

**INÊS SÁ DA COSTA PEREIRA BORGES**

**Caracterização de duas linhas de peixe-zebra  
mutantes para a elastina no estudo da  
síndrome de Keutel**

*Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas*



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas**

**2021**

**INÊS SÁ DA COSTA PEREIRA BORGES**

**Caracterização de duas linhas de peixe-zebra  
mutantes para a elastina no estudo da  
síndrome de Keutel**

*Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas*

**Mestrado em Ciências Biomédicas - Mecanismos de Doenças**

**Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Leonor Cancela e  
Doutor Paulo Gavaia**

**Local: Laboratório de Biologia Comparativa, Adaptativa e Funcional do Esqueleto  
(BIOSKEL), no Centro de Ciências do Mar (CCMAR)**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas**

**2021**

Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel

**Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Inês Sá da Costa Pereira Borges)

Copyright© 2021, Inês Sá da Costa Pereira Borges

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

*"I feel a thousand capacities spring up in me."*

Virginia Woolf

## **Agradecimentos**

Ao longo deste percurso são várias as pessoas a quem gostava agradecer por todo o carinho e dedicação. Em primeiro lugar aos meus orientadores, à Professora Doutora Leonor Cancela e ao Doutor Paulo Gavaia, pela oportunidade de realizar esta tese de mestrado, pelos conhecimentos partilhados, apoio, compreensão e orientação.

A todos os meus colegas do grupo BIOSKEL que sempre se mantiveram disponíveis para me fornecer uma palavra de conforto e incentivo, em especial à Daniela, Débora, Tatiana, Sunil e Gil que tiveram um papel crítico na realização deste trabalho, por me guiarem e ensinarem a ser e estar neste laboratório. Obrigada.

Ao Doutor Vincent Laizé, que sempre se manteve prestável e disponível para me ajudar, pela sua simpatia e colaboração neste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, às minhas irmãs e aos meus avós, a quem devo tudo o que sou, pelo amor incondicional, por me motivarem e mostrarem que a vida não são só dias maus. Pela arte de terem sempre a palavra certa no momento certo, por estarem sempre presentes e me permitirem a ser feliz.

A todos os meus amigos, os da terra natal, os de Vila Real e restantes companheiros da vida universitária, por todo o carinho, companheirismo, por todos os conselhos e palavras trocadas ao longo desta jornada. A todos vós o meu enorme obrigada e votos de muito sucesso.

Por fim, mas não menos importante ao meu namorado a quem agradeço do fundo do meu coração toda a amizade, carinho, paciência e dedicação. Obrigada por estares presente desde o primeiro dia, por acreditares em mim, por me incentivares e mostrares que posso ser o que quiser, e que na vida tudo é possível.

A todos os que de alguma forma me acompanharam e contribuíram para o meu sucesso académico, o meu mais sincero obrigada!

## Resumo

É essencial que haja um equilíbrio nos processos metabólicos envolvidos no ciclo de remodelação óssea, para que tenhamos um correto e dinâmico funcionamento do sistema musculoesquelético, evitando assim possíveis patologias.

A síndrome de Keutel é uma doença autossômica recessiva rara que está associada a uma mutação específica. O gene afetado codifica a proteína Gla da matriz (MGP), um componente da matriz extracelular. Esta patologia envolve uma alteração de fenótipo e é principalmente caracterizada pela presença de um excesso de calcificação, como resultado de causas genéticas e defeitos bioquímicos. De forma geral, podemos dizer que mutações associadas ao gene da MGP resultam em proteínas alteradas e/ou disfuncionais, responsáveis pelo desenvolvimento de alterações patológicas.

Um outro importante constituinte da matriz extracelular são as fibras elásticas. Constituídas essencialmente por elastina, uma proteína estrutural, podem ser encontradas em tecidos moles, na traqueia, laringe, pavilhão auricular, pele, tendões e cartilagem. A sua principal função é fornecer elasticidade e resistência a tecidos dinâmicos, como os pulmões e as artérias.

Estudos sugerem a existência de uma interligação positiva entre a mineralização anormal, provocada pela presença de MGP mutada, e a degradação de elastina. Assim, foi do nosso interesse investigar a interação entre estas duas proteínas, através da caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina. Por recurso à análise fenotípica, viabilidade reprodutiva, exposição a antagonistas da vitamina K, análise histológica e imunohistoquímica, conseguimos obter alguns resultados que apoiam a hipótese de uma associação entre a existência de uma MGP disfuncional e a consequente degradação de fibras elásticas.

Palavras-chave: síndrome de Keutel; MGP; calcificação; elastina; mutantes.

## **Abstract**

It is essential that there is a balance in the processes involved in the bone remodeling cycle so that we have a good and dynamic functioning of the musculoskeletal system, thus avoiding possible pathologies.

Keutel's syndrome is a rare autosomal recessive disease that is associated with a specific mutation. The affected gene encodes the matrix Gla protein (MGP), an extracellular matrix protein. This pathology involves a change of phenotype and is mainly characterized by the presence of excessive calcification as a result of genetic causes and biochemical defects. In general, we can say that mutations associated with the MGP gene result in altered and/or dysfunctional proteins, thus leading to the development of disease.

Another important component of the extracellular matrix is the elastic fibers. These fibers are made up essentially of elastin, a structural protein, and they can be found in soft tissues, trachea, larynx, pinna, skin, tendons, and cartilage. Their main function is to provide elasticity and resistance to dynamic tissues such as the lungs and arteries.

Studies suggest the existence of a positive interconnection between abnormal mineralization, caused by a mutation in MGP, and the degradation of elastin. Thus, it was of our interest to investigate the interaction between these two proteins, through the characterization of two zebrafish mutant lines for elastin. By using phenotypic analysis, reproductive viability, exposure to vitamin K antagonists, histological and immunohistochemical analysis, we were able to obtain some results that indicate a possible association between a dysfunctional MGP and the consequent degradation of elastic fibers.

Keywords: Keutel's syndrome; MGP; calcification; elastin; mutants



## Índice de matérias

Agradecimentos .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract.....	viii
Índice de matérias .....	ix
Índice de figuras .....	xi
Índice de tabelas .....	xvi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	xvii
1. Introdução .....	1
1.1. Síndrome de Keutel .....	1
1.1.1. História e evolução da doença .....	1
1.1.2. Descrição clínica.....	4
1.1.3. Tratamentos, diagnóstico e prognóstico .....	6
1.2. Proteína Gla da matriz .....	7
1.2.1. Caracterização estrutural do gene e da proteína .....	7
1.2.2. Vitamina K.....	10
1.2.3. MGP enquanto inibidor da calcificação .....	13
1.2.4. Causas e consequências da ausência de MGP .....	15
1.3. Sistema vascular .....	16
1.4. Elastina .....	18
1.4.1. Degradação de elastina e a sua possível interação com a síndrome de Keutel	19
1.5. Peixe-zebra .....	22
2. Objetivos.....	26
3. Materiais e métodos .....	27
3.1. Linhas de estudo e condições de manutenção .....	27
3.2. Experiência de exposição a varfarina com peixes <i>wild type</i> juvenis .....	27
3.3. Genotipagem das linhas Sa17177 e Sa42459 .....	29
3.4. Relações biométricas e análise do fenótipo .....	32

3.5. Estudo bioinformático da estrutura da elastina.....	32
3.6. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos, Sa42459 homozigóticos e <i>wild type</i> adultos .....	33
3.7. Validação de anticorpos anti-elastina em peixes <i>wild type</i> e Sa42459 heterozigóticos .....	35
3.8. Protocolo para obtenção de cortes histológicos .....	36
3.9. Protocolo para obtenção de cortes através de um criostato .....	38
3.10. Protocolo de imunohistoquímica para microscopia ótica .....	39
3.11. Protocolo de coloração de fibras elásticas através da técnica de Verhoeff-Van Gieson .....	40
3.12. Protocolo de coloração com von Kossa .....	43
4. Resultados .....	45
4.1. Experiência de exposição a varfarina com peixes <i>wild type</i> juvenis .....	45
4.2. Genotipagem das linhas Sa17177 e Sa42459 .....	50
4.3. Registo das posturas e mortes ao longo do ensaio experimental .....	51
4.4. Relações biométricas e análise do fenótipo .....	53
4.5. Estudo bioinformático da estrutura da elastina.....	58
4.6. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos.....	65
4.7. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 homozigóticos.....	72
4.8. Experiência de exposição a varfarina com peixes <i>wild type</i> adultos .....	76
5. Discussão .....	79
6. Conclusões e perspectivas futuras .....	83
7. Bibliografia .....	85
8. Anexos .....	92
8.1. Anexo I - Características clínicas da síndrome de Keutel .....	92
8.2. Anexo II – Estrutura do gene que codifica para a Elna no peixe-zebra .....	94
8.3. Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas .....	96

## Índice de figuras

Figura 1.1. Análise morfológica de ratinhos <i>wild type</i> (+/+) e knockout da MGP (-/-). É possível verificar um menor tamanho nos ratinhos MGP -/-. Imagem de Luo et al., 1997. ....	3
Figura 1.2. Esquema temporal desde a descoberta da síndrome de Keutel até à sua interligação com a mutação da MGP.....	4
Figura 1.3. Aparência típica de um paciente com KS, vista de frente (A) e de perfil (B). Identificação por raio-X da presença de calcificações laringotraqueais (C) e de braquitelefalangismo (D). Imagens de Devriendt et al., 1999 (A e B) e de Khosroshahi et al., 2014 (C e D). ....	5
Figura 1.4. Representação esquemática da estrutura do gene (A) e da proteína (B) MGP. Os exões encontram-se numerados de 1-5 (o exão correspondente à caixa vermelha apenas pode ser encontrado em primatas). Os pontos azuis representam os resíduos Gla, enquanto os pontos verdes correspondem aos resíduos fosfoserina. SP- péptido sinal; P- domínio de fosforilação; $\gamma$ - ponto de reconhecimento da enzima $\gamma$ -glutamil carboxilase; AxxF- local de clivagem proteolítica; Gla domain- domínio Gla; C-C - ponte dissulfeto entre duas cisteínas; RR- local de clivagem proteolítica C-terminal. Imagem adaptada de Cancela et al., 2021.....	8
Figura 1.5. Esquema representativo da conversão de glutamato em ácido glutâmico $\gamma$ -carboxilado e a interligação com o ciclo da vitamina K. Glu- ácido glutâmico; Gla- ácido glutâmico $\gamma$ -carboxilado; GGCX- enzima $\gamma$ -glutamil carboxilase; KH <sub>2</sub> - vitamina K na forma reduzida (hidroquinona); KO- vitamina K na forma oxidada (epóxido); K- vitamina K (quinona); VKOR- vitamina K epóxido redutase. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	10
Figura 1.6. Ação da varfarina no ciclo da vitamina K. Glu- ácido glutâmico; Gla- ácido glutâmico $\gamma$ -carboxilado; GGCX- enzima $\gamma$ -glutamil carboxilase; KH <sub>2</sub> - vitamina K na forma reduzida (hidroquinona); KO- vitamina K na forma oxidada (epóxido); K- vitamina K (quinona); VKOR- vitamina K epóxido redutase. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	11
Figura 1.7. Contraste entre a presença e ausência de vitamina K. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	12
Figura 1.8. Esquema representativo das diferenças existentes entre a mineralização óssea e a calcificação vascular. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	13
Figura 1.9. Genes que interagem com a MGP. Imagem retirada de Pathway Commons ao dia 27 de Janeiro de 2021. ....	14

Figura 1.10. Esquema representativo da interação existente entre a ausência de MGP, degradação de elastina e o sistema vascular. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	17
Figura 1.11. Vias envolvidas no processo de remodelação vascular em quatro doenças genéticas. PXE- pseudoxanthoma elasticum; MMP- metaloproteínases da matriz; VSMC- célula muscular lisa vascular; GGCX- enzima $\gamma$ -glutamil carboxilase. Imagem de Bernard van Varik et al., 2012.....	18
Figura 1.12. Esquema das etapas associadas à degradação e calcificação de elastina. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	20
Figura 1.13. Corte histológico da pele, onde se pode observar a epiderme e as duas camadas que formam a derme. Imagem adaptada de Yoshito, 2011. ....	21
Figura 1.14. Calcificação da elástica interna em três tipos de artérias: da artéria de um tecido mole (A), da artéria meníngea (B) e da artéria intracerebral (C). As setas indicam onde se encontram as calcificações. Imagens adaptadas de Meier et al., 2001.....	21
Figura 1.15. Evolução de estudos publicados sobre elastina ao longo dos anos. Gráfico retirado do Pubmed ao dia 22 de Setembro de 2021. ....	22
Figura 1.16. Fases do desenvolvimento do peixe-zebra ao longo do tempo. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	23
Figura 1.17. Alinhamento das sequências proteicas da MGP no <i>Homo sapiens</i> (HsaMGP), ratinho (MmuMGP) e peixe-zebra (DreMGP) através do software T-Coffe. A previsão do local do péptido sinal e do domínio Gla foi realizado com recurso à plataforma InterProScan, enquanto os restantes domínios através do artigo de Laizé et al. (2005). 24	
Figura 3.1. Esquema experimental do protocolo de exposição a varfarina com peixes <i>wild type</i> . n = número de animais por tanque. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	28
Figura 3.2. Electroforese das amostras da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B). ....	31
Figura 3.3. Linhagem e processo de obtenção de peixes-zebra homozigóticos. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	32
Figura 3.4. Esquema experimental do protocolo de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos. n = número de animais por tanque. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	34
Figura 3.5. Imagem representativa da técnica imunohistoquímica para microscopia ótica, utilizando um anticorpo secundário fluorescente. (figura obtida através da aplicação BioRender) .....	39
Figura 4.1. Exemplo representativo de um peixe <i>wild type</i> após a exposição a 25 mg/L de varfarina. Ponta de seta- hemorragia cerebral. ....	45

- Figura 4.2. Mortalidade diária dos três grupos *wild type* expostos a 25 mg/L de varfarina ao longo do período experimental. .... 45
- Figura 4.3. Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para o grupo WT exposto a 0 mg/L de varfarina. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- estrutura ocular; 2- retina; 3- rim; 4- fígado; 5- arcos branquiais; 6- ovários; 7- aorta; 8- coração; 9- células sanguíneas..... 46
- Figura 4.4. Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para o grupo WT exposto a 25 mg/L de varfarina. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- estrutura ocular; 2- retina; 3- arcos branquiais; 4- ovários; 5- testículos; 6- vertebra; 7- vaso e células sanguíneas. .... 47
- Figura 4.5. Análise dos resultados obtidos pela técnica imunohistoquímica, tanto para o grupo controlo como para o grupo tratado com 25 mg/L. A cor verde fluorescente corresponde a tecidos reativos ao anticorpo, enquanto uma cor amarelada a background. 1- rim; 2- células sanguíneas; 3- arcos branquiais; 4- estrutura ocular; 5- intestino; 6- vaso sanguíneo; 7- coração; 8- fémur. .... 49
- Figura 4.6. Posturas da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B) ao longo do ensaio experimental. \* - desova de ovos não viáveis; \*\* - produção de ovos, mas com alguma mortalidade nas primeiras 24h..... 52
- Figura 4.7. Mortalidade da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B) ao longo do ensaio experimental. .... 53
- Figura 4.8. Imagem representativa dos tamanhos de algumas larvas e de peixes adultos. Em A e B podemos observar a linha Sa17177, enquanto que em C e D a linha Sa42459. .... 55
- Figura 4.9. Análise do fenótipo da 2ª geração de peixes mutantes das duas linhas em estudo. Fotos obtidas com uma ampliação de 0,8x. 1- lordose; 2- cifose; 3- escoliose. 57
- Figura 4.10. Proposta de apresentação da estrutura e domínios da proteína elastina. A) Estrutura dos 13 transcritos possíveis para o gene da elastina do *Homo sapiens* (Hsa). B) Comparação da estrutura do transcrito *Hsa,ELN1* com a estrutura proteica do rato (*Mmu,ELN*) e do peixe-zebra (*Dre,ELNa* e *Dre,ELNb*). C) Comparação do transcrito existente em peixes *wild type* (*Dre, ELNa*) com a estrutura proteica das mutações em estudo (*Dre,Sa17177* e *Dre,Sa42459*). Informações obtidas com recurso às plataformas NCBI e InterProScan, apenas para os transcritos validados. (figura obtida através da aplicação BioRender) ..... 59
- Figura 4.11. Alinhamento das sequências proteicas da elastina no *Homo sapiens* (Hsa,ELN1), rato (*Mmu,ELN*) e peixe-zebra (*Dre,ELNa*) através do software T-Coffee. A previsão dos diversos domínios foi realizada graças à plataforma InterProScan..... 65

- Figura 4.12. Mortalidade nos dois grupos da linha Sa42459 heterozigóticos (controle e com exposição a 50 mg/L de varfarina) ao longo do período experimental. .... 66
- Figura 4.13. Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes Sa42459 heterozigóticos, no estado de controle e quando tratados com varfarina. 1-hemorragia cerebral; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados). .... 67
- Figura 4.14. Análise histológica das secções coradas com von Kossa para ambos os grupos experimentais. A cor preta corresponde a locais onde existem depósitos de cálcio, como resultado do tratamento com varfarina. 1- ventrículo; 2- tubo da aorta; 3- bolbo arterioso. .... 68
- Figura 4.15. Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para ambos os grupos experimentais. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- ventrículo; 2- tubo da aorta; 3- bolbo arterioso. .... 69
- Figura 4.16. Análise dos resultados obtidos pela técnica imunohistoquímica nos dois grupos experimentais. A cor verde fluorescente corresponde a tecidos reativos ao anticorpo, enquanto uma cor amarelada a background. 1- coração; 2- aorta; 3- vaso sanguíneo; 4- fémur. .... 71
- Figura 4.17. Exemplo representativo de um peixe Sa42459 homozigótico após a exposição a 50 mg/L de varfarina. Ponta de seta- hemorragia cerebral. .... 72
- Figura 4.18. Mortalidade dos dois grupos da linha Sa42459 homozigóticos (controle e com exposição a 50 mg/L de varfarina) ao longo do período experimental. .... 73
- Figura 4.19. Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes Sa42459 homozigóticos, no estado de controle e quando tratados com varfarina. 1-hemorragias; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- anomalias esqueléticas na formação da cauda; 4- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados). .... 74
- Figura 4.20. Análise do tecido cardíaco de peixes Sa42459 homozigóticos, expostos a 50 mg/L de varfarina, em condições normais (A) e quando observado sob fluorescência (B). .... 75
- Figura 4.21. Análise dos arcos branquiais de peixes Sa42459 homozigóticos em condições normais (A) e quando observado sob fluorescência (B). 1- basibrânquial; 2- arcos branquiais. .... 76
- Figura 4.22. Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes *wild type* adultos, no estado de controle e quando tratados com varfarina. 1-hemorragias cerebrais; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados). .... 77

Figura 4.23. Análise do tecido cardíaco de peixes *wild type* adultos em condições normais (A e C) e quando submetidos a microscopia de fluorescência (B e D), para as duas situações experimentais. .... 78

## Índice de tabelas

Tabela 1.1. Sinais e sintomas clínicos da KS de acordo com o seu nível de frequência..	6
Tabela 1.2. Domínios da MGP e respectivas funções. Tabela adaptada de Cancela et al., 2014. ....	9
Tabela 3.1. Tabela de <i>primers</i> . ....	29
Tabela 4.1. Número de animais existentes na 1ª geração de peixes, para ambas as mutações em estudo. ....	50
Tabela 4.2. Número de animais, por postura, existentes na 2ª geração de peixes-zebra para ambas as mutações em estudo. _ - significa que a postura não foi genotipada. ....	51
Tabela 4.3. Relações biométricas de peixes adultos (1ª geração) das duas linhas de estudo. ....	54
Tabela 4.4. Média do comprimento de larvas (2ª geração) com 48h, para as duas linhas mutadas. ....	55
Tabela 4.5. Domínios da elastina e respectivas funções. ....	61
Tabela 8.1. Resumo das características clínicas da síndrome de Keutel observadas ao longo dos anos. PPS- Estenoses Pulmonares Periféricas; X- corresponde à presença do sintoma no(s) paciente(s) observado(s). ....	92



## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

**AxxF** - Local de clivagem proteolítica

**BGP** - Proteína Gla do osso / Osteocalcina

**BMP** - Proteína morfogenética óssea

**BMP2** - Proteína morfogenética óssea 2

**bp** - Pares de bases

**cm** - Centímetros

**C-C** - Ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína

**DES** - Desmosina e isodesmosina

**dNTPs** - Nucleótidos

**DP** - Previsão de desordem

**dp-ucMGP** - MGP inativo

**DreMGP** - MGP no peixe-zebra

**Dre,ELNa** - Alinhamento das sequências da elastina no *Danio rerio*

**ECM** - Matriz extracelular

**Eln / ELN** - Elastina

**Eln +/-** - Menor quantidade de elastina

**Elna** - Elastina a

**g** - Grama

**GGCX** - Enzima  $\gamma$ -glutamyl carboxilase

**Gla** - Ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado

**Gla domain**- Domínio Gla

**Glu** - Ácido glutâmico / glutamato

**GRP** - proteína rica em Glas

**h** - Horas

**hMGP** - MGP humana

**HsaMGP** - MGP no *Homo sapiens*

**Hsa,ELN** - Alinhamento da sequência da elastina no *Homo sapiens*

**H<sub>2</sub>O** - Água

**H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>** - Água destilada

**IgG** - Imunoglobulina G

**K** - Vitamina K (quinona)

**kb** - Quilobases

**kDa** - Quilodaltons

**KH<sub>2</sub>** - Vitamina K na forma reduzida (hidroquinona)

**KO** - Vitamina K na forma oxidada (epóxido)

**KS** - Síndrome de Keutel

**L** - Litro

**mg** - Miligramas

**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de magnésio

**MGP** - Proteína Gla da matriz

**MGP<sup>-/-</sup>** - Ausência de MGP

**min** - Minutos

**mL** - Mililitros

**mm** - Milímetros

**mM** - Milimolar

**MMPs** - Metaloproteinases da matriz

**MmuMGP** - MGP no ratinho

**Mmu,ELN** - Alinhamento das sequências da elastina no ratinho

**m3pS** - Péptido N-terminal da MGP que possui 3 resíduos serina fosforilados

**n** - Número de animais

**P** - Domínio de fosforilação

**pDES** - Níveis de desmosina e isodesmosina plasmáticos

**pH** - Potencial de hidrogénio

**PPS** - Estenoses pulmonares periféricas

**PXE** - *Pseudoxanthoma elasticum*

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RR** - Local de clivagem proteolítica C-terminal

**SNPs** - Polimorfismos de um único nucleótido

**SP** - Péptido sinal

**TD** - Domínio transmembranar

**TE** - Tropoelastina

**TG2** - Transglutaminase 2

**UV** - Luz ultravioleta

**VKAs** - Antagonista da vitamina K

**VKDPs** - Proteínas dependentes de vitamina K

**VKOR** - Vitamina K epóxido redutase

**VSMCs** - Células musculares lisas vasculares

**VVG** - Verhoeff-Van Gieson

**WT** - *Wild type*

$\gamma$  - Enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase

% - Percentagem

°C - Grau Celsius

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrómetro

$\mu\text{S}$  - Microsiemens

## 1. Introdução

### 1.1. Síndrome de Keutel

#### 1.1.1. História e evolução da doença

A síndrome de Keutel (KS) é uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada pela calcificação difusa da cartilagem. Esta patologia tem uma taxa de incidência de 1:1.000.000, tendo sido identificada pela primeira vez em 1971 por Keutel, num estudo onde se observou um excesso de calcificação da cartilagem, estenoses pulmonares periféricas (PPS), braquitelefalangismo e perda auditiva, em dois irmãos com pais consanguíneos<sup>1-5</sup>. No estudo desenvolvido por Meier *et al.* em 2001, foi feito um acompanhamento destes pacientes onde o exame *post mortem* verificou a presença de estenose traqueobronquial e calcificação de várias artérias (pulmonares, coronárias, hepáticas, renais, entre outras)<sup>6</sup>.

Ao longo dos anos, vários investigadores têm confirmado as observações de Keutel, mostrando que de facto esta doença é uma síndrome diferente que merece alguma atenção. É exemplo o estudo desenvolvido por Fryns em 1984 e por Khosroshahi em 1989<sup>3,7</sup>. No entanto os efeitos a longo prazo ainda não são claros, dado que tudo depende da extensão da calcificação que varia de paciente para paciente.

Em 1983, Price *et al.* descobriram uma nova proteína denominada por proteína Gla da matriz<sup>8,9</sup>. Esta proteína, purificada a partir do osso de bovino, tem cinco resíduos de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado (Gla) e um resíduo de glutamato (Glu). É ainda insolúvel em água, liga-se ao cálcio e é dependente de vitamina K para que ocorra a sua ativação<sup>8,10-12</sup>. Segundo os mesmos autores, esta foi a primeira proteína composta por resíduos Gla a ser identificada na cartilagem<sup>11</sup>

Através de um processo de desnaturação com ureia e guanidina-HCl, podemos extrair a MGP da matriz óssea, possibilitando depois a sua associação com a proteína morfogenética óssea (BMP). Desta forma, supôs-se que a MGP poderia exercer um papel importante no metabolismo ósseo, nomeadamente na fase inicial de produção de tecido mineral<sup>8,10</sup>.

Mais tarde, em 1985, os mesmos investigadores concluíram que a MGP era composta por 79 resíduos de aminoácidos, contendo apenas uma ligação dissulfito entre dois

resíduos de cisteína, e que apresentava um peso molecular de 9961 daltons<sup>10</sup>. Devido à homologia existente entre as sequências de MGP e BGP (proteína Gla do osso ou Osteocalcina), outra proteína Gla presente no osso, crê-se que estas duas proteínas tenham um ancestral comum<sup>10,11</sup>. No entanto, devido à ausência de hidroxiprolina (um aminoácido presente na BGP) na constituição da MGP, pôde-se afirmar que esta não é um precursor da proteína Gla óssea<sup>8</sup>.

Em 1988, um estudo desenvolvido em ratinhos permitiu observar a presença de MGP em todas as amostras de cartilagem. Esta grande quantidade de proteína no tecido cartilágneo confirmou que de facto existe uma elevada afinidade com a matriz orgânica. Também neste trabalho verificou-se que o nível de RNA mensageiro da MGP na cartilagem, era muito maior do que nos ossos, podendo-se então concluir que a MGP era realmente sintetizada na cartilagem. Observou-se ainda nesta experiência que a quantidade de proteína expressa, bem como o peso molecular da MGP na cartilagem, tinham valores semelhantes aos níveis da MGP no osso<sup>11</sup>.

Estas observações levaram Hale *et al.* a concluir que a MGP é sintetizada por condrócitos e a propor que fosse responsável pela inibição da calcificação. De facto, esta afirmação pode ajudar a explicar o excesso de mineralização da cartilagem observado em ratos quando sujeitos a um tratamento com varfarina, um antagonista da vitamina K responsável por inibir o processo de ativação da MGP. Resultados semelhantes também foram observados em humanos<sup>11,13</sup>. Resumidamente, podemos dizer que a falta de vitamina K leva à inativação da MGP, que por sua vez não consegue exercer a sua função de inibidor da calcificação.

Novos dados foram obtidos em 1990, quando se descobriu que o gene que codifica para a MGP humana (hMGP), afinal constituída por 84 resíduos, encontra-se no braço pequeno do cromossoma 12 (12p12.3-13.1) e é composta por quatro exões, três grandes intrões e apenas um local de poliadenilação<sup>12,14</sup>. Dado que o promotor do gene da hMGP pode ser regulado por hormonas esteroides, como a vitamina D3 e o ácido retinóico, crê-se que estas poderão regular a atividade deste gene em algumas células<sup>12</sup>.

A calcificação patológica ocorre quando deixa de haver um balanço dos processos envolvidos no ciclo de remodelação óssea, passando a existir uma deposição anormal de sais de cálcio e fosfato nos tecidos. Esta acumulação leva à formação de cristais de hidroxiapatite que, numa fase avançada, podem dar origem a diversos tipos de doenças

associadas ao excesso de mineralização do osso <sup>15,16</sup>. É sabido que este excesso de calcificação também pode ocorrer em artérias, cartilagens e tecidos moles <sup>17-19</sup>.

No estudo feito por Luo *et al.*, onde se desenvolveu um ratinho mutante com uma MGP não funcional, foi possível observar uma calcificação espontânea das artérias e da cartilagem nos ratinhos com ausência de MGP (MGP <sup>-/-</sup>) <sup>6,17</sup>. Como consequência, estes ratinhos MGP <sup>-/-</sup> podem desenvolver baixa estatura (Figura 1.1), fraturas, osteopenia, batimento cardíaco mais acelerado e tendem a morrer ao fim de 2 meses, devido à ruptura dos vasos sanguíneos. A análise histológica das artérias revelou a presença de lâminas elásticas calcificadas, células do músculo liso desorganizadas e metaplasia cartilaginosa. Também a matriz extracelular (ECM) e os condrócitos se apresentavam desorganizados na cartilagem <sup>17</sup>. Estas observações permitiram confirmar que a MGP é realmente responsável por inibir a calcificação <sup>20</sup>.

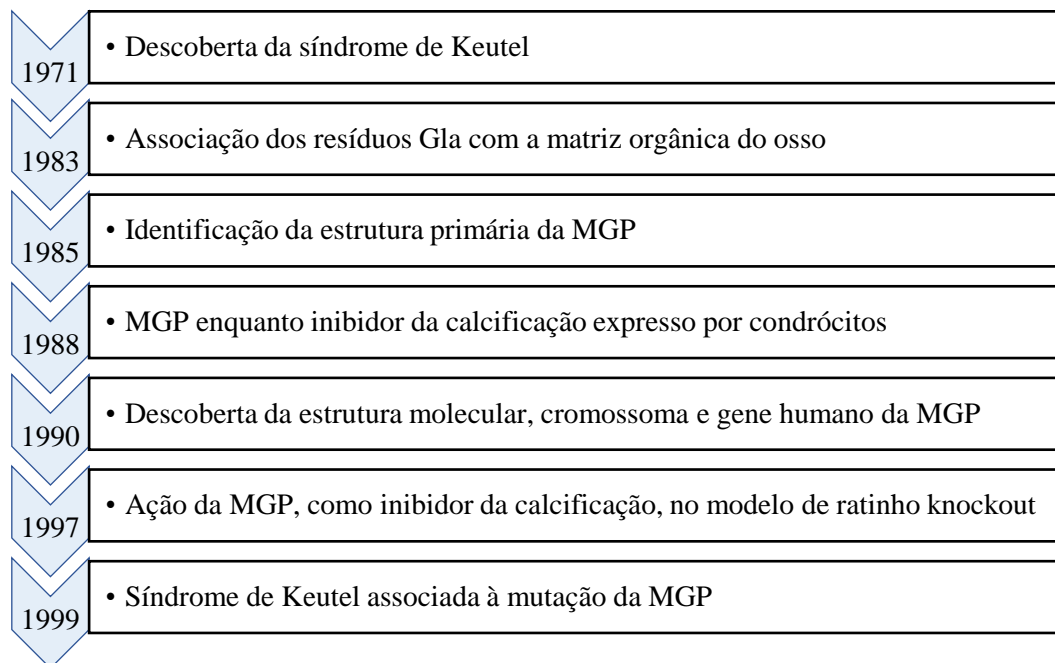


**Figura 1.1.** Análise morfológica de ratinhos *wild type* (+/+) e knockout da MGP (-/-). É possível verificar um menor tamanho nos ratinhos MGP <sup>-/-</sup>. Imagem de Luo *et al.*, 1997.

