partículas fluorescentes. Desta forma, é útil impedir a formação de pigmentos endógenos, como a melanina. Em embriões, a pigmentação surge após a gastrulação (24 horas pós-fertilização)⁴⁵. O seu aparecimento pode ser prevenido ao adicionar PTU (1-fenil 2-tiourea) no meio embrionário neste estadio de desenvolvimento⁴⁴. No entanto o PTU afecta o desenvolvimento precoce, razão pela qual deve ser apenas administrada após o final da gastrulação⁴⁶.

II.2.3 Amputação de barbatanas caudais

Os peixes foram anestesiados com uma solução tricaína (ácido etil 3-aminobenzoato metanosulfónico). Após a anestesia, os peixes foram colocados numa caixa de *petri* juntamente com um pouco de anestésico. Usando uma lâmina de bisturi, a barbatana caudal foi amputada um a dois segmentos proximais relativamente à origem da bifurcação. Os peixes são depois colocados num aquário de recuperação, a 28°C, com água em circulação.

II.2.4 Recolha e conservação do material biológico

Embriões no estado de desenvolvimento adequados foram recolhidos em meio embrionário e colocados num microtubo de centrífuga de 2mL. Após a remoção da maior parte do meio embrionário, foi adicionado PFA. As barbatanas caudais foram recolhidas imediatamente após a amputação, com uma pipeta de plástico estéril, directamente para um microtubo de centrífuga de 2mL contendo PFA.

Os embriões ou barbatanas caudais foram fixados nesta solução a uma temperatura de 4°C. O tempo de fixação depende do processamento posterior da amostra: 2 horas apenas para imunohistoquímica, ou então durante a noite (aproximadamente 16h) para hibridação *in situ*. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBT durante 10 minutos de forma a permeabilizar o material; desidratadas até metanol a 100% numa série crescente de metanol em PBT e guardados a -20°C até à sua utilização. A conservação do material biológico deve ser feita em metanol absoluto de forma a evitar-se a formação de cristais de água que poriam em causa a sua integridade celular.

II.2.5 Remoção dos córions de embriões

O córion é uma membrana resistente que envolve o embrião em desenvolvimento, protegendo-o do meio exterior. Porém, também interfere com a penetração de reagentes durante o processamento da amostra. Os córions foram removidos manualmente utilizando pinças finas de dissecação.

II.3 Isolamento e clonagem dos genes em estudo

II.3.1 Isolamento do RNA total

A extracção de RNA total dos tecidos foi efectuada a partir de embriões de peixe-zebra inteiros, seguindo-se o protocolo do TRIZOL[®] Reagent. No fim, o RNA isolado é precipitado e a sua concentração e pureza é medida num espectrofotómetro (Nanodrop, ND-1000).

II.3.2 Retrotranscrição

A preparação de cDNA foi efectuada através do 1st Strand DNA Synthesis kit for RT-PCR de acordo com as instruções do fabricante.

II.3.3 Amplificação da subunidade H da V-ATPase

Os *primers* usados para a clonagem da subunidade H do domínio V₁ da V-ATPase foram desenhados com base na sequência nucleotídica e sintetizados por MWG Oligo Synthesis Report (Tabela 1). Estes *primers* específicos foram usados a uma concentração de 1 pmol/μL. Os fragmentos foram amplificados por PCR (Polimerase Chain Reaction), segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.1). O produto de PCR foi analisado por electroforese em gel de agarose.

Tabela 1 Sequência de *primers* utilizados para a amplificação do gene para a subunidade H da V-ATPase.

Gene	<i>Primers</i> usados	Tamanho do fragmento clonado
<i>zatp6v1h</i>	Fw - 5' GGA TCT GAG GAC AAG CAA GCA 3' Rv - 5' CTC CAG CAG GTT CCT GAA AG 3'	658 pb

II.3.4 Preparação de géis de agarose e electroforese DNA/RNA

Por acção de um campo eléctrico, as moléculas de ácidos nucleicos (carregadas negativamente) migram na matriz de agarose do pólo negativo para o positivo. Neste trabalho foram utilizados géis de agarose a 1%. As amostras migraram a uma voltagem entre 80 a 100 volts. Por cada 25 mL de agarose, adicionou-se 2,5 μL de brometo de etídio a 10 mg/mL. Esta molécula permite a detecção de ácidos nucleicos quando exposto a radiação UV.

II.3.5 Extracção e purificação de banda em gel de agarose

Para a extracção e purificação do produto de PCR do gel de agarose utilizou-se o kit QIAquick[®] gel extraction kit, segundo as instruções do fabricante.

II.3.6 Ligação

Os produtos de PCR, já purificados, foram ligados no plasmídeo pGEM[®]-T Easy (Anexo 2), segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.2). O DNA de interesse foi clonado num Multiple Cloning Site (MCS) flanqueado por promotores fágicos (SP6 e T7), que podem ser usados para a produção *in vitro* de RNA. De modo a aumentar a eficiência desta reacção, o DNA de interesse foi utilizado num excesso molar de 3 vezes em relação ao vector de clonagem.

II.3.7 Transformação bacteriana

A transformação permite incorporar o vector plasmídico, que inclui a sequência inserida, em bactérias competentes. Este procedimento (descrito em pormenor no Anexo A3.3) tem como objectivo a obtenção de um grande número de clones recombinantes transformados.

II.3.8 Análise de transformantes

A amplificação dos clones foi feita por inoculação de colónias isoladas em tubos com 5 mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina. Estes foram incubados durante cerca de 16 horas a 37°C com agitação. Seguidamente foi feita a extracção do DNA plasmídico e subsequente análise de restrição.

II.3.8.1 Expressed Sequence Tags (ESTs)

As *Expressed Sequence Tags* (ESTs) são sequências curtas, não editadas, e seleccionadas aleatoriamente directamente de sequências de cDNA⁴⁷. Representam “instantâneos” de genes expressos num determinado tecido, sendo assim muito úteis na análise do transcriptoma. No entanto, a sua maior vantagem é o facto de estarem disponíveis em bases de dados *online* e serem de baixo custo, podendo assim evitar-se uma clonagem completa desde o mRNA.

A EST para o gene da subunidade E₁ da V-ATPase (*zatp6v1e1*) foi encomendada de I.M.A.G.E Consortium e tem como número de identificação 7162760. Esta veio inserida no vector pDNR-LIB (Anexo 2) com um tamanho de 1269 pb (gene completo). O plasmídeo encontrava-se transformado em *E. coli* DH5a e continha uma cassette de resistência ao cloranfenicol. Essas bactérias foram plaqueadas em meio LB agar com cloranfenicol e, de modo idêntico, colónias isoladas foram inoculadas em meio LB e analisadas quanto à presença do DNA de interesse.

II.3.8.2 Extracção de DNA plasmídico

Para a extracção e purificação de DNA plasmídico foi utilizado o *kit Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System*, segundo as instruções do fabricante.

II.3.8.3 Digestão de plasmídeos

Concluída a extracção do DNA plasmídico procedeu-se à sua análise de restrição. Esta permite identificar os clones que possuem a inserção do DNA de interesse, consistindo na digestão com enzimas de restrição que cortam o DNA em dois locais de ambos os lados do inserto, libertando o inserto clonado. A análise de restrição foi feita por digestão dupla usando enzimas apropriadas (Tabela 3) e segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.4). As amostras foram então analisadas em gel de agarose.

II.3.8.4 Sequenciação

Para confirmar que o fragmento inserido é, de facto, o pretendido, os clones considerados positivos por análise de restrição foram sequenciados. O protocolo de sequenciação usado foi do *kit* BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Anexo A3.5). As amostras foram entregues ao serviço de sequenciação do Instituto Gulbenkian Ciência. Os resultados da sequenciação foram comparados com as sequências disponíveis na base de dados, por alinhamento através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

II.3.9 Amplificação da quantidade de DNA

Em seguida, o DNA correspondente ao clone positivo, sequenciado, e identificado correctamente foi amplificado. O clone com o melhor resultado de homologia foi transformado em *E. coli* DH5 α , usando-se 1 μ L de DNA (Anexo A3.3). Finalizada a transformação, o DNA foi extraído segundo o *kit* QIAfilter Plasmid Midi, de acordo com as instruções do fabricante.

II.4 Linearização do vector, transcrição *in vitro* e produção de sonda de RNA

As sondas de RNA produzidas foram sintetizadas a partir dos fragmentos de cDNA conseguidos – ESTs ou produtos de PCR. Estes fragmentos encontram-se clonados no MCS (*Multiple Cloning Site*) do vector entre 2 promotores com orientações inversas (Fig. 6), reconhecidos pela RNA-Polimerase T3, T7, ou SP6, consoante o plasmídeo em questão. Para a produção de sondas, o plasmídeo é linearizado com uma enzima de restrição de corte único numa das extremidades do inserto e transcrito com a polimerase da extremidade oposta. Desta forma, podem ser sintetizadas dois tipos de sondas: *antisense* (complementar ao mRNA de interesse) e *sense* (controlo).

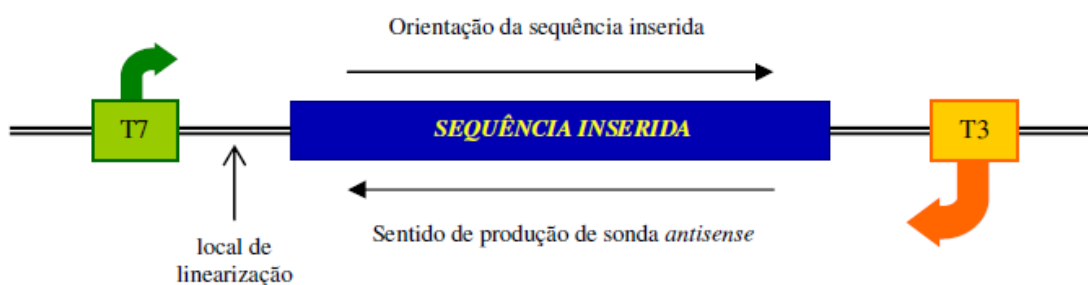


Figura 6 Esquema simplificado da preparação do DNA molde para produção de sondas de RNA por transcrição *in vitro*. Para a produção da sonda *antisense*, o plasmídeo é linearizado a montante da sequência (em termos de direcção de transcrição do gene original) e transcrito com a enzima T3 RNA Polimerase. De forma semelhante, a sonda *sense* de controlo é obtida linearizando o plasmídeo a jusante da sequência e transcrito com o enzima T7 RNA Polimerase. (© A. R. Tomás, 2005)

II.4.1 Subclonagem de *zatp6v1e1*

O vector no qual a EST para o gene da subunidade E₁ da V-ATPase estava, originalmente, inserido não era apropriado para a produção de sonda dado que não apresentava dois promotores a ladear o seu MCS. Assim, foi necessário subclonar o fragmento num outro mais vector adequado. O vector de origem foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, o fragmento libertado foi extraído e purificado (ver secção II.3.5), e foi feita uma reacção de ligação entre este fragmento génico e o vector final (Tabela 2). Neste caso, foi usado o vector pBluescript® II KS+ (Anexo 2). Para que a clonagem fosse dirigida, este vector foi digerido com as mesmas enzimas que o vector de origem. Para impedir a re-ligação espontânea do vector, este foi desfosforilado com o enzima *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*), segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.6). Em seguida adicionaram-se os reagentes necessários para a ligação (secção II.3.6).

Tabela 2 Enzimas de restrição e vectores usados para a subclonagem de *zatp6v1e1*.

Fragmento clonado	Enzimas de restrição usadas	Tamanho do fragmento obtido	Vector de partida	Vector final
EST <i>zatp6v1e1</i>	EcoRI/XhoI	1269 pb	pDNR-LIB	pBluescript® II KS+

II.4.2 Linearização do vector plasmídico

A preparação do DNA molde (*template*) foi feita ao linearizar-se 10 µg de DNA plasmídico com enzima de restrição apropriada (Tabela 3). O produto de reacção foi analisado por electroforese. A observação de apenas uma banda, correspondente à forma linear do plasmídeo, indica que a reacção foi bem sucedida. Em seguida, a remoção de proteínas foi realizada com Fenol/Clorofórmio, após a qual se precipitou o DNA molde para remover os sais (Anexo A3.7).

II.4.3 Transcrição *in vitro* para síntese de sonda de RNA

A transcrição e precipitação do plasmídeo linearizado foi feita segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.8). As RNA-polimerases usadas para a transcrição de cada sonda estão descritas na Tabela 3. No final a sonda foi guardada a -20°C até ser utilizada.

Tabela 3 Enzimas de restrição e RNA-polimerases usadas para a produção de sondas de RNA.

Gene clonado	Enzima de restrição (<i>antisense</i>)	RNA-polimerase (<i>antisense</i>)	Enzima de restrição (<i>sense</i>)	RNA-polimerase (<i>sense</i>)
<i>zatp6v1e1</i>	EcoRI	T3	XhoI	T7
<i>zatp6v1h</i>	NcoI	Sp6	NdeI	T7

II.5 Hibridação *in situ*

A técnica de hibridação *in situ* tira partido da capacidade de hibridação específica entre ácidos nucleicos de sequências complementares. A detecção da sequência de interesse nas células é conseguida pela marcação dos nucleótidos da sonda correspondente (sonda *antisense*) com epitopos particulares, que são posteriormente reconhecidos por anticorpos de alta afinidade. Estes têm acopladas enzimas que, quando expostas ao substrato apropriado, geram um precipitado colorido que se acumula nas células.