Mais tarde, em 1999, Munroe e colaboradores mostraram evidências de que a síndrome de Keutel (KS) estaria relacionada com mutações no gene que codifica para a MGP <sup>2,6,21</sup>. Para tal foi realizado um mapeamento genético a três famílias consanguíneas que possuíam KS, onde se verificou uma “região de homozigidade” no cromossoma 12p, entre os marcadores loci D12S320 e D12S363 <sup>2,6</sup>. Foram identificados três tipos de mutações (c.69delG, IVS1-2A→G e c.113T→A) que resultavam numa MGP disfuncional, ficando por isso confirmado que mutações nesta proteína levavam ao aparecimento de KS. Estes resultados foram concordantes com algumas das observações vistas por Luo *et al.* em 1997 <sup>2</sup>.

Esta descoberta foi um grande marco histórico, permitindo desta forma entender melhor os processos envolvidos nesta patologia (Figura 1.2). No entanto, as vias moleculares associadas a esta doença ainda não são evidentes.

O número de pessoas identificadas como sendo afetadas por esta patologia é muito escasso, mas tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Em 1998, foram relatados 13 casos enquanto que, passados 20 anos, já se encontravam cerca de 36 casos reportados <sup>6,21,22</sup>.



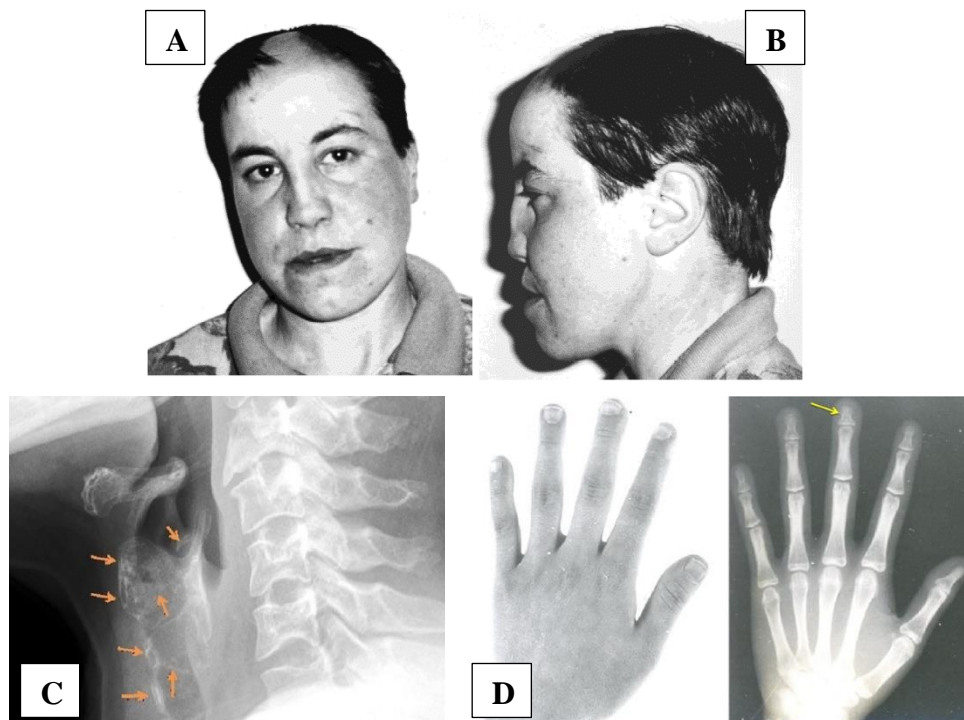
**Figura 1.2.** Esquema temporal desde a descoberta da síndrome de Keutel até à sua interligação com a mutação da MGP.

### 1.1.2. Descrição clínica

A síndrome de Keutel, patologia que afeta homens e mulheres, envolve uma alteração de fenótipo e é principalmente caracterizada pela presença de um excesso de calcificação da cartilagem, como resultado de causas genéticas e defeitos bioquímicos. A fisionomia característica desta doença compreende: rosto alongado, testa inclinada, olhos proeminentes, ponte nasal larga e deprimida, narinas pequenas, hipoplasia facial e maxilar, má oclusão dentária, boca larga, queixo recuado e baixa estatura. Um exemplo destas alterações está caracterizado na Figura 1.3 (A e B) <sup>2,3,7,21-24</sup>.

A calcificação difusa da cartilagem é predominantemente observada nos tecidos moles, árvore traqueobronquial, brônquios, traqueia, laringe, costelas, coluna vertebral, testa, orelhas, nariz, aurículas e nas artérias (Figura 1.3, C) podendo, portanto, levar à diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos, dificultando a respiração <sup>1,3,4,6,7,21,23</sup>.

Além da calcificação ectópica anormal, esta patologia está associada à presença de braquitelefalangismo (falanges distais mais curtas; Figura 1.3, D), estenoses pulmonares periféricas, infecções respiratórias recorrentes (como bronquite, sinusite, enfisema, asma e doenças pulmonares obstrutivas crônicas), perda de audição, e a possibilidade da existência de um ligeiro atraso mental <sup>1,2,6,22,23</sup>. Estudos verificaram que a maioria destes pacientes apresentavam consanguinidade familiar, o que pode explicar assim a herança direta desta mutação <sup>1,2,7,22,23</sup>. Acredita-se que este excesso de mineralização seja responsável pelos problemas respiratórios constantes e pela perda de audição <sup>1,2,21</sup>.



**Figura 1.3.** Aparência típica de um paciente com KS, vista de frente (A) e de perfil (B). Identificação por raio-X da presença de calcificações laringotraqueais (C) e de braquitelefalangismo (D). Imagens de Devriendt et al., 1999 (A e B) e de Khosroshahi et al., 2014 (C e D).

Obviamente existem outros sintomas, não tão recorrentes, que variam de doente para doente. Alguns deles são otites, sinusites, convulsões, alopecia (perda de cabelo em certas regiões), lesões cutâneas, possíveis problemas cardíacos (como a hipertrofia ventricular e hipertensão da artéria pulmonar), anomalias dentárias, nódulos na tireoide e problemas de fertilidade <sup>1,14,21-23</sup>. Relatou-se ainda que os indivíduos afetados manifestam valores normais de cálcio e fósforo e não tendem a apresentar fraturas ósseas <sup>2</sup>.



Assim, como podemos concluir pela análise da Tabela 1.1, de modo a evitar complicações maiores, recomenda-se que pacientes que apresentem a aparência típica desta doença, calcificações anormais, PPS, braquitelefalangismo, perda auditiva e dificuldades respiratórias, devem receber acompanhamento médico. No Anexo I, consta uma tabela-resumo das características clínicas observadas da síndrome de Keutel ao longo dos anos.

**Tabela 1.1.** Sinais e sintomas clínicos da KS de acordo com o seu nível de frequência.

MUITO FREQUENTE	FREQUENTE	ESPORÁDICO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Calcificação da cartilagem</li><li>• PPS</li><li>• Braquitelefalangismo</li><li>• Hipoplasia maxilar e da parte central da face</li><li>• Ponte nasal deprimida e larga</li><li>• Face comprida e olhos proeminentes</li><li>• Atresia traqueal (formação incompleta do orifício da traqueia)</li><li>• Problemas respiratórios</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Deficiência auditiva</li><li>• Infecções respiratórias persistentes</li><li>• Ligeiro atraso mental</li><li>• Atraso no desenvolvimento corporal e psicomotor</li><li>• Consanguinidade familiar</li><li>• Dispneia e pieira</li><li>• Otites e sinusites recorrentes</li><li>• Hipertensão da artéria pulmonar</li><li>• Hipertrofia e defeito no septo ventricular</li><li>• Anomalias dentárias</li><li>• Alae nasae subdesenvolvida</li><li>• Testa inclinada</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Baixa estatura</li><li>• Convulsões</li><li>• Lesões cutâneas e cerebrais</li><li>• Alopecia</li><li>• Atrofia ótica</li><li>• Pele flácida e pastosa</li><li>• Nódulos na tiroide</li><li>• Fala nasalada e ofegante</li><li>• Abortos</li><li>• Infertilidade</li><li>• Perda de memória</li><li>• Desenvolvimento e progressão tumoral</li></ul>

### 1.1.3. Tratamentos, diagnóstico e prognóstico

Atualmente os únicos tratamentos existentes para a síndrome de Keutel são sintomáticos, ou seja, apenas aliviam os sintomas, pelo que o estudo e pesquisa desta doença é essencial de modo a conseguir melhorar o estilo de vida dos pacientes afetados. Pode-se ainda recorrer ao uso de broncodilatadores para aliviar a dispneia e pieira, e à realização de uma endoscopia para tratar a estenose simples <sup>21,24,25</sup>.

Os pacientes tendem a ser diagnosticados com KS durante a infância <sup>5,6</sup>. Esta patologia pode ser confirmada através de análise clínica permitindo a observação e deteção das características físicas, ou então por raio-X e/ou tomografia computadorizada para confirmação da presença de calcificações anormais no corpo, enfisema e braquitelefalangismo <sup>1,23-25</sup>. Caso necessário, pode-se ainda realizar um

eletroencefalograma, exames oftalmológicos e otorrinolaringológicos <sup>23</sup>. O exame genético é também outra possibilidade, garantindo assim a existência ou não de mutações na MGP <sup>2</sup>.

O prognóstico para a maioria dos pacientes é bom. No entanto, a esperança média de vida depende da quantidade e das zonas calcificadas, bem como da gravidade dos problemas pulmonares, podendo obviamente, em alguns casos, ser fatal <sup>2,25</sup>.

## **1.2. Proteína Gla da matriz**

Como foi dito anteriormente a proteína Gla da matriz, extraída a partir do osso de bovino, foi identificada por Price e colaboradores em 1983 <sup>8,9,26</sup>. Esta foi a primeira proteína Gla a ser identificada na cartilagem e a segunda a ser isolada do osso <sup>10,11,27</sup>.

A MGP é uma proteína da matriz extracelular, apresentando por isso uma forte ligação a esta, que pode ser encontrada em diversos órgãos e tecidos, tais como na cartilagem, osso, pulmão, coração, artérias, cérebro, rim, olho e pele <sup>8,11,17-19,21,27,28</sup>. Além de insolúvel em água, exibe uma elevada afinidade pelo cálcio e é extremamente dependente de vitamina K para que seja  $\gamma$ -carboxilada e a sua atividade seja possível e correta <sup>8,10-12,21</sup>. A sua estrutura tem vindo a ser preservada ao longo dos anos, ainda que já se tenham observado algumas variantes à sua disposição base, o que leva a supor que a MGP tem vindo a manifestar um comportamento evolutivo <sup>26,28</sup>. Exibindo uma função direcionada para os vertebrados, esta proteína apresenta fundamentalmente um papel enquanto inibidor da calcificação cartilágnea e vascular <sup>13,21,26</sup>.

Para além do ser humano, a proteína Gla da matriz já foi identificada em várias espécies como no rato, ratazana, coelho, xenopus, galinha, peixes ósseos, como o peixe-zebra e cartilágneos, como o tubarão <sup>27-32</sup>.

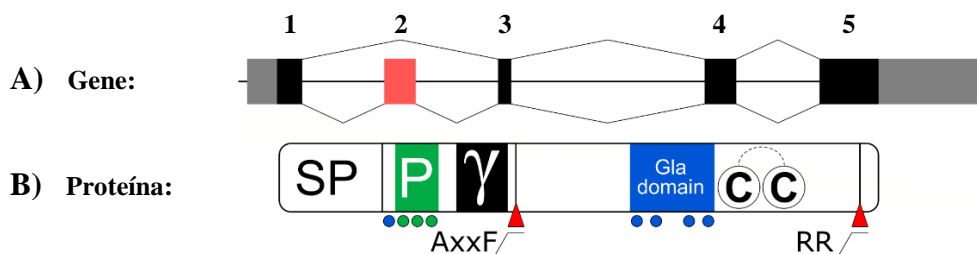
### **1.2.1. Caracterização estrutural do gene e da proteína**

Como anteriormente referido, sabe-se que o gene que codifica para a hMGP encontra-se localizado no cromossoma 12p, sendo composto por quatro exões e três intrões que no seu todo atingem um comprimento de 3,9 kb. Esta proteína, expressa principalmente por

condrócitos e células musculares lisas vasculares (VSMCs), apresenta um total de 84 aminoácidos e uma massa atômica de 10,6 kDa<sup>11-14,22,26,27,33</sup>.

Estudos recentes identificaram a presença de um exão extra entre o que se pensava corresponder ao primeiro e segundo exão (Figura 1.4, A - o novo exão corresponde à caixa vermelha). Desta forma, o número total de exões existentes na hMGP passou a ser cinco, o que levou à adição de mais 33 aminoácidos na cadeia peptídica. Este novo exão, específico de primatas, foi descoberto a partir do tecido precursor do cérebro fetal humano, não havendo ainda informações sobre que estruturas codifica<sup>26,28</sup>.

A estrutura molecular mais comum encontrada na proteína, sintetizada pelo gene que codifica para a MGP, corresponde aos 4 exões inicialmente identificados e é a que se pode ver representada na Figura 1.4, B. Esta organização existe em praticamente todas as espécies, ainda que com ligeiras alterações entre si. Como podemos observar, esta estrutura é complexa possuindo na sua constituição: um péptido sinal (SP), um domínio de fosforilação (P), resíduos serina, um ponto de reconhecimento da enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase ( $\gamma$ , GGCX), um primeiro local de clivagem (AxxF), seguido por um domínio Gla, uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (C-C) e, por fim, um local de clivagem proteolítica C-terminal (RR)<sup>26,27</sup>.



**Figura 1.4.** Representação esquemática da estrutura do gene (A) e da proteína (B) MGP. Os exões encontram-se numerados de 1-5 (o exão correspondente à caixa vermelha apenas pode ser encontrado em primatas). Os pontos azuis representam os resíduos Gla, enquanto os pontos verdes correspondem aos resíduos fosforilados. SP- péptido sinal; P- domínio de fosforilação;  $\gamma$ - ponto de reconhecimento da enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase; AxxF- local de clivagem proteolítica; Gla domain- domínio Gla; C-C - ponte dissulfeto entre duas cisteínas; RR- local de clivagem proteolítica C-terminal. Imagem adaptada de Cancela et al., 2021.

Na tabela 1.2 é possível observar com mais detalhe as funções que estão associadas aos domínios desta proteína.

**Tabela 1.2.** Domínios da MGP e respectivas funções. Tabela adaptada de Cancela et al., 2014.

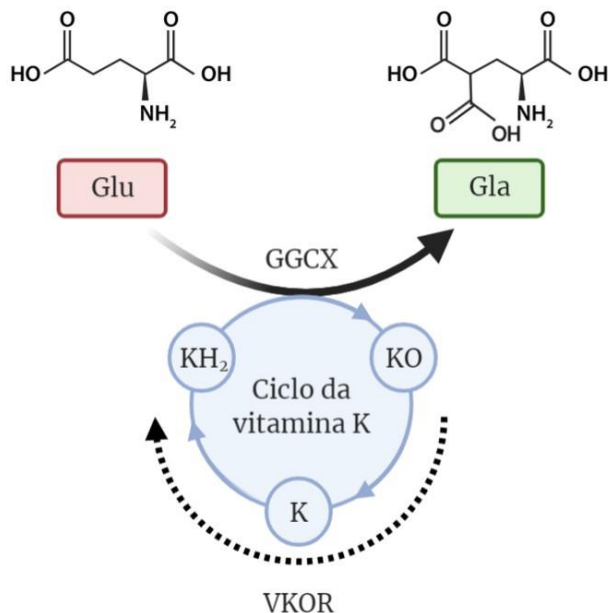
DOMÍNIOS DA MGP	FUNÇÃO
<u>Péptido sinal (SP)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Garante a exportação da MGP da célula para a ECM</li> </ul>
<u>Domínio de fosforilação (P)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosforilação da MGP</li> <li>• Secreção para a matriz extracelular</li> <li>• Inibidor da calcificação</li> <li>• Inibidor da formação de cristais</li> <li>• Ligação a cristais de cálcio e vesículas da matriz</li> </ul>
<u>Domínio da enzima GGCX (<math>\gamma</math>)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Local de reconhecimento da enzima GGCX</li> </ul>
<u>Local de clivagem proteolítica (AxxF)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processamento proteolítico pós-tradução</li> </ul>
<u>Domínio Gla (Gla domain)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibidor da calcificação</li> <li>• Ligação a BMP2 e BMP4 (prolina e resíduos de ácido glutâmico <math>\gamma</math>-carboxilado)</li> <li>• Afinidade e ligação a iões de cálcio</li> </ul>
<u>Ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (C-C)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Garante a estrutura dimensional</li> </ul>
<u>Local de clivagem proteolítica C-terminal (RR)</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibidor da calcificação</li> <li>• Clivagem proteolítica</li> <li>• Ligação a vitronectina</li> </ul>

Esta proteína é ainda composta por cinco resíduos de ácido glutâmico/glutamato (Glu) que, quando expostos à enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase, sofrem uma alteração pós-tradução em ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado (Gla) <sup>8,10-12,26</sup>. Assim, a GGCX é uma enzima altamente conservada e dependente de vitamina K para efetuar e garantir a conversão de resíduos Glu em Gla, através da adição de um grupo carboxilo na zona gama (Figura 1.5) <sup>26,34-36</sup>.

Com esta conversão os resíduos Gla passam a ter a capacidade de se ligar a iões minerais (como cálcio e fosfato), cristais de hidroxiapatite, fosfolípidos e a proteínas BMP, impedindo assim a calcificação vascular e de outros tecidos. Portanto, com esta modificação de estrutura passamos de uma MGP inativa, para uma MGP ativa e capaz de exercer a sua função enquanto inibidor da calcificação <sup>2,17,18,26,27,33</sup>.

Tem-se ainda conhecimento que o gene que codifica para a síntese de MGP, pode interagir com fatores hormonais que vão atuar diretamente no promotor desta proteína, é

o exemplo da vitamina D que atua nas células ósseas através da modulação da expressão da proteína Gla da matriz. É de notar ainda que a hMGP pode ser regulada por ácido retinóico e fatores de crescimento de fibroblastos <sup>12,26</sup>.



**Figura 1.5.** Esquema representativo da conversão de glutamato em ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado e a interligação com o ciclo da vitamina K. Glu- ácido glutâmico; Gla- ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado; GGCX- enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase;  $KH_2$ - vitamina K na forma reduzida (hidroquinona); KO- vitamina K na forma oxidada (epóxido); K- vitamina K (quinona); VKOR- vitamina K epóxido redutase. (figura obtida através da aplicação BioRender)

### 1.2.2. Vitamina K

A vitamina K é um micronutriente conhecido por atuar como cofator da enzima GGCX na produção de Gla <sup>27</sup>. Ainda que descoberta em 1929 pelo cientista Henrik Dam, só mais tarde é que se veio a compreender as diversas funções e vias onde participa. É facilmente encontrada na nossa dieta e a sua ausência pode levar a problemas de coagulação e calcificação <sup>36,37</sup>.

Como se pôde observar na Figura 1.5, para que se possa ocorrer a formação de ácido glutâmico  $\gamma$ -carboxilado é necessário que a vitamina K na sua forma reduzida ( $KH_2$ ) seja convertida na forma oxidada (KO). Mais tarde, a KO pode então ser reciclada pela vitamina K epóxido redutase (VKOR) a  $KH_2$ , permitindo que ocorra novamente a passagem de Glu a Gla. Este mecanismo de reciclagem ocorre no fígado, local onde sucede também a síntese de uma série de fatores de coagulação como é exemplo a protrombina, fator essencial que se liga a iões cálcio promovendo, portanto, a coagulação do sangue <sup>27,39</sup>.

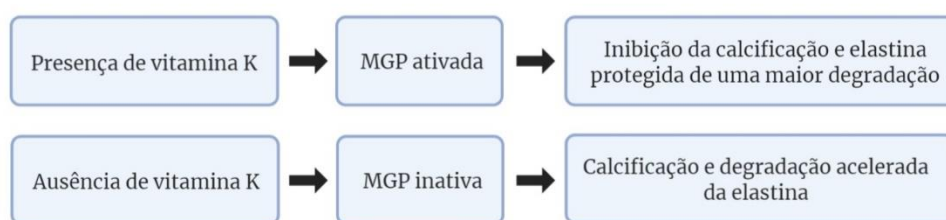


excessivas, hemorragias e pode mesmo ser fatal. Devido à sua capacidade de ultrapassar a barreira placentária, este fármaco não é recomendado durante a gravidez<sup>8,13,42</sup>.

Em 2019, foi feita uma investigação que permitiu estudar o desenvolvimento do peixe-zebra quando exposto a um tratamento com varfarina. Deste trabalho pôde-se concluir que tanto embriões como eleuthero-embriões apresentavam alguma mortalidade, hemorragias e alterações esqueléticas. Foi ainda observado que algumas vias e processos biológicos se encontravam expressos de forma significativa após o início da terapia<sup>42</sup>. Estas informações foram de encontro à pesquisa de Price *et al.* em 1983.

Além do uso de VKAs existem outras explicações para uma diminuição dos níveis de vitamina K, tais como: um baixo consumo da mesma, uma vez que esta vitamina apenas pode ser obtida de forma exógena; alguma alteração no seu ciclo de reciclagem; maior utilização de vitamina K de modo a contrariar o processo de calcificação; ou como resultado de alguma mutação genética<sup>43</sup>.

Sabe-se que uma suplementação com vitamina K conduz ao aumento dos níveis de MGP, levando assim a uma maior proteção dos tecidos contra a calcificação ectópica (Figura 1.7)<sup>19,41,43</sup>. Assim, podemos dizer que uma forma de repor os níveis da proteína Gla da matriz passa por aumentar a quantidade de vitamina K disponível. No entanto, na síndrome de Keutel, esta abordagem não é possível pois o gene que codifica para a MGP leva à formação de uma proteína disfuncional, pelo que mesmo aumentando os níveis de vitamina K não se consegue reverter o excesso de mineralização<sup>26</sup>. Desta forma, estudos nesta área devem ser realizados para que se possam arranjar terapias para esta doença.

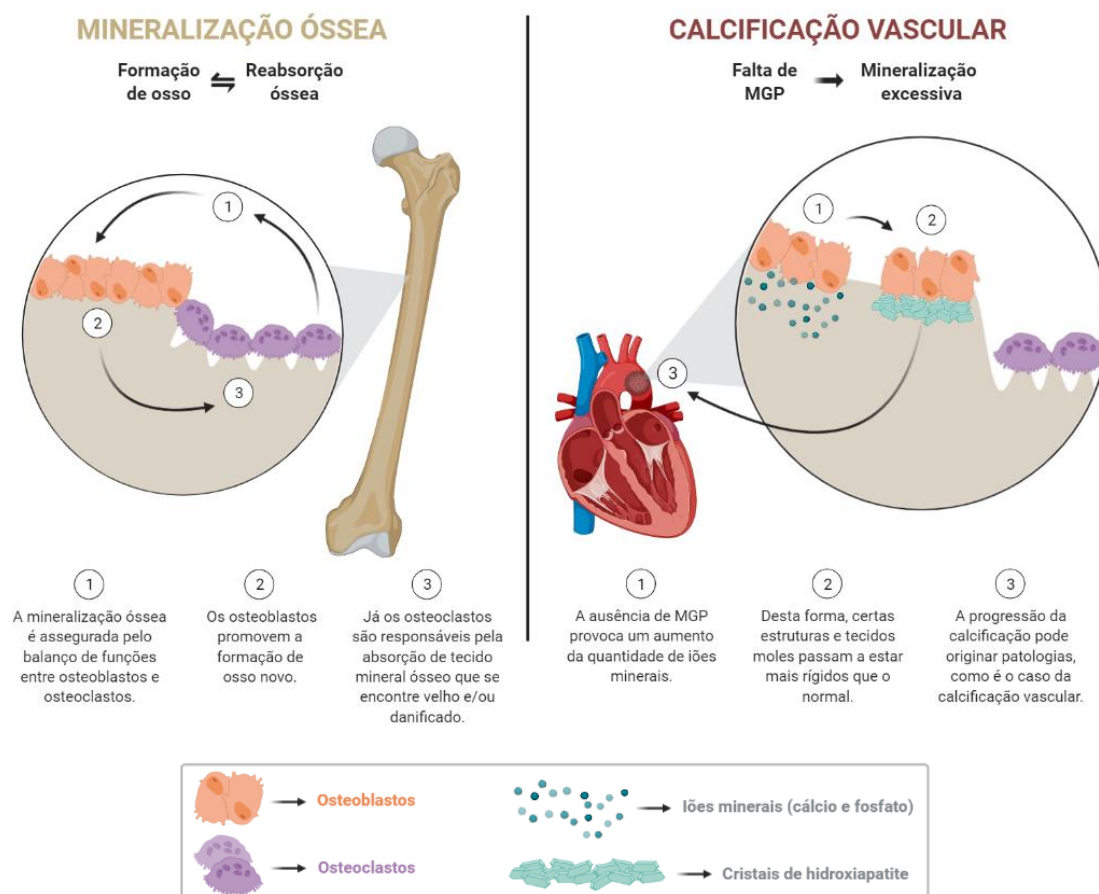


**Figura 1.7.** Contraste entre a presença e ausência de vitamina K. (figura obtida através da aplicação BioRender)

### 1.2.3. MGP enquanto inibidor da calcificação

Apesar de se saber a função da MGP, o seu mecanismo molecular ainda não é bem compreendido, pelo que mais investigações devem ser desenvolvidas no sentido de se esclarecer estas dúvidas <sup>18,26</sup>. No entanto, já se sabe que a inibição da deposição de minerais nos tecidos moles, quando induzida por fosfato inorgânico, é também feita pelo péptido N-terminal da MGP (m3pS), que possui 3 resíduos serina fosforilados <sup>44</sup>.

Existem diferenças entre a mineralização óssea e o processo de calcificação vascular (Figura 1.8). No primeiro, a deposição de minerais ocorre devido ao balanço existente entre as funções de células osteoblásticas e osteoclásticas, podendo em algumas situações estar associada à transdiferenciação condrogénica/osteogénica de VSMCs. Já na segunda, a mineralização é causada pela deficiência de MGP, está diretamente associada à presença de elastina e não existe dependência da diferenciação de células musculares lisas

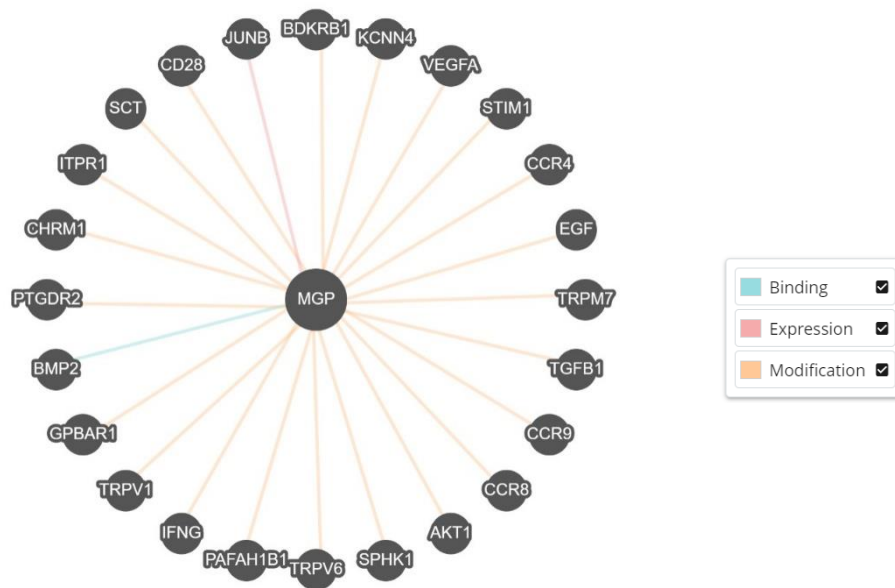


**Figura 1.8.** Esquema representativo das diferenças existentes entre a mineralização óssea e a calcificação vascular. (figura obtida através da aplicação BioRender)



vasculares <sup>44</sup>. Na Síndrome de Keutel o tipo de mineralização predominante é a calcificação cartilágnea e vascular.

Além da sua ação anticalcificante, esta proteína interage com diversos genes que podem, obviamente, influenciar a sua expressão (Figura 1.9). Um exemplo é a BMP2, uma proteína que atua a favor da mineralização estimulando a diferenciação osteocondrogénica, que é inibida pela MGP <sup>14</sup>. Pode-se então afirmar que esta proteína também pode agir como antagonista de proteínas que apoiam o desenvolvimento ósseo <sup>18,44</sup>.



**Figura 1.9.** Genes que interagem com a MGP. Imagem retirada de Pathway Commons ao dia 27 de Janeiro de 2021.

Outro fator que parece afetar diretamente a ação da MGP é a transglutaminase 2 (TG2). Esta enzima, expressa praticamente em todo o tipo de células, apresenta um papel fundamental na transformação condrogénica, favorece a degradação de elastina (Eln) levando ao desenvolvimento de elastocalcinose, estando também associada a diversos tipos de patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias e fibrose <sup>18,46</sup>. No estudo desenvolvido por Beazley *et al.*, confirmou-se que a mutação do gene da TG2 em ratinhos MGP <sup>-/-</sup> resulta numa diminuição das lesões cartilaginosas, atenua a deposição de cálcio nas fibras elásticas e aumenta o tempo de vida deste modelo animal aquando comparado ao controlo <sup>18</sup>.