Esta técnica foi aplicada a embriões e barbatanas caudais de peixe-zebra intactos (*in toto*) e tem, em média, a duração de três dias. Todos os procedimentos são realizados com agitação vertical, excepto quando o contrário é indicado.

II.5.1 Hibridação *in situ* em embriões de peixe-zebra

A técnica de hibridação *in situ* em embriões de peixe-zebra foi realizado segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.10).

II.5.2 Hibridação *in situ* em barbatanas caudais de peixe-zebra

O protocolo de hibridação *in situ* usado para barbatanas caudais é algo semelhante ao aplicado a embriões. No entanto, como se tratam de tecidos adultos, certas modificações tornam-se necessárias. A hibridação *in situ* nestes tecidos foi feita segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.11).

II.6 Inclusão em gelatina e obtenção de cortes histológicos

A inclusão em gelatina foi realizada segundo o protocolo em anexo (Anexo A3.12). Os cortes foram recolhidos em lâminas *SuperFrost Plus*. A espessura do corte depende do fim a que vão ser sujeitos. Para imunohistoquímica foram usados secções com 12µm, enquanto o material biológico previamente sujeito ao protocolo de hibridação *in situ* foi seccionado com 25µm de espessura.

II.7 Detecção imunohistoquímica em amostras seccionadas

Uma outra forma de caracterizar a expressão génica espacial e temporalmente é observar a distribuição da proteína codificada em células e tecidos. A técnica de imunohistoquímica baseia-se no reconhecimento de motivos proteicos – os epitopos – por anticorpos específicos, designados por anticorpos primários. É então aplicado um outro anticorpo - o anticorpo secundário - que reconhece a espécie em que foi feito o anticorpo primário e que contém acopladas moléculas que permitem a sua detecção. Desta forma, a localização do epitopo é detectada segundo a marcação do anticorpo secundário. Os anticorpos secundários usados (Alexa Fluor[®], Invitrogen) têm fluoróforos conjugados. Quando excitados apropriadamente, estas moléculas emitem fluorescência num comprimento de onda específico que pode ser captado num microscópio equipado com filtros apropriados.

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em amostras previamente seccionadas, segundo o protocolo do anexo (Anexo A3.13). As imagens foram obtidas por microscopia confocal.

Tabela 5 Anticorpo primário utilizado.

Anticorpo primário	Referência	Empresa	Isotipo e clonalidade	Espécie onde foi produzido	Diluição
ATP6E	sc-20946	Santa Cruz Biotechnology	IgG Policlonal	Coelho	1:200

Tabela 6 Anticorpo secundário utilizado.

Anticorpo secundário	Referência	Empresa	Espécie onde foi produzido	Reactividade	Diluição
Alexa Fluor [®] 488	A-11008	Invitrogen	Cabra	IgG Coelho	1:500

II.8 Manipulação experimental de embriões e barbatanas caudais de peixe-zebra

Para a manipulação de embriões, estes foram recolhidos numa caixa de *petri* em meio embrionário cerca de 30 minutos após a oviposição, altura em que se forma a primeira célula⁴⁵. Após a injeção, os embriões foram distribuídos por novas caixas de *petri* e incubados em meio embrionário numa estufa a 28°C, até atingirem o estágio de desenvolvimento necessário. Antes de qualquer manipulação experimental das barbatanas caudais os peixes foram anestesiados conforme o descrito na secção **II.2.3**. Após a manipulação foram colocados em aquários de recuperação a 28,5°C.

II.8.1 Morfolinos

Para analisar funcionalmente a influência da V-ATPase na regeneração, procurou-se interferir com a sua expressão usando a técnica de *knockdown* por morfolinos. Estas moléculas consistem em oligonucleótidos sintéticos, com um tamanho de cerca de 25 bases, que se ligam a regiões do RNA cuja sequência é complementar à sua. Os morfolinos impedem assim o acesso de outras moléculas ao RNA. Quando são desenhados para se ligarem à região 5' não traduzida (5'UTR) do mRNA, a tradução do transcrito é impedida e a proteína que este codifica deixa de ser produzida – *knockdown* do gene –, uma vez que interferem com a progressão do complexo de iniciação do ribossoma⁴⁸.

Os morfolinos injectados (Gene Tools, LLC) têm sequências complementares à região 5' não traduzida do mRNA para a subunidade E₁ da V-ATPase (Tabela 7). Nesta experiência foi também usado um morfolino de controlo (*mismatched*): embora a sua sequência seja muito semelhante, algumas bases foram propositadamente alteradas

relativamente à sequência do morfolino experimental (Tabela 7). Estas modificações impedem que o morfolino *mismatched* se ligue ao mRNA do gene de interesse e, consequentemente, que tenha algum efeito biológico⁴⁸.

Tabela 7 Sequência dos morfolinóis usados para a injeção de embriões e barbatanas caudais. As bases em letra minúscula representam alterações face ao morfolino experimental.

Morfolino	Sequência
<i>zntp6v1e1</i>	TCG GCA TCG CTG AGC GCC ATG ACT G
<i>Mismatched zntp6v1e1</i>	TCc GCA TgG CTG AcC GCg ATG AgT G

Foram usados dois tipos de morfolinóis, com e sem fluoresceína covalentemente ligada. Esta molécula emite fluorescência e permite a avaliação da eficiência de injeção e electroporação. Desta forma, quando não ligada directamente ao morfolino, a fluoresceína é adicionada em separado à solução a injectar.

II.8.2 Injeção e electroporação de morfolinóis

A injeção de morfolinóis em embriões e barbatanas caudais é feita com recurso a um injector Narishige IM 300. As agulhas usadas foram moldadas a partir de capilares de vidro (World Precision Instruments, #1B100-4) num puller. O injector e a agulha foram calibrados com auxílio de uma gráticula (1cm com divisões de 0,1 mm), de forma a que a quantidade de solução injectada fosse, aproximadamente, 14 nL por embrião. Para a injeção em embriões foram usados morfolinóis sem fluoresceína covalentemente ligada.

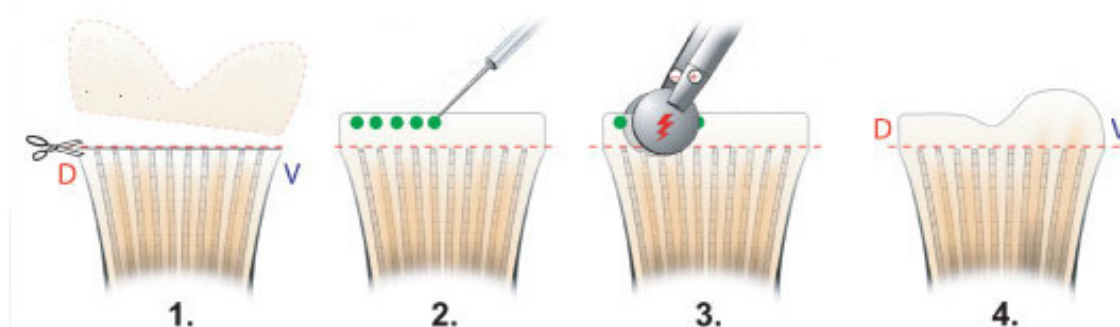


Figura 7 Técnica de injeção e electroporação *in vivo* de barbatanas caudais em regeneração. A barbatana é amputada (1) e deixada regenerar durante 24 horas. O blastema é então injectado com o morfolino experimental na metade dorsal e com o morfolino controlo na metade ventral (2). A barbatana é totalmente electroporada de imediato (3) e deixada regenerar durante mais 72 horas. O fenótipo é avaliado diariamente (4). (Adaptado de Thummel *et al.*, 2006⁴⁹).

Assim, ambos os morfolidos (experimentais e *mismatched*) foram solubilizados em meio Danieau conjuntamente com fluoresceína. A microinjecção foi feita na célula do vitelo até ao estadio de 2 células. Em cada experiência os embriões foram divididos em três grupos: embriões injectados com o morfolido experimental, embriões injectados com o morfolido *mismatched* e embriões não injectados. Este último grupo destina-se à avaliação da qualidade das posturas e para o teste do efeito da injecção em termos de taxas de mortalidade.

Em barbatanas caudais (Fig. 7), a microinjecção foi feita no blastema de cada raio 24h após a amputação (hpa) da cauda. Os morfolidos usados neste procedimento experimental estão covalentemente ligados a fluoresceína, e, portanto, foram solubilizados apenas em meio Danieau. Este tipo de morfolidos foi usado devido ao facto de a fluoresceína conferir carga à molécula de morfolido (normalmente neutra), tornando-o mais susceptível à entrada na célula por acção do campo eléctrico da electroporação. O blastema dos 8 primeiros raios ósseos dorsais foi injectado com o morfolido experimental, enquanto que o morfolido *mismatched* foi injectado nos restantes raios ósseos (ventrais). A parte ventral da barbatana serve, assim, como controlo da parte dorsal do mesmo peixe. Ambos os morfolidos foram injectados a uma concentração de 0,75mM, uma vez que parece ser uma concentração suficientemente alta para conseguir inibir a regeneração⁴⁹. Após a injecção do morfolido, a totalidade da barbatana foi electroporada de imediato usando um eléctrodo de platina plano com 10 mm de diâmetro (CUI650P10, Sonidel™ Limited). A electroporação foi feita num electroporador Electro Square Porator, ECM 830 (BTX®), nas seguintes condições: 10 pulsos de 25V, com a duração individual de 50 milisegundos e 1 segundo de pausa entre cada um deles. Os peixes manipulados foram fotografados diariamente durante os três dias que se seguiram à injecção.

II.8.3 Curva dose-resposta para embriões de peixe-zebra

Tendo em conta que o efeito do morfolido é dependente da sua dose⁴⁹, em primeiro lugar foi necessário fazer uma curva dose-resposta. Por razões de disponibilidade de elevados números de amostras, este procedimento foi realizado apenas em embriões de peixe-zebra.

A curva dose-resposta (Fig. 8) consiste na injecção de várias concentrações de morfolido e na contabilização do número de embriões mortos, anormais e alterados (*morphants*). Desta forma é possível encontrar uma concentração óptima de morfolido, que origine o maior número de *morphants*, e simultaneamente, a menor taxa de mortalidade e a menor quantidade de embriões anormais. Considerando os resultados obtidos, a concentração de morfolido usada para a injecção de embriões de peixe-zebra foi de 0,5 mM.

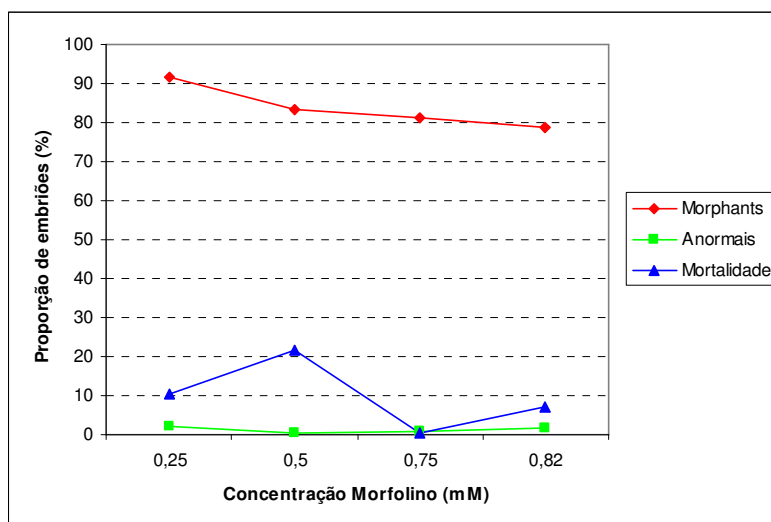


Figura 8 Curva dose-resposta em embriões de peixe-zebra para a injeção do morfolino contra a subunidade E₁ da V-ATPase.

II.9.4 Análise estatística

Os raios ósseos dos peixes injectados (n=6) foram medidos individualmente com o *software* de análise de imagem ImageJ. Para cada estadio, as medições foram agrupadas em dois conjuntos – experimental vs controlo. Os dados foram examinados com o *software* EXCEL. A significância estatística do efeito da injeção dos morfolinolinos na regeneração foi avaliada usando o teste *t* de Student, com distribuição de duas caudas, assumindo variâncias iguais e com um p=0,05.

Capítulo III:

Resultados

III. Resultados

III.1 Padrões de expressão génicos da V-ATPase

III.1.1 Expressão génica da subunidade E_1 em barbatanas caudais

O padrão de expressão da subunidade E_1 da V-ATPase (*zntp6v1e1*) foi caracterizado em vários estádios de regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra. Vinte e quatro horas após a amputação (hpa), esta subunidade é expressa no blastema recém-formado e no tecido conjuntivo do inter-raio distal ao plano de amputação (Fig. 9A). Já durante o início da fase de crescimento regenerativo (48hpa), o domínio de expressão de *zntp6v1e1* no blastema sofre uma expansão, que é concomitante com o aumento dos tecidos em regeneração (Fig. 9B). Em secção longitudinal observa-se que a maioria das células expressa este gene, o que revela o carácter ubíquo da V-ATPase. Porém, a expressão de *zntp6v1e1* parece ser maior nas células do blastema distal e na camada basal do epitélio de ferida (Fig. 9B'). Às 72hpa, o domínio de expressão da V-ATPase no blastema torna-se mais definido (Fig. 9C). Contudo, parecem surgir outros domínios em que este gene é expresso, nomeadamente no tecido conjuntivo do inter-raio que reveste os lepidotrichia em maturação e na região do plano de amputação em cada raio.

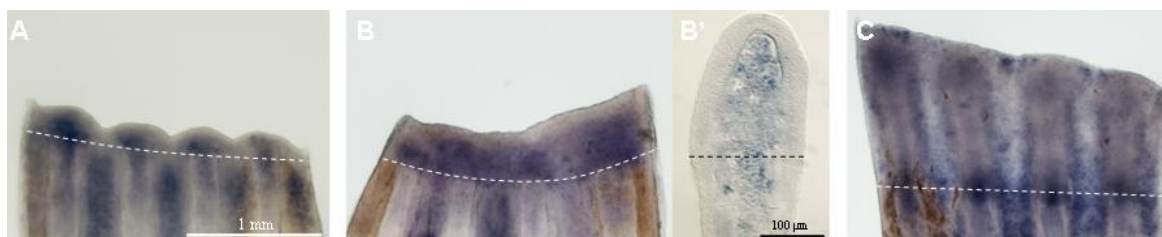


Figura 9 Padrão de expressão génica da subunidade E_1 da V-ATPase em barbatanas caudais em regeneração. A) 24hpa; B) 48hpa; B') secção longitudinal do blastema a 48hpa; C) 72hpa. A linha tracejada representa o plano de amputação.

III.1.2 Expressão génica da subunidade E_1 em embriões

Tal como foi observado na Introdução (secção I.5.4), é possível que haja uma sobreposição entre os mecanismos usados na regeneração e os empregues durante o desenvolvimento embrionário. Desta forma, o padrão de expressão de *zntp6v1e1* foi, em seguida, analisado em vários estádios do desenvolvimento do embrião de peixe-zebra.

Em geral, às 24 horas pós-fertilização (hpf) observa-se que a V-ATPase está presente no sistema nervoso central do embrião, especialmente nos neurónios da zona marginal do tubo neural (figuras 10A e 11A). À medida que este se desenvolve, a expressão é cada vez mais limitada. Às 48hpf, *zntp6v1e1* encontra-se expresso no telencéfalo, rombencéfalo e olho, continuando nos neurónios da zona marginal do tubo neural (figuras 10B e 11E). Finalmente, às 72hpf, a expressão deste gene fica restrita ao encéfalo e à retina do embrião

(Figuras 10D e 11H). Durante o desenvolvimento do embrião, surge um grupo especial de células que expressam fortemente a V-ATPase. As células HR (H^+ -ATPase rich), descritas anteriormente⁵⁰, encontram-se dispersas por todo o embrião e são aqui especialmente visíveis a partir das 48hpf no saco vitelino (Fig. 10B'). Estas células excretam protões, participando no equilíbrio ácido-base do embrião⁵⁰. Assim, constituem um excelente controlo interno, confirmando a especificidade da sonda para *zntp6v1e1*. As células HR mantêm uma grande expressão deste gene até, pelo menos, às 72hpf.

Para validar o padrão de expressão da V-ATPase obtido com a subunidade E₁, procurou-se também obter o padrão de expressão de uma outra subunidade. Hibridações *in situ* para o gene que codifica a subunidade H (*zntp6v1h*) demonstram padrões idênticos ao gene da subunidade E, incluindo a marcação das células HR (Fig. 10C).

Em seguida, a expressão da V-ATPase foi observada mais atentamente nas barbatanas peitorais em formação. Nos estádios mais precoces (24, 29 e 33 hpf) não há qualquer sinal nessa zona (Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente). Só às 44hpf surge marcação, embora ténue (Fig. 11D). Esta continua a ser observada às 48hpf (Fig. 11E). Contudo, devido ao facto de a sonda *sense* de controlo também gerar alguma pigmentação na zona das barbatanas (Fig. 11F), é impossível garantir que a marcação da sonda *antisense* seja, de facto, uma marcação específica. A marcação desaparece quase completamente às 56hpf (Fig. 11G), mantendo-se assim até às 72hpf (Fig. 11H).

Cortes transversais dos mesmos embriões confirmam os dados das *in situs* integrais anteriores. Às 33hpf, a expressão da V-ATPase parece estar dispersa por todo o embrião, incluindo nas barbatanas peitorais (Fig. 12A). Esta marcação, mais uma vez, reflecte o carácter ubíquo desta bomba de protões. Neste estágio, a V-ATPase é expressa mais intensamente nos neurónios periféricos do tubo neural, na ectoderme do flanco do embrião e na camada sincicial do vitelo, sendo também fortemente visível nas células HR da ectoderme. Às 44hpf observa-se expressão da V-ATPase no mesênquima das barbatanas peitorais (Fig. 12B). Quatro horas (48hpf) depois, este sinal diminui notavelmente, contrastando com o concomitante aumento do sinal na parte ventral do tubo neural, em redor da notocorda e no revestimento do intestino em desenvolvimento (Fig. 12C). Finalmente, 72 horas após a fertilização a expressão desta bomba é baixa exceptuando nas células do vitelo. No entanto, ainda é visível algum sinal na parte ventral do tubo neural (Fig. 12D).

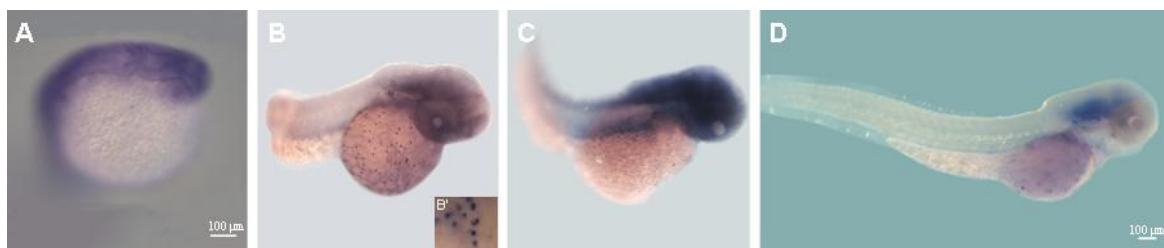


Figura 10 Híbridação *in situ* em embriões de peixe-zebra para a subunidade E₁ da V-ATPase, vista geral. A) 24 hpf; B) 48hpf, B') células HR; D) 72hpf. Em C) observa-se o padrão de expressão da subunidade H da V-ATPase às 48hpf.

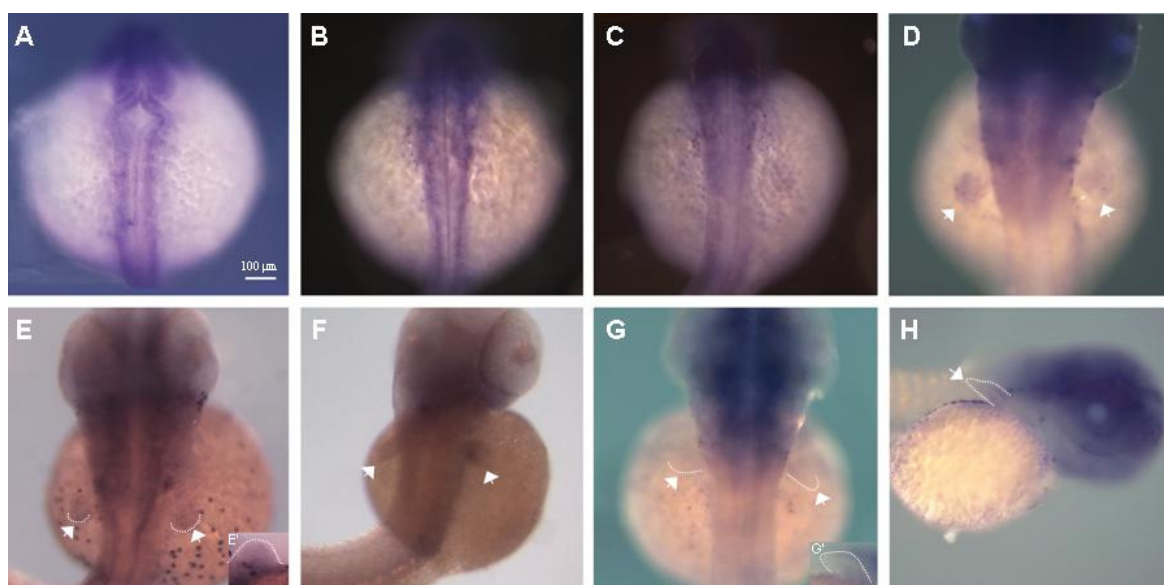


Figura 11 Híbridação *in situ* para a subunidade E₁ da V-ATPase em embriões de peixe-zebra, zona do primórdio das barbatanas peitorais. A) 24hpf; B) 29hpf; C) 33hpf; D) 44hpf; E) 48hpf, sonda *antisense*; E') pormenor do primórdio da barbatana em vista frontal; F) 48hpf; sonda *sense*; G) 56 hpf; G') pormenor da barbatana peitoral em desenvolvimento (vista lateral direita); H) 72hpf. As setas indicam o local das barbatanas peitorais em desenvolvimento.

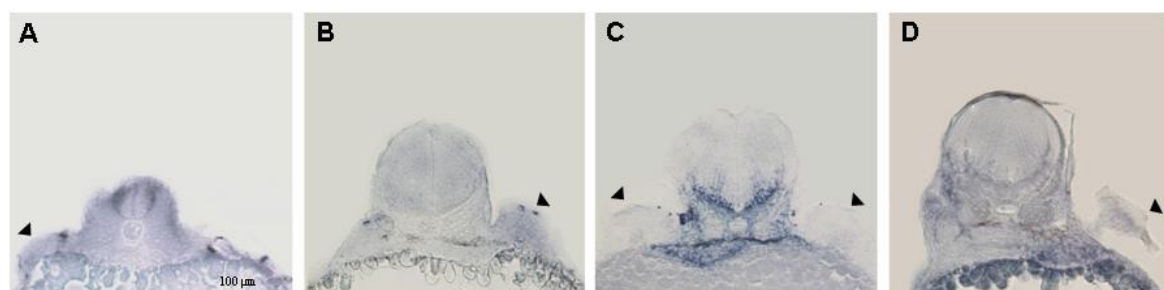


Figura 12 Secções de híbridação *in situ* em embriões para a subunidade E₁ da V-ATPase. A) 33hpf, B) 44hpf, C) 48hpf, D) 72hpf. As setas indicam o local das barbatanas peitorais em desenvolvimento.

III.2 Localização da subunidade E₁ da V-ATPase

Em seguida, observou-se a localização da subunidade E da V-ATPase em secções longitudinais de raios em regeneração (Fig. 13). Vinte e quatro horas após a amputação (Fig. 13A), esta proteína é observada em todas as células epiteliais da barbatana, tecido mesenquimatoso e blastema. No entanto, nota-se uma certa tendência para a sua acumulação tanto na camada basal como na camada mais exterior do epitélio de ferida. Este padrão acentua-se às 48 hpa, verificando-se que a subunidade E está claramente presente na camada basal e nas camadas mais externas do epitélio de ferida (Fig. 13B). Porém, está também localizada nas células do blastema, o que coincide com o padrão de expressão génico da subunidade E₁ obtido por hibridação *in situ*. Finalmente, às 72 hpa (Fig. 13C), a subunidade E é encontrada fundamentalmente nas camadas exteriores do epitélio de ferida, nas células mais caudais do blastema distal e nas células mais rostrais do blastema proximal.