A proteína Gla da matriz apresenta ainda um papel essencial na angiogênese, assegurando a função correta das células endoteliais. A sua ação também já foi observada na diferenciação celular e na tumorigênese<sup>28</sup>. Por fim, uma grande vantagem da MGP é que esta é das poucas proteínas que tem a capacidade de entrar no interior das fibras elásticas, impedindo desta forma a degradação de elastina<sup>41,43</sup>.

#### 1.2.4. Causas e consequências da ausência de MGP

Mutações no gene responsável pela produção de MGP, têm sido associadas a um excesso de calcificação em tecidos moles e ainda à fragmentação de fibras elásticas<sup>1,18</sup>. Uma má ligação da MGP à ECM também pode levar a alterações nesta proteína, que por sua vez, podem desencadear o desenvolvimento de várias doenças, tais como *pseudoxanthoma elasticum* (PXE), esclerose sistémica e síndrome de Keutel<sup>26,27</sup>.

Dado que a fosforilação pós-tradução dos resíduos serina da MGP é uma das etapas essenciais para evitar a maturação óssea, pode-se dizer que também um defeito neste processo poderá pôr em causa a ação da proteína Gla da matriz<sup>22,44</sup>. Outro modo de afetar a função da MGP passa por bloquear a etapa da conversão de Glu a Gla. Assim sendo, esta fase pode ser destabilizada essencialmente de cinco formas:

- Deficiência em vitamina K, como resultado da alimentação, da exposição a um tratamento com VKAs, ou mesmo de uma mutação no recetor desta vitamina;
- Mutação do resíduo Glu;
- Disfunção da GGCX, devido a mutações no local de ligação (maior tendência para hemorragias como resultado do comprometimento dos fatores de coagulação);
- Estado incompleto de carboxilação;
- Alteração da proteína Gla da matriz.

Desta forma, a MGP não fica ativa e operacional para se ligar a iões de cálcio e impedir, portanto, a calcificação ectópica. É importante não esquecer que efeitos epigenéticos, bem como a modelação de outros genes, poderão também ser elementos causadores de alterações nesta proteína. Todas as mutações conhecidas até ao momento geraram proteínas disfuncionais<sup>2,26,28</sup>.

Algumas das consequências da ausência desta proteína passam pela calcificação ectópica de artérias e cartilagens, malformações no desenvolvimento ósseo e no sistema arterial/venoso, crescimento anormal e hemorragias <sup>14,47</sup>.

Mais se sabe que a análise dos níveis de MGP inativo (desfosforilada e descarboxilada, dp-ucMGP) na corrente sanguínea são um modo de estudar a quantidade de vitamina K presente no organismo, pelo que se pode considerar a dp-ucMGP como um biomarcador do défice da vitamina K <sup>19,38,48</sup>.

De forma geral, podemos dizer que mutações associadas ao gene da proteína Gla da matriz resultam em proteínas alteradas e promovem o desenvolvimento de fenótipos patológicos.

### **1.3. Sistema vascular**

O sistema vascular é composto pelos vasos sanguíneos, sendo eles: artérias, veias e capilares. Compreende funções que variam consoante a sua constituição e estrutura, mas que estão principalmente associados ao transporte sanguíneo, garantindo a entrega de oxigénio e nutrientes a todas as células do organismo e consequente extração de resíduos metabólicos <sup>49</sup>.

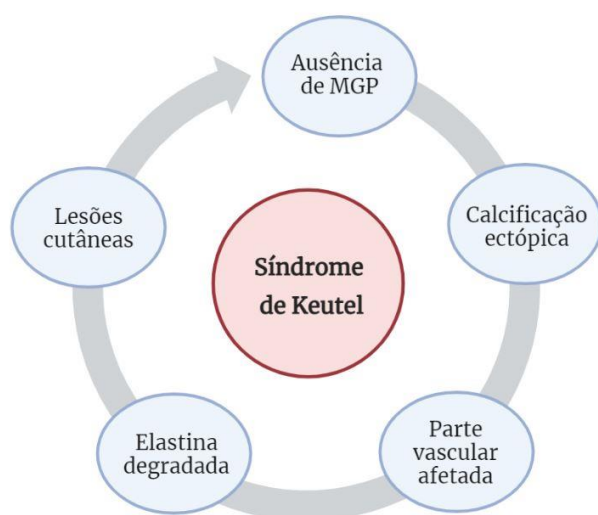
A calcificação vascular normalmente inicia-se nas redes de elastina da parede arterial, podendo ocorrer tanto na camada íntima como na camada média dos vasos sanguíneos, sendo estas independentes uma da outra <sup>19,40,43</sup>. O seu processo pode estar associado à alteração da ECM, infiltração de macrófagos, proliferação e diferenciação de células musculares lisas vasculares (VSMC) e degradação de fibras elásticas. Resulta muitas vezes de falhas no processo de remodelação vascular e, no caso da calcificação medial, localiza-se especificamente nas fibras elásticas e/ou VSMCs <sup>47,50,51</sup>. Num estudo desenvolvido em 2004, concluiu-se que a calcificação da aorta é um processo localizado, uma vez que apenas as áreas vasculares expostas diretamente a cloreto de cálcio tenderam a calcificar de forma significativa <sup>50</sup>.

Como já foi dito anteriormente, num estudo publicado em 1997, observou-se que ratinhos MGP <sup>-/-</sup> morreram prematuramente devido a calcificações vasculares, promovendo assim a rutura dos vasos <sup>17,19</sup>. Foi também identificado que as VSMCs apresentam um papel crucial na calcificação vascular, uma vez que se tende a observar

uma mudança de fenótipo destas células para um perfil osteogénico. Estes dados foram observados também em ratinhos MGP  $-/-$  e podem ser explicados pela diminuição da expressão de marcadores de VSMCs, seguido do aumento da expressão de marcadores que favorecem a formação de tecido mineral ósseo <sup>27,44</sup>.

Estudos afirmam ainda que a parte vascular é dos principais contribuintes para o aumento de produtos, resultantes da digestão das fibras elásticas, na corrente sanguínea. O que nos leva a concluir que, também a degradação e calcificação de elastina, farão parte das doenças vasculares <sup>41,47,50</sup>.

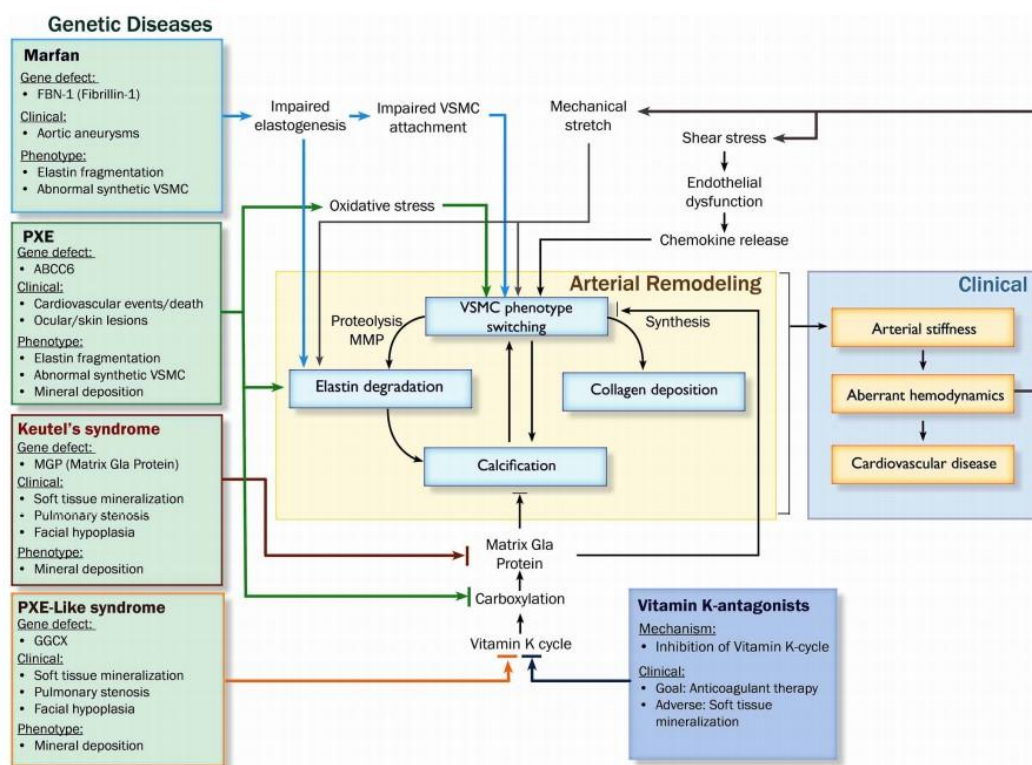
A biópsia feita às lesões cutâneas de um paciente com KS apresentou uma baixa proliferação vascular, associada a inflamação crónica perivascular <sup>1</sup>. Desta forma é possível perceber a interação existente entre a falta de MGP, a digestão de fibras elásticas e o papel que o sistema vascular desempenha nesta patologia, que é a síndrome de Keutel (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Esquema representativo da interação existente entre a ausência de MGP, degradação de elastina e o sistema vascular. (figura obtida através da aplicação BioRender)

São várias as vias de sinalização que contribuem para este tipo de calcificação. É exemplo a via Notch, Wnt, mas principalmente a via da BMP. Como já foi abordado neste trabalho, esta última via apresenta propriedades importantes para que ocorra a formação de osso, estando por isso intimamente relacionada com a regulação da expressão de marcadores osteogénicos. A veracidade das afirmações anteriores ficou assegurada quando se observou que ratinhos knockout para a MGP não apresentam calcificação vascular quando expostos a inibidores da via BMP <sup>47</sup>.

Cada vez mais se tem verificado um aumento do nível de incidência de problemas vasculares, estando estes associados a alguma mortalidade. Exemplos de doenças relacionadas com o sistema vascular são o enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, isquemia, hipertensão, aterosclerose, diabetes, doença renal crônica, PXE, doença de Marfan e a síndrome de Keutel (Figura 1.11) <sup>51</sup>. De um modo geral, podemos concluir que a rigidez e remodelação arterial anômala favorecem a formação de danos <sup>50,51</sup>. Mais estudos têm de ser realizados para que se possa entender com clareza as causas e consequências associadas a este tipo de patologia.



**Figura 1.11.** Vias envolvidas no processo de remodelação vascular em quatro doenças genéticas. PXE- pseudoxanthoma elasticum; MMP- metaloproteinases da matriz; VSMC- célula muscular lisa vascular; GGX- enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase. Imagem de Bernard van Varik et al., 2012.

## 1.4. Elastina

Um importante constituinte da ECM são as fibras elásticas, compostas essencialmente por elastina (cerca de 90%) e microfibrilas. A sua estrutura e função depende do tecido onde se encontra, podendo alternar desde uma organização em forma de anéis, à volta do lúmen das artérias, a uma disposição com aspeto de malha ou mesmo de favo de mel <sup>51,52</sup>.

A elastina é uma proteína de estrutura, constituída por desmosina e isodesmosina (DES), que deriva do precursor tropoelastina (60-70 kDa) localizado no cromossoma 7q do ser humano. A sua produção ocorre antes do nascimento, podendo ainda ser secretada por VSMCs nos primeiros meses de vida <sup>19,40,50</sup>. Encontra-se principalmente em tecidos moles, mas também na traqueia, laringe, pavilhão auricular, pele, tendões e cartilagem <sup>52</sup>.

Apresenta uma série de características particulares, como a elevada elasticidade, resistência, resiliência e deformabilidade, que são essenciais ao funcionamento de certos tecidos dinâmicos, como os pulmões e as artérias <sup>19,41,43,52</sup>. Estas qualidades são um importante requisito para os processos que envolvem a circulação sanguínea e a respiração <sup>19,52</sup>. Para além disto, a elastina apresenta um papel fundamental na manutenção e remodelação da parede arterial, na regulação da homeostasia de VSMCs e está também envolvida no processo de calcificação ectópica patológica <sup>51</sup>.

#### **1.4.1. Degradação de elastina e a sua possível interação com a síndrome de Keutel**

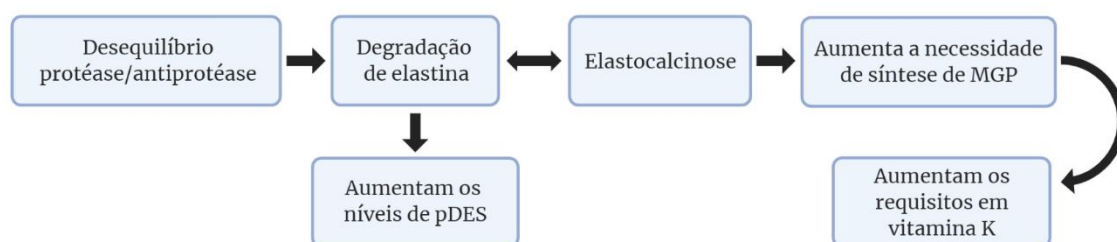
Quando existe um desequilíbrio entre a ação de proteases (promovem a degradação de proteínas) e antiproteases (impedem a digestão de proteínas), passam a existir mecanismos patológicos que, em condições normais, não aconteceriam <sup>41</sup>. A calcificação e a degradação de elastina são, como foi dito anteriormente, características da patologia vascular e resultam, exatamente, de uma falha deste balanço <sup>50</sup>. O envelhecimento é outro fator responsável pela perda das redes de elastina <sup>41,51</sup>.

É sabido que as fibras elásticas são o local de eleição para que se proceda à deposição inicial de minerais necessários ao processo de calcificação <sup>18</sup>. Tal deve-se ao facto da elastina apresentar uma elevada afinidade ao cálcio, pelo que estes níveis tendem a aumentar com a idade <sup>41,44,50</sup>. Desta forma, e apesar da elastina manifestar uma certa resistência à proteólise, tende a ocorrer a sua digestão por parte de enzimas, como elastases e metaloproteínases da matriz (MMPs), levando assim à diminuição dos níveis de DES e à perda de organização e de integridade das fibras elásticas <sup>19,49,52</sup>.

Podemos então definir elastases como enzimas serina-proteases, produzidas por macrófagos e neutrófilos, que são responsáveis por degradar a elastina <sup>54-56</sup>. A sua síntese aumenta em função do teor de cálcio das fibras, pelo que se pode afirmar que as elastases

tendem a ser estimuladas pela presença de calcificação<sup>41,43</sup>. Beazley *et al.* identificaram a adiposina como a principal elastase ativa, sendo induzida pela ausência de MGP em ratinhos knockout. Verificou-se ainda que esta é responsável por intensificar a atividade proteolítica, resultando numa maior quantidade de fibras elásticas fragmentadas<sup>18</sup>.

A calcificação e a degradação de elastina são dois processos que estão intimamente relacionados e, por isso, tendem a estimular-se mutuamente<sup>41,50</sup>. Estudos recentes confirmaram esta observação, mostrando que o aumento da degradação de elastina tende a estar diretamente relacionado com uma elevada presença de calcificação. Tal é possível de comprovar pela interligação positiva com o aumento dos níveis de desmosina e isodesmosina plasmáticas (pDES), que funcionam como biomarcadores sanguíneos da taxa de degradação das fibras elásticas<sup>19,41,43,50</sup>. Pode-se então afirmar que a degradação de elastina é um dos fatores que promove a calcificação (Figura 1.12)<sup>51</sup>.

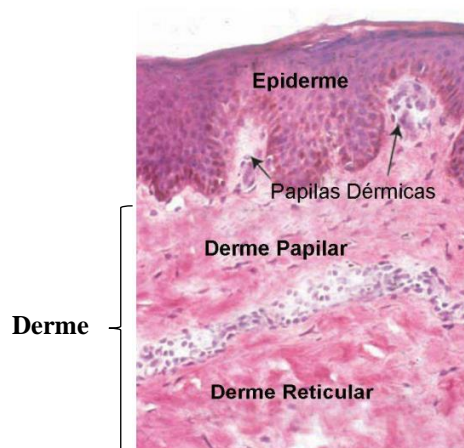


**Figura 1.12.** Esquema das etapas associadas à degradação e calcificação de elastina. (figura obtida através da aplicação BioRender)

À proteólise de elastina, poderá estar ainda associada uma desorganização e mudança de morfologia das fibras elásticas, podendo haver, portanto, uma transição de fibras com um aspeto ondulado para fibras achatadas<sup>50,53</sup>.

De igual forma, será de esperar que também na síndrome de Keutel, os níveis de degradação das fibras elásticas e da elastocalcinose tendam a aumentar gradualmente em função da ausência de MGP. No estudo desenvolvido em 1997 por Luo *et al.*, a análise histológica das artérias de ratinhos MGP<sup>-/-</sup>, revelou a presença de lâminas elásticas calcificadas<sup>17</sup>. Mais tarde, outros investigadores confirmaram a presença de fibras elásticas calcificadas na derme e nas artérias de pacientes com síndrome de Keutel, bem como uma diminuição da quantidade das mesmas<sup>1,5,14,57</sup>. Isto pode em parte explicar a formação de lesões cutâneas nestes doentes.

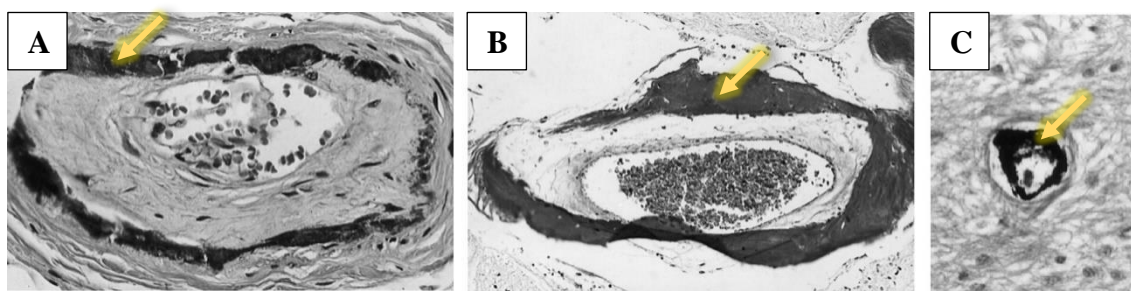
Num estudo de 2014, os autores afirmaram que pacientes com KS manifestavam falta de fibras elásticas na derme papilar, enquanto que a derme reticular se encontrava inalterada <sup>1</sup>. Como podemos observar pela Figura 1.13, a derme é composta por duas camadas, papilar e reticular. A camada papilar é a que se encontra junto à epiderme, e é caracterizada pela existência de papilas dérmicas. Já a derme reticular, encontra-se entre a derme papilar e a hipoderme <sup>58</sup>.



**Figura 1.13.** Corte histológico da pele, onde se pode observar a epiderme e as duas camadas que formam a derme. Imagem adaptada de Yoshito, 2011.

Basalyga *et al.* (2004), realizaram um tratamento da aorta abdominal de ratos, através da administração de baixas concentrações de cloreto de cálcio. Deste estudo pôde-se observar a presença de uma ECM aórtica desorganizada, apoptose de algumas células vasculares, perda da estrutura e forma natural das fibras, diminuição dos níveis de DES e a formação de depósitos de cálcio nas lâminas elásticas, seguido da sua degradação e calcificação <sup>50</sup>.

Também no estudo desenvolvido por Meier *et al.* (2001), verificou-se a presença de fibras elásticas calcificadas, nomeadamente na elástica interna, em lesões vasculares de um paciente com KS (Figura 1.14) <sup>6</sup>.



**Figura 1.14.** Calcificação da elástica interna em três tipos de artérias: da artéria de um tecido mole (A), da artéria meníngea (B) e da artéria intracerebral (C). As setas indicam onde se encontram as calcificações. Imagens adaptadas de Meier *et al.*, 2001.

Estudos recentes mostraram que uma suplementação rica em vitamina K, poderá impedir a degradação e a calcificação de elastina, diminuindo assim os níveis de pDES,

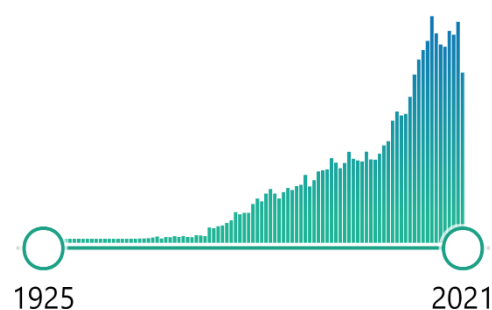


bem como a possibilidade de formação de doenças despoletadas pela perda de função destas fibras <sup>19,41,43</sup>. Também em 2004, foi realizado um ensaio que concluiu que um tratamento com iões de alumínio reduz os efeitos patológicos associados a estas fibras, bem como as alterações morfológicas que possam estar relacionadas. Tal deve-se ao facto destes iões manifestarem um efeito protetor, atuando como inibidores da degradação e calcificação de elastina <sup>50</sup>.

Como podemos observar pela Figura 1.15, o estudo desta proteína tem vindo a tomar cada vez mais relevância com o passar dos anos, mostrando que de facto a elastina terá um papel importante na manutenção dos tecidos saudáveis <sup>59</sup>.

Recentemente, num estudo publicado já em 2021, verificou-se que ratinhos mutantes para MGP  $-/-$  e Eln  $+/-$  mostravam uma menor calcificação medial, o que sugere um efeito direto por parte da quantidade de elastina no processo de mineralização <sup>44</sup>.

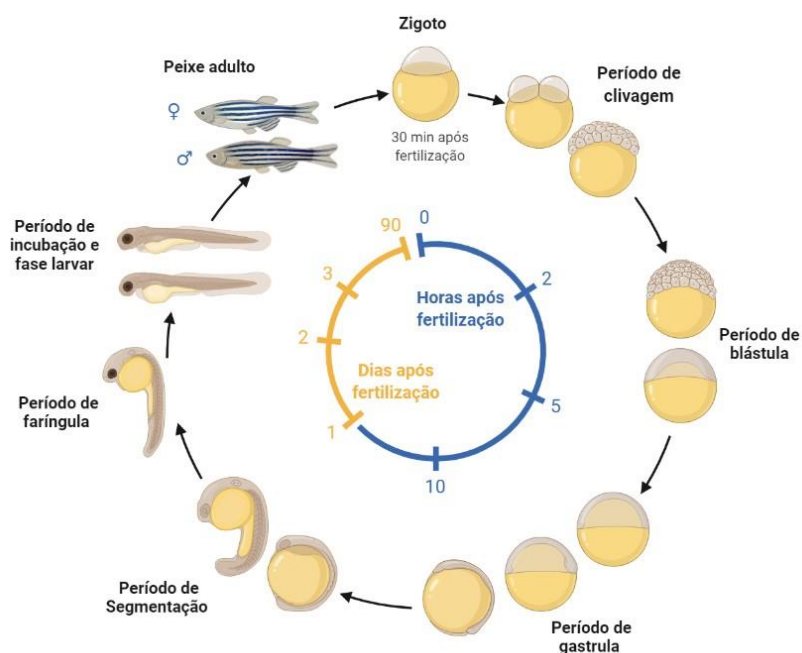
RESULTS BY YEAR



**Figura 1.15.** Evolução de estudos publicados sobre elastina ao longo dos anos. Gráfico retirado do Pubmed ao dia 22 de Setembro de 2021.

## 1.5. Peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem vindo cada vez mais a ser usado enquanto modelo de estudo de diversas patologias humanas, tais como doenças genéticas e alterações de processos biológicos <sup>60</sup>. De facto, este animal apresenta várias vantagens que o tornam num dos melhores modelos de investigação na área da biomedicina <sup>61</sup>. Algumas delas são a fácil e rápida capacidade de reprodução (Figura 1.16); fertilização externa; a possibilidade do estudo e observação do desenvolvimento desde a fase de zigoto; atingem a maturidade sexual com aproximadamente três meses; pequeno tamanho; fácil de cuidar e manipular; elevada capacidade de regeneração; resistência a variações de temperatura e salinidade; custo de manutenção relativamente menor quando comparado com roedores; e o facto de apresentar semelhanças estruturais com outros organismos <sup>60,62-65</sup>. Esta espécie é muito usada no estudo funcional do esqueleto, bem como das etapas que lhe estão associadas <sup>65</sup>.



**Figura 1.16.** Fases do desenvolvimento do peixe-zebra ao longo do tempo. (figura obtida através da aplicação BioRender)

Foi a possibilidade da análise da biologia do desenvolvimento que realmente nos despertou interesse neste animal. Como já foi abordado anteriormente, a síndrome de Keutel é uma doença associada a problemas de calcificação, pelo que a análise desta patologia no peixe-zebra poderá ajudar a explicar quais as vias e processos que são afetados ao longo do crescimento. Além disto, podemos facilmente observar através da Figura 1.17 que a sequência proteica da MGP é bastante semelhante entre o *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Danio rerio*, podendo desta forma desempenhar funções idênticas nestes três organismos <sup>66</sup>. Esta é mais uma prova de que o peixe-zebra é um modelo animal indicado para o nosso estudo.

O sistema esquelético desta espécie, nomeadamente o processo de mineralização e vias de sinalização, apresentam semelhanças com o dos mamíferos, e em particular com o ser humano <sup>64,67</sup>. Este é constituído por uma ECM mineralizada, células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), proteínas de matriz, colagénio e água <sup>64,67,68</sup>. Um dos fatores que afeta o seu desenvolvimento é a nutrição, ainda que o uso de suplementos possa influenciar o crescimento e a incidência de anomalias <sup>64</sup>. Este organismo modelo tem vindo inclusive a ser usado no estudo de problemas associados à mineralização ectópica, como no caso da PXE <sup>67,69</sup>.

## Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel



**Figura 1.17.** Alinhamento das sequências proteicas da MGP no *Homo sapiens* (HsaMGP), ratinho (MmuMGP) e peixe-zebra (DreMGP) através do software T-Coffe. A previsão do local do péptido sinal e do domínio Gla foi realizado com recurso à plataforma InterProScan, enquanto os restantes domínios através do artigo de Laizé et al. (2005).

Outro fator que pode afetar o sistema ósseo é a TG2. Esta já foi descrita como tendo um papel essencial na formação da estrutura do ovo da carpa e, mais recentemente, no processo de mineralização e calcificação do peixe-zebra<sup>70,71</sup>. Num estudo realizado em 2012, verificou-se ainda que a TG2 tende a estar envolvida principalmente nas primeiras etapas do desenvolvimento de *Danio rerio*, bem como no processo de homeostasia da fase adulta. Esta enzima pode ser encontrada nos músculos, notocorda e barbatanas peitorais<sup>71</sup>.

Relativamente ao gene que codifica para a proteína Gla da matriz de peixe-zebra, este localiza-se no cromossoma 3 e é composto por cinco exões, sendo apenas quatro deles codantes. Esta particularidade da existência de um exão não codante do lado N-terminal da proteína, foi identificada em praticamente todos os anfíbios, apresentando um papel importante na regulação de transcritos <sup>72</sup>.

Através do Assembly GRCz11 (GCF\_000002035.6) da plataforma do NCBI, pudemos concluir que o peixe-zebra apresenta um único gene para a MGP e que este possui 19 266 pares de bases <sup>73</sup>. Vários estudos realizados ao longo dos anos permitiram concluir que a MGP é expressa na barbatana caudal, arcos branquiais e numa série de sistemas essenciais ao funcionamento deste organismo, tais como o sistema respiratório, cardiovascular, digestivo, nervoso e esquelético <sup>74-78</sup>.

Já o gene que codifica para a elastina a (Elna) em *Danio rerio*, encontra-se no cromossoma 15 e é constituído por cinquenta e sete exões (Anexo II). Possuindo um total de 59 908 pares de bases, este gene pode levar à produção de vinte e um transcritos, estando apenas um deles validado <sup>79</sup>. A elastina a é expressa no sistema nervoso, coração, bexiga natatória e nas estruturas ligamentares do crânio de peixes-zebra adultos de ambos os géneros <sup>80,81</sup>. Desta forma, a manifestação desta proteína poderá afetar o tecido muscular, vascular, nervoso e esquelético.

## **2. Objetivos**

Sendo a síndrome de Keutel uma doença rara e ainda sem cura, o propósito desta tese de mestrado foi caracterizar duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina, e analisar de que modo esta proteína pode estar diretamente associada a uma proteína Gla da matriz alterada.

Através da análise fenotípica, relações biométricas, mortalidade, viabilidade reprodutiva, exposição a VKAs, análise histológica e imunohistoquímica, foi feito um estudo dos mutantes heterozigóticos e homozigóticos das duas linhas. Foi ainda realizado um estudo bioinformático da estrutura da proteína elastina.

Este trabalho, além de ser o primeiro estudo com estas duas linhas de peixes mutantes, poderá promover novas abordagens no que toca ao funcionamento desta patologia, podendo mais tarde ser uma mais-valia no tratamento de pacientes afetados.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Linhas de estudo e condições de manutenção

Neste trabalho foram usados três modelos diferentes de peixe-zebra, duas linhas transgênicas (Sa17177 e Sa42459) e uma *wild type* (WT, linha AB). As duas linhas modificadas expressam uma mutação no cromossoma 15 que afeta diretamente a estrutura de Elna<sup>82</sup>. A diferença entre elas advém da localização da mutação.

Assim, a mutação existente na linha Sa17177 provoca a troca de uma guanina por uma timina na posição genômica 296216, resultando num códão STOP prematuro. Já na linha Sa42459 há a substituição de uma timina por uma adenina (localização genômica 285811) que vai afetar o local de splicing, uma vez que o intrão onde se encontra a mutação vai ser retido<sup>82</sup>. A razão pela qual nos focamos em duas linhas de estudo deve-se a não sabermos qual será o efeito de cada uma neste modelo animal.