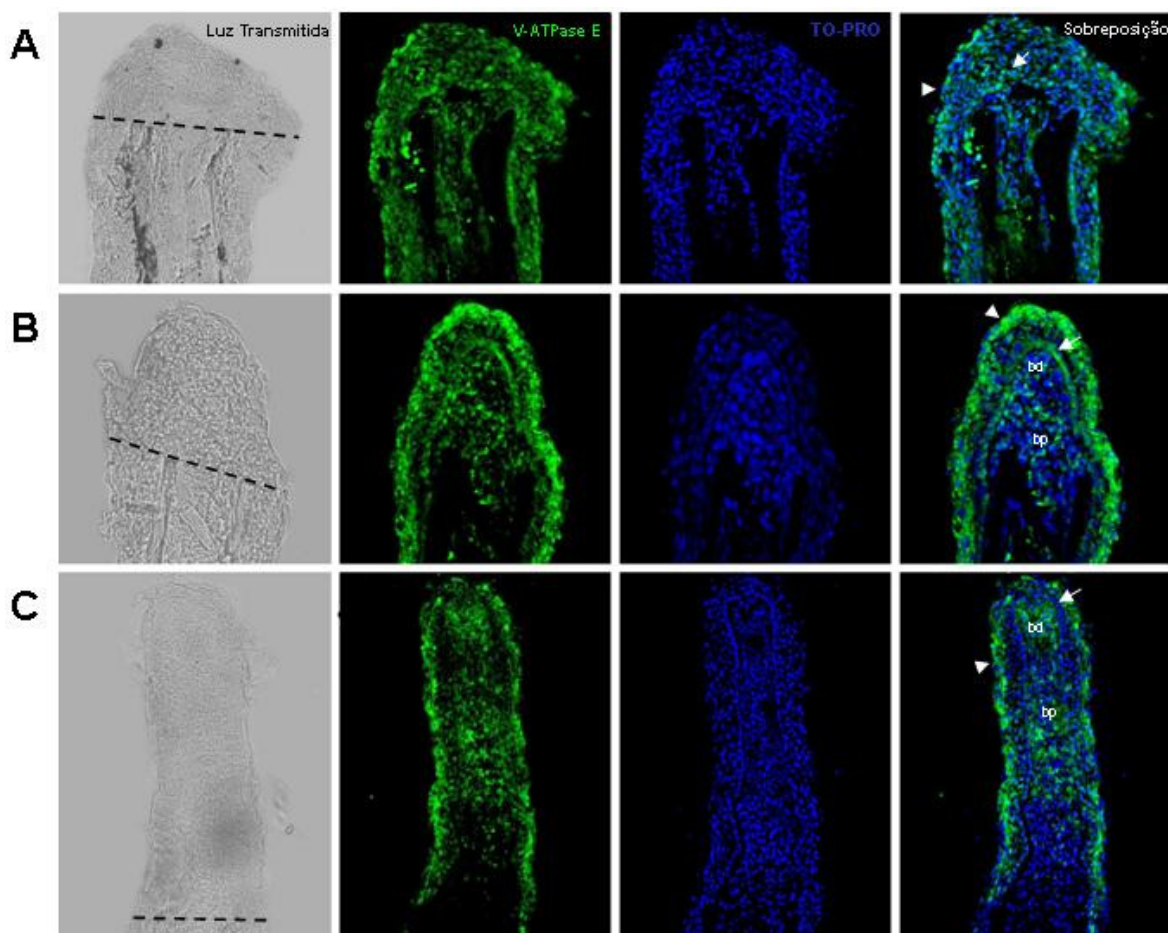


Figura 13 Localização da subunidade E da V-ATPase em secções longitudinais de barbatanas caudais em regeneração. A) 24hpa; B) 48hpa; 72hpa. A linha tracejada representa o plano de amputação. O triângulo indica a camada externa do epitélio de ferida; enquanto a seta aponta para a camada basal do epitélio de ferida. bd: blastema distal; bp: blastema proximal. Ampliação: 200x.

III.3 Análise funcional da V-ATPase

Dado que a subunidade E é expressa durante a regeneração da barbatana caudal, a sua função neste processo foi avaliada através de silenciamento génico por morfolinós.

III.3.1 Validação da especificidade do morfolino em embriões

A existência de uma linha mutante para subunidade E₁ da V-ATPase permitiu confirmar a especificidade do morfolino contra este gene pela comparação dos respectivos fenótipos gerados. *atp6v1e1^{hi577aTg}*⁵¹ é uma mutação por inserção, recessiva, gerada por transgênese. Quando em homozigotia, os indivíduos demonstram alterações nas células pigmentares com concomitante redução na pigmentação. Adicionalmente, apresentam uma redução nas dimensões da cabeça e otólitos, deficiências ao nível do esqueleto, do movimento músculo-esquelético, na resposta aos estímulos externos e no sistema sensorial⁵¹.

Os efeitos do *knockdown* da subunidade E₁ da V-ATPase em embriões só começam a ser notados 48 horas após a fertilização (hpf), estágio em que a pigmentação está mais desenvolvida (Fig. 14). Ao contrário dos controlos (embriões injectados com o morfolino *mismatch*, Fig. 14 D-E), a pigmentação nos embriões *morphants* neste estágio é muito pouco desenvolvida. As células pigmentares perdem a sua característica forma de estrela, tornando-se pequenas manchas arredondadas que estão dispersas por todo o corpo (Fig. 14 A-C). No entanto, as diferenças mais notáveis entre embriões *morphant* e controlo são ao nível comportamental, a partir das 72 hpf. Os embriões *knockdown* demonstram uma redução dramática do comportamento de fuga, que pode ser resultado de incapacidade de resposta a estímulos externos ou, alternativamente, de deficiências no sistema sensorial. Desta forma, conclui-se que o morfolino contra a subunidade E₁ da V-ATPase desenhado é específico, uma vez que dá origem a embriões cujo fenótipo é semelhante ao observado em mutantes para esta subunidade.

III.3.2 Knockdown de *zatp6v1e1* durante a regeneração

O *knockdown* da subunidade E₁ da V-ATPase tem a capacidade de atrasar a regeneração da barbatana caudal (Fig. 15). O crescimento dos raios ósseos dorsais da barbatana é significativamente reduzido com a injeção do morfolino experimental durante as primeiras vinte e quatro horas que se seguem ($p < 0,05$, Fig. 15A); sendo que o comprimento médio dos raios na metade dorsal da barbatana é 11,8% inferior face aos ventrais (Fig. 16). No entanto, esta diferença esbate-se ao longo do tempo: quarenta e oito horas após a injeção deixa de ser estatisticamente significativa e às setenta e duas horas a diferença média entre os raios experimentais e de controlo é de apenas 6,1% (Fig. 16). Concomitantemente, a fluorescência é cada vez mais reduzida, resultado da degradação progressiva do morfolino ao longo do tempo (Fig. 15D-E). Ou seja, a regeneração dos raios dorsais parece deixar de ser inibida no final das primeiras 24 horas após administração do morfolino.

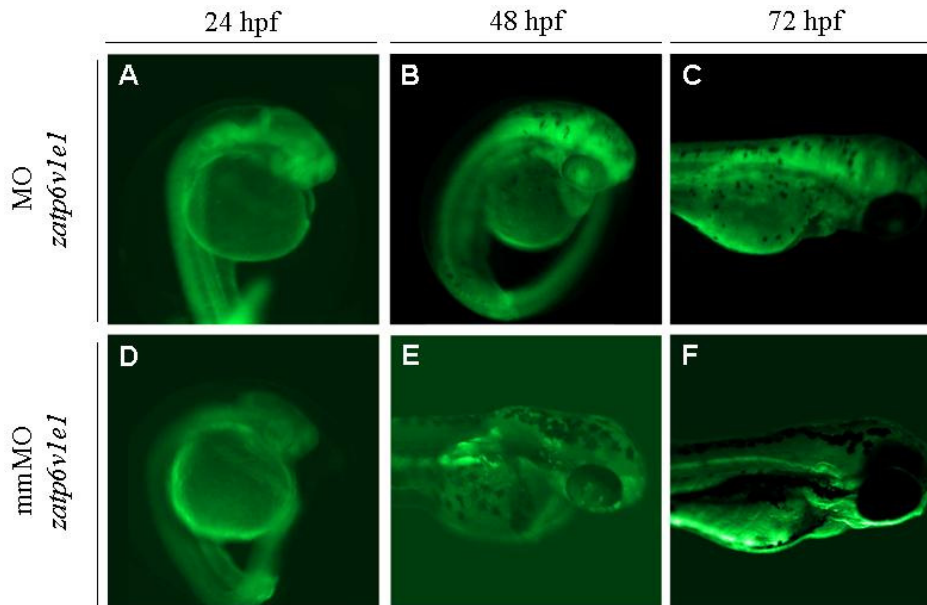


Figura 14 Injeção de morfolinóis (0,5 mM) para a subunidade E₁ da V-ATPase em embriões de peixe-zebra. A-C: morfolino experimental; D-F: morfolino *mismatch* (controlo).

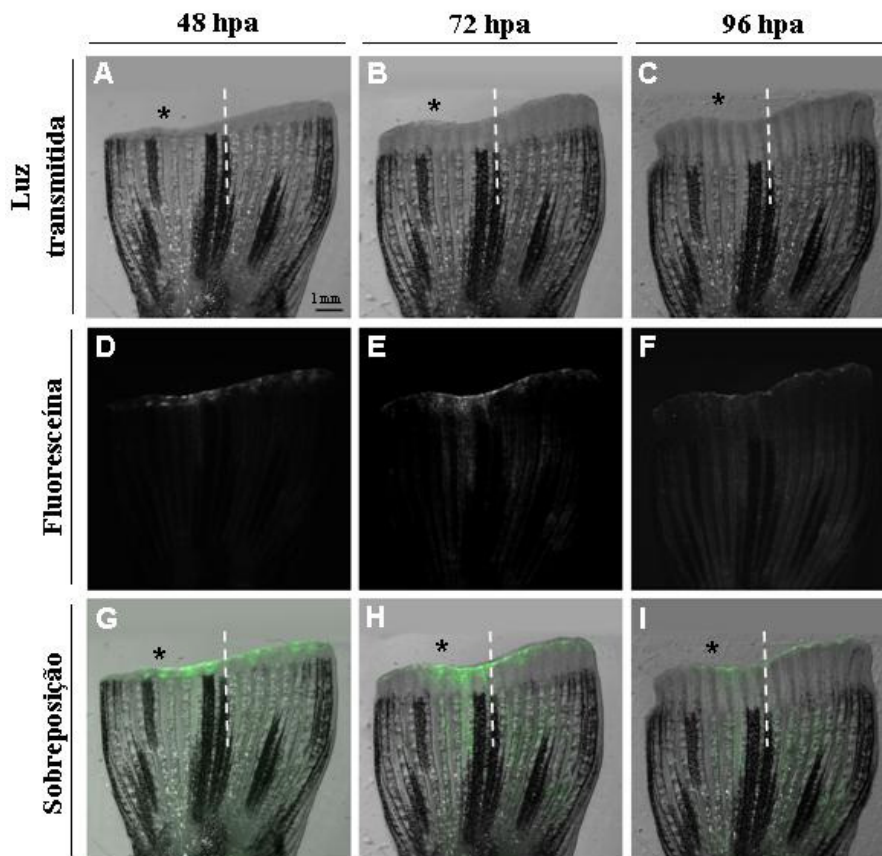


Figura 15 Injeção de morfolinóis para a subunidade E₁ da V-ATPase em barbatanas caudais de peixe-zebra em regeneração (0,75 mM). A, D e G: 48 horas após amputação (hpa); B, E e H: 72 hpa; C, F, I: 96 hpa. O asterisco indica o local de injeção do morfolino experimental (metade dorsal da barbatana). A linha tracejada representa a divisão entre a metade dorsal (à esquerda) e a ventral (à direita).

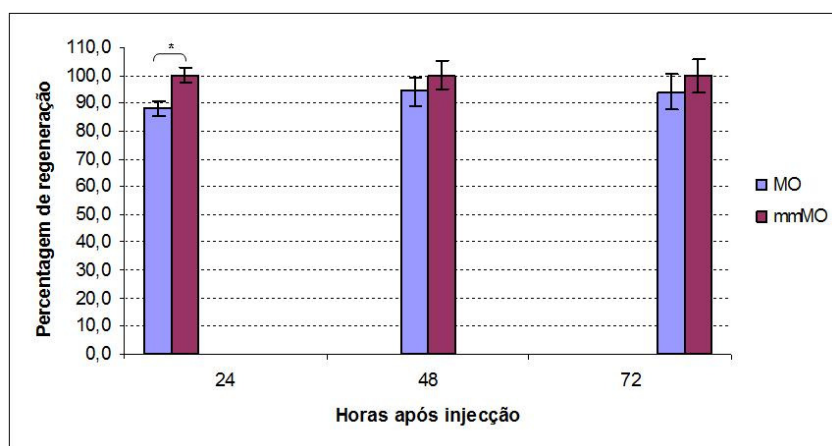


Figura 16 Percentagem de regeneração dos raios dorsais (MO) relativamente aos raios ventrais de controlo (mmMO). O asterisco indica um $p < 0,05$.

Capítulo IV:

Discussão

IV. Discussão

IV.1 Expressão da V-ATPase

Dados de fluxos iónicos previamente obtidos pelo laboratório apontavam para um possível papel dos fluxos de prótons na regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra. Estes resultados foram mais tarde reforçados por análise de perfis de expressão génica (*microarrays*), que demonstraram uma regulação positiva da maioria das subunidades constituintes da V-ATPase a partir das 24 horas após a amputação (hpa).

De forma a complementar e validar estes dados, tornou-se importante localizar esta bomba nos tecidos. A V-ATPase é um grande complexo proteico constituído por múltiplos componentes, logo é pouco prático localizar todo o complexo simultaneamente. Assim, uma das suas subunidades - a subunidade E₁ (*zatp6v1e1*)- foi escolhida para avaliar a distribuição desta bomba de prótons nos tecidos. Embora a sua nomenclatura sugira o contrário, esta é a única isoforma da subunidade E que se conhece em peixe-zebra, sendo homóloga à isoforma E₂ - isoforma ubíqua, presente em todos os tecidos em Mamíferos. A subunidade E foi seleccionada devido ao facto de ser crucial para o funcionamento da bomba⁵². Além disso, também foi demonstrado que tem um papel importante na regulação pós-traducional da V-ATPase, nomeadamente no processo de montagem da bomba (*assembly*)⁵³, na dissociação reversível dependente de glucose⁵⁴ e, possivelmente, também no controlo da eficiência de acoplamento entre o domínio V₀ e V₁⁴⁰. Uma outra vantagem importante é o facto de existirem linhas mutantes para esta proteína disponíveis em colecções.