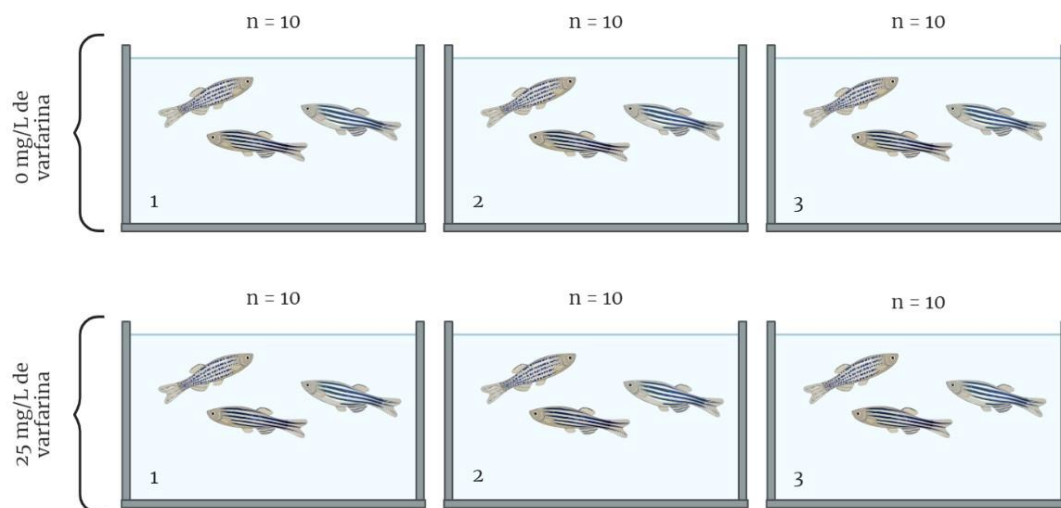
A sequência nucleotídica do gene Elna no peixe-zebra pode ser observada na plataforma do NCBI, ou através do link: [Danio rerio strain Tuebingen chromosome 15, GRCz11 Primary Assembly - Nucleotide - NCBI \(nih.gov\)](#).

Todos os animais foram mantidos em condições ótimas de modo a garantir o bem-estar e desenvolvimento. Assim, os peixes foram cuidados à temperatura de  $28\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , pH de  $7,5\pm 0,1$ , níveis de condutividade entre  $750\pm 30\mu\text{S}$  e um fotoperíodo de 14h de luz/10h de escuro. Relativamente a limpezas, regularmente procedia-se à higiene dos tanques (volume de 3,5 L, marca Tecniplast) garantindo que não houvesse acumulação de comida no fundo dos aquários. Os peixes eram ainda alimentados duas vezes por dia, uma vez com artémia (*Artemia nauplii*, da INVE Aquaculture) e outra com ração (Zebrafeed<sup>®</sup>, da Sparos).

#### 3.2. Experiência de exposição a varfarina com peixes *wild type* juvenis

De modo a verificar se realmente a degradação das fibras elásticas está diretamente associada à calcificação, foi feito um ensaio com o propósito de avaliar a presença e estrutura da elastina em juvenis de peixe-zebra (linha *wild type*), com cerca de dois meses de idade, quando sujeitos a um protocolo de exposição a varfarina. Este teste envolveu duas experiências: uma exposta a 0 mg/L de varfarina, desempenhando por isso a função

de grupo controle; e outra contendo 25 mg/L. Cada grupo teve três réplicas e a cada um deles foram adicionados 10 peixes (Figura 3.1). A amostragem foi feita aleatoriamente e os animais colocados em tanques com 1 L de água do sistema.



**Figura 3.1.** Esquema experimental do protocolo de exposição a varfarina com peixes *wild type*. n = número de animais por tanque. (figura obtida através da aplicação BioRender)

Diariamente os tanques eram sifonados, os peixes alimentados e era feito o registo do comportamento dos animais, bem como da mortalidade. A cada dois dias, era feita uma substituição de 800 mL da água dos tanques por água nova do sistema e, aos grupos sujeitos à concentração de 25 mg/L de varfarina, era adicionado novamente esta substância de modo a manter os seus níveis constantes. Os peixes eram alimentados duas vezes por dia, uma vez com artémia e outra com ração. A experiência teve a duração de 2 semanas.

Após perfazer o período estabelecido, procedeu-se à anestesia dos animais com uma dose letal de Tricaine, seguido de fixação e desidratação das amostras segundo o protocolo desenvolvido por Gavaia *et al.* em 2006 (Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas)<sup>75</sup>. Mais tarde, após a obtenção dos cortes histológicos (ver capítulo 3.8.), realizou-se a análise dos mesmos através das técnicas Verhoeff-Van Gieson (VVG, ver protocolo no capítulo 3.11.) e imunohistoquímica com anticorpos anti-elastina (informações mais pormenorizadas no capítulo 3.7. e 3.10.). Nesta última técnica, utilizámos um controlo positivo através de secções de amostras de rato, nomeadamente do fémur e do coração.

### 3.3. Genotipagem das linhas Sa17177 e Sa42459

Para se proceder à genotipagem de ambas as linhas de peixes-zebra, iniciando nos peixes adultos heterozigóticos (com cerca de 6 meses, 1ª geração) e depois passando para os animais obtidos das suas posturas (peixes com 2 meses), realizou-se a encomenda de *primers* específicos para cada uma das mutações. Na Tabela 3.1 constam as informações sobre cada um deles. Os *primers* foram dissolvidos em 90 µL de água e guardados a -20°C.

**Tabela 3.1.** Tabela de *primers*.

<b>LINHA</b>	<b>PRIMERS</b>			
	TIPO DE <i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA (SENTIDO 5' → 3')	PARES DE BASES	TEMPERATURA DE MELTING (T <sub>m</sub> )
Sa17177	Forward	CCTAACTCCTCATTGCTCAGCCA	24	58,91°C
	Reverse	TTCCACCAGCACCTGAAACAAGAG	24	59,41° C
Sa42459	Forward	GCAGCACAGCAGTCTTCAAGG	21	58,88° C
	Reverse	GGATTCGTCTCAGTTGGTTTAGTTGG	26	57,57° C

De seguida, realizou-se a extração do DNA genómico a partir das caudas de peixes-zebra. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com uma solução de Tricaine (3,5 mL de Tricaine misturados em 100 mL de água do sistema) e realizou-se um pequeno corte da barbatana caudal de cada um dos peixes. Cada uma das amostras genómicas foi guardada num tubo de 0,2 mL, já preparado com uma solução de Alkalyne Lysis buffer (25 µL: 25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA pH=8) para promover a lise dos tecidos.

Após todas as colheitas, os tubos com o material genético foram sujeitos a uma temperatura de 95°C durante 15 minutos, seguido de um ligeiro SPIN e da adição de 25 µL de Tris-HCl buffer para neutralizar as amostras.



A próxima etapa consistiu em fazer um PCR, onde foi adicionado a cada amostra:

- 1,5 µL DNA genómico
- 2,5 µL buffer
- 0,75 µL MgCl<sub>2</sub>
- 0,5 µL dNTPs
- 0,1 µL Taq polimerase
- 1,25 µL *primer* forward
- 1,25 µL *primer* reverse
- 17,15 µL H<sub>2</sub>O

Relativamente ao número de ciclos:

- 94°C durante 3 minutos
  - 94°C durante 45 segundos
  - 58°C durante 30 segundos
  - 72°C durante 55 segundos
  - 72°C durante 10 minutos
- } 35 ciclos

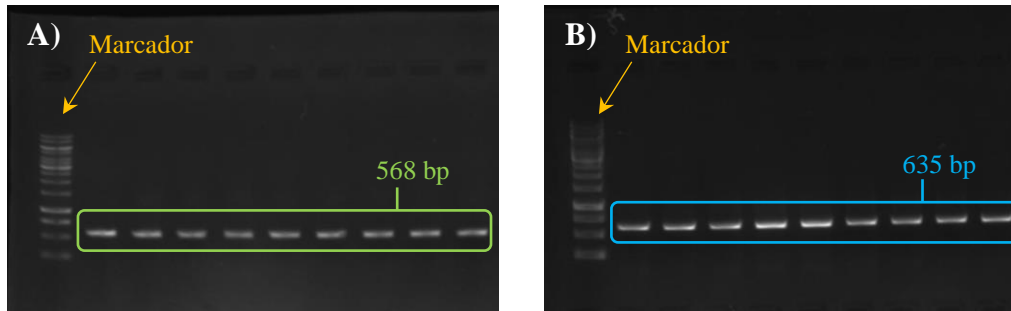
Após esta técnica, fizemos uma electroforese de modo a garantir que o fragmento que pretendemos observar realmente existe. Para o gel de agarose usamos:

- 1,2 g agarose em pó
  - 120 mL TAE
  - 1,6 µL GreenSafe
- } 3 minutos no microondas, seguido de arrefecimento do recipiente em água corrente à temperatura ambiente

Vertemos a solução para o suporte e deixamos solidificar por 10 minutos. De seguida, procedemos à colocação do gel numa tina cheia de TAE. No primeiro poço do gel é pipetado o marcador de tamanhos (Gene Ruler 1kb DNA ladder) (6 µL) e aos restantes poços é adicionado:

- 15 µL do produto de PCR
- 4 µL *loading* buffer

Deixamos o gel a correr por cerca de 30 minutos à voltagem de 120 Volts e posteriormente visualizamos as bandas no transiluminador de luz ultravioleta (UV). Na Figura 3.2 podemos ver um exemplo do gel analisado em cada uma das mutações. Quando foi possível a observação das bandas esperadas, procedemos ao envio das amostras do produto de PCR para sequenciação.

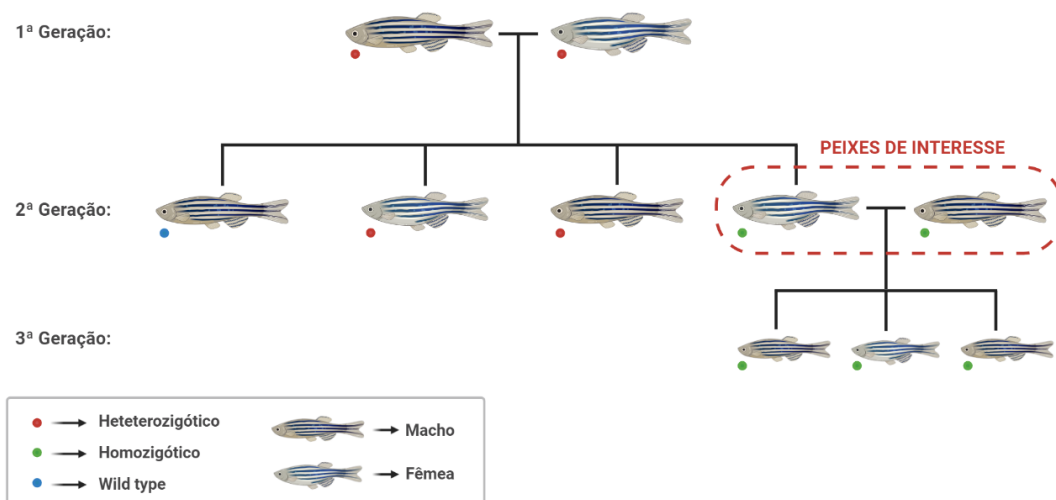


**Figura 3.2.** Electroforese das amostras da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B).

A análise dos dados da sequenciação foi feita em duas plataformas:

- NCBI - Fizemos um blast para confirmar se de facto era a sequência de nucleótidos esperada;
- BioEdit - Foi realizado o estudo dos cromatogramas de cada animal. A sobreposição de dois picos no quadro de leitura, indica que estamos perante um animal heterozigótico (um alelo apresenta-se normal e o outro manifesta a mutação).

Após efetuar a análise de todas as amostras, os peixes foram separados conforme sejam *wild type*, heterozigóticos ou homozigóticos. Seguidamente, deu-se início aos cruzamentos de acordo com o que se encontra visualizado na Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Linhagem e processo de obtenção de peixes-zebra homozigóticos. (figura obtida através da aplicação BioRender)

### 3.4. Relações biométricas e análise do fenótipo

De maneira a podermos verificar se existem alterações significativas no desenvolvimento ósseo nos dois mutantes, foi feito o registo das medidas biométricas dos peixes adultos heterozigóticos (1ª geração) de ambas as linhas, bem como de algumas larvas que resultaram do primeiro cruzamento. Para a obtenção das medidas das larvas tivemos de recorrer ao software Fiji-ImageJ, que funciona como uma aplicação de processamento de imagens. Já no caso dos peixes adultos o método utilizado foi manual.

### 3.5. Estudo bioinformático da estrutura da elastina

Foi ainda do nosso interesse realizar um estudo mais aprofundado sobre a estrutura da elastina, de modo a entender como é que esta proteína tem vindo a evoluir ao longo dos anos em diferentes espécies. Assim, numa primeira abordagem, fomos analisar a estrutura dos transcritos existentes no humano, ratinho e peixe-zebra.

Para que esta análise bioinformática fosse possível recorreremos então a duas plataformas digitais, NCBI e InterProScan. Da primeira aplicação, tivemos acesso à sequência da proteína, no formato FASTA, apenas para os transcritos validados de cada um dos animais em estudo. Depois então, na plataforma InterProScan, carregámos cada uma das sequências e obtivemos, para cada uma delas, um gráfico onde constam os

diferentes domínios, bem como as suas posições e o tamanho total da proteína. É de ressaltar que este estudo foi feito com base no algoritmo da plataforma InterProScan e, portanto, os esquemas realizados são com base numa percentagem de aceitação, podendo não corresponder à estrutura real da proteína.

De maneira a entendermos se existe algum nível de similaridade entre estes três organismos, fizemos ainda um alinhamento das sequências (*Hsa,ELN1*; *Mmu,ELN*; *Dre,ELNa*) através do software T-Coffee - Multiple Sequence Alignment. Desta forma, além de conseguirmos organizar as estruturas, podemos comparar os locais das regiões funcionais da elastina, verificar se existem zonas isoladas/não alinhadas e prever se houve de facto uma tendência evolutiva. Tal é possível pois este software apresenta um conjunto de algoritmos focados na comparação de sequências compreendidas em bases de dados. No caso de se verificar que realmente existe uma homologia de regiões, isso significa que provavelmente esses locais terão relações funcionais e/ou estruturais semelhantes.

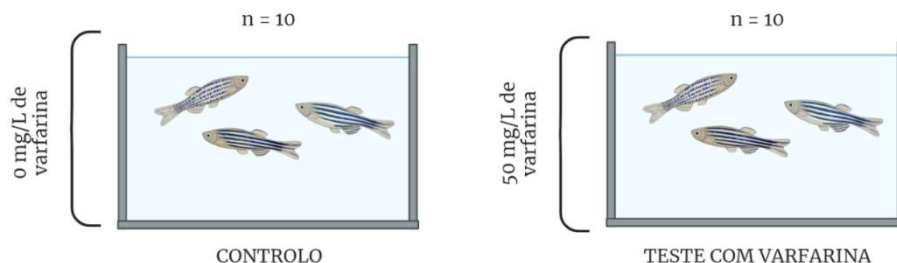
Posteriormente, aproveitámos também para comparar a estrutura das proteínas produzidas nas linhas Sa17177 e Sa42459, com a estrutura da proteína ELNa existente no peixe-zebra *wild type*.

### **3.6. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos, Sa42459 homozigóticos e *wild type* adultos**

Depois do estudo bioinformático da estrutura da elastina nas duas linhas mutadas decidimos, à semelhança da experiência desenvolvida no capítulo 3.2., realizar também um ensaio onde peixes Sa42459 heterozigóticos, com cerca de 2 meses e meio de idade, foram sujeitos a um protocolo de exposição a varfarina. Assim, como é visível na Figura 3.4 foram usados dois tanques, um desempenhando a função de grupo controlo (0 mg/L de varfarina) e outro onde os animais foram expostos a 50 mg/L de varfarina. Cada tanque foi preenchido com 1,5 L de água do sistema, e a este foram adicionados 10 peixes, tendo sido a amostragem feita aleatoriamente. Os dois grupos foram mantidos numa incubadora a 28,2° C, com um fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro.

Diariamente os tanques eram sifonados, os peixes alimentados e era feito o registo do comportamento dos animais, bem como da mortalidade. A cada dois dias, era feita uma substituição de 1 L da água dos tanques por água nova do sistema e, ao grupo sujeito à

concentração de 50 mg/L de varfarina, era adicionado novamente esta substância de modo a manter os seus níveis constantes. Ao longo dos 9 dias de experiência, os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração Zebrafeed.



**Figura 3.4.** Esquema experimental do protocolo de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos. n = número de animais por tanque. (figura obtida através da aplicação BioRender)

Após perfazer o período estabelecido, procedeu-se à realização de um banho de Alizarin Red (0,3% em H<sub>2</sub>O destilada, pH=7,6), técnica que permite assegurar a presença de calcificações nos tecidos de interesse. Para tal, 50 mL deste composto foram adicionados em 700 mL de água do sistema, de modo a se obter uma concentração final de 0,02%. Os peixes foram expostos a esta coloração durante cerca de 30 minutos. De seguida, realizaram-se quatro banhos com água do sistema, cada um entre 10-15 minutos, de maneira a garantir que todo o corante em excesso era descartado.

Mais tarde, realizou-se uma análise de tipo *live imaging* para que pudéssemos observar se de facto a exposição a varfarina provocou hemorragias e/ou calcificações nos animais. Assim, estes foram previamente anestesiados com uma solução de Tricaine (3,5 mL de Tricaine misturados em 100 mL de água do sistema) e fotografados em posição lateral, na zona peitoral e na barbatana caudal. Nestes dois últimos locais, foi usado fluorescência para permitir visualizar a presença/ausência de aglomerações de iões cálcio e fosfato.

Durante esta etapa, quatro dos animais do grupo Sa42459 expostos a varfarina faleceram. Assim, posteriormente, realizou-se a fixação e desidratação das amostras conforme o que se encontra descrito no Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas<sup>75</sup>. Estas mantiveram-se guardadas numa arca frigorífica a 4° C, até que mais tarde fosse possível realizar a análise histológica através das técnicas von Kossa (permite visualizar a presença de mineralização nos tecidos, protocolo pormenorizado no capítulo

3.12.) e VVG. Também neste ensaio foi do nosso interesse realizar uma imunohistoquímica através de anticorpos anti-elastina.

Para isso, os animais foram dissecados e procedeu-se à extração do coração para que depois pudessem ser feitos os cortes, apenas para este órgão, por criosecção (ver capítulo 3.9.). Esta diferença de protocolo comparativamente ao capítulo 3.2., deveu-se a tentar evitar que as amostras fragmentassem novamente e, que fosse possível uma análise mais detalhada deste tecido rico em elastina. De modo a termos também um grupo controlo nesta análise, foi feita de igual forma este mesmo procedimento para peixes WT. Estas secções foram depois distribuídas para que se conseguisse realizar as três técnicas acima referidas. Relativamente à imunohistoquímica, fizemos ainda uso de um controlo positivo através de secções de amostras de ratinho, nomeadamente do fêmur e do coração.

Para as linhas Sa42459 homozigóticos e *wild type*, foi feito este mesmo protocolo de exposição a varfarina tendo os animais, respetivamente, cerca de quatro e cinco meses de idade. Devido ao curto espaço de tempo, apenas foi possível realizar este ensaio até à etapa de *live imaging*. Após esta etapa, escolhemos alguns exemplares de cada grupo para que posteriormente fosse possível realizar uma dissecação do coração, seguido do seu registo fotográfico em condições normais e sob fluorescência.

Também devido ao período pandémico que vivemos, não nos foi possível realizar este mesmo estudo para a linha Sa17177 por restrição do tempo de trabalho.

### **3.7. Validação de anticorpos anti-elastina em peixes *wild type* e Sa42459 heterozigóticos**

Neste trabalho, desejámos ainda estudar o uso de anticorpos anti-elastina nos modelos de peixe-zebra mutados. Para isso foram encomendados anticorpos para a proteína pretendida.

Uma vez que não existe um anticorpo validado para a elastina no peixe-zebra, recorreremos então ao uso de dois anticorpos policlonais de coelho anti-ratinho (*ab21607* e *BA-4*). Os testes destes anticorpos podem ser feitos por western blot (1:2000), ou então por imunofluorescência (IF; 1:400-800). Como anticorpo secundário foi usado o anticorpo policlonal de cabra anti-coelho - *Alexa Fluor® 488*, caracterizado por absorver

radiação azul e emitir cor verde. O isotipo deste anticorpo é a imunoglobulina G (IgG, H+L).

Quando observado ao microscópio de fluorescência apresenta uma cor verde intensa, enquanto o background exibe uma cor amarelada.

### **3.8. Protocolo para obtenção de cortes histológicos**

O principal objetivo dos procedimentos histológicos é produzir secções de parafina muito finas e de boa qualidade para que posteriormente possam ser analisadas microscopicamente. Para isso, após os cortes as lâminas podem ser coradas ou sujeitas a um protocolo de imunohistoquímica. Esta análise permite observar possíveis alterações nos tecidos e /ou a presença de doenças.

#### Procedimento:

1- Após o sacrifício dos animais com excesso de Tricaine (6 mL de Tricaine misturados em 100 mL de água do sistema), estes foram fixados segundo o protocolo desenvolvido por Gavaia *et al.* em 2006 (Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas) e, posteriormente, guardados em etanol 70% a 4° C.

2- É essencial ainda, preparar também as lâminas com o protocolo seguinte: Revestimento de lâminas com o reagente (3-Aminopropyl)triethoxysilane, mais conhecido como TESPA, para histologia e hibridização *in situ*. Para isso as lâminas vão sofrer um esquema de montagem onde vão ser “lavadas” pela seguinte ordem:

2.1- Água destilada: Passagem rápida

2.2- Etanol a 100%: Passagem rápida

2.3- TESP A a 2% em acetona (2 mL em 100 mL de acetona): 30 segundos

2.4- Acetona a 100%: Passagem rápida x2

2.5- Água destilada: Passagem rápida

2.6- Deixar secar as lâminas numa incubadora a 40° C durante a noite, e no dia seguinte guardá-las à temperatura ambiente até uso posterior.

3- O passo seguinte passa por colocar as amostras num processador de tecidos, para proceder à inclusão em parafina (no nosso caso fizemos uso da máquina *Leica TP1020*).

Para isso as amostras foram previamente colocadas em cassetes descartáveis, e submetidas a várias soluções pela seguinte ordem:

- |                           |   |                       |
|---------------------------|---|-----------------------|
| 3.1- Etanol 70%, 15 min.  | } | Etapa de desidratação |
| 3.2- Etanol 90%, 15min.   |   |                       |
| 3.3- Etanol 100%, 15 min. |   |                       |
| 3.4- Etanol 100%, 30 min. |   |                       |
| 3.5- Etanol 100%, 45 min. |   |                       |
| 3.6- Xilol, 20 min.       | } | Etapa de limpeza      |
| 3.7- Xilol, 45 min.       |   |                       |
| 3.8- Parafina, 30 min.    | } | Etapa de inclusão     |
| 3.9- Parafina, 30 min.    |   |                       |
| 3.10- Parafina, 45 min.   |   |                       |

4- Depois de passarmos as nossas amostras para uns moldes de plástico, iniciamos o processo de obtenção dos blocos de parafina com recurso ao aparelho *Tissue embedding station 28157 & 28157-230*. Esta máquina engloba um centro de incorporação que permite verter parafina derretida para o nosso molde, e uma placa fria que permite exatamente arrefecer e solidificar o bloco.

5- Por fim, são feitas as secções com recurso a um micrótomo e a um *slide warmer*. Os nossos cortes foram feitos com uma espessura de 5 µm. Após o corte dos blocos, colocamos as secções numa lâmina, previamente preparada com uma gota de água destilada. É importante que as lâminas a usar (preparadas com TESPA) estejam sobre uma placa aquecida a 35° C. NOTA: Para que os cortes sejam limpos e corretos, os blocos devem estar frios (-1° - 0° C).

No nosso caso, a maioria das amostras fragmentaram após o corte. Assim, num trabalho futuro, talvez devêssemos recorrer a uma etapa de descalcificação após a fixação dos tecidos.

6- Após seccionar os tecidos, as lâminas devem ser armazenadas a -80° C para manter a integridade das proteínas/RNA, caso o objetivo seja fazer uma reação de imunohistoquímica ou uma hibridação *in situ*. Se o propósito for realizar colorações histológicas, basta armazenar no frigorífico a 4° C.



### 3.9. Protocolo para obtenção de cortes através de um criostato

Um criostato permite preservar e cortar amostras de tecido congelado, graças à existência de uma câmara que mantém a temperatura bastante baixa (inclusive valores negativos). O corte dos tecidos de interesse é feito graças a um micrótomo, que se encontra montado dentro do criostato.

#### Procedimento:

1- Após o sacrifício dos animais com excesso de Tricaine (6 mL de Tricaine misturados em 100 mL de água do sistema), estes foram fixados segundo o protocolo desenvolvido por Gavaia *et al.* em 2006 (Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas) e, posteriormente, guardados em etanol 70% a 4° C.

2- Lavar 3x com tampão fosfato salino (PBS 10x), durante 30 min cada lavagem.

3- Mergulhar as amostras numa solução de sacarose 15%, durante a noite a 4° C.

4- No dia seguinte, substituir a solução anterior por uma solução de sacarose 30% durante pelo menos 5h a 4° C (as amostras podem permanecer guardadas a esta temperatura até um período máximo de 2 meses).

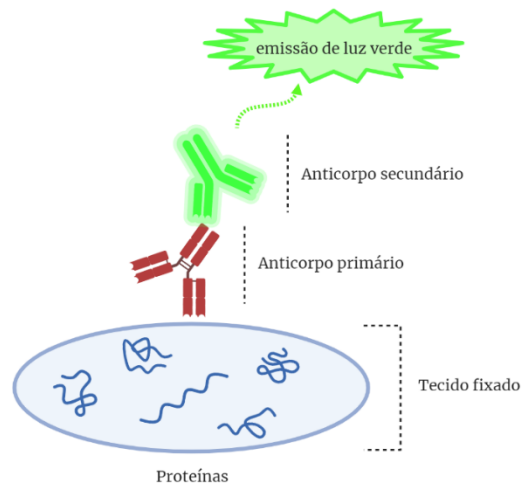
5- Extrair o coração dos animais em estudo e guardar a -80° C num bloco de plástico com Optimal Cutting Temperature (O.C.T. compound, meio de montagem para criosecção), até que se queira realizar as secções.

6- Mais tarde, realizar cortes com 10 µm através do uso de um criostato (recorremos a um micrótomo criostato rotativo CryoStar™ NX70 da *Thermo Scientific*). Para que isto seja possível necessitamos de uma temperatura de câmara de -20° C. É ainda importante que as secções sejam colocadas em lâminas microscópicas de carga positiva. Uma vez que as amostras biológicas tendem a apresentar uma carga negativa, o uso destas lâminas permite uma melhor adesão de células e tecidos à superfície da lâmina.

7- Após terminar os cortes, deve-se guardar as lâminas a -80° C até uso posterior. Para se proceder às colorações ou imunohistoquímica, basta primeiro retirar as lâminas do congelador, deixar descongelar durante alguns minutos e fazer uma lavagem em PBS.

### 3.10. Protocolo de imunohistoquímica para microscopia ótica

O objetivo desta técnica é detetar e identificar a presença de antígenos específicos através de uma reação anticorpo-antígeno (Figura 3.5). Esta técnica é muito usada em investigação, principalmente na anatomia patológica, pela grande capacidade de estabelecer ligação a diversos constituintes de interesse como proteínas, células e tecidos. Tal é possível, graças à formação de uma cor exclusiva para um determinado complexo antígeno-anticorpo.



**Figura 3.5.** Imagem representativa da técnica imunohistoquímica para microscopia ótica, utilizando um anticorpo secundário fluorescente. (figura obtida através da aplicação BioRender)

#### Procedimento:

1- Numa primeira etapa, retiramos as lâminas do  $-80^{\circ}\text{C}$  e deixamos descongelar durante alguns minutos.

2- No caso das amostras a tratar estarem em parafina, de seguida temos de proceder ao processo de desparafinação das lâminas (Xilol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 50%, 10min;  $\text{H}_2\text{O}$ , 10min). Se as secções a usar tiverem sido obtidas no criostato, esta etapa não é necessária pois as amostras não sofreram a fase de desidratação, e então prosseguimos diretamente para o próximo ponto do protocolo.

3- Lavar 3x com PBS, 5min.

4- Saturar os cortes com PBS + 4% soro de cabra, 30min.

5- Dissolver o anticorpo primário em PBS + 4% soro de cabra (5 µL de anticorpo primário para 750 µL de soro de cabra em PBS). Fazer esta etapa para os dois anticorpos em estudo (*ab21607* e *BA-4*, anticorpos de coelho anti-ratinho).

6- Incubar durante a noite as lâminas com o anticorpo primário, dentro de uma câmara húmida.

7- No dia seguinte, lavar 3x em PBS, 5 min.

Nota: Todos os passos seguintes devem ser realizados no escuro, pois os fluorocromos presentes no anticorpo secundário perdem rapidamente fluorescência quando expostos à luz ou aos UV.

8- Incubar durante 1 h com anticorpo secundário *Alexa Fluor® 488* (anticorpo de cabra anti-coelho) diluído em PBS + 4% soro de cabra (5 µL de anticorpo secundário para 750 µL de soro de cabra em PBS), em câmara húmida. Na Figura 3.5 podemos ver ilustrada a ação deste anticorpo de uma forma meramente representativa.

9- Lavar 3x em PBS, 10 min.

10- Montar as lâminas em glicerol e observar rapidamente ao microscópio sob luz UV (também se pode substituir o glicerol por um meio de montagem antifading, como é exemplo o DAKO ou Mowiol que são meios de montagem que evitam a perda de fluorescência).

No final os tecidos podem ser analisados e diferenciados segundo as seguintes cores:

- Tecidos reativos ao anticorpo: fluorescentes de cor verde intensa
- Background: cor amarelada

### **3.11. Protocolo de coloração de fibras elásticas através da técnica de Verhoeff-Van Gieson**

Para que a observação das fibras elásticas fosse possível, recorreremos ao uso da técnica de coloração de Verhoeff-Van Gieson, uma coloração histológica especialmente direcionada para a observação de elementos do tecido conjuntivo. Esta é ainda recorrentemente usada para comprovar a ausência ou desgaste de fibras elásticas em tecidos associados a problemas vasculares. Devido a diversos fatores, como é o caso do

envelhecimento ou problemas genéticos, estas fibras podem fragmentar perdendo assim a sua capacidade de promover a extensão, elasticidade e flexibilidade de certos órgãos e tecidos.

Por outro lado, uma vez que estas fibras são muito finas, torna-se impossível a sua visualização e análise pelos métodos tradicionais, como a coloração com hematoxilina e eosina. Assim, de uma forma sucinta, podemos dizer que a VVG é a técnica ideal para promover uma coloração rápida e intensa, além de permitir confirmar a presença ou ausência de fibras elásticas.

Uma outra grande vantagem desta coloração é que combina duas técnicas, Verhoeff e Van Gieson. Enquanto a primeira atua diretamente na marcação de fibras elásticas, a solução de Van Gieson é específica para o colagénio.

Reagentes:

➤ **Hematoxilina alcoólica:**

-Hematoxilina: 5,0 g

-Álcool absoluto: 100,0 mL

Dissolver a hematoxilina em álcool com a ajuda de um ligeiro calor, não ferver. Etiquetar com a data e iniciais, a solução é estável durante 1 ano.

➤ **Cloreto férrico a 10%:**

-Cloreto férrico: 10,0 g

-Água destilada: 100,0 mL

Misturar bem. Etiquetar com a data e iniciais, a solução é estável para 1 ano.

➤ **Iodo de Lugol:**

-Iodo: 2,5 g

-Iodeto de potássio: 5,0 g

-Água destilada: 50 mL

➤ **Hematoxilina de Verhoeff:**

-Hematoxilina alcoólica: 20,0 mL

-Cloreto férrico a 10%: 8,0 mL

- Iodo de Lugol: 8,0 mL

Adicionar por ordem, misturando entre as adições. Faça fresco e descarte.

➤ **Solução de diferenciação (cloreto férrico a 2%):**

-Cloreto férrico a 10%: 10,0 mL

-Água destilada: 40,0 mL

Usar feito de fresco.

➤ **Tiosulfato de sódio a 5%:**

-Tiosulfato de sódio: 5,0 g

-Água destilada: 100,0 mL

Misturar bem. Etiquetar com a data e iniciais.

➤ **Solução de Van Gieson:**

-Ácido Fuchsin a 1%: 1,0 mL

-Ácido pícrico, saturado: 45,0 mL

Misturar bem. Deixar repousar durante a noite. Etiquetar com a data e iniciais. Estável durante 2 semanas.

ATENÇÃO: Tóxico, evitar o contacto e inalação.

SEGURANÇA: Usar luvas (nitrilo), óculos de proteção e bata de laboratório.

Trabalhar numa área bem ventilada, utilizar a hotte, evitar o contacto e inalação.

-Ácido pícrico: tóxico, pode tornar-se explosivo se forem dadas as condições que favoreçam a sua solidificação.

-Iodo: sensibilizante dérmico, irritante aos olhos, pele e sistema respiratório.

Procedimento:

1- Desparafinar e hidratar as secções com água destilada (Xilol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 50%, 10min; H<sub>2</sub>Odd, 10min).

2- Aplicar a solução de hematoxilina de Verhoeff durante 30min (guardar a solução até que a coloração esteja completa).

3- Lavar as secções com água destilada.

4- Etapa de diferenciação através do uso de uma solução de cloreto férrico a 2%, até que seja possível observar microscopicamente a presença de fibras pretas bem definidas sobre um fundo cinzento.

5- Lavar as secções com água destilada.

6- Aplicar uma solução de tiosulfato de sódio a 5% durante um 1 min, de forma a remover o iodo.

7- Lavar as secções com água destilada.

8- Coloração de contraste com a solução de Van Gieson durante 5min.

9- Desidratar os cortes e lavar em xileno (Etanol 96%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min).

10- Montar as lâminas com EUKIT.

No final os tecidos podem ser analisados e diferenciados segundo as seguintes cores:

- Fibras e núcleos elásticos: preto
- Colagénio: vermelho
- Outros elementos do tecido: amarelo

### **3.12. Protocolo de coloração com von Kossa**

Esta coloração é recorrentemente usada em processos histológicos pois permite detetar a presença de quantidades anormais de cálcio nos tecidos. Tal é possível, porque estes depósitos de cálcio são transformados em sais de prata quando aplicamos uma solução de nitrato de prata a 1%. Este corante, que apresenta uma carga positiva, reage com as células aniónicas dando origem a forças eletrostáticas. De forma resumida, podemos dizer que os iões de cálcio, em contacto com a solução aplicada, são substituídos por iões de prata promovendo assim a presença de um aspeto metálico nos lugares onde houver presença de cálcio.

#### Procedimento:

- 1- Inicialmente, começamos por retirar as lâminas do frigorífico a 4° C.
- 2- De seguida, saturamos os cortes com uma solução de nitrato de prata a 1%, durante cerca de 60 min sob luz forte.
- 3- Lavar as amostras com água destilada.
- 4- Aplicar a solução de tiosulfato de sódio 2,5% por 5min.
- 5- Lavar as amostras com água destilada.
- 6- Coloração de contraste com azul de toluidina (1% em 0.1% Borax) por 5 seg.
- 7- Lavar as amostras com água destilada.

8- Desidratar os cortes e lavar em xileno (Etanol 96%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Etanol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min; Xilol 100%, 10min).

9- Montar as lâminas com EUKIT.

Sendo a azul toluidina um corante histológico metacromático, significa que as cores obtidas vão variar segundo as ligações estabelecidas entre a solução e os elementos do tecido (por exemplo: ácidos nucleicos, proteínas e glicosaminoglicanos da ECM). As secções podem ser analisadas e diferenciadas segundo as seguintes cores:

- Sais de cálcio: preto
- Estrutura normal do tecido: azul
- Proteoglicanos e glicosaminoglicanos: rosado

## 4. Resultados

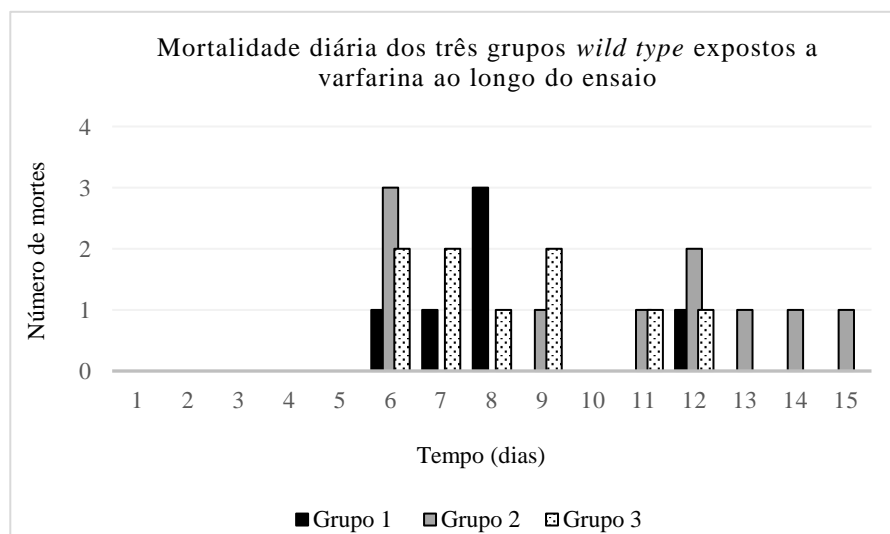
### 4.1. Experiência de exposição a varfarina com peixes *wild type* juvenis

O registo diário permitiu verificar uma incidência do número de mortes nos grupos sujeitos a este produto, antes de perfazer uma semana desde o início do tratamento. Assim, confirmou-se que a varfarina atua como VKA promovendo hemorragias e uma mortalidade acentuada (Figuras 4.1 e 4.2). Este composto afeta diretamente a reciclagem da vitamina K. Além disto, verificou-se que estes animais tendiam a manifestar um comportamento mais agitado, provavelmente devido à alteração do meio.



**Figura 4.1.** Exemplo representativo de um peixe *wild type* após a exposição a 25 mg/L de varfarina. Ponta de seta- hemorragia cerebral.

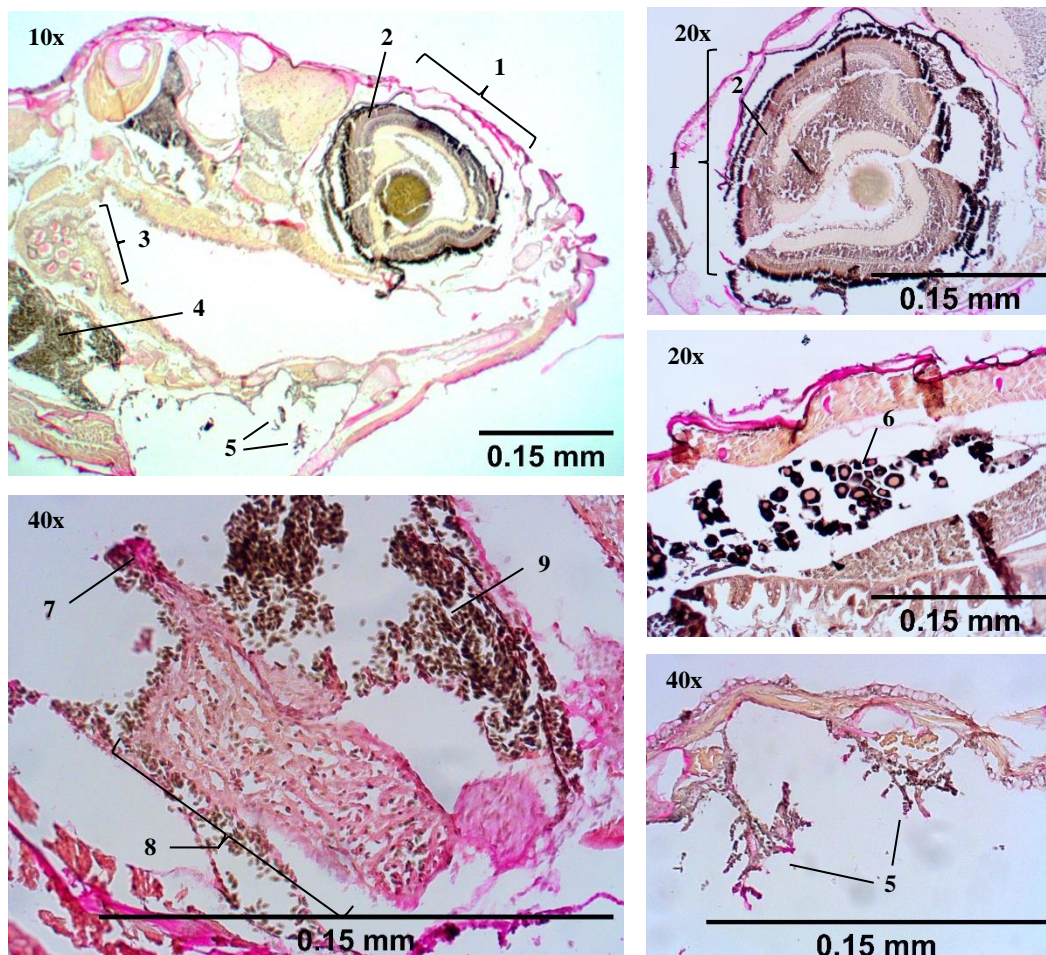
Num total de trinta peixes sujeitos a 25 mg/L deste fármaco, apenas sobreviveram cinco exemplares, quatro do grupo 1 e um do grupo 3. O gráfico da Figura 4.2 mostra a evolução do número de mortes ao longo da experiência. Nos grupos de controlo não foi registada nenhuma mortalidade.



**Figura 4.2.** Mortalidade diária dos três grupos *wild type* expostos a 25 mg/L de varfarina ao longo do período experimental.

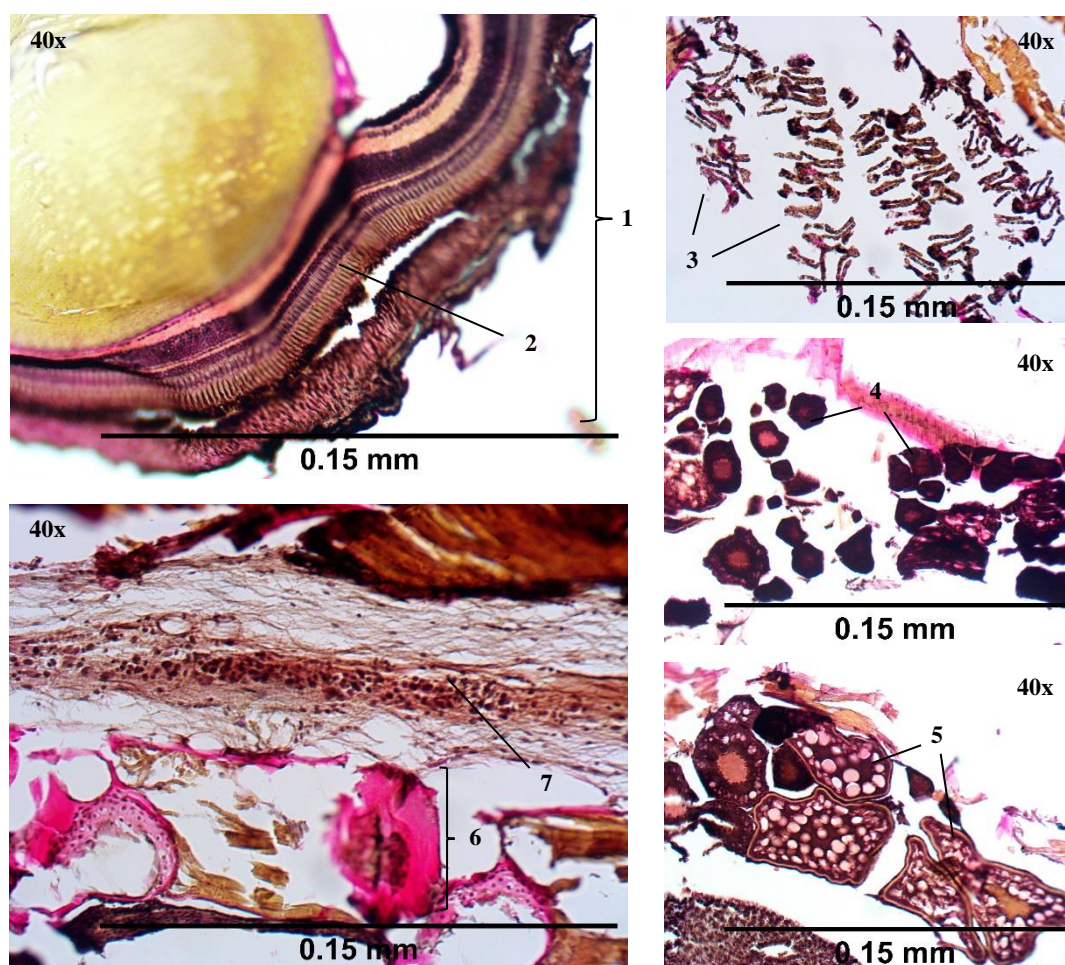


De seguida, realizámos a análise histológica pela técnica Verhoeff-Van Gieson (VVG). Como já foi anteriormente abordado, grande parte das secções fragmentaram no momento do corte, dificultando assim a análise, pelo que as figuras que se seguem poderão não representar completamente a estrutura “normal” deste modelo animal. Como podemos notar na Figura 4.3, a técnica de coloração de VVG resultou positivamente nas amostras WT não expostas ao tratamento. Através da cor preta conseguimos facilmente verificar a presença de fibras elásticas ao redor da borda do olho, na estrutura ocular, arcos branquiais, ovários e nas células sanguíneas, estando grande parte delas presentes no fígado. Ao contrário do que era esperado, o músculo cardíaco não foi tão fácil de examinar dada a sua localização no sítio de fragmentação das secções. Outra observação desta última estrutura foi estar predominantemente marcada a cor vermelha, cor representativa do colagénio.



**Figura 4.3.** Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para o grupo WT exposto a 0 mg/L de varfarina. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- estrutura ocular; 2- retina; 3- rim; 4- fígado; 5- arcos branquiais; 6- ovários; 7- aorta; 8- coração; 9- células sanguíneas.

Já os resultados dos peixes WT expostos a varfarina foram ligeiramente diferentes. Como podemos observar pela Figura 4.4, existe uma maior tendência para que os locais onde existe elastina manifestem uma cor preta bem mais intensa do que o que foi visualizado nos controlos (Figura 4.3). Mais uma vez as zonas marcadas predominam na estrutura ocular, arcos branquiais, vasos sanguíneos e gónadas masculinas e femininas. Não conseguimos uma foto representativa do coração neste grupo devido à fragmentação dos cortes.



**Figura 4.4.** Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para o grupo WT exposto a 25 mg/L de varfarina. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- estrutura ocular; 2- retina; 3- arcos branquiais; 4- ovários; 5- testículos; 6- vertebra; 7- vaso e células sanguíneas.

É sabido que este anticoagulante além de ser o responsável pelo aparecimento das hemorragias observadas, também promove a calcificação de diversos órgãos. Assim, havendo uma maior mineralização, era de esperar que consequentemente as fibras elásticas fossem degradadas levando a uma menor quantidade de elastina marcada nos

tecidos. Como tal não se verificou, podemos afirmar que os resultados alcançados foram contra a nossa hipótese. Futuramente seria interessante realizar um teste de coloração com von Kossa, de modo a conseguirmos entender a extensão e intensidade das calcificações.

Relativamente à imunohistoquímica podemos ver os resultados ilustrados na Figura 4.5. Ao contrário do que possa parecer, não conseguimos detetar sinal através do uso destes dois anticorpos anti-elastina. Tal poderá ser devido ao facto dos anticorpos de coelho contra ratinho não reconheçam a proteína de peixe-zebra, dado a diferença evolutiva entre os dois animais. O pouco sinal de fluorescência detetado, não correspondia realmente a sinais específicos e sim à sobreposição de cortes originando, portanto, pequenas interferências. De qualquer das formas, de modo a esclarecer dúvidas que possam surgir, poderíamos numa próxima etapa repetir esta experiência e aumentar a quantidade de anticorpo aplicado às secções. Não foram visíveis diferenças entre os dois grupos experimentais, nem destes para com as condições de controlo, para ambos os anticorpos utilizados.

Devido ao facto do controlo positivo também não manifestar qualquer tipo de fluorescência, apesar dos anticorpos usados serem teoricamente reativos em ratinho, sugere-se que a falta de sinal possa ser devido a um problema na técnica, ou à possível degradação dos anticorpos que poderão não estar a ligar ao antigénio.

**Figura 4.5.** Análise dos resultados obtidos pela técnica imunohistoquímica, tanto para o grupo controlo como para o grupo tratado com 25 mg/L. A cor verde fluorescente corresponde a tecidos reativos ao anticorpo, enquanto uma cor amarelada a background. 1- rim; 2- células sanguíneas; 3- arcos branquiais; 4- estrutura ocular; 5- intestino; 6- vaso sanguíneo; 7- coração; 8- fémur.

	CONTROLO PRIMÁRIO	ANTICORPO <i>ab21607</i>	CONTROLO SECUNDÁRIO, <i>ab21607</i>	ANTICORPO <i>BA-4</i>	CONTROLO SECUNDÁRIO, <i>BA-4</i>		CONTROLO POSITIVO, <i>ab21607</i>	CONTROLO POSITIVO, <i>BA-4</i>
WT exposto a 0 mg/L de varfarina						Amostras de ratinho		
WT exposto a 25 mg/L de varfarina								

## 4.2. Genotipagem das linhas Sa17177 e Sa42459

Através da genotipagem, além de confirmarmos a presença das mutações em estudo, conseguimos observar que na linha Sa42459 há a adição de uma adenina na cadeia mutada (posição 286034), explicando assim o desfasamento encontrado nos cromatogramas. No entanto, dado que esta inserção ocorre no intrão anterior aquele onde se encontra a mutação, acreditamos que não irá afetar a viabilidade dos animais. No Anexo II pode-se observar com mais detalhe a estrutura e organização do gene Elna em cada uma das linhas transgênicas.

Na Tabela 4.1 está diferenciado o número de animais, por gênero, para cada uma das mutações (1ª geração).

**Tabela 4.1.** Número de animais existentes na 1ª geração de peixes, para ambas as mutações em estudo.

<u>LINHAS</u>	<u>GÊNERO</u>	<u>NÚMERO DE ANIMAIS</u>
Sa17177	Machos	12
	Fêmeas	13 (atualmente 11)
Sa42459	Machos	13 (atualmente 12)
	Fêmeas	12

Como já foi levemente referido, posteriormente, realizámos também a genotipagem dos animais que resultaram dos cruzamentos na primeira linha de peixes. Assim, na Tabela 4.2, encontram-se os resultados das posturas efetuadas que permitiram levar à 2ª geração de peixes-zebra. Nesta mesma tabela, podemos ainda observar a quantidade de animais adquiridos por postura, e quantos correspondem a peixes homozigóticos, heterozigóticos e/ou WT siblings.

Devido ao período pandémico que vivemos e a alguns problemas técnicos com os equipamentos necessários, não nos foi possível realizar a genotipagem de todas as

posturas. Desta forma, nesta mesma tabela as posturas que não foram genotipadas estão representadas com um \_.

**Tabela 4.2.** Número de animais, por postura, existentes na 2ª geração de peixes-zebra para ambas as mutações em estudo. \_ - significa que a postura não foi genotipada.

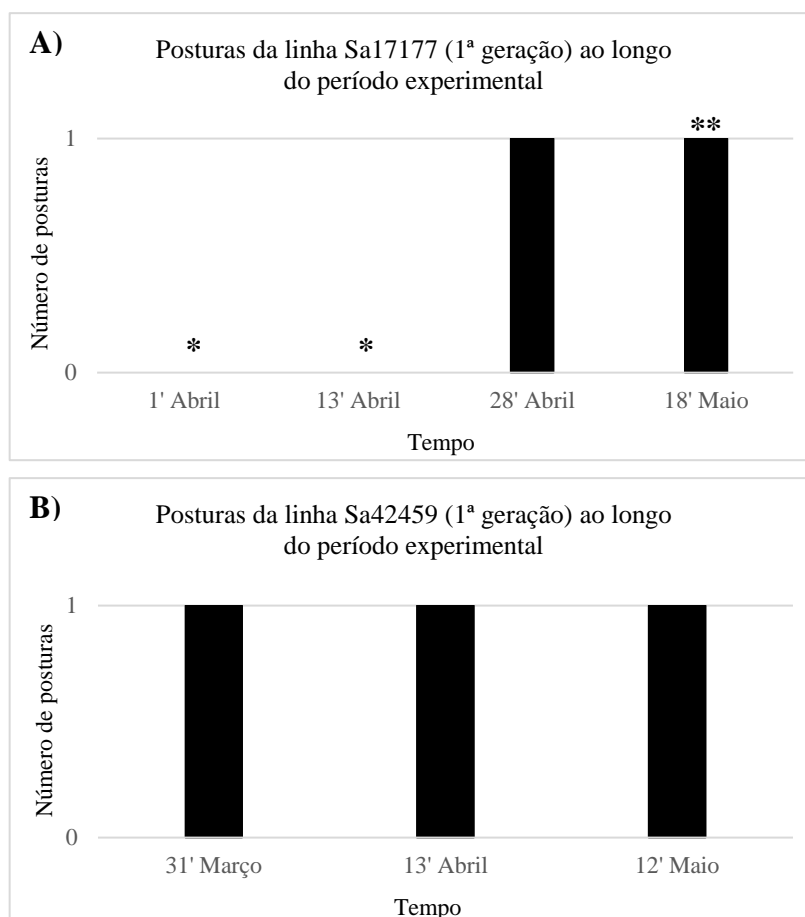
<b>LINHAS</b>	<b>POSTURA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	<b>NÚMERO DE PEIXES/POSTURA</b>
Sa17177	28' Abril	Homozigóticos	–	–
		Heterozigóticos	–	
		WT siblings	–	
	18' Maio	Homozigóticos	–	–
		Heterozigóticos	–	
		WT siblings	–	
Sa42459	31' Março	Homozigóticos	17	62
		Heterozigóticos	29	
		WT siblings	16	
	13' Abril	Homozigóticos	3	17
		Heterozigóticos	11	
		WT siblings	3	
	12' Maio	Homozigóticos	–	–
		Heterozigóticos	–	
		WT siblings	–	

### 4.3. Registo das posturas e mortes ao longo do ensaio experimental

Ao longo deste trabalho, foram realizadas várias posturas conforme se ilustra na Figura 4.6. Quanto mais cruzamentos fossem realizados maior seria a probabilidade de obtermos peixes homozigóticos.

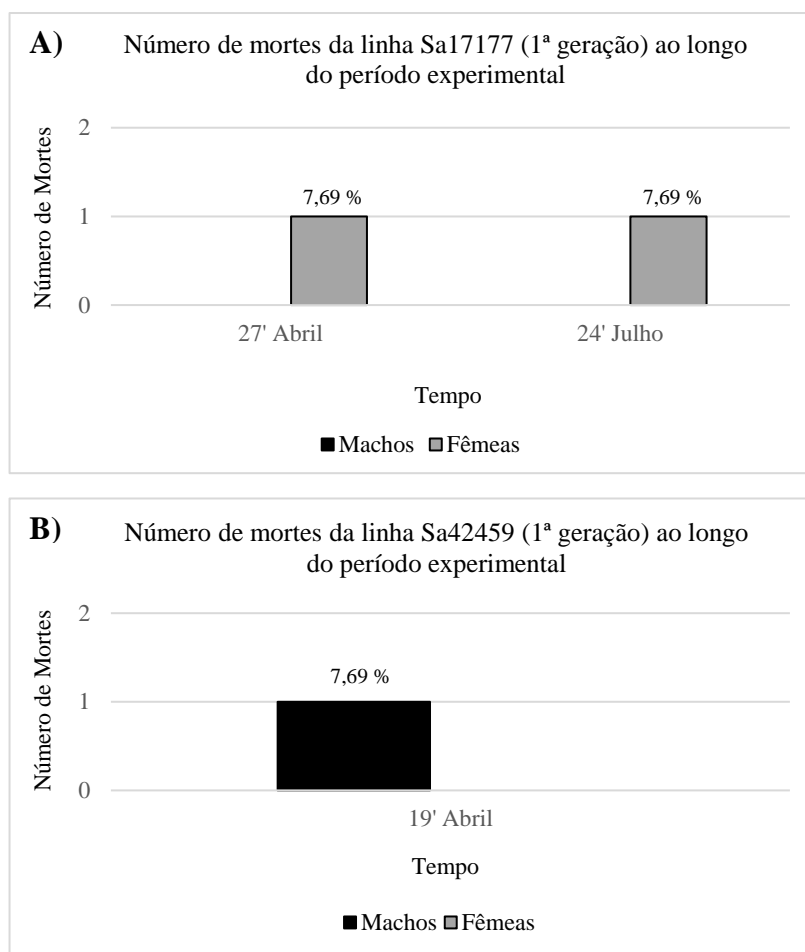
Na Figura 4.6, A é notável a ausência de produção de ovos viáveis nas duas primeiras posturas. Observou-se ainda que na quarta reprodução desta mesma linha, cerca de um

terço dos ovos postos resultaram em abortos após 24h da desova. Este facto despertou-nos curiosidade uma vez que na síndrome de Keutel, onde estamos perante uma MGP disfuncional, existem relatos de pacientes com abortos e problemas de fertilidade. Assim, estes dados levam-nos a supor que de facto poderá existir algum elo de ligação entre a MGP e a ELN na mutação Sa17177. Em contraste, na linha Sa42459 não se observaram problemas significativos na produção de ovos.



**Figura 4.6.** Posturas da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B) ao longo do ensaio experimental. \* - desova de ovos não viáveis; \*\* - produção de ovos, mas com alguma mortalidade nas primeiras 24h.

Durante o ensaio experimental, foi ainda feito o registo da mortalidade da primeira geração de peixes mutantes. Da análise da Figura 4.7 podemos concluir que em ambas as linhas estudadas se verificou um número de mortes relativamente baixo, correspondendo a 15,38 % para as fêmeas da linha Sa17177, e 7,69 % para os machos da mutação Sa42459.



**Figura 4.7.** Mortalidade da linha Sa17177 (A) e Sa42459 (B) ao longo do ensaio experimental.

#### 4.4. Relações biométricas e análise do fenótipo

Também para a 1ª geração foram registados os tamanhos dos espécimes, comparando depois as linhas transgênicas com peixes WT da mesma postura, de forma a poder avaliar possíveis diferenças significativas no desenvolvimento. Na Tabela 4.3 podemos examinar com mais detalhe os dados observados. Da sua análise, concluímos que os peixes Sa17177 machos são maiores que os WT do mesmo género, bem como das fêmeas mutantes desta mesma linha. Já estas últimas, não apresentam diferenças dos peixes controlo fêmeas. É ainda visível que esta linha possui animais com dimensões menores, aquando equiparado com a linha Sa42459.

Relativamente à outra mutação em estudo, verificou-se que os animais Sa42459 machos também apresentavam um tamanho superior comparativamente aos seus controlos e às fêmeas transgênicas. Paralelamente, os resultados observados nas fêmeas



desta linha foram diferentes, dado que estas mostraram ser ligeiramente mais pequenas que fêmeas WT da mesma postura.

**Tabela 4.3.** Relações biométricas de peixes adultos (1ª geração) das duas linhas de estudo.

<b><u>Linhas</u></b>	<b>Género</b>	<b>Média do comprimento total</b>	<b>Média da distância da cabeça ao opérculo (1)</b>	<b>Média da distância do opérculo à cauda (2)</b>	<b>Média da distância de (1) pelo comprimento total</b>	<b>Média da distância de (2) pelo comprimento total</b>
Sa17177	Machos (n=12)	2,92 cm	0,54 cm	2,38 cm	0,18 cm	0,82 cm
	Fêmeas (n=12)	2,70 cm	0,50 cm	2,20 cm	0,19 cm	0,81 cm
Sa17177, WT siblings	Machos (n=3)	2,63 cm	0,50 cm	2,13 cm	0,19 cm	0,81 cm
	Fêmeas (n=8)	2,71 cm	0,51 cm	2,21 cm	0,19 cm	0,82 cm
Sa42459	Machos (n=12)	3,73 cm	0,63 cm	3,10 cm	0,17 cm	0,83 cm
	Fêmeas (n=12)	3,46 cm	0,57 cm	2,90 cm	0,16 cm	0,84 cm
Sa42459, WT siblings	Machos (n=12)	3,48 cm	0,61 cm	2,87 cm	0,18 cm	0,82 cm
	Fêmeas (n=11)	3,55 cm	0,58 cm	2,97 cm	0,16 cm	0,84 cm

No entanto, quando olhamos para as duas últimas colunas da Tabela 4.3 podemos facilmente perceber que as diferenças entre linhas e géneros não são assim tão distintas. O facto de realizarmos a média da distância do opérculo pelo comprimento total, tem o propósito de averiguarmos se de facto os valores em causa são ou não significativos, o que neste caso não se verifica. No entanto, pelos dados que constam nesta tabela, não podemos afirmar que haja diferenças consideráveis no estado adulto destas duas linhas.