No geral, os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados anteriormente obtidos pela equipa. As hibridações *in situ* para *zatp6v1e1* realizadas em vários estádios de regeneração da barbatana caudal confirmam que, de facto, este gene é expresso no blastema a partir das 24hpa, mantendo-se aí até às 72hpa (Fig. 9). Às 48hpa observa-se que *zatp6v1e1* é expresso a um nível basal em quase todas as células, o que reflecte o carácter ubíquo deste transportador (Fig. 9B'). Porém, nas células do blastema distal, a V-ATPase é fortemente expressa, o que poderá indicar uma possível hiperpolarização destas células por extrusão de cargas positivas. Este facto é consistente com a menor taxa de proliferação observada no blastema mais distal⁵⁵, uma vez que a hiperpolarização do potencial de membrana está geralmente associado à quiescência das células²⁰. Embora não haja uma fronteira bem definida entre os dois domínios, uma forte expressão da V-ATPase poderia indicar a população de células pouco proliferativas do blastema distal, enquanto baixos níveis de V-ATPase poderiam gerar condições de potencial de membrana permissivas às altas taxas de proliferação observadas no blastema proximal. Existe uma terceira zona, localizada distalmente ao plano de amputação, em que a V-ATPase é também expressa (Fig. 9B' e 9C). Esta poderia corresponder à região de padronização, na

qual ocorrem processos de diferenciação e cuja taxa de proliferação é apenas moderada⁵⁵. De notar que ambos os processos são favorecidos por um potencial de membrana polarizado. Esta expressão da V-ATPase nas células do blastema imediatamente abaixo do epitélio de ferida é consistente com o observado durante a regeneração da cauda em larvas de *Xenopus laevis*¹, o que poderá indicar conservação evolutiva destes mecanismos. O mesmo trabalho descreve também expressão desta bomba no epitélio de ferida, expressão que aqui só foi verificada na sua camada basal. Este assunto será debatido em pormenor mais abaixo. O facto deste transportador, em embriões, estar ausente na ectoderme do primórdio da barbatana (Fig. 12) e dos embriões *morphants* exibirem barbatanas peitorais aparentemente normais (Fig. 14) sugere que o seu papel durante o desenvolvimento destas estruturas é menos importante que durante a regeneração da barbatana caudal (ver secção **IV.3**).

A análise da distribuição da subunidade E por imunohistoquímica revela que a V-ATPase está localizada em todas as células do raio ósseo em regeneração, mas em especial nas camadas mais exteriores do epitélio de ferida. A localização ubíqua deste transportador nas células deve-se, principalmente, à sua importância no funcionamento celular básico (ver secção **I.8.2**). Contudo, a V-ATPase poderá também estar envolvida no evento repolarizador do potencial de membrana que, em larvas de *Xenopus laevis*, parece ser essencial para o início da regeneração da cauda¹. Já a presença da V-ATPase nas camadas mais exteriores do epitélio de ferida desde as 24 até as 72hpa sugere que este transportador poderá ser responsável pelos fluxos de prótons observados durante a regeneração (Fig. 13). Devido às grandes quantidades presentes no citoplasma, é impossível dizer se a V-ATPase está também localizada na membrana plasmática das células do epitélio de ferida. No entanto, tanto a sua localização nos tecidos como o intervalo de tempo no qual a V-ATPase está presente coincidem com o período inicial de actividade dos fluxos de prótons e com a ocorrência de eventos muito importantes no processo de regeneração (ver secção **I.5.3**). Estes dados apoiam a hipótese da importância dos campos eléctricos como moduladores celulares e organizadores espaciais durante a regeneração⁶.

Apesar de, em geral, serem coincidentes, parece haver uma discordância entre o padrão de expressão génica e a distribuição da proteína no epitélio de ferida. Baseado nos primeiros, esperar-se-ia uma maior acumulação da proteína nas células do blastema distal (Fig. 9B') às 48hpa. Contudo, neste estágio de regeneração, a proteína encontra-se fundamentalmente nas camadas mais externas do epitélio de ferida (Fig. 13B), não havendo correspondente expressão génica nessas células. A hipótese mais plausível para falta de consistência nestes resultados é a existência de um desfaseamento entre o *timing* de expressão génica e o *timing* de observação da proteína no epitélio de ferida. Ou seja, a transcrição do gene para a subunidade E₁ da V-ATPase poderia ocorrer num estágio mais

precoce do que o observado em secção longitudinal. Como o tempo de semi-vida dos constituintes da V-ATPase é relativamente longo⁵⁶, isto resultaria numa detecção da subunidade E mesmo após a transcrição do gene ter terminado (48hpa). Os dados de *microarrays* parecem apoiar esta possibilidade, uma vez que a regulação positiva das subunidades da V-ATPase tem início às 24hpa. O epitélio de ferida é constituído por um menor número de células que o blastema; logo esta estrutura poderia estar sub-representada nos transcritos detectados. Assim, os níveis de mRNA detectados às 24hpa podem ser representativos de uma sobreexpressão só no epitélio, que começaria mais cedo que no mesênquima. Uma forma simples de clarificar esta discordância seria então pela obtenção de secções de hibridação *in situ* em estádios de regeneração mais precoces, como às 24 horas após amputação. No entanto, não se pode afastar a possibilidade de esta aparente contradição de resultados poder advir das próprias limitações da técnica de hibridação *in situ*. A digestão da amostra com proteinase K é um dos passos cruciais durante o procedimento, uma vez que determina a permeabilidade do tecido à sonda. Tempos de incubação ou concentrações demasiado elevadas resultam num excesso de permeabilidade da amostra, o que pode gerar falsos resultados negativos. Este problema pode ser contornado com a realização de um controlo positivo, usando um gene que se saiba ser expresso no epitélio de ferida. Para além disto, a detecção colorimétrica usada durante o procedimento tem um limite de sensibilidade⁵⁷. Assim, os níveis de mRNA nas células do epitélio de ferida podem não ser suficientemente elevados para que sejam detectados pela técnica de hibridação *in situ*. Contudo, níveis tão baixos de expressão não justificam convenientemente as diferenças observadas entre níveis expressão génica e proteína, embora complexos de poli-ribossomas possam transcrever um mesmo mRNA intensivamente¹⁴.

IV.2 Silenciamento da V-ATPase em barbatanas caudais

O silenciamento do gene *zatp6v1e1* em blastemas de 24 horas inibe significativamente a regeneração deste órgão durante o primeiro dia após a injeção. Tendo em conta que o *knockdown* de um gene por morfolinolinos demora cerca de 24 horas até que seja efectivo⁴⁹, o estádio de regeneração mais afectado corresponde então ao final do período de maturação do blastema e início do crescimento regenerativo (48hpa). Nesta fase, o blastema especializa-se funcionalmente (subdividindo-se em blastema proximal e distal) e as células desta estrutura começam a sua diferenciação e padronização^{28,55}. A inibição da regeneração por silenciamento da V-ATPase pode ser explicada de duas formas.

A presença desta bomba nas camadas exteriores do epitélio de ferida sugere que a V-ATPase poderá ser responsável pelos fluxos de protões observados durante a regeneração. Como já foi discutido anteriormente, a V-ATPase poderá ter um papel na definição dos dois domínios do blastema, promovendo a hiperpolarização e a quiescência das células do blastema distal. De forma a manter a homeostasia do tecido, seria necessária a extrusão

activa dessas cargas positivas para o exterior do organismo, que seria realizada através das V-ATPases das células do epitélio de ferida. O silenciamento deste transportador impediria assim o processo de alcalinização, perturbando o blastema. Adicionalmente, baixos níveis de expressão da bomba poderiam também causar a despolarização do blastema distal, comprometendo a especialização funcional do blastema e, conseqüentemente, o seu funcionamento. Assim, a diminuição nos níveis da V-ATPase nas células do epitélio de ferida poderia resultar no cessamento do fluxo iónico gerado. O colapso destas correntes de prótons afectaria a homeostasia dos tecidos e processos celulares importantes como a regulação da proliferação celular e a diferenciação do blastema. De facto, o efeito dos fluxos de prótons nestes dois acontecimentos durante a regeneração foi já comprovado em larvas de *Xenopus laevis*¹.

Alternativamente, a V-ATPase poderia ainda influenciar o estabelecimento e manutenção das correntes regenerativas. Muito recentemente foi demonstrado que existem correntes regenerativas em larvas de *Xenopus laevis*, e que estas são negativas e dependentes de sódio³⁸. Para além disso, a sua perturbação implica uma diminuição na taxa de regeneração³⁸. A extrusão activa de prótons através do epitélio de ferida observada durante a regeneração poderia gerar potenciais electroquímicos através da membrana plasmática das células epiteliais. Estes serviriam para energizar processos de transporte iónico que seriam responsáveis pelo estabelecimento e manutenção das correntes regenerativas.

A existência de outros transportadores contribuindo para o fluxo de prótons também não pode ser descartada. Especificamente o antiportador de sódio-prótons (NHE – *sodium-proton exchanger*), que importa iões sódio à custa da saída de um próton a favor do seu gradiente electroquímico. Este transportador faria desta forma a ligação directa entre os fluxos de prótons, que se sabem ser essenciais à regeneração, e as correntes de entrada de sódio observadas durante a regeneração. Este facto explicaria a razão pela qual a inibição deste processo não foi completa aquando do silenciamento da V-ATPase por morfolino. Assim, seria interessante silenciar simultaneamente tanto a V-ATPase como o NHE, de forma a verificar se, tal como em *Xenopus laevis*, as correntes de prótons em peixe são realmente necessárias para o início da regeneração.

O facto de a V-ATPase ter também funções importantíssimas na própria fisiologia da células requer algum cuidado na interpretação destes resultados de silenciamento génico. São assim necessários mais estudos, nomeadamente de proliferação celular e apoptose.

IV.3 Conclusões e direcções futuras

Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com os dados de fluxos iónicos e com os perfis de expressão génica previamente obtidos. Em conjunto, estas observações

indicam um possível papel da V-ATPase no estabelecimento e manutenção de fluxos iónicos essenciais à regeneração. No entanto, não foi possível associar definitivamente a inibição da regeneração causada pelo silenciamento da V-ATPase às perturbações celulares que adviriam da ausência de correntes iónicas endógenas. Desta forma, estes são apenas resultados preliminares, sendo necessária a observação e manipulação de um maior número de indivíduos. Para clarificar esta questão será importante efectuar medições do fluxo de prótons em barbatanas *knockdown* para a V-ATPase, analisando detalhadamente tanto a histologia como a expressão de genes cruciais para a regeneração nestas estruturas. Desta forma, estabelecer-se-ia uma relação de causalidade entre o silenciamento da bomba de prótons, a concomitante diminuição dos fluxos, e os efeitos celulares; que não seria observada nos controlos ventrais. A influência dos campos eléctricos não foi apenas demonstrada na regeneração de apêndices, mas também na regeneração do nervo óptico e ciático². Inclusivamente, testes clínicos estão já em curso para a potencial aplicação destes conhecimentos na regeneração da espinal medula em humanos, com resultados prometedores⁵⁸. Desta forma, um conhecimento mais aprofundado destes sinais celulares é uma mais-valia para o desenvolvimento de novas terapias na medicina regenerativa.