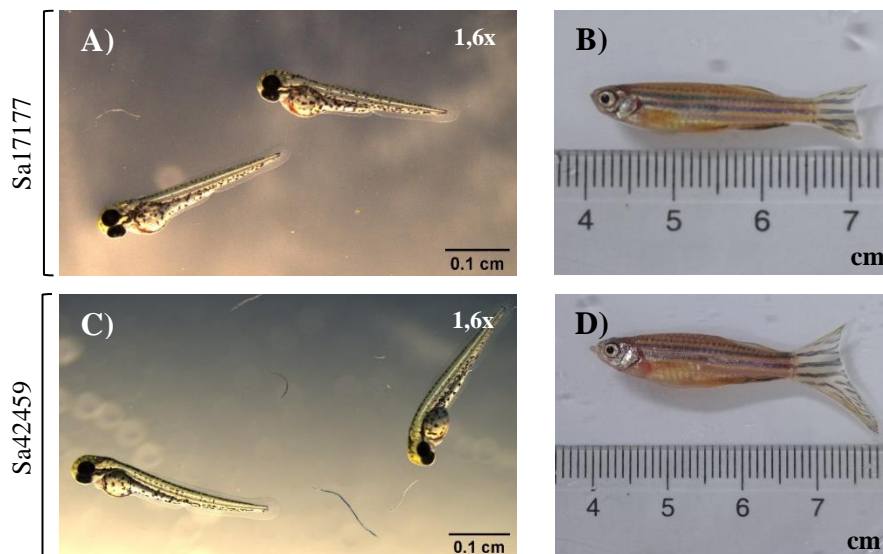
Assim, de forma a esclarecer se estes animais manifestam de facto alterações no crescimento, foi feito ainda um apanhado do comprimento de algumas larvas de ambas as linhas às 48h após o período de eclosão (Tabela 4.4). Da sua análise concluímos que os valores são semelhantes entre os dois tipos de mutantes. É de notar que estas larvas

não foram genotipadas, pelo que não sabemos se estamos ou não presente de animais transgênicos.

**Tabela 4.4.** Média do comprimento de larvas (2ª geração) com 48h, para as duas linhas mutadas.

<u>Linhas</u>	<u>Comprimento total</u>
Sa17177 (n=8)	0,3271 cm
Sa42459 (n=8)	0,3300 cm

Na Figura 4.8 podemos observar algumas das amostras analisadas, quer para as larvas quer para os peixes adultos heterozigóticos.





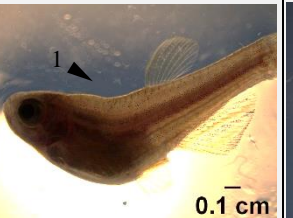


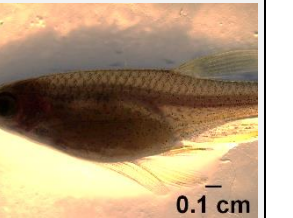

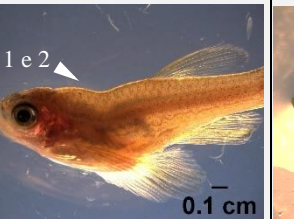


**Figura 4.8.** Imagem representativa dos tamanhos de algumas larvas e de peixes adultos. Em A e B podemos observar a linha Sa17177, enquanto que em C e D a linha Sa42459.

Relativamente à análise fenotípica os resultados foram diferentes. Como podemos ver na Figura 4.9, os animais da linha Sa17177 apresentavam uma estrutura esquelética normal, com ausência de deformações. No entanto, não nos podemos esquecer que estas amostras não foram genotipadas pelo que não sabemos se estávamos de facto perante animais transgênicos ou não (ainda que todos os animais exibissem o fenótipo típico).

Já na linha Sa42459 obtivemos resultados mais surpreendentes. Verificámos a existência de animais heterozigóticos e homozigóticos com anomalias esqueléticas, nomeadamente lordose, cifose e escoliose, logo na 2ª geração de peixes. Os espécimes WT da mesma postura manifestavam um fenótipo normal.

Os resultados da linha Sa42459 foram inesperados. Não era espectável a presença de anomalias nos mutantes heterozigóticos, e apenas sim nos homozigóticos uma vez que estes últimos apresentam ambos os alelos afetados.

**Figura 4.9.** Análise do fenótipo da 2ª geração de peixes mutantes das duas linhas em estudo. Fotos obtidas com uma ampliação de 0,8x. 1- lordose; 2- cifose; 3- escoliose.

LINHA	Sa17177	Sa42459					
		Heterozigóticos		Homozigóticos		WT siblings	
		Estrutura normal	Estrutura com a presença lordose, cifose e escoliose	Estrutura normal	Estrutura com a presença lordose, cifose e escoliose	Estrutura normal	
EXEMPLARES	*Espécimes não genotipados						
							
							

#### 4.5. Estudo bioinformático da estrutura da elastina

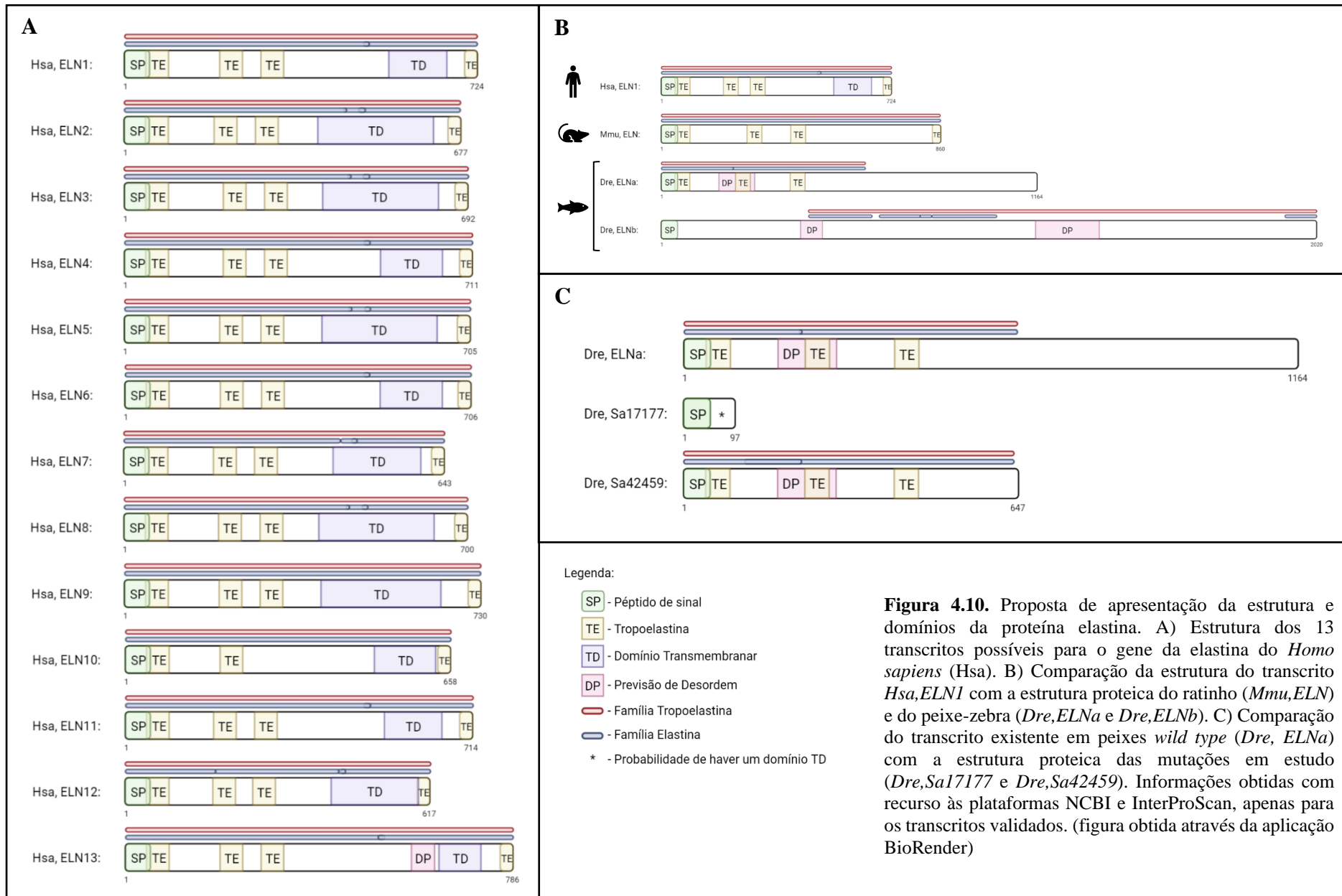
De maneira a tentar perceber o porquê de possíveis alterações no crescimento destes animais, desenvolvemos também um estudo bioinformático da estrutura da elastina. No ser humano é sabido que o gene que codifica para esta proteína se encontra no cromossoma 7 e possui trinta e quatro exões. Esta é expressa em vários tecidos como no coração, pulmão, pele, ligamentos e vasos sanguíneos<sup>83-86</sup>. No entanto, relativamente à sua estrutura e domínios que lhe estão associados, ainda pouco se sabe. Da análise da Figura 4.10, conseguimos concluir que o gene *ELN* no *Homo sapiens* tem treze isoformas possíveis por splicing alternativo. Todas elas são muito semelhantes em termos de constituição, mas ainda assim, existem pequenas diferenças que podem ser detetadas, como o número de aminoácidos ou a ausência de domínios. Um exemplo desta última situação é a estrutura da isoforma *Hsa,ELN10* que não apresenta o terceiro domínio tropoelastina.

É notável a existência de uma grande heterogeneidade de estruturas possíveis, bem como da sua organização, no ser humano. No entanto, não nos podemos esquecer que estes dados foram obtidos através da *multidatabase* do InterProScan. No fundo o uso deste software permite obter uma mera hipótese da estrutura e disposição de uma dada proteína. Assim, basta que exista um pequeno erro na codificação da sequência proteica para que certos domínios não sejam detetados e/ou estejam mal-organizados. Esta pode ser a justificação do mau alinhamento de certos domínios entre diferentes isoformas, mas também da ausência do terceiro grupo TE na estrutura *Hsa,ELN10*. Outra suposição passa pela diminuição do número de aminoácidos, resultando assim num menor *score signature* na plataforma e por isso, não detetando o domínio tropoelastina.

Observámos ainda que a *Hsa,ELN13* é a única a apresentar um domínio DP. Analisando com mais detalhe percebemos que o domínio transmembranar nesta estrutura é ligeiramente menor aquando comparado às restantes isoformas. Uma vez que este é um caso singular pode ser mais um exemplo do mau alinhamento por parte do software originando, portanto, um grupo TD menor e identificando um DP inexistente.

De seguida, fomos analisar e comparar a estrutura dos transcritos existentes no humano, ratinho e peixe-zebra. Para o representar *Homo sapiens* escolhemos a isoforma *Hsa,ELN1*, dado que foi a primeira estrutura a ser encontrada, e por ser também a que

Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel



**Figura 4.10.** Proposta de apresentação da estrutura e domínios da proteína elastina. A) Estrutura dos 13 transcritos possíveis para o gene da elastina do *Homo sapiens* (Hsa). B) Comparação da estrutura do transcrito *Hsa,ELN1* com a estrutura proteica do ratinho (*Mmu,ELN*) e do peixe-zebra (*Dre,ELNa* e *Dre,ELNb*). C) Comparação do transcrito existente em peixes *wild type* (*Dre, ELNa*) com a estrutura proteica das mutações em estudo (*Dre,Sa17177* e *Dre,Sa42459*). Informações obtidas com recurso às plataformas NCBI e InterProScan, apenas para os transcritos validados. (figura obtida através da aplicação BioRender)

melhor representa todas as isoformas existentes. Já para o *Danio rerio*, realizámos o estudo das duas isoformas atualmente encontradas, *Dre,ELNa* e *Dre,ELNb*.

Na Figura 4.10, B podemos observar desde logo que existe uma maior homologia entre as sequências do humano e do ratinho, ainda que este último animal não apresente o domínio transmembranar. Mais uma vez, também aqui a causa para a ausência do grupo TD pode estar num mau alinhamento da sequência, não havendo assim o reconhecimento deste domínio por parte da base de dados do InterProScan. Verificámos ainda que o ratinho apresenta mais 137 aminoácidos que o humano, provavelmente consequência da evolução a que este organismo foi sujeito. Um exemplo disso é o facto do gene que codifica para a elastina estar no cromossoma 5 e apresentar trinta e sete exões. Também neste animal a proteína tende a ser expressa no sistema cardiovascular, no sistema respiratório e ainda nas estruturas ligamentares do crânio<sup>87-90</sup>.

Consequentemente, no peixe-zebra existem também algumas diferenças. Como já foi anteriormente abordado, o gene que codifica para esta proteína encontra-se no cromossoma 15 e é constituído por cinquenta e sete exões. Este organismo exhibe dois tipos de elastina, elastina a e elastina b, que como podemos observar pela Figura 4.10, B apresentam diferenças na organização dos seus transcritos. Começando pela *Dre,ELNa*, concluímos que esta estrutura não apresenta o quarto domínio TE, domínio esse anteriormente observado no humano e no ratinho. Além disto, mostra um domínio DP junto ao segundo grupo tropoelastina, e a presença de um grande espaço em branco no final da estrutura. Esse local, atualmente ainda sem qualquer tipo de função associada, poderá corresponder à parte estrutural e/ou funcional da proteína. Para esclarecermos esta questão mais estudos terão de ser realizados.

Já o transcrito *Dre,ELNb* mostra uma estrutura completamente distinta. Desde logo notamos a ausência de qualquer grupo tropoelastina, sendo a única semelhança para com as proteínas anteriormente observadas a localização do péptido sinal. Comparando este transcrito com o *Dre,ELNa*, facilmente concluímos que a estrutura da elastina b apresenta mais um domínio DP e 857 aminoácidos. As diferenças entre estas duas isoformas sugerem uma tendência evolutiva, podendo ter resultado em funções diferentes. É de ressaltar mais uma vez que este estudo foi feito com base no algoritmo da plataforma InterProScan e, portanto, os esquemas realizados são com base numa percentagem de aceitação, podendo não corresponder à estrutura real da proteína. Assim sendo, a probabilidade de existirem domínios não identificados não deve ser descartada.

Posteriormente, aproveitámos também para supor e comparar a estrutura das proteínas produzidas nas linhas Sa17177 e Sa42459, com a estrutura da proteína ELNa existente no peixe-zebra *wild type* (Figura 4.10, C). A primeira observação da estrutura *Dre,Sa17177* é o pequeno tamanho da proteína, apresentando apenas 97 aminoácidos. Isto poderá levar obviamente a alterações quer a nível de estrutura, quer a nível funcional. Notámos ainda que há a probabilidade de haver um domínio TD, mas uma vez que as sequências *Dre,ELNa* e *Dre,Sa42459* não o apresentam, pomos em hipótese que se trate apenas de um mero artefacto. Poderá ter sido também uma falha por parte do software.

Por fim, a isoforma *Dre,Sa42459* mostra semelhanças notáveis com a estrutura dos peixes *wild type*. A única diferença é a ausência do “espaço branco”, resultando por isso numa proteína com menos 518 aminoácidos, o que poderá implicar diferenças relativamente à estrutura e função original (*Dre,ELNa*).

Na Tabela 4.5 estão indicados os diversos domínios observados nesta proteína, assim como as respetivas funções.

**Tabela 4.5.** Domínios da elastina e respetivas funções.

<b>DOMÍNIOS DA ELASTINA</b>	<b>FUNÇÃO</b>
<u>Péptido sinal (SP)</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Promove a secreção da proteína do citoplasma para a matriz extracelular</li></ul>
<u>Tropoelastina (TE)</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Interação com microfibrilas na ECM</li><li>• Montagem das fibras elásticas</li></ul>
<u>Domínio transmembranar (TD)</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Regiões hidrofóbicas responsáveis pelo transporte intracelular</li></ul>
<u>Previsão de desordem (DP)</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prevê a possibilidade/tendência de existirem regiões desordenadas/não estruturadas numa proteína</li></ul>

Como já foi anteriormente abordado, após a análise destas estruturas procedeu-se ao alinhamento das mesmas através do software T-Coffee, escolhendo apenas uma sequência para representar cada um dos animais. Assim, na Figura 4.11 podemos observar o alinhamento das sequências *Hsa,ELN1*, *Mmu,ELN* e *Dre,ELNa*.



Numa primeira análise concluímos que embora alguns dos domínios funcionais coincidam, nunca existe uma homologia completa nos três organismos em estudo. Inicialmente, conseguimos observar que a região que corresponde ao péptido sinal apresenta praticamente o mesmo número de aminoácidos nas três espécies, e que existe uma maior similaridade entre o humano e o ratinho.

Relativamente aos domínios de tropoelastina conseguimos facilmente ver maiores diferenças. No primeiro grupo TE a ausência de aminoácidos tanto no *Hsa,ELNI* como *Mmu,ELN* é um facto, pelo que nos leva a supor que provavelmente a sua causa será a tendência evolutiva a que estas espécies foram sujeitas. Por outro lado, não nos podemos esquecer que estes resultados baseiam-se no algoritmo do software, podendo assim existir locais mal alinhados que nos poderão levar em erro. Passando ao segundo grupo tropoelastina, as três sequências apresentam igual número de resíduos e pelo menos treze locais alinhados foram observados. Já o terceiro domínio TE apresenta-se ligeiramente desfasado na sequência *Dre,ELNa*, ainda que seja de fácil visualização a presença de vários locais emparelhados entre as três espécies. Assim, à semelhança do segundo domínio TE, era de esperar que o também este terceiro grupo tivesse uma maior similaridade entre as três sequências. Desta forma, especulamos que talvez possa ter havido um mau alinhamento por parte do software T-Coffee provocando um desfasamento na sequência correspondente ao peixe-zebra, ou então que as informações que constam nas bases de dados estejam desatualizadas ou incorretas levando-nos ao equívoco sobre quais os resíduos que realmente correspondem ao terceiro domínio TE no *Dre,ELNa*.

Por fim, é visível que apenas os dois mamíferos apresentam um quarto grupo tropoelastina mesmo no limiar da sequência. Também esta informação nos deixou apreensivos, dado que é de fácil observação a presença de vários locais alinhados nos três animais em estudo. Portanto, supomos que também nesta situação possa haver informações incorretas e que muito provavelmente também exista um quarto domínio TE no peixe-zebra, que pode apenas não estar a ser representado por falha do software.

Ainda da análise desta figura, concluímos que apenas o *Homo sapiens* manifesta a presença de um domínio transmembranar, enquanto o *Danio rerio* é a única espécie a exhibir um local de previsão de desordem. Em ambas as situações, várias regiões apresentam pequenas zonas conservadas. Estas informações vão de acordo ao observado na Figura 4.10.

Verificamos também na Figura 4.11 vários locais emparelhados, apesar de não estarem associados a um domínio específico. Mais uma vez, não nos podemos esquecer que este alinhamento é baseado num algoritmo e nas informações existentes nas bases de dados, pelo que estes vários locais alinhados podem apresentar funções associadas à estrutura ou à parte funcional da proteína, mas não estarem associadas diretamente a um domínio por não haver um registo destas informações nas bases de dados.

De maneira a conseguir esclarecer todas estas informações, poderíamos estender o nosso estudo a mais espécies e, para além do alinhamento das diversas sequências, fazer um ajuste manual permitindo assim uma melhor visualização dos locais conservados. Outra sugestão, seria ainda realizar um *WebLogo* para que pudéssemos efetuar uma representação gráfica do alinhamento das sequências, promovendo também uma interpretação mais fácil dos resultados.

Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel

```

HsaELN1  MAGLTAAAPRPGVLLL-LLSILHPSRPGGVP--GA-----IPG----GVPGGVFYPGAGLGALGG--GALGP
MmuELN  MAGLTAVVPQPGVLLILLNLLHPAQPGGVP--GA-----VPGGLPGGVPPGGVYYPGAGIGLGGGGGALGP
DreELNa  MANRSVALLLLGFFL--SVQLSPSLQGGVYVQAGGGGAGPGGA-GVLPAGAGLYPGAGSSPY-----
cons    ** . : . . * . : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  GKKPLKP-----VPGGLAGAGLGAGLGAFPAVTFPG--ALVPGGVADAAAAYKA-----AKAGAGL
MmuELN  GKKPKPGAGLLGTFGAGPGLGGAGPGAGLGAFPAVTFPGAGALVPGGAAGAAAAYKAA-----AKAGAGL
DreELNa  -----KAAKAAAGGYGGAAGAGALGAGGYGAGGYGGYGGYGGAGRFYPMAGGLPKAKSGAGL
cons    . . . * * . * * * * : * : . * * . . * * *

```

```

HsaELN1  G---GVPG-----V-----GGLGVSAGA
MmuELN  GGVGVPGGVGVGG-VPGGVGVGGVPGGVGVGGVPGGVGGIG---GI-----GGLGVSTGA
DreELNa  PGG-VLPGGVLPGGVLPGGVLPGGVLPG--GGLPFGGAGGKPKPGPGVGGAGTGLPGLGIPQTGVQGLGPGG
cons    : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  VVPQPGAVK----P--GKVPVGLPGVYPGGVLP--GARFPGVGVLPGVPTGAGVKPKAPGVGGAFAGIPG
MmuELN  VVPQVGAGIGAGGKPK--GKVPVGLPGVYPGGVLPGTGARFPGVGVLPGVPTGTGVKAKAPGGGAFAGIPG
DreELNa  VGPQAKAAK----AGKAPVPGVGVPGPYQGG-LP--GQGFNGRGVLPGVATGTGLKPKSGGGQGLVPGAGG
cons    * * * * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  VGPFGGP-QPGVPLGYPIKAPKLPGGYGLPYTTGKLPYGYG-----PGGVAGAAGKAGYPTGTGVGPQA
MmuELN  VGPFGGQ-QPGVPLGYPIKAPKLPGGYGLPYTNGKLPYG-----VAGAGGKAGYPTGTGVGSQA
DreELNa  RGPFGGP-LQQGVFHGYPLKSPKAPGA-GLPYTGGKLPYGYGGFGGGAGLPGGKAGAGSKPGYPTGTGVGSLG
cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  AAAAAKAAAKFGAGA----AGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTAAAAAATAKAAKYGAAAGL
MmuELN  AAAAAK--AAKYGAGG----AGVLPVGGGGIPGGAGAIPIGIGGIAGAGTAAAAAATAKAAKYGAAGGL
DreELNa  VSAAQAK-AAKYGAGAGLGGAGAFPGGVGAGLG-GAGAFPGGAGGFYPGAVGTGGLTPAQAKAAKYGA----
cons    . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  VPGGP-----GFGPGVGVPGAG-----VPGVGV-PGAGIPVV-PGAGI-PGAAV---PG
MmuELN  VPGGP-----GVRLLPGAGIPGVGG-----IPGVGIPGVGGPGI-GGPGI-VGG----PG
DreELNa  VPGATGIGGLPGAGGL-FP---GPGVGGAGALSPAQAKAAKYGAGAVPGG-AGVLPGGAGVLPGGAGGIYPA
cons    * * * . . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  VVSPEAAKAAKAAKYGAR-PGVGCGIPTYGV----GA-----
MmuELN  AVSPAAKAAKAAKYGAR-GGVG---IPTYGV----GA-----
DreELNa  PGGAGALSPAQAKAAKYGAVPGGA--G-VLPGGAGVLPGGAGVLPGGAGIYPGAGGVYAPGGAGALSQA
cons    . . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  -----GGFPG-----FGVGVGG-----IPGVAGVP
MmuELN  -----GGFPG-----YGVGAGA-----GLGGASPAKAAKAAKY
DreELNa  KAAKYGAGAVPGGAGILPGGAGILPGGAGILPGGAGILPGGAGIYPGAGGVYPGAGG-AGALSQAQAKAAKY
cons    * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  GVGVPVGGV-PGV--GISPEAQAAAAKAAKYGVGTAAAAAATAKAAK-AAQFGLVPGV-GVAPG-VGVAP
MmuELN  GAGGAGALGGLVPGAVPGALPGAVPAVPGAGVPGAGTAAAAAATAKAAKAGLGPV-GGVPGGVGVG-
DreELNa  GAGAVPGGAGILPGG-AGILPGGAGIGPG-GVYPTG-GGAGALSQAQAKA-KYAVPGGAGILPGGAGILP
cons    * . . . . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  GV-----GVAPGVGLPAGVAVPGVGV-----APGVGAPG-IGPGG-VA-----
MmuELN  G-----IPGGVGVG-GVPGGVGG-----VTGIGAGPGLGGAG-SF-----
DreELNa  GAGGVYPGAGGAGALSQAQAKAAKYGAGAVPGGAGVLPGGAGIYPGRITGIVPAGPGIYPGAGGVYPATGGLT
cons    * . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

HsaELN1  -----
MmuELN  -----
DreELNa  PAQAKAAKYGLGAAGGAGAVPGVGGLYPGAGGAVAPGYGSVAGLGGQLGAGGLAAGAKPKYVPGGTGFG
cons    -----

```

(A imagem continua na página seguinte)

## Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel

```

HsaELN1 -----AAKSAAKVAAKAQLRAAAGLGAGIPGLGVGVGVP--LGVGAGVPGLGVGAGV
MmuELN -----AAKSAAKAAAKAQYRAAAGLGAGVPGFGAGAGVPG--FGAGAGVPGFGAGAGV
DreELNa VPGGVPGGIPITGPGGYPAGAKALKYGLSGGLPAGTGVVPLQRPGLGGALGGAGTGTGYPFPGGYGAGAKP
cons          * . ** :      . . .      * . : : . * :      * * . : *      * . *      . * * . **

HsaELN1 PGFG-----AV-----PGALAAAKAAKYGAA-----V--PGVLGGLGALGGVGIPGGV----
MmuELN PGFGAGAGVPGFGAGAV-----PGSLAASKAAKYGAAGGLGGPGGLGG--PGGLGGPGGLGGAGVPGRV----
DreELNa PKYGVPGGVPGGVPGGVPGGVPGGYPAGVKPPKYGVAGGAGTVPAGAGVPLAGTGTGLAPGAGVGGYPGGVK
cons          * : *      . *      * * . * . * . * . *      *      * *      * . * : *

HsaELN1 -----VGAG-PAAAAAAKAAKAAQFLVGAAGL-----
MmuELN -----AGAAPAAAAAAKAAKAAQYGLGGAGGLGAGGLGAGG
DreELNa PPKTGAGIAGTGIAAPGATPGGTGIVVPGVPGGTGIAVPSGTGVPILPSGKPAKLPTLAPAGTAVPGGAQR-
cons          . * . * : . . . . .      . : * . * :      . . . * .

HsaELN1 -----GLGVGGLGVPGVGGLGGI P P A A A A K A -----A K YGAAGL-----
MmuELN LGAGGLGAGGLGAGGLGAGGLGAGGLGAGGVSPAAAAKA-----AKYGAAGL-----
DreELNa -----VPGAVPGGAYPYGSGQYYGSAGPSGVGTGVLPGAKPLKAPG
cons          . : * . . . *      * : * * .

HsaELN1 -----GVLGGAGQFPLGGVAARPFGFLSPIFPGG-----
MmuELN -----GVLG-ARPFPGGVAARPGFLSPIYPGGGAGGL
DreELNa VGGAGGVGGVGLYPGAGVGLGTGGVGTGAKPPKPYGVSV-G-TGYAQP GGVAAG-GYG--AYPGGYGAGL
cons          . * * :      * * * * *      * : *      : * *

HsaELN1 -----ACLGKACGRKRK
MmuELN GVGGKPPKPYGGALGAL---GYQG-GGCFGKSCGRKRK
DreELNa SPQQAKAAKYGGGLTGFLGGGYRGGAGCQGYCGRRRK
cons          . * * * * * : * *

```

### Legenda:

- Péptido de sinal
- Tropoelastina
- Domínio Transmembranar
- Previsão de Desordem

- - Falta de um ou mais aminoácidos

\* - Sequência alinhada nos três animais em estudo

: - Local onde se observam substituições conservadas de resíduos, ainda que estes estejam associados a um grupo de aminoácidos com uma forte semelhança

. - Local onde se observam substituições semi-conservadas de resíduos que estão associados a um grupo de aminoácidos com uma fraca semelhança

\*  
 - Mutação Sa17177  
  
 - Mutação Sa42459

**Figura 4.11.** Alinhamento das sequências proteicas da elastina no *Homo sapiens* (Hsa,ELN1), ratinho (Mmu,ELN) e peixe-zebra (Dre,ELNa) através do software T-Coffe. A previsão dos diversos domínios foi realizada graças à plataforma InterProScan.

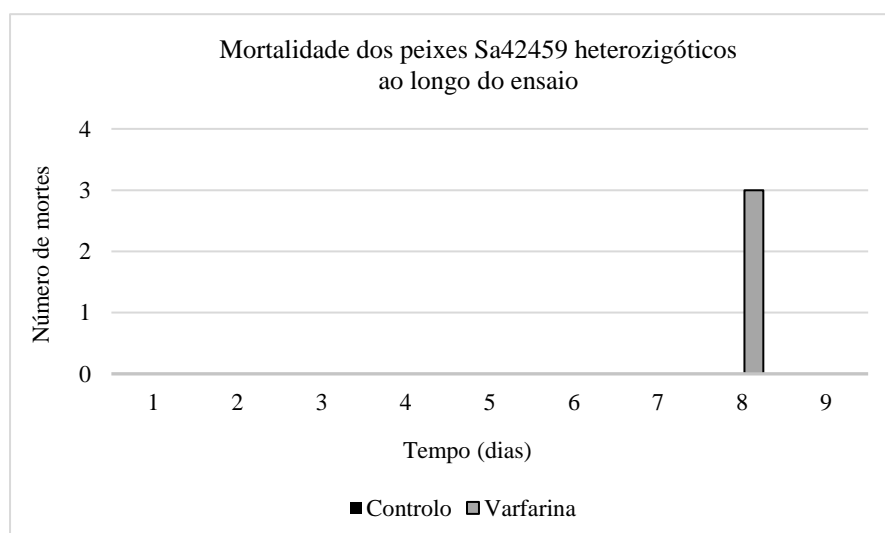
## 4.6. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 heterozigóticos

Desde o início do tratamento, os espécimes de ambos os grupos manifestavam um comportamento agitado, sendo mais evidente nos peixes expostos a varfarina. Dado que nesta experiência também o grupo controlo apresentou alterações a nível

comportamental, a justificação para esta atitude não poderá recair apenas na exposição com varfarina podendo, por exemplo, o manuseio dos animais ser um dos fatores que despoletou esta reação. Verificámos ainda que também o grupo tratado, não ia imediatamente à comida quando era disponibilizado alimento. Assim, estas observações levam-nos a sugerir que talvez o uso deste anticoagulante possa afetar diretamente a reação a estímulos, bem como a atitude deste nosso modelo animal.

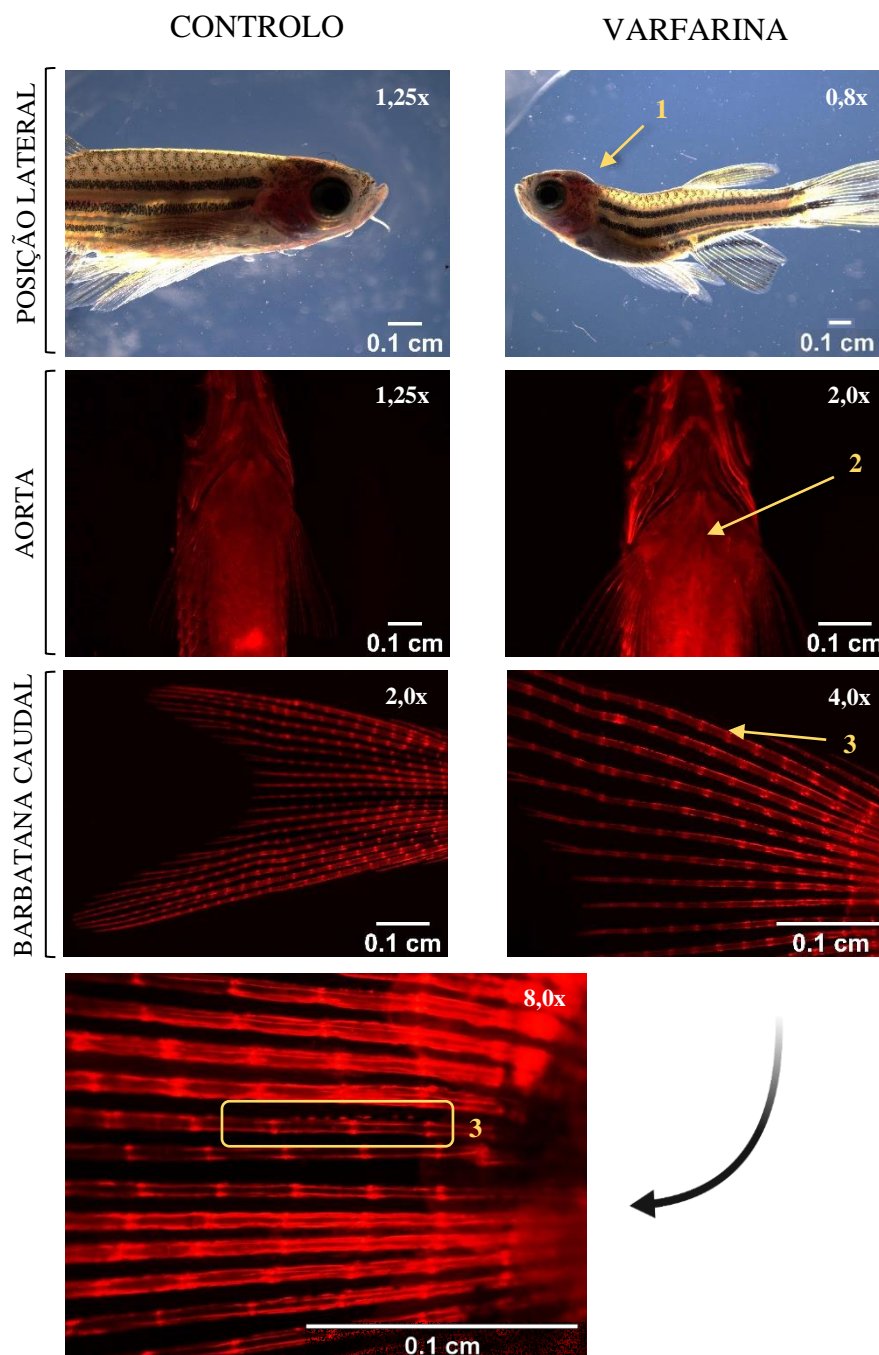
Ao fim do 5º dia de ensaio, dois dos peixes mais pequenos sujeitos ao tratamento com varfarina manifestavam hemorragias cerebrais, enquanto no 6º dia de experiência, o número de animais com lesões subiu para cinco. Já no penúltimo dia, este número voltou a aumentar e pelo menos três mortes foram registadas, sendo em duas delas visível a presença de hemorragias na cabeça, podendo esta ser certamente a causa da mortalidade. Podemos assim dizer que também nesta experiência, a varfarina atua como VKAs promovendo hemorragias e provocando uma redução do número de amostras expostas ao tratamento.

Na Figura 4.12 podemos observar a mortalidade ao longo do tratamento. Assim, para a concentração de 50 mg/L de varfarina, foram registadas três mortes ao 8º dia do ensaio experimental. De notar que após o *live imaging* quatro animais deste mesmo grupo faleceram, provavelmente devido aos procedimentos realizados. Relativamente ao tanque controlo, não foi registada qualquer de mortalidade.



**Figura 4.12.** Mortalidade nos dois grupos da linha Sa42459 heterozigóticos (controlo e com exposição a 50 mg/L de varfarina) ao longo do período experimental.

Alguns dos resultados obtidos do *live imaging* estão representados na Figura 4.13. Também aqui confirmamos que os animais tratados com o anticoagulante apresentam realmente hemorragias cerebrais. Além disto, é visível que a zona da aorta se apresenta com coloração por vermelho de Alizarina, algo que não foi observado nos grupos controle, indicando por isso que esta região se encontra calcificada. Também nos vasos

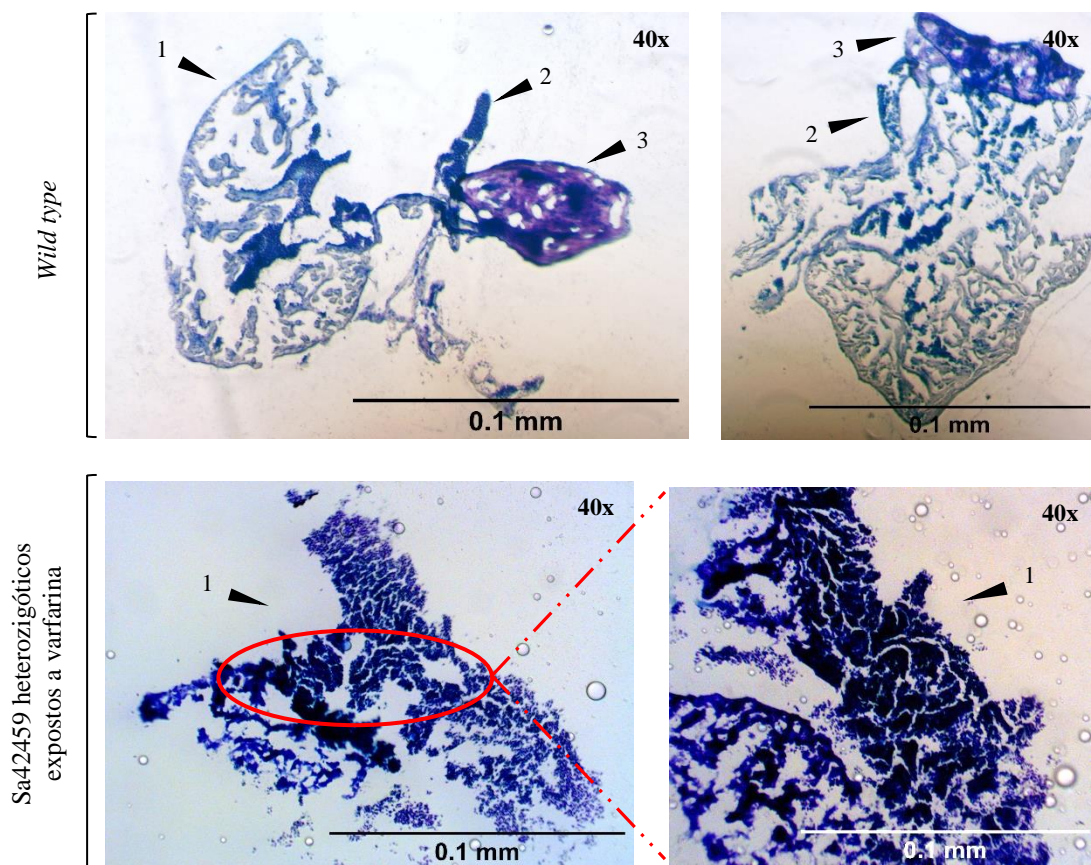


**Figura 4.13.** Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes Sa42459 heterozigóticos, no estado de controle e quando tratados com varfarina. 1- hemorragia cerebral; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados).

sanguíneos da barbatana caudal é observável, sob a forma de um ligeiro ponteados/picotados, que estas estruturas são alvo da acumulação de íons cálcio e fosfato.

Nesta mesma figura é possível observar o fenótipo característico de alguns animais desta linha, com alterações na estrutura esquelética (lordose e escoliose), que conseqüentemente afeta a viabilidade destes espécimes no meio ambiente. De uma forma geral, podemos dizer que dos sete peixes analisados: três apresentavam deformidades esqueléticas, cinco tinham lesões cerebrais e os sete manifestavam calcificações nas zonas analisadas.

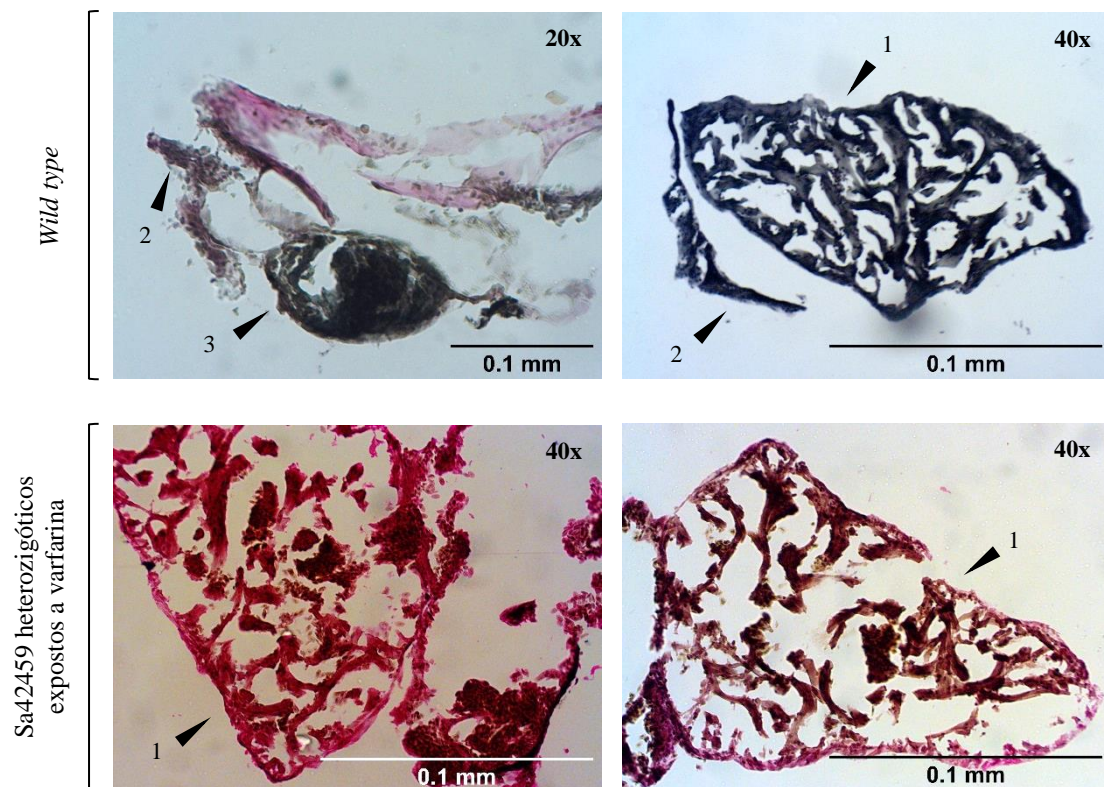
Posteriormente, como já foi referido, realizámos a análise histológica dos corações expostos à coloração com a técnica de von Kossa. Na Figura 4.14 podemos ver ilustrados os resultados obtidos para os peixes Sa42459 heterozigóticos tratados com varfarina, e para o seu grupo controlo (peixes WT).



**Figura 4.14.** Análise histológica das secções coradas com von Kossa para ambos os grupos experimentais. A cor preta corresponde a locais onde existem depósitos de cálcio, como resultado do tratamento com varfarina. 1- ventrículo; 2- tubo da aorta; 3- bolbo arterioso.

Comparando os dois grupos experimentais concluímos que as diferenças são notórias. Facilmente percebemos que nos animais heterozigóticos da linha mutada, existe a aglomeração de manchas escuras que correspondem a sais de cálcio depositados no tecido cardíaco. Podemos então afirmar que esta coloração realmente permitiu detetar a presença de quantidades significativas de cálcio no coração de peixes tratados com o anticoagulante varfarina, sendo este o principal causador destas alterações.

De modo a poder averiguar se a presença de calcificações neste tecido levou à degradação de fibras elásticas, de seguida procedemos à análise histológica das secções coradas com a técnica VVG. Na Figura 4.15 constam os resultados observados para os dois grupos experimentais.



**Figura 4.15.** Análise histológica das secções coradas pela técnica VVG para ambos os grupos experimentais. A cor preta corresponde a fibras e núcleos elásticos, a cor vermelha a resíduos de colagénio e a tonalidade amarela a outros elementos do tecido. 1- ventrículo; 2- tubo da aorta; 3- bolbo arterioso.

Após a análise desta última imagem, verificámos que os espécimes Sa42459 heterozigóticos expostos ao tratamento com varfarina apresentam um coração contendo colagénio e fibras elásticas (tecido corado com a cor vermelha e preta, respetivamente).



Já o grupo de controlo exhibe a estrutura cardíaca praticamente só constituída por elastina, estando o colagénio apenas nas estruturas envolventes a este tecido e no tubo da aorta. Mais tarde, olhando com mais detalhe, conseguimos perceber que a quantidade de fibras elásticas na linha mutada é muito menor comparativamente ao grupo controlo. Tal é possível de confirmar pela presença de pouco corante preto nas secções dos animais Sa42459.

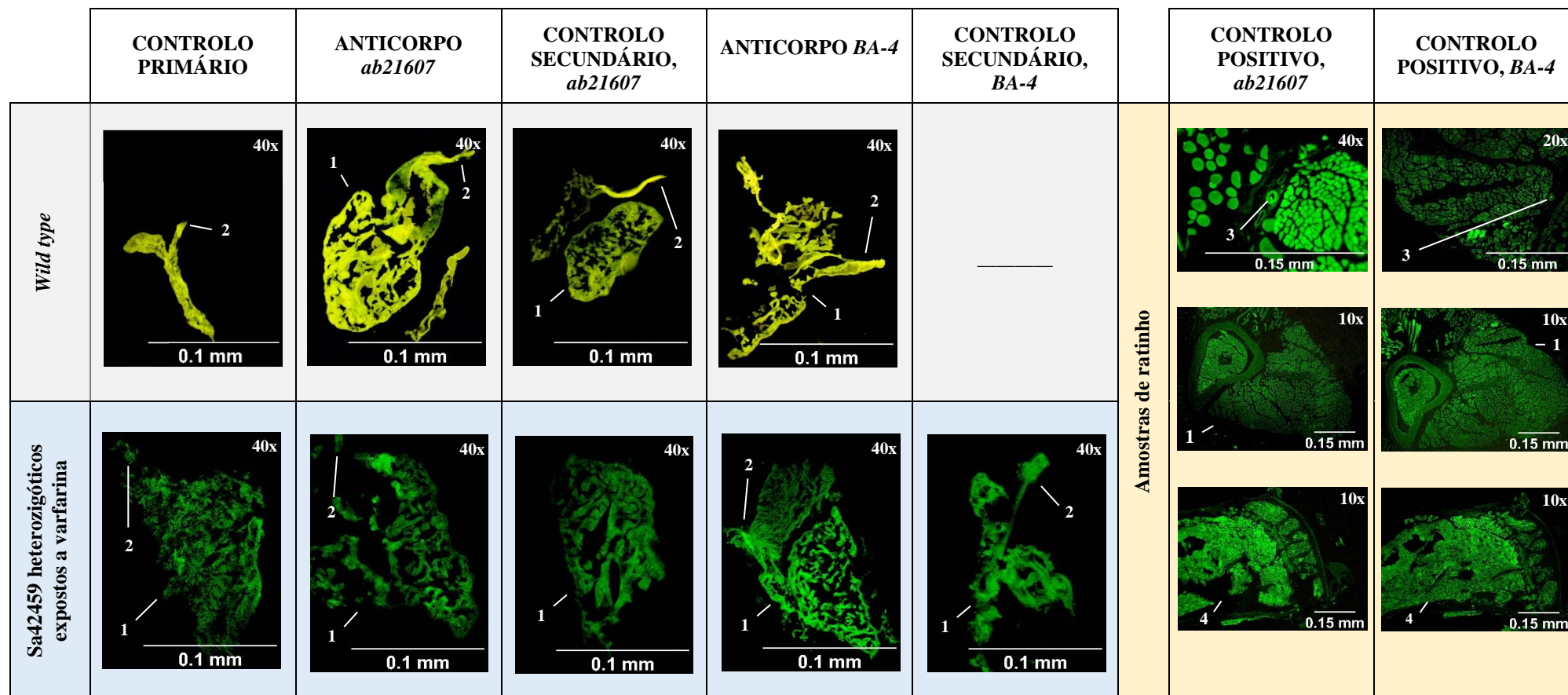
Assim, pusemos em questão a possibilidade de que exposição a varfarina, ao induzir a mineralização excessiva do músculo cardíaco, pudesse consequentemente provocar a degradação das fibras elásticas presentes neste mesmo tecido levando, portanto, a uma diminuição da quantidade de elastina detetada por esta técnica.

Por fim, examinámos as amostras sujeitas ao protocolo de imunohistoquímica para deteção da presença de elastina (Figura 4.16). Mais uma vez, não foi detetado sinal através do uso dos anticorpos *ab21607* e *BA-4*. Também aqui pusemos a possibilidade de os anticorpos usados não reconhecerem a proteína de peixe-zebra, dado a diferença evolutiva entre os dois animais. De modo a esclarecer dúvidas que possam surgir, poderíamos numa próxima etapa repetir também esta experiência e aumentar a quantidade de anticorpo aplicado às secções.

Não foram visíveis alterações entre as amostras WT e Sa42459 heterozigóticos expostos a varfarina, e as respetivas condições de controlo para ambos os anticorpos aplicados.

Sendo os controlos positivos os mesmos do capítulo 4.1., também aqui nos surpreendeu o facto deste grupo não manifestar qualquer tipo de fluorescência. Sendo os anticorpos usados reativos em ratinho, era de esperar que ao menos em amostras deste modelo animal fosse detetado sinal.

**Figura 4.16.** Análise dos resultados obtidos pela técnica imunohistoquímica nos dois grupos experimentais. A cor verde fluorescente corresponde a tecidos reativos ao anticorpo, enquanto uma cor amarelada a background. 1- coração; 2- aorta; 3- vaso sanguíneo; 4- fêmur.



#### **4.7. Experiência de exposição a varfarina com peixes Sa42459 homozigóticos**

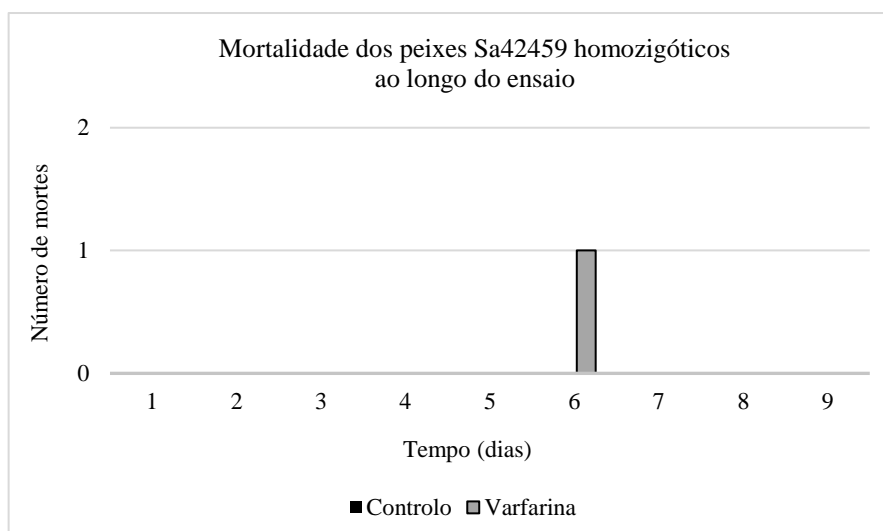
À semelhança dos resultados comentados no capítulo 4.1. e 4.6., verificou-se também que neste ensaio tanto o grupo controlo como o exposto a varfarina apresentavam regularmente um comportamento agitado. Outra observação que ainda vai de encontro às experiências anteriormente realizadas, é o facto de ambos os grupos não terem ido diretamente à comida.

As causas que despertaram estas atitudes nos nossos animais podem ser variadas. Obviamente a exposição ao anticoagulante é uma delas, mas também devemos ter em conta que a manipulação do técnico poderá ter influenciado a conduta desempenhada pelas nossas amostras. Concluímos então, mais uma vez, que o uso de varfarina poderá realmente afetar a resposta a estímulos independentemente da linha de peixes usada e da sua zigotia.

Ao longo dos nove dias de experiência apenas um óbito foi registado no grupo tratado, sendo visível a presença de lesões cerebrais (Figura 4.17). Examinando a Figura 4.18 entendemos que o falecimento deste animal ocorreu no 6º dia do ensaio, e que no grupo controlo não houve mortalidade. Reparámos ainda que no 5º dia de tratamento, quatro dos dez peixes expostos a 50 mg/L de varfarina já apresentavam hemorragias na cabeça. O número de peixes afetados foi aumentando com o passar dos dias.



**Figura 4.17.** Exemplo representativo de um peixe Sa42459 homozigótico após a exposição a 50 mg/L de varfarina. Ponta de seta- hemorragia cerebral.

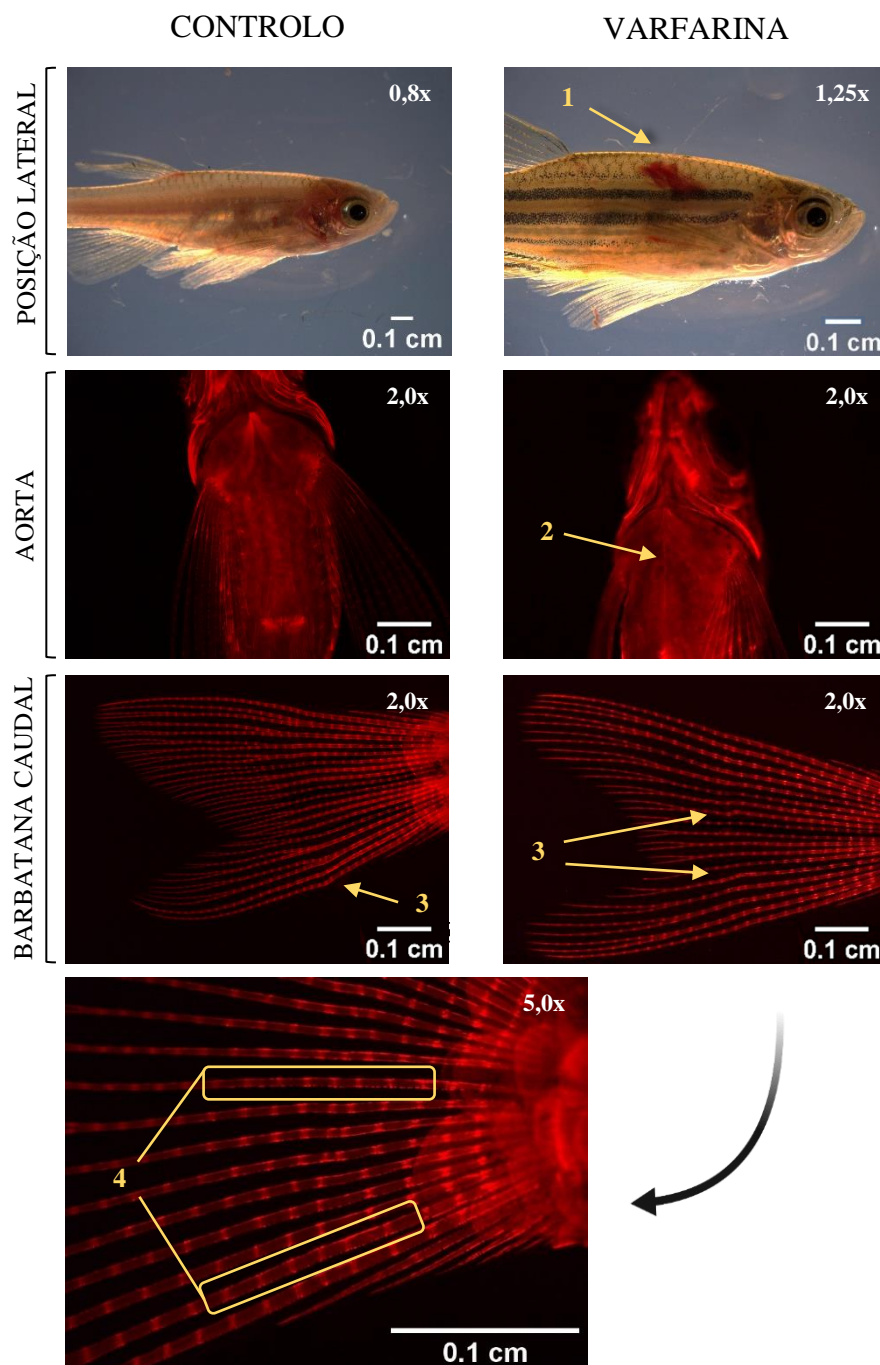


**Figura 4.18.** Mortalidade dos dois grupos da linha Sa42459 homozigóticos (controlo e com exposição a 50 mg/L de varfarina) ao longo do período experimental.

Relativamente ao *live imaging*, podemos ver representado na Figura 4.19 alguns dos resultados observados nos dois grupos experimentais. Mais uma vez, conseguimos ver a presença de hemorragias e calcificações na aorta e barbatana caudal dos indivíduos tratados com 50 mg/L de varfarina. Visualizámos ainda que grande parte dos peixes desta linha apresentava anomalias esqueléticas na formação da cauda, sendo esta provavelmente outra característica fenotípica destes mutantes.

Podemos então concluir que este anticoagulante além de ser responsável pela formação de hemorragias, também foi o principal composto que levou ao aparecimento de uma mineralização anormal nos peixes sujeitos a este tratamento. Logo, confirmamos que a ação desta molécula altera o ciclo da vitamina K, especificamente a atividade da VKOR, impedindo a conversão de KO em KH<sub>2</sub>. Desta forma, não obtemos ácidos glutâmicos  $\gamma$ -carboxilados, que por sua vez levam a uma MGP inativa e incapaz de impedir a calcificação excessiva de certos tecidos.

Também aqui, após a análise dos resultados obtidos pela técnica de coloração com vermelho de Alizarina, se verificou a morte de dois peixes do grupo tratado. A possível justificação para esta situação poderá recair sobre a anestesia aplicada aos animais, que quando em excesso pode provocar mortalidade, ou então, do tratamento a que estes foram submetidos ao longo dos nove dias. Assim, posteriormente, os indivíduos foram fixados e guardados a 4°C.

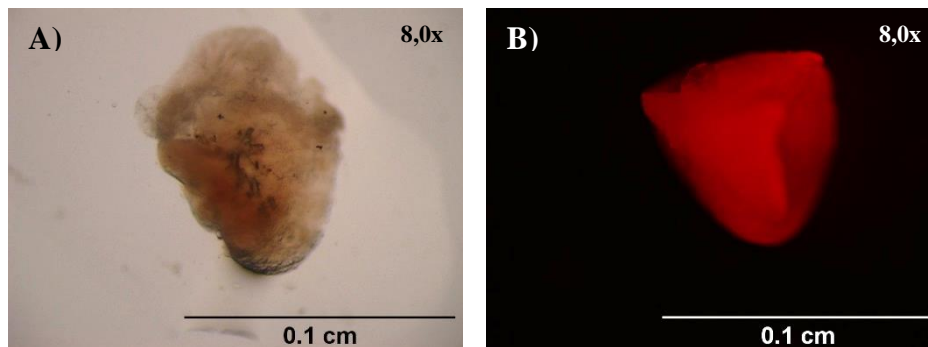


**Figura 4.19.** Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes Sa42459 homozigóticos, no estado de controlo e quando tratados com varfarina. 1- hemorragias; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- anomalias esqueléticas na formação da cauda; 4- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados).

Como já foi anteriormente abordado, de seguida seleccionámos algumas das amostras sujeitas ao tratamento com o anticoagulante para que pudéssemos proceder à recolha do coração, seguido do seu registo fotográfico. Também foi feito este procedimento para os

animais fixados. Na Figura 4.20 podemos examinar o tecido cardíaco em condições normais e quando submetido a fluorescência. Foi observada a marcação de veias e do coração.

Apenas alguns animais mostraram resultados positivos quando observados sob fluorescência, indicando por isso a presença de locais calcificados neste tecido. De uma forma geral, podemos afirmar que um em cada três peixes apresentou os resultados esperados, confirmando assim a ação da varfarina. Talvez fosse necessário um maior período de exposição a este composto para se conseguir possuir dados mais significativos e em maior quantidade. No entanto, não nos podemos esquecer que a ação desta droga varia consoante a fragilidade e resistência de cada organismo, podendo às vezes não corresponder aos efeitos imaginados.



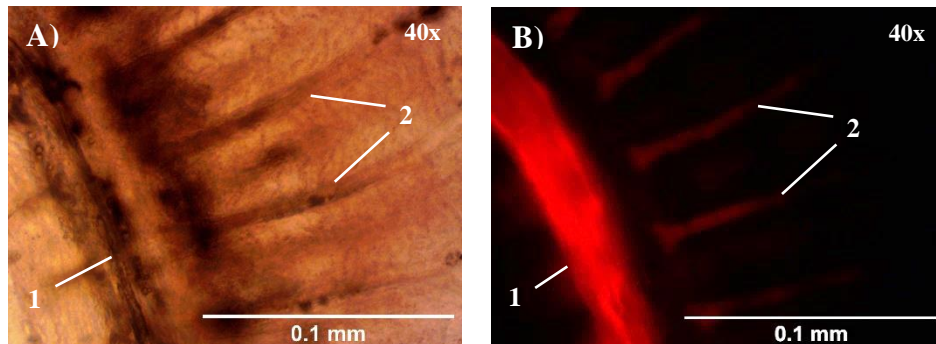
**Figura 4.20.** Análise do tecido cardíaco de peixes Sa42459 homozigóticos, expostos a 50 mg/L de varfarina, em condições normais (A) e quando observado sob fluorescência (B).