Capítulo V:

Referências Bibliográficas

V. Referências Bibliográficas

- 1 Adams, D. S., Masi, A., and Levin, M., H⁺ pump-dependent changes in membrane voltage are an early mechanism necessary and sufficient to induce *Xenopus* tail regeneration. *Development* **134** (7), 1323 (2007).
- 2 McCaig, C. D., Rajnicek, A. M., Song, B., and Zhao, M., Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiological Reviews* **85** (3), 943 (2005).
- 3 Levin, Michael, Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends in Cell Biology* **17** (6), 261 (2007).
- 4 Nuccitelli, R., Endogenous electric fields in embryos during development, regeneration and wound healing. *Radiat Prot Dosimetry* **106** (4), 375 (2003).
- 5 Song, Bing, Zhao, Min, Forrester, John, and McCaig, Colin, Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo. *J Cell Sci* **117** (20), 4681 (2004).
- 6 Levin, Michael, Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol.* **20** (5), 543 (2009).
- 7 Nuccitelli, R., Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues. *Bioelectromagnetics* (1), 147 (1992).
- 8 Serway, Raymond A., Faughn, Jerry S., Vuille, Chris, and Bennett, Charles A., *Serway's College Physics*, 7th ed. (David Harris, London, 2006).
- 9 Zhao, Min, Electrical fields in wound healing - An overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20** (6), 674 (2009).
- 10 Zhao, M., Agius-Fernandez, A., Forrester, J. V., and McCaig, C. D., Directed migration of corneal epithelial sheets in physiological electric fields. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37** (13), 2548 (1996).
- 11 Zhao, Min et al., Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci* **117** (3), 397 (2004).
- 12 Ferrier, Jack, Ross, Stephen M. , Kanehisa, Junya , and Aubin, Jane E., Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field. *Journal of Cellular Physiology* **129** (3), 283 (1986).
- 13 Wang, Entong, Zhao, Min, Forrester, John V., and McCaig, Colin D., Bi-directional migration of lens epithelial cells in a physiological electrical field. *Experimental Eye Research* **76** (1), 29 (2003).
- 14 Lodish, Harvey et al., *Molecular Cell Biology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000).
- 15 Yao, Li, McCaig, Colin D. , and Zhao, Min Electrical signals polarize neuronal organelles, direct neuron migration, and orient cell division. *Hippocampus* **19** (9), 855 (2009).
- 16 McCaig, C. D., Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *J Cell Sci* **95** (4), 605 (1990).
- 17 McCaig, C. D., Dynamic aspects of amphibian neurite growth and the effects of an applied electric field. *The Journal of Physiology* **375** (1), 55 (1986).
- 18 Zhao, Min, Forrester, John V., and McCaig, Colin D., A small, physiological electric field orients cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (9), 4942 (1999).
- 19 Song, Bing, Zhao, Min, Forrester, John V., and McCaig, Colin D., Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing invivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (21), 13577 (2002).
- 20 Sundelacruz, Sarah, Levin, Michael, and Kaplan, David, Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports* **5** (3), 231 (2009).
- 21 Cone, C. D., Jr. and Cone, C. M., Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Science* **192** (4235), 155 (1976).
- 22 Robinson, Kenneth R. and Mark A., Messerli, Left/right, up/down: The role of endogenous electrical fields as directional signals in development, repair and invasion. *BioEssays* **25** (8), 759 (2003).
- 23 Hotary, K. B. and Robinson, K. R., The neural tube of the *Xenopus* embryo maintains a potential difference across itself. *Brain Research. Development and Brain Research.* **59** (1), 65 (1991).
- 24 Borgens, Richard B. , Rouleau, Marie F. , and DeLanney, Louis E. , A steady efflux of ionic current predicts hind limb development in the axolotl. *Journal of Experimental Zoology* **228** (3), 491 (1983).

- 25 Altizer, A. M. et al., Endogenous electric current is associated with normal development of the
vertebrate limb. *Developmental Dynamics* **221** (4), 391 (2001).
- 26 Wills, Airon A., Kidd, Ambrose R., III, Lepilina, Alexandra, and Poss, Kenneth D., Fgfs control
homeostatic regeneration in adult zebrafish fins. *Development* **135** (18), 3063 (2008).
- 27 Alvarado, A. S. and Tsonis, P. A., Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse
animal models. *Nature Reviews Genetics* **7** (11), 873 (2006).
- 28 Poss, K. D., Keating, M. T., and Nechiporuk, A., Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental
Dynamics* **226** (2), 202 (2003).
- 29 Akimenko, M. A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., and Geraudie, J., Old questions, new tools, and
some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics* **226** (2), 190 (2003).
- 30 Yokoyama, H., Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity.
Development, Growth and Differentiation **50** (1), 13 (2008).
- 31 Galis, Frietson , Wagner, Günter P. , and Jockusch, Elizabeth L. , Why is limb regeneration
possible in amphibians but not in reptiles, birds, and mammals? *Evolution & Development* **5** (2),
208 (2003).
- 32 Borgens, R. B. , McGinnis, M. E. , Vanable, Jr., J. W. , and Miles, E. S. , Stump currents in
regenerating salamanders and newts. *Journal of Experimental Zoology* **231** (2), 249 (1984).
- 33 Borgens, R. B., Vanable, J. W., and Jaffe, L. F., Bioelectricity and regeneration: large currents
leave the stumps of regenerating newt limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America* **74** (10), 4528 (1977).
- 34 Jenkins, L. S., Duerstock, B. S., and Borgens, R. B., Reduction of the current of injury leaving the
amputation inhibits limb regeneration in the red spotted newt. *Developmental Biology* **178** (2), 251
(1996).
- 35 Illingworth, C. M. and Barker, A. T. , Measurement of electrical currents emerging during the
regeneration of amputated finger tips in children. *Clinical Physics and Physiological Measurement*
1, 87 (1980).
- 36 Nuccitelli, R., in *Current Topics in Developmental Biology, Vol 58* (2003), Vol. 58, pp. 1.
- 37 Altizer, A. M., Stewart, S. G., Albertson, B. K., and Borgens, R. B., Skin flaps inhibit both the
current of injury at the amputation surface and regeneration of that limb in newts. *Journal of
Experimental Zoology* **293** (5), 467 (2002).
- 38 Reid, B., Song, B. , and Zhao, M., Electric currents in Xenopus tadpole tail regeneration. *Dev. Biol.*
335 (1), 198 (2009).
- 39 Hinton, Ayana, Bond, Sarah, and Forgac, Michael, V-ATPase functions in normal and disease
processes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **457** (3), 589 (2009).
- 40 Forgac, Michael, Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat
Rev Mol Cell Biol* **8** (11), 917 (2007).
- 41 Diepholz, Meikel, Börsch, Michael, and Böttcher, Bettina, Structural organization of the V-ATPase
and its implications for regulatory assembly and disassembly. *Biochemical Society Transactions*
036 (5), 1027 (2008).
- 42 Cipriano, D.J. et al., Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1777**
(7-8), 599 (2008).
- 43 Briggs, J. P., The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of
Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **282** (1), R3 (2002).
- 44 Thisse, Christine and Thisse, Bernard, High-resolution in situ hybridization to whole-mount
zebrafish embryos. *Nat. Protocols* **3** (1), 59 (2008).
- 45 Kimmel, Charles B. et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental
Dynamics* **203** (3), 253 (1995).
- 46 Karlsson, Johnny, von Hofsten, Jonas, and Olsson, Per-Erik, Generating Transparent Zebrafish: A
Refined Method to Improve Detection of Gene Expression During Embryonic Development.
Marine Biotechnology **3** (6), 522 (2001).
- 47 Nagaraj, Shivashankar H., Gasser, Robin B., and Ranganathan, Shoba, A hitchhiker's guide to
expressed sequence tag (EST) analysis. *Brief Bioinform* **8** (1), 6 (2007).
- 48 Eisen, J. S. and Smith, J. C., Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense.
Development **135** (10), 1735 (2008).
- 49 Thummel, R. et al., Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of
morpholinos against *fgfr1* and *msxb*. *Developmental Dynamics* **235** (2), 336 (2006).
- 50 Lin, Li-Yih, Horng, Jiun-Lin, Kunkel, Joseph G., and Hwang, Pung-Pung, Proton pump-rich cell
secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am J Physiol Cell Physiol* **290** (2), C371 (2006).
- 51 Golling, Gregory et al., Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for
early vertebrate development. *Nat Genet* **31** (2), 135 (2002).

- 52 Foury, F., The 31-kDa polypeptide is an essential subunit of the vacuolar ATPase in
Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **265** (30), 18554 (1990).
- 53 Hayashi, K. et al., Defective assembly of a hybrid vacuolar H(+)-ATPase containing the mouse
testis-specific E1 isoform and yeast subunits. *Biochim Biophys Acta*. **1777** (10), 1370 (2008).
- 54 Lu, Ming et al., Interaction between Aldolase and Vacuolar H+-ATPase. *Journal of Biological
Chemistry* **276** (32), 30407 (2001).
- 55 Nechiporuk, Alex and Keating, Mark T., A proliferation gradient between proximal and msxb-
expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development* **129** (11), 2607 (2002).
- 56 Benito, B., Moreno, E., and Lagunas, R., Half-life of the plasma membrane ATPase and its
activating system in resting yeast cells *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1063** (2),
265 (1991).
- 57 Speel, Ernst J. M., Hopman, Anton H. N., and Komminoth, Paul, Amplification Methods to
Increase the Sensitivity of In Situ Hybridization: Play CARD(S). *J. Histochem. Cytochem.* **47** (3),
281 (1999).
- 58 Shapiro, Scott et al., Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a
Phase 1 trial. *Journal of Neurosurgery: Spine* **2** (1), 3 (2005).

ANEXOS

Anexo 1

Sequências de cDNA clonadas

EST *zatp6v1e1* de *Danio rerio* – 1264 pb

CCAGTCTATTTTCACGGCTCTGACACTGTACGATCAACCCTTTTCGAGTAAATTTAAAATCTAAAGGCTTT
CAGGATTATTTTCGAGCTGTATTTGCAAAGCAGACGCCTTTCTCTGCCACAAAACCGAGCTTTATCTGTCCGG
CGGAGTTTAAAATCCTCTTAAAGCAGCAGGAGCAGGATCTGCAGTCATGGCGCTCAGCGATGCCGACGTC
CAGAAACAGATCAAGCACATGATGGCTTTCATTGAGCAGGAGGCAATGAAAAAGCCGAGGAGATAGAC
GCCAAGGCGGAGGAGTTTAAACATTGAGAAAGGTGCGACTGGTTCAGACCCAGCGCTTGAAGATCATGG
AGTATTACGAAAAGAAGGAGAAACAGATCGAACAGCAGAAGAAAATTCAAATGTCCAATCTGATGAATC
AGGCCAGACTGAAGGTCCTGAAGGCCAGAGATGACATGATTGCGGATTTACTAAACGACGCACGTACGCG
ACTAGCGAATGTAGCCAGAGATCCGTCCAGATACGCGGCTCTGATGGACGGACTGGTTCAGGGTTTTT
ACCAGCTGCTGGAACCTAAAGTGACCATCCGTGCGCAACAGGATGTGGGGATTGTGCAGGCCGCCGT
CCAGAAAAACATCTCCATCTACAAAGCAGCAGTAAAGAACAATCTAGAAGTGCGCATCGACCAAGACAAC
TTCCTCTCTCCAGAAATCTCTGGAGGTATTGAGCTCTATAATGCGGATGGGAAAATTAAGTGGCAAACAC
TCTGGAGAGCCGACTGAGTTCATCGCACAGCAGATGATGCCTGAAATACGAGTCGCCCTGTTGGTGCGG
AACCAGAACCGCAAGTTCATGGATGATGGATCTTCCGGAGATCGGCAGTGTGTTGATGTTGATTTTTTATT
TTGATGTTAAAAATCCATTCCTGCGTCTCTATCTGTACTGTATTTAAGAAGACATCACCTGTGTGTGTGT
GTGTGTATATGATTATCATTGCTGTATAAAGATCAAATAGTGTCTGCACATTTCTGTGTTAGATTATGA
ATCAATTAAGCTCCGTTATGTTCCATAAAGTCTTAAAGTGATGCATAACCTCGCTTCATGAAGAAAAT
ATGACTTTTTTTATTTGCATTCTGTAATGAGGAGCATGATCTGTATATCGGAAGCAAACGTGCTGTGCGAT
GATGCAAAAAGACTATATTGATGTGAAAACCTATAATGAAAACCCATATGGCCAGTAAAAA

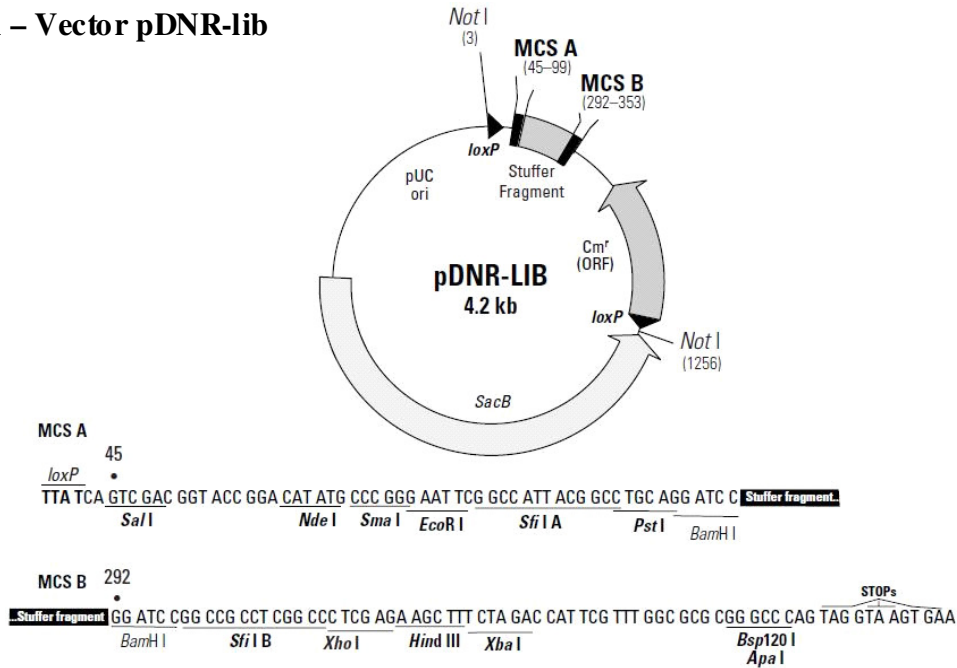
***zatp6v1h* de *Danio rerio* – 658 pb**

GGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTGATGGATCTGAGGACAAGCAAGCAATTCTACAAACGAAGGACAT
CAGTGTGCAAAGACCTTCTCAACCTTATGGCTCATATATCTAAGGAGCAAACCGTTCAGTACATCCTGAC
CCTGATTGATGACACACTGCAGGAAAATCATCAGAGAGTGAATATCTTCTTTGATTATGCAAAGAAGACTA
AGAATACAGCCTGGTCATACTTCCCTCCAATGCTGAACCGTCAAGACCTCTTACTGTTACATGGCTGCC
AGAATCATAGCCAAACTGGCTGCCTGGGACGTGACCTGATGGAAGGCAGTGACTTGAACTACTACTTCA
ACTGGATTAAGACCCAGCTCAGCTCTCAGAGCTCCAGTACGTTTCAGTGTGTCGCTGGCTGCCTACAGCTG
ATGCTGAGAGTCAATGAATACAGATTTGCCTGGGTGGAGGCCGATGGAGTGAATGCATCACGGCAGTGC
TGAGCAATAAGTGTGGCTTCCAGCTGCAGTATCAGATGATCTTCTGCGTGTGGCTCCTGGCATTACAGCCG
CAGCTCTGCGAACAGCTGCGGCGCTACAACGTGGTACCAGCCCTCTCCGACATCCTCCAAGAGTCTGTCAA
AGAGAAGGTCACTCGCATAATTCTGGCTGCTTTTCAGGAACCTGCTGGAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCC
GCCTGCAGGTCGACCATAGGGAGAGCTCCCAACGCGTGAGCAGTCTATACTTCCGGTGGGT

ANEXO 2

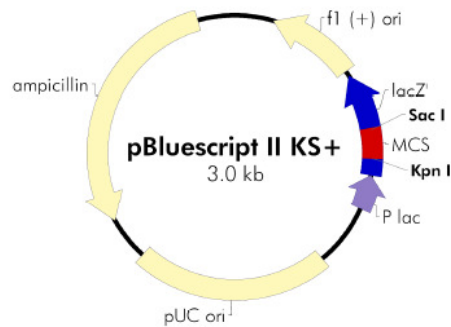
Mapas dos vectores plasmídicos usados

Mapa 1 – Vector pDNR-lib

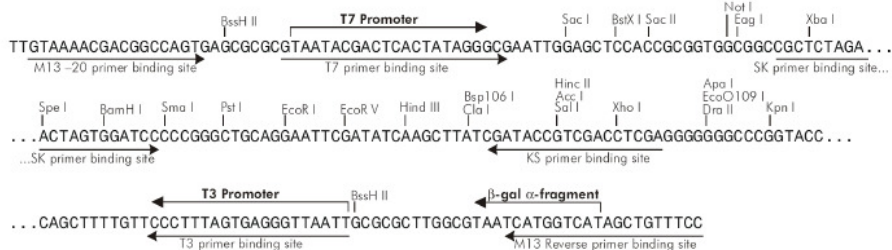


Mapa 2 – Vector pBluescript KS +

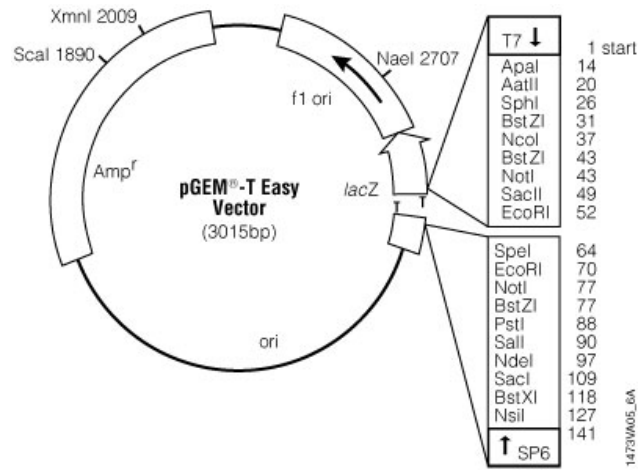
f1 (+) origin 135–441
 β-galactosidase α-fragment 460–816
 multiple cloning site 653–760
 lac promoter 817–938
 pUC origin 1158–1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region
 (sequence shown 598–826)



Mapa 3 – Vector pGEM[®]-T Easy



ANEXO 3 Protocolos Experimentais

Todas as informações relativamente a reagentes e soluções sublinhados no texto encontram-se no Anexo 4.

A3.1 Protocolo de reacção de PCR

1. Adicionar num microtubo de PCR:

Reagentes	Quantidades
cDNA	2 µg/µL
Tampão Taq DNA polimerase	1X
MgCl ₂ 25mM	2,5 mM
dNTPs 25mM	0,25 mM
Primer Fw 10pmol/uL	1 pmol/L
Primer Rv 10pmol/uL	1 pmol/L
Água	q.s
Volume total	50 µL

2. Colocar a mistura num termociclador com o seguinte programa:

Temperatura	Tempo de reacção	Número de ciclos
96°C	4'	-
94°C	1' 30''	x 35 ciclos
56°C	1' 30''	
72°C	1' 30''	
72°C	10'	-
4°C	2h	-

3. Analisar o produto de PCR por electroforese em gel de agarose.

A3.2 Protocolo de Ligação

De modo a aumentar a eficiência desta reacção o DNA de interesse foi utilizado num excesso molar de 3 vezes em relação ao vector de clonagem.

1. Calcular a quantidade de inserto a utilizar para a reacção, segundo a fórmula:

$$= \frac{\text{ng de vector} \times \text{tamanho da sequência inserida (Kb)} \times (\text{razão da sequência inserida:vector})}{\text{tamanho do vector (Kb)}}$$

2. Adicionar num microtubo de centrífuga de 1,5 mL:

Reagentes	Quantidades
DNA inserto	3X
Vector	1X
T4 ligase	1U
Tampão de ligação 10X	1X
Água	q.s
Volume total	10 µL

3. Incubar a a 16°C durante a noite.

A3.3 Protocolo de transformação bacteriana

1. Descongelar lentamente (em gelo) 50 µL de células competentes *E. Coli DH5α*.
2. Adicionar a quantidade apropriada de DNA ao microtubo que contém as células.
3. Colocar em gelo durante 30 minutos.
4. Incubar as células a 42°C durante 1 minuto (choque térmico).
5. Incubar 2 minutos em gelo.
6. Adicionar 700 µL de meio LB líquido em condições de assépsia, e incubar durante 1 hora num banho seco a 37°C, com agitação (300rpm).
7. Plaquear em meio LB sólido com ampicilina e incubar numa estufa a 37°C durante a noite.
8. Retirar da estufa e armazenar a 4°C.

A3.4 Protocolo de análise de restrição

1. Adicionar num microtubo de centrífuga de 1,5mL:

Reagentes	Quantidades
DNA	1 µg
Enzimas de restrição (<i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>)	10U
SuRE/Cut Buffer H 10X	1X
Água	q.s.
Volume total	20 µL

2. Incubar numa estufa a 37°C durante 2-3 horas.
3. Analisar em gel de agarose a 1%.

A3.5 Protocolo de Sequenciação

O procedimento de sequenciação foi efectuado segundo o protocolo do *kit BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing*:

1. Adicionar, para cada reacção:

Reagentes	Quantidades
DNA	300-500ng
Tampão de sequenciação 5X	2µL
Mistura finalizadora de reacção	2µL
Primer (T3, T7 ou SP6)	3,2 pmol
Água	q.s
Volume total	10µl

2. As misturas foram sujeitas ao seguinte programa de PCR num termociclador:

Temperatura	Tempo de reacção	Número de ciclos
96°C	1 minuto	-
96°C	10 segundos	x 25 ciclos
50°C	5 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	2 horas	-

3. Precipitação do DNA:

- a) Transferir o conteúdo de cada um dos tubos para um microtubo de centrífuga de 1,5mL, contendo 10 μ L de água, um décimo do volume total de acetato de sódio, e dois volumes e meio de etanol absoluto.
- b) Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
- c) Centrifugar durante 30 minutos a 4°C e a 14000 rpm.
- d) Retirar o sobrenadante e lavar o sedimento com 250 μ L de etanol a 70%.
- e) Centrifugar durante 15 minutos a 4°C e a 14000 rpm.
- f) Eliminar o sobrenadante e deixar secar o sedimento à temperatura ambiente.

A3.6 Protocolo de desfosforilação de vector plasmídico

1. Adicionar, num microtubo de centrífuga de 1,5mL:

Reagentes	Quantidades
Vector	200 ng
SAP	1U
Tampão de desfosforilação 10X	1X
Água	q.s
Volume total	10 μ L

2. Incubar durante 10 minutos a 37°C.
3. Incubar a mistura durante 15 minutos a 65°C (iInactivação do enzima)
4. Adicionar directamente os reagentes necessários para a ligação.

A3.7 Protocolo de digestão e precipitação de DNA

1. Adicionar num microtubo de centrífuga de 1,5mL:

Reagentes	Quantidades
DNA	10µg
Enzima de restrição (<i>EcoRI</i> ou <i>XhoI</i>)	10U
SuRE/Cut Buffer H 10X	1X
Água	q.s.
Volume total	20µL

2. Incubar numa estufa a 37°C durante 2-3 horas.
3. Analisar em gel de agarose a 1%. A observação de apenas uma banda indica que a reacção foi bem sucedida (plasmídeo completamente linearizado).
4. Adicionar 80 µL de água ao microtubo de centrífuga anterior, de modo a perfazer um volume total de 100 µL.
5. Adicionar igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizar a mistura.
6. Centrifugar durante 3 minutos a 13600rpm, à temperatura ambiente.
7. Transferir fase superior para um novo microtubo de centrífuga. Adicionar um décimo do volume de acetato de sódio e dois volumes e meio de etanol a 100%.
8. Incubar durante 30 minutos a -80°C.
9. Centrifugar durante 30 minutos a 4°C, a uma velocidade de 14000rpm.
10. Remover o sobrenadante e lavar o sedimento resultante com 500 µL de etanol a 70%.
11. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C, a uma velocidade de 14000rpm.
12. Eliminar o sobrenadante e deixar secar o sedimento à temperatura ambiente.
13. Ressuspender em água MiliQ. Guardar a -20°C até que o DNA seja utilizado.

A3.8 Protocolo de transcrição *in vitro* para síntese de sonda de RNA

1. Colocar, num microtubo de centrífuga de 1,5 mL:

Reagentes	Quantidades
DNA molde linearizado	1 µg
Tampão de transcrição 5X	1X
Mistura de ribonucleótidos DIG 10X	1X
Inibidor de RNAses (RNAsin)	20U
RNA-polimerase	20U
Água	q.s
Volume total	20 µL

2. Incubar durante 3 a 4 horas, numa estufa a 37°C.

A3.9 Protocolo de precipitação de RNA

1. Adicionar 80 µL de água ao microtubo de centrífuga anterior, de modo a perfazer um volume total de 100 µL.
2. Adicionar igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizar a mistura.
3. Centrifugar durante 3 minutos a 13600rpm, à temperatura ambiente.
4. Transferir fase superior para um novo microtubo de centrífuga. Adicionar um décimo do volume de cloreto de lítio e dois volumes e meio de etanol a 100%.
5. Incubar durante 30 minutos a -80°C.
6. Centrifugar durante 30 minutos a 4°C, a uma velocidade de 14000rpm.
7. Remover o sobrenadante e lavar o sedimento resultante com 500 µL de etanol a 70%.
8. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C, a uma velocidade de 14000rpm.
9. Eliminar o sobrenadante e e deixar secar o sedimento à temperatura ambiente.
10. Ressuspender em água MiliQ. Guardar a -20°C até a sonda ser utilizada.

A3.10 Protocolo de hibridação *in situ* em embriões de peixe-zebra

Primeiro dia

1. Re-hidratar o material biológico numa série crescente de metanol em PBT:
 - a) 1x 5 minutos em 75% MetOH/PBT.

- b) 1x 5 minutos em 50% MetOH/PBT.
 - c) 1x 5 minutos em 25% MetOH/PBT.
2. Lavar 2 x 5 minutos com PBT.
 3. Pré-fixar em PFA durante 20 minutos a 4°C, sem agitação.
 4. Lavar novamente com PBT e incubar em solução de Proteinase K, sem agitação, à temperatura ambiente e durante o período de tempo apropriado (Tabela 1).

Tabela 1 Tempos médios de incubação em solução de proteinase K para embriões de peixe-zebra.

Amostra	Tempo	Tempo médio de incubação (minutos)	Concentração de pK
Embriões	24 hpf	2	10µg/mL
	29 hpf		
	33 hpf	3	
	44 hpf	4	
	48 hpf		
	56 hpf	6	
	72 hpf	8	

5. Lavar com PBT 5 x 5 minutos, sem agitação, de forma a parar a reacção de digestão.
6. Fixar novamente com PFA, sem agitação, durante 20 minutos a 4°C.
7. Lavar 2 x 5 minutos em PBT.
8. Lavar brevemente o material biológico em água estéril.
9. Incubar numa solução de anidrido acético/trietanolamina durante 10 minutos e sem agitação.
10. Lavar brevemente em água estéril.
11. Lavar novamente 2 x 5 minutos com PBT.
12. Pré-hibridação: incubar as amostras durante 1 hora a 70°C em solução de hibridação.
13. Diluir a sonda em solução de hibridação previamente aquecida, para que a sua concentração final seja de 500 ng/mL.

14. Descartar a solução anterior e substituir pela solução de hibridação com sonda. Hibridar durante a noite (cerca de 16 horas), sem agitação.

Segundo dia

1. Lavar com de soluções de Formamida/SSC progressivamente menos estridentes, a 70°C e sem agitação:
 - a) 50% formamida/5X SSCT durante 30 minutos.
 - b) 50% formamida/2X SSCT durante 30 minutos.
 - c) 25% formamida/2X SSCT durante 30 minutos.
 - d) 2X SSCT durante 30 minutos.
 - e) 0,2X SSCT durante 30 minutos.
2. Lavar em PBT 2 x 5 minutos.
3. Incubar em solução de bloqueio I durante 1 hora.
4. Adicionar à solução de bloqueio I o anticorpo anti-digoxigenina-AP, na razão de 1:8000.
5. Descartar a solução anterior e substituir pela solução de bloqueio com anticorpo. Incubar durante a noite a 4°C.

Terceiro dia

1. Lavar 6 x 15 minutos em PBT.
2. Lavar 3 x 15 minutos em solução de NTMT com levamisol.
3. Substituir a solução anterior por solução de revelação BM Purple. Incubar no escuro, sem agitação, e à temperatura ambiente até que a marcação atinja a intensidade desejada.
4. Lavar 5 x 5 minutos em PBT, para parar a reacção de revelação.
5. Fixar em PFA durante 20 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o material biológico para uma solução de azida. Guardar a 4°C.

A3.11 Protocolo de hibridação *in situ* em barbatanas caudais de peixe-zebra

Primeiro dia

1. Re-hidratar o material biológico numa série crescente de metanol em PBT:
 - a) 1x 5 minutos em 75% MetOH/PBT.

- b) 1x 5 minutos em 50% MetOH/PBT.
 - c) 1x 5 minutos em 25% MetOH/PBT.
2. Lavar 2 x 5 minutos com PBT.
 3. Incubar o material biológico durante 1 hora em solução de peróxido de hidrogénio, sem agitação.
 4. Pré-fixar em PFA durante 20 minutos a 4°C, sem agitação.
 5. Lavar novamente com PBT e incubar durante 15 minutos, sem agitação, em solução de Proteinase K a 1 µg/mL.
 6. Lavar com glicina em PBT 5 x 5 minutos, sem agitação, para parar a reacção de digestão.
 7. Fixar em PFA-glutaraldeído, sem agitação, durante 20 minutos a 4°C.
 8. Lavar 2 x 5 minutos em PBT.
 9. Lavar brevemente o material biológico em água estéril.
 10. Incubar numa solução de anidrido acético/trietanolamina durante 10 minutos, sem agitação.
 11. Lavar brevemente em água estéril.
 12. Lavar novamente 2 x 5 minutos com PBT.
 13. Pré-hibridação: incubar as amostras durante 1 hora a 70°C em solução de hibridação.
 14. Diluir a sonda em solução de hibridação previamente aquecida, para que a sua concentração final seja de 500ng/mL.
 15. Descartar a solução anterior e substituir pela solução de hibridação com sonda. Hibridar durante a noite (cerca de 16 horas), sem agitação.

Segundo dia

1. Lavar com de soluções de Formamida/SSC progressivamente menos estridentes, a 70°C e sem agitação:
 - a) 50% formamida/5X SSCT durante 30 minutos.
 - b) 50% formamida/2X SSCT durante 30 minutos.
 - c) 25% formamida/2X SSCT durante 30 minutos.
 - d) 2X SSCT durante 30 minutos.

e) 0,2X SSCT durante 30 minutos.

2. Lavar em MABT 2 x 5 minutos.
3. Incubar em solução de bloqueio II durante 1 hora.
4. Adicionar à solução de bloqueio II o anticorpo anti-digoxigenina-AP, na razão de 1:8000.
5. Descartar a solução anterior e substituir pela solução de bloqueio com anticorpo. Incubar durante a noite a 4°C.

Terceiro dia

1. Lavar 6 x 15 minutos em MABT com levamisol.
2. Lavar 3 x 15 minutos em solução de NTMT com levamisol.
3. Substituir a solução anterior por solução de revelação BM Purple. Incubar no escuro, sem agitação, e à temperatura ambiente até que a marcação atinja a intensidade desejada.
4. Lavar 5 x 5 minutos em PBT, de forma a parar a reacção de revelação.
5. Fixar em PFA durante 20 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o material biológico para uma solução de azida. Guardar a 4°C.

A3.12 Protocolo de inclusão de amostras em gelatina

1. Fixar o material biológico em PFA.
2. Lavar 5 x 5 minutos em PBS e incubar numa solução de PBS com sacarose durante a noite a 4°C.
3. Lavar 3 x 3 horas em PBS com sacarose, a 4°C.
4. Colocar as amostras individualmente em solução de Gelatina e incubar a 37°C durante 1 a 2 horas.
5. Revestir o fundo dos moldes com uma camada de solução de gelatina, deixando-a solidificar à temperatura ambiente.
6. Após a incubação, verter as amostras no molde, orientá-las convenientemente e deixar solidificar também à temperatura ambiente.
7. Remover o molde, cortar o bloco de gelatina com o tamanho pretendido, e orientar de novo o bloco numa base de cartão.

8. Fixar o bloco com a ajuda de meio de montagem (Tissue Tek O.C.TTM Compound) e congelar a -80°C.

A3.13 Protocolo de imunohistoquímica em amostras seccionadas

1. Incubar as lâminas a 37°C em tampão TBS, até que toda a gelatina envolvente desapareça.
2. Lavar em TBS 3 x 5 minutos e cobrir as lâminas com solução de bloqueio III.
3. Lavar novamente as lâminas 3 x 5 minutos com TBS.
4. Incubar com anticorpo primário diluído em TBS++ durante a noite a 4°C.
5. Lavar com TBS++ 3x 5 minutos, e incubar durante 1 hora em anticorpo secundário diluído em TBS++.
6. Lavar 5 x 5 minutos em TBS e incubar durante 5 minutos com DAPI (1:10000, em TBS).
7. Lavar 5 x 5 minutos em TBS e incubar durante 15 minutos com TO-PRO3 (1:1000 em TBS).
8. Lavar 3 x 5 minutos em TBS e incubar durante 20 minutos em PFA.
9. Lavar 5 x 5 minutos em TBS e montar as lâminas em meio de montagem específico para fluorescência (VECTASHIELD® HardSetTM).

ANEXO 4

Reagentes e soluções usados

Reagentes:

Produto	Fabricante	Referência
Manipulação experimental		
PTU	Sigma-Aldrich	P7629-10G
Tricaína	Sigma-Aldrich	A-5040
Fluoresceína	Thermo Scientific	46409
Extracção de RNA e RT-PCR (II.3.1 e II.3.2)		
Trizol	Invitrogen	15596-026
1 st Strand DNA Synthesis kit for RT-PCR	Roche	11483188001
PCR e extracção de banda em gel de agarose (II.3.3 e II.3.5)		
DNTPs	Fermentas	R1121
MgCl ₂	Fermentas	R0971
Taq DNA Polimerase	Fermentas	EP0402
Tampão Taq (com (NH ₄) ₂ SO ₄ e sem MgCl ₂)	Fermentas	EP0402
QIAquick [®] gel extraction Kit (250)	QIAGEN [®]	28706
Ligação e transformação (II.3.6 e II.3.7)		
Vector pGEM [®] -T Easy	Promega	A1360
T4 Ligase	Roche	10 481 220 001
Tampão de Ligação 10x	Promega	M1801
Subcloning Efficiency [™] DH5 α [™] Competent Cells	Invitrogen	18265-017
Análise de transformantes (II.3.8 e II.3.9)		
Wizard [®] Plus Minipreps DNA Purification System	Promega	A1460
XhoI	Roche	10 899 194 001
EcoRI	Roche	10 703 737 001
SuRE/Cut Buffer H	Roche	11 417 991 001
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing	Applied Biosystems	4337449
<i>Primer T3</i>	Fermentas	SO119
<i>Primer T7</i>	Fermentas	SO118
<i>Primer SP6</i>	Fermentas	SO116
QIAfilter Plasmid Midi Kit (100)	QIAGEN [®]	12245
Desfosforilação (II.4.1)		
SAP	Roche	11 758 250 001
Tampão de desfosforilação 10X	Roche	11 758 250 001

Transcrição de sondas (II.4.3)

T3 RNA Polimerase	Promega	P208C
T7 RNA Polimerase	Promega	P207B
Tampão de transcrição 5X	Promega	P118B
SP6 RNA Polimerase	Promega	P108B
DIG RNA Labeling Mix	Roche	11277073910
RNAsin	Promega	N2111

Hibridação *in situ* (II.5)

Soro de ovelha	Chemicon	S22-100ML
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragmentos	Roche	11 093 274 910
BM Purple	Roche	11442074001
Blocking Reagent	Roche	11096176001

Imunohistoquímica

Soro de cabra	Sigma-Aldrich	G9023
DAPI	Invitrogen	D1306
TO-PRO 3 (1mM)	Invitrogen	T3605
Tissue Tek O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek	4583
VECTASHIELD® HardSet TM Mounting medium	Vector Laboratories	H-1400

Soluções:

Meio embrionário

NaCl	7,5mM
KCl	0,25mM
MgSO ₄	0,5mM
KH ₂ PO ₄	0,075mM
Na ₂ HPO ₄	0,025mM
CaCl ₂	0,5mM
NaHCO ₃	0,35mM
Azul de metileno	0,0002% (v/v)

Solução de PTU

PTU	0,0045%
	em água do sistema

Tricaína

Tricaína	0,01%
	em água do sistema

PFA

PFA	4% em PBS
-----	--------------

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
	Ajustar a pH 7,4 com HCl

PBT

PBS	1x
Tween-20	0,1% (v/v)

Danieu 1X

NaCl	58mM
KCl	0,7mM
MgSO ₄	0,4mM
Ca(NO ₃) ₂	0,6mM
HEPES pH 7,6	5,0mM

TAE 1X

EDTA	2mM
Tris-acetate, pH 8,0	40mM

Acetato de sódio

CH ₃ COONa	3M Ajustar a pH 5,3
-----------------------	------------------------

Cloreto de Lítio

LiCl	4M
------	----

Solução de brometo de etídeo

Et ₂ Br	10 mg/mL em ddH ₂ O
--------------------	-----------------------------------

Luria Broth (LB)

Bacto-tryptone	1% (w/v)
Bacto-yeast extract	0,5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)

Meio LB com ampicilina

Ampicilina	50 µg/mL em meio LB
------------	------------------------

Anidrido acético/ Trietanolamina

Trietanolamina	0,1M
Anidrido acético	26mM

Solução de hibridação

Formamida	60%
SSC, pH 6,0	5x
Tween-20	0,1%
tRNA de levedura	500 µg/mL
Heparina	50 µg/mL em água sem Rnases

Soluções de Formamida/SSC		Estringência*
Formamida	50% (v/v)	1
SSC, pH 6,0	5X	
Tween-20	0,1% (v/v)	
Formamida	50% (v/v)	2
SSC, pH 6,0	2X	
Tween-20	0,1% (v/v)	
Formamida	25% (v/v)	3
SSC, pH 6,0	2X	
Tween-20	0,1% (v/v)	
SSC, pH 6,0	2X	4
Tween-20	0,1% (v/v)	
SSC, pH 6,0	0,2X	5
Tween-20	0,1% (v/v)	

* 1: maior estringência, 5: menor estringência

Solução de bloqueio I

Soro de Ovelha inativado por calor	5% (v/v) em PBT
------------------------------------	--------------------

NTMT com levamisol

Tris-HCl, pH 9,5	100mM
MgCl ₂	50mM
NaCl	100mM
Tween-20	0,1%
Levamisol	0,048% (p/v)

Solução de azida

Azida de Sódio	0,1% em PBT
----------------	----------------

Solução de peróxido de hidrogénio

H ₂ O ₂	6% (v/v) em PBT
-------------------------------	--------------------

Solução de Glicina

Glicina	2mg/mL em PBT
---------	------------------

PFA-Glutaraldeído

Glutaraldeído	0,2% (v/v) em PFA 4%
---------------	-------------------------

MABT

Ácido Maleico	100mM
NaCl	150mM
Tween-20	0,1% (v/v)
	Ajustar até pH 7,5 com NaOH 1N

Solução de bloqueio II

Soro Normal de Bovino	10% (v/v)
Blocking Reagent	2% (p/v) em MABT

MABT com Levamisol

Levamisol	0,0048% (p/v) em MABT
-----------	--------------------------

Solução de PBS com sacarose

Sacarose	10% (p/v) em PBS
----------	---------------------

Solução de gelatina

Gelatina	10% (p/v) em solução de PBS com sacarose
----------	--

TBS

NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
Tris HCl, pH 8,0	25 mM

Solução de bloqueio III

Triton-X	0,5% (v/v)
Soro de cabra	3% (v/v) em TBS

TBS ++

Triton-X	0,1% (v/v)
Soro de cabra	3% (v/v) em TBS