Futuramente seria interessante realizar a histologia destes tecidos recorrendo à técnica de coloração com von Kossa, de modo a conseguir entender a extensão destas calcificações. Poderíamos ainda repetir esta experiência aumentando o número de amostras, fazendo replicados e uma análise estatística, com o propósito de comprovar se a mineralização e fluorescência observada neste ensaio é ou não considerável.

Nos últimos anos vários estudos foram realizados com as linhas transgênicas fli/a e gata-2 (associada à mCherry). Enquanto a primeira marca os vasos sanguíneos e o coração, a segunda é responsável por colorir os glóbulos vermelhos. Assim, quando promovemos o cruzamento destes dois mutantes, damos origem à linha fligata-2 que vai englobar ambas as características. Neste sentido, outra proposta para estudos posteriores, seria cruzar a linha fligata-2 com os nossos mutantes Sa42459 homozigóticos. Desta

forma, não só conseguiríamos examinar mais corretamente as calcificações presentes no coração, aquando provocadas pela exposição a varfarina, bem como a mineralização de vasos e eritrócitos. Consequentemente, esta ideia seria ainda uma mais-valia no estudo da degradação da elastina.

Foi ainda visível a presença de fluorescência nos arcos branquiais dos organismos Sa42459 homozigóticos (Figura 4.21).



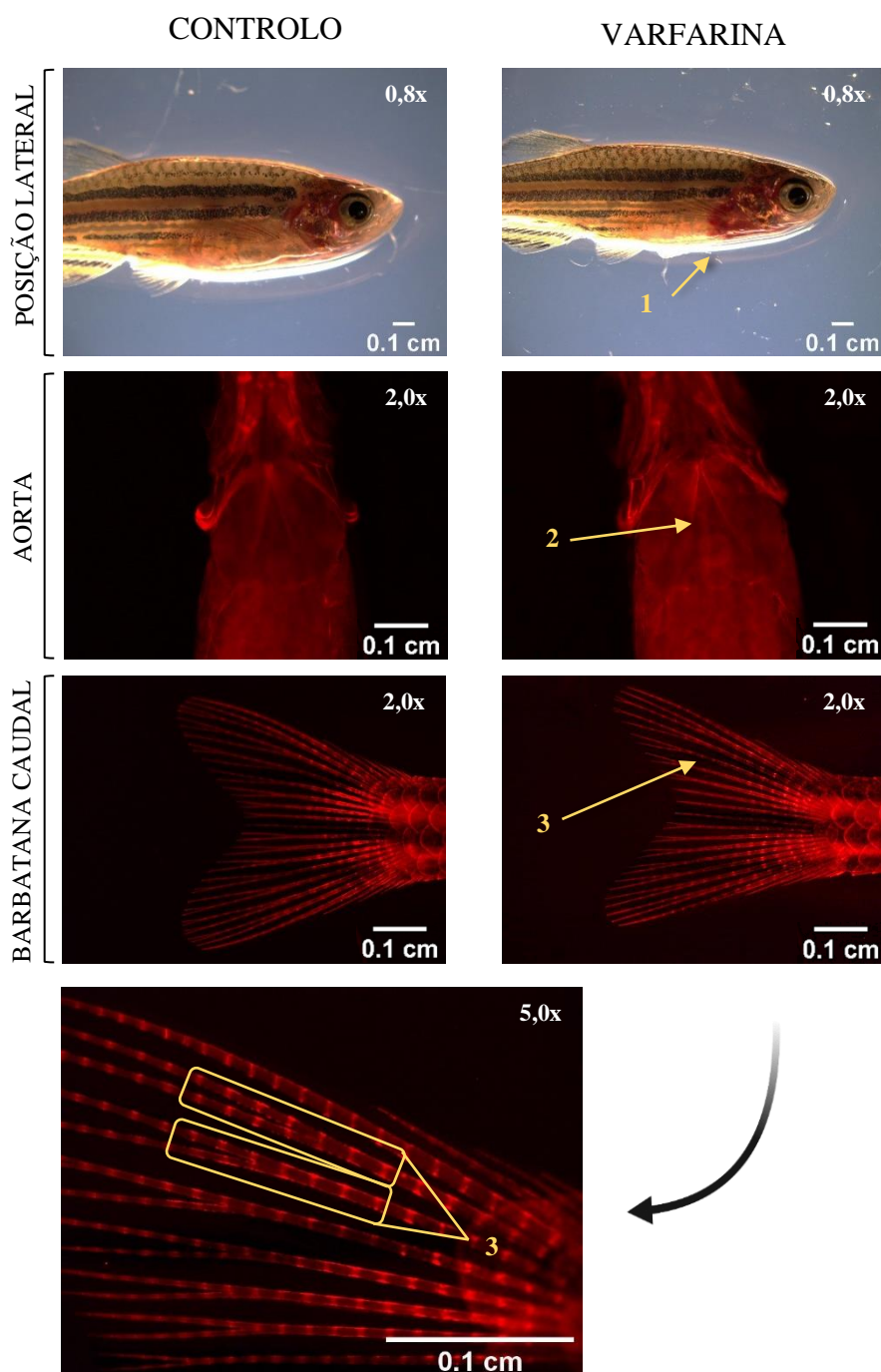
**Figura 4.21.** Análise dos arcos branquiais de peixes Sa42459 homozigóticos em condições normais (A) e quando observado sob fluorescência (B). 1- basibranchial; 2- arcos branquiais.

#### 4.8. Experiência de exposição a varfarina com peixes *wild type* adultos

Também neste ensaio alcançámos dados idênticos às experiências anteriormente realizadas. Ao longo do período experimental foi notado a presença de algum stress nos animais, bem como alguma tendência a não responder positivamente à disposição de alimento, sendo estas observações predominantes no grupo varfarina. As possíveis justificações para estas atitudes são as mesmas previamente referidas.

Contrariamente ao que foi visualizado nas outras exposições experimentais, neste ensaio não houve nenhuma mortalidade, quer para o grupo controlo quer para o grupo tratado com 50 mg/L do anticoagulante. São visíveis as diferenças comparativamente ao capítulo 4.1., onde os animais *wild type* de apenas 2 meses foram expostos a uma menor quantidade deste composto (25 mg/L de varfarina), mas sofreram efeitos mais adversos do que os analisados em peixes *wild type* adultos. Podemos assim fomentar a possibilidade de que a maturidade dos indivíduos pode estar diretamente associada a uma maior resistência à ação da varfarina.

Relativamente às hemorragias apenas foram visíveis no último dia do ensaio, a presença de três peixes afetados. Na Figura 4.22 podemos examinar os resultados do *live imaging*. Comprovamos também aqui, a presença de lesões cerebrais e calcificação de tecidos como uma consequência do tratamento. No caso da aorta foi difícil examinar o

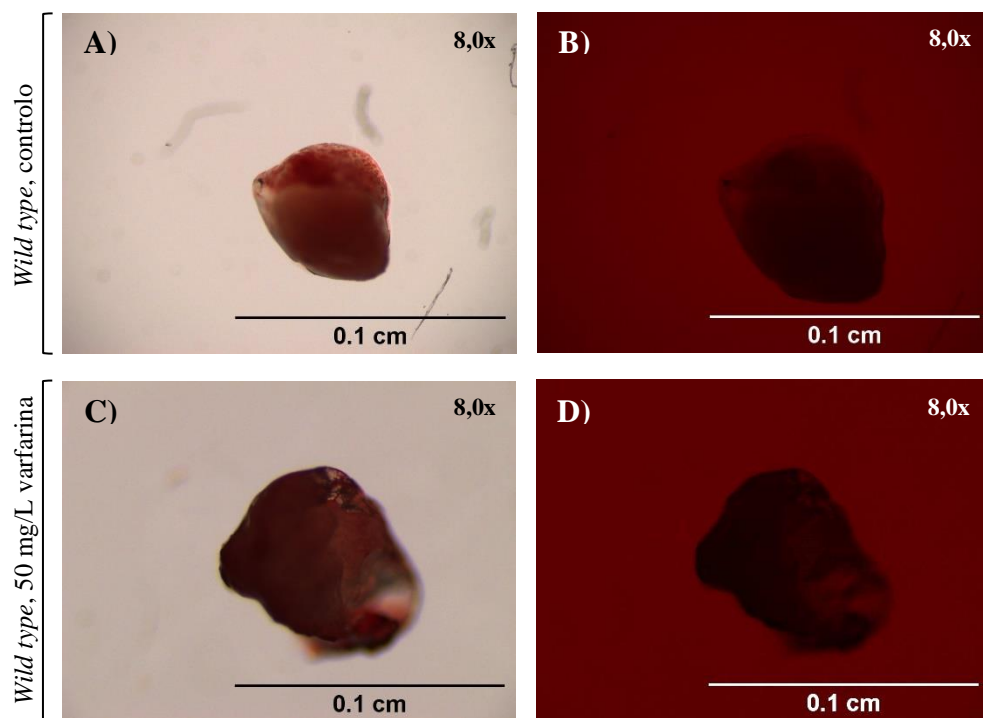


**Figura 4.22.** Visualização da ausência/presença de calcificações em peixes *wild type* adultos, no estado de controlo e quando tratados com varfarina. 1-hemorragias cerebrais; 2- aorta calcificada (local mais saliente); 3- vasos sanguíneos da barbatana calcificados (ligeiro ponteados).



local, dado a presença de um elevado número de escamas devido à idade avançada das nossas amostras.

Na Figura 4.23 podemos examinar o tecido cardíaco em condições normais e quando submetido a microscopia de fluorescência, para as duas situações experimentais. Como esperado, o coração dos animais do grupo de controlo não apresentou qualquer tipo de fluorescência. Já os resultados observados nos indivíduos tratados com varfarina foram mais surpreendentes. Como sabemos, a exposição a este anticoagulante promove a mineralização anormal dos tecidos, pelo que quando observados sob microscopia de fluorescência, o previsto seria a presença de algum sinal para Alizarina neste tecido, comprovando assim a ação deste composto. Como tal não foi visualizado, podemos concluir que uma exposição de 50 mg/L de varfarina ao longo de nove dias de ensaio não foi suficiente para promover o efeito previsto, pelo que numa próxima etapa poderíamos optar por aumentar o tempo de tratamento, bem como a concentração de varfarina.



**Figura 4.23.** Análise do tecido cardíaco de peixes *wild type* adultos em condições normais (A e C) e quando submetidos a microscopia de fluorescência (B e D), para as duas situações experimentais.

## 5. Discussão

O objetivo deste trabalho foi caracterizar duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina, e averiguar de que modo a degradação e calcificação de fibras elásticas poderá alterar a sua associação à MGP, acelerando ou diminuindo o processo de calcificação ectópica. São vários os estudos onde se concluiu que estas duas proteínas tendem a estar relacionadas, exemplo disso é a pesquisa desenvolvida em 1997 por Luo *et al.* e a investigação realizada em 2014 por Khosroshahi e colaboradores <sup>1,14,17,18</sup>.

Como sabemos a síndrome de Keutel é uma patologia caracterizada por provocar alterações fenotípicas e uma mineralização anormal <sup>1,2,6,22</sup>. Crê-se que o desenvolvimento de calcificações ectópicas seja o responsável por grande parte das condições associadas a esta doença, nomeadamente dos problemas respiratórios e da perda auditiva, uma vez que a calcificação descontrolada destes tecidos leva à diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos, dificultando assim a sua funcionalidade <sup>6,21-23</sup>.

O modelo animal selecionado para este projeto foi o peixe-zebra. São várias as características que fazem deste um dos melhores modelos de estudo em ciência, tais como o pequeno tamanho, fácil e rápida capacidade de reprodutiva, baixo custo de manutenção e semelhanças estruturais para com o ser humano <sup>60,65</sup>. É importante lembrar que este é o primeiro ensaio que envolve as mutações Sa17177 e Sa42459, pelo que não é possível comparar os resultados obtidos com trabalhos realizados por outros investigadores.

O registo das posturas ao longo do ensaio experimental permitiu verificar diferenças entre os dois tipos de mutantes. Se por um lado a linha Sa42459 não apresentou problemas, a Sa17177 manifestou desde o primeiro cruzamento, levando à formação de ovos não viáveis. Além disto, observou-se que na quarta postura cerca de um terço dos ovos resultaram em abortos após 24h da desova. Estes resultados sugerem características semelhantes às observadas em pacientes com KS <sup>1</sup>. Paralelamente, existe uma grande quantidade de ensaios que relatam a associação da degradação de elastina com a infertilidade. Um exemplo disto foi a investigação realizada por LeBlanc *et al.* (2009) onde se avaliaram os problemas associados à endometrite de éguas <sup>91</sup>. Outro trabalho fala sobre a diminuição da quantidade de fibras elásticas e de desmosina, no colo do útero de mulheres com um tipo de gravidez de risco. Esta patologia, denominada de insuficiência cervical, promove um parto prematuro conduzindo muitas vezes ao aborto espontâneo <sup>92</sup>. Assim, na tentativa de se perceber se realmente no nosso estudo existe uma ligação entre

a MGP e a ELN na reprodução, experiências futuras poderiam passar pelo exame dos órgãos reprodutores, bem como da viabilidade dos gametas produzidos por estes animais.

Relativamente à mortalidade da primeira geração de peixes mutantes, os valores foram baixos pelo que não considerámos serem muito significativos. Passando à análise das relações biométricas, também aqui não foram observados resultados discrepantes no desenvolvimento das duas linhas transgênicas. No entanto, é de notar que a linha Sa42459 apresentou espécimes de tamanhos relativamente maiores quando comparados com os indivíduos da linha Sa17177 e com os irmãos *wild type*. Para as larvas analisadas após as 48h do período de eclosão também não foram vistas diferenças.

A análise fenotípica da 2ª geração de peixes permitiu obter resultados mais surpreendentes. Nos mutantes Sa42459, além do aspeto comum, examinamos animais heterozigóticos e homozigóticos com deformações esqueléticas, nomeadamente lordose, cifose e escoliose. Foi ainda visualizado nos homozigóticos a presença de anomalias na estrutura da barbatana caudal. No entanto, devido ao período pandémico que vivemos não nos foi possível realizar a genotipagem de todas as posturas, pelo que para os peixes da linha Sa17177 esta análise foi apenas realizada visualmente. Concluímos então que para estes indivíduos a aparência esquelética era normal, sem qualquer tipo de irregularidade.

Como já foi comentado no capítulo anterior, os resultados dos mutantes Sa42459 foram invulgares, principalmente os dos peixes heterozigóticos, dado que os animais da 1ª geração (de igual zigotia) não apresentavam uma aparência semelhante. Assim, após o estudo bioinformático da estrutura da elastina, supusemos que a justificação para esta situação poderia estar na proteína produzida por esta linha. Comparativamente à estrutura original, a linha Sa42459 gera uma proteína de menor dimensão, tendo perdido um fragmento importante na porção C-terminal para o qual não se conhece uma função. Desta forma, propusemos que a parte em falta possa ter contribuído para uma função alterada da proteína, ficando os animais mais suscetíveis ao desenvolvimento de problemas. Esta justificação poderia assim explicar as deformações esqueléticas observadas.

A estrutura da proteína ELN nos animais Sa17177 pode explicar o facto destes indivíduos apresentarem tamanhos ligeiramente menores do que a linha Sa42459. A realidade é que a elastina produzida nestes mutantes é completamente diferente da sua estrutura original, exemplo disso é a ausência de pelo menos 1068 aminoácidos. As desigualdades a nível de domínios e de tamanho, fazem-nos supor possíveis

consequências nestes peixes, pelo que para se confirmar as nossas hipóteses mais estudos terão de ser realizados no futuro. Ainda neste estudo bioinformático conseguimos concluir que as diferenças observadas entre o humano, ratinho e peixe-zebra podem estar associadas à evolução a que estes animais foram sujeitos. Estudos concordantes foram vistos no alinhamento destas três sequências.

Quanto às experiências de exposição a varfarina foram realizados quatro ensaios com animais diferentes: peixes *wild type* juvenis, Sa42459 heterozigóticos, Sa42459 homozigóticos e *wild type* adultos. Apesar das inúmeras semelhanças nos resultados, houve algumas diferenças quanto à mortalidade observada. O ensaio mais afetado foi com os peixes-zebra *wild type* juvenis, onde se verificou vinte e cinco animais mortos. Comparativamente, o estudo com indivíduos *wild type* adultos não demonstrou qualquer mortalidade. Assim, questionámos se as diferenças de idade entre experiências poderão ter tido influência quer no número de óbitos, quer a nível da extensão das calcificações. Já nos mutantes Sa42459 heterozigóticos e homozigóticos, apenas foi registado uma morte em cada um dos trabalhos. Também no artigo publicado por Granadeiro *et al.* se observou um elevado número de óbitos em embriões e eleutero-embriões de peixes-zebra tratados com diferentes quantidades do anticoagulante varfarina <sup>42</sup>.

Passando aos resultados obtidos do *live imaging*, podemos concluir que todos os animais sujeitos a varfarina, apresentaram hemorragias e calcificações ectópicas na aorta e na barbatana caudal. Estes dados vão mais uma vez de acordo com o examinado por Granadeiro e colaboradores em 2019, bem como do trabalho realizado por este mesmo autor em 2015, onde embriões e larvas de peixe-zebra mostraram lesões cerebrais e perturbações na estrutura esquelética quando expostos a níveis crescentes deste anticoagulante <sup>42,93</sup>. Contrariamente ao esperado, a análise do músculo cardíaco dos animais WT adultos do grupo tratado não revelou uma mineralização anormal, quando observado por microscopia de fluorescência. Por outro lado, nos mutantes Sa42459 homozigóticos sujeitos ao mesmo tratamento foi visível a marcação do mineral corado nas veias, do coração, bem como dos arcos branquiais. Assim, estudos futuros poderiam proceder a análise histológica destes tecidos para conseguirmos entender a extensão das calcificações. Ensaio em ratas provaram a calcificação das lamelas elásticas existentes nas artérias e válvulas cardíacas, quando aplicado um tratamento com varfarina. Ainda neste estudo realizado por Price, fez-se a comparação destas calcificações com o fenótipo observado em ratinhos MGP <sup>-/-</sup>, podendo-se concluir que a

varfarina promove a calcificação através da inibição da  $\gamma$ -carboxilação da proteína Gla da matriz, o que por sua vez leva a uma MGP inativa e incapaz de impedir a mineralização patológica dos tecidos <sup>94</sup>.

Da análise histológica dos corações corados com a técnica de von Kossa, observámos que os peixes Sa42459 heterozigóticos tratados com varfarina apresentavam uma grande quantidade de minerais depositados no tecido cardíaco. Estes dados são concordantes com o estudo desenvolvido por Krüger, onde se visualizou a calcificação do coração e da aorta de ratinhos sujeitos a um tratamento com este anticoagulante <sup>95</sup>. Também numa investigação realizada em ratazanas expostas a esta mesma terapia, se examinou a acumulação de sais de cálcio ao longo das fibras elásticas da aorta <sup>96</sup>.

A análise histológica através da técnica VVG permitiu observar a marcação de fibras elásticas no olho, arcos branquiais, órgãos reprodutores e nas células sanguíneas dos peixes WT expostos ao tratamento com varfarina. Paralelamente, nos mutantes Sa42459 heterozigóticos sujeitos à mesma terapia, notou-se a presença de fibras no coração, ainda que menos intensas do que no grupo controlo. Assim, sugerimos que a mineralização induzida pela varfarina possa ter conduzido à degradação de elastina. Também num estudo onde se aplicou esta mesma coloração, conclui-se que pacientes com elastofibroma dorsal, patologia que provoca lesões tumorais em tecidos moles, tendem a apresentar fibras elásticas fragmentadas e alguns depósitos de colagénio <sup>97</sup>.

Por fim, a imunohistoquímica não mostrou qualquer tipo de sinal através do uso dos anticorpos *ab21607* e *BA-4*, tanto nos animais *wild type* juvenis, Sa42459 heterozigóticos expostos a varfarina, como nos controlos positivos. Tal poderá ser devido a algum problema técnico, ou ao facto destes anticorpos não serem específicos e por isso não funcionarem no peixe-zebra. Assim, em trabalhos posteriores poderíamos optar por desenvolver anticorpos mais específicos para a elastina de peixe-zebra.

## 6. Conclusões e perspectivas futuras

Após a análise e discussão dos dados obtidos, podemos concluir que de facto existem algumas provas que indicam que a proteína elastina poderá realmente estar em contacto com a proteína Gla da matriz. Sugerimos, portanto, através dos nossos estudos, que a exposição a VKAs promove uma interligação positiva entre uma MGP disfuncional e a consequente degradação de fibras elásticas. É importante lembrar que apesar de apresentarem funções bastante distintas, estas duas proteínas encontram-se em locais idênticos.

Apesar dos trabalhos realizados nesta tese de mestrado, mais ensaios deveriam ser desenvolvidos de modo a melhorar a caracterização das linhas mutantes em estudo. Desde logo poderíamos estender o estudo e análise à linha Sa17177 e observar se existem diferenças para com os resultados visualizados nos mutantes Sa42459. Seria bastante interessante ainda comparar as duas linhas em termos de sobrevivência a longo prazo, viabilidade reprodutiva e possíveis deformações esqueléticas, quer para os peixes heterozigóticos como para os homozigóticos. Para dados mais completos, a análise morfológica e histológica poderia ser realizada ao longo do desenvolvimento e na fase adulta dos animais.

Como já foi anteriormente descrito, outro estudo de grande importância seria cruzar animais homozigóticos das linhas Sa17177 e Sa42459 com a linha fligata-2, permitindo assim observar com mais detalhe as calcificações presentes no coração, quando provocadas pela exposição a varfarina, bem como a mineralização de vasos sanguíneos. Posteriormente, poder-se-ia fazer testes mais direcionados à análise da resistência cardíaca (como por exemplo sujeitando os animais a uma corrente de água com uma determinada velocidade) e dos níveis de resposta a estímulos nervosos (através da exposição a luz durante o período larvar), verificando assim se existem ou não defeitos nestes órgãos ricos em fibras elásticas.

Relativamente à imunohistoquímica poderíamos fazer uso de anticorpos mais específicos, como é o caso do anticorpo monoclonal anti-elastina (A-8) de ratinho, com o epítipo compreendido entre os aminoácidos 371-407. Este anticorpo é recomendado para a deteção do precursor tropoelastina no ratinho, ratazana e humano, mas nada se sabe sobre a sua funcionalidade para o peixe-zebra. Em simultâneo, também se podia realizar a recolha e processamento de amostras biológicas para validação de anticorpos anti-MGP,

permitindo mais tarde apurar se a localização de ambas as proteínas sempre ocorre nos mesmos tecidos. A par desta técnica, podíamos promover a identificação dos locais de expressão do gene da MGP por RT-PCR e hibridação *in situ*.

É importante lembrar que um constituinte nunca age sozinho, pelo que o estudo dos parceiros funcionais tanto da elastina como da MGP, seria uma mais-valia em trabalhos futuros (exemplo BMP2 e TG2).

Como sabemos ainda não existem terapias eficazes para a síndrome de Keutel, sendo que os pacientes podem recorrer unicamente a tratamentos sintomáticos. Através de estudos anteriormente realizados, prevê-se que um tratamento com iões de alumínio possa reduzir os efeitos patológicos associados a estas fibras diminuindo, portanto, a gravidade e extensão dos danos. Ainda assim, estudos nesta área devem ser feitos para que se possam arranjar mais alternativas terapêuticas para esta doença.

Não há dúvida que a proteína elastina tem vindo a ganhar um papel crítico na investigação, pelo que garantidamente no futuro existirão novas abordagens que permitam ajudar os indivíduos afetados. Cada passo em ciência conduz a pequenos dados que, embora possam parecer pouco consideráveis, mais tarde podem ser a chave tão aguardada. Desta forma, esperamos que os nossos resultados consigam ajudar pesquisas futuras.

## 7. Bibliografia

1. Khosroshahi HE, Sahin SC, Akyuz Y, Ede H. Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2014;164(11):2849-2856. doi:10.1002/ajmg.a.36699
2. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns J-P, et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet*. 1999;21(1):142-144. doi:10.1038/5102
3. Fryns JP, van Fleteren A, Mattelaer P, van den Berghe H. Calcification of cartilages, brachytelephalangy and peripheral pulmonary stenosis. Confirmation of the Keutel syndrome. *Eur J Pediatr*. 1984;142(3):201-203. doi:10.1007/BF00442449
4. Keutel J, Jörgensen G, Gabriel P. Ein neues autosomal-rezessiv vererbbares Syndrom. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 1971;96(43):1676-1681. doi:10.1055/s-0028-1110200
5. Aleid NM. Saudi Patient with Keutel Syndrome, a Rare Disease. *J Clin Exp Dermatol Res*. 2020.
6. Meier M, Weng LP, Alexandrakis E, Rüschoff J, Goeckenjan G. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J*. 2001;17(3):566-569. doi:10.1183/09031936.01.17305660
7. Khosroshahi HE, Uluoğlu Ö, Olguntürk R, Başaklar C. Keutel syndrome: A report of four cases. *Eur J Pediatr*. 1989;149(3):188-191. doi:10.1007/BF01958278
8. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;117(3):765-771. doi:10.1016/0006-291X(83)91663-7
9. Viegas CSB, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML. Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates. *J Biol Chem*. 2008;283(52):36655-36664. doi:10.1074/jbc.M802761200
10. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem*. 1985;260(28):14971-14975.
11. Hale JE, Fraser JD, Price PA. The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Biol Chem*. 1988;263(12):5820-5824.
12. Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem*. 1990;265(25):15040-15048.
13. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci*. 1982;79(24):7734-7738. doi:10.1073/pnas.79.24.7734
14. Hur DJ, Raymond G V., Kahler SG, Riegert-Johnson DL, Cohen BA, Boyadjiev SA. A novel MGP mutation in a consanguineous family: review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;135(1):36-40. doi:10.1002/ajmg.a.30680
15. Dunstan CR, Blair JM, Zhou H, Seibel MJ. Bone, Mineral, Connective Tissue



- Metabolism. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Vol 6.21. Elsevier; 2007:495-520. doi:10.1016/B0-08-045044-X/00182-6
16. Khurana JS. *Bone Pathology*. (Khurana JS, ed.). Humana Press; 2009. doi:10.1007/978-1-59745-347-9
  17. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. doi:10.1038/386078a0
  18. Beazley KE, Reckard S, Nurminsky D, Lima F, Nurminskaya M. Two Sides of MGP Null Arterial Disease: chondrogenic lesions dependent on transglutaminase 2 and elastin fragmentation associated with induction of adipsin. *J Biol Chem*. 2013;288(43):31400-31408. doi:10.1074/jbc.M113.495556
  19. Janssen R, Vermeer C. Vitamin K deficit and elastolysis theory in pulmonary elasto-degenerative diseases. *Med Hypotheses*. 2017;108:38-41. doi:10.1016/j.mehy.2017.07.029
  20. Yagami K, Suh J-Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Matrix Gla Protein Is a Developmental Regulator of Chondrocyte Mineralization And, When Constitutively Expressed, Blocks Endochondral and Intramembranous Ossification in the Limb. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1097-1108. doi:10.1083/jcb.147.5.1097
  21. Devriendt K, Holvoet M, Fryns J-P. Follow-Up of an Adult With Keutel Syndrome. *Journal, Am Genet Med*. 1999;83:82-83.
  22. Perrone E, Chen K, Ramos M, et al. A Novel MGP Gene Mutation Causing Keutel Syndrome in a Brazilian Patient. *Mol Syndromol*. 2018;9(3):159-163. doi:10.1159/000488573
  23. Teebi AS, Lambert DM, Kaye GM, Al-Fifi S, Tewfik TL, Azouz EM. Keutel syndrome: further characterization and review. *Am J Med Genet*. 1998;78(2):182-187.
  24. Sun L-F, Chen X. Tracheobronchial stenosis in keutel syndrome. *Indian Pediatr*. 2012;49(9):759-759. doi:10.1007/s13312-012-0141-2
  25. Orphanet: Keutel syndrome. Accessed December 1, 2020. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=EN&data\\_id=11660&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=keutel-syndrome&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Disease\(s\)/group\\_of\\_diseases=Keutel-syndrome&title=Keutel syndrome&search=Disease\\_Searc](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=11660&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=keutel-syndrome&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Disease(s)/group_of_diseases=Keutel-syndrome&title=Keutel syndrome&search=Disease_Searc)
  26. Cancela ML, Laizé V, Conceição N, Kempf H, Murshed M. Keutel Syndrome, a Review of 50 Years of Literature. *Front cell Dev Biol*. 2021;9:642136, 1-9. doi:10.3389/fcell.2021.642136
  27. Alexandra Rosa dos Santos L. Interaction studies of Gla-rich protein with bone morphogenetic proteins.
  28. Cancela ML, Laizé V, Conceição N. Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:56-63. doi:10.1016/j.abb.2014.07.020
  29. Otawara Y, Price PA. Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat. *J Biol Chem*. 1986;261(23):10828-10832.

- doi:10.1016/S0021-9258(18)67462-9
30. Kiefer MC, Bauer DM, Young D, Hermsen KM, Masiarz FR, Barr PJ. The cDNA and derived amino acid sequences for human and bovine matrix Gla protein. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(11):5213. doi:10.1093/nar/16.11.5213
  31. Wiedemann M, Trueb B, Belluoccio D. Molecular cloning of avian matrix Gla protein. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1998;1395(1):47-49. doi:10.1016/S0167-4781(97)00155-3
  32. Hackeng TM. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci.* 2001;10(4):864-870. doi:10.1110/ps.44701
  33. Moshi J. Regulation of Matrix Gla Protein Gene Expression by an Intronic Sequence.
  34. Engelke JA, Hale JE, Suttie JW, Price PA. Vitamin K-dependent carboxylase: utilization of decarboxylated bone Gla protein and matrix Gla protein as substrates. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1078(1):31-34. doi:10.1016/0167-4838(91)90088-h
  35. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr.* 2000;130(8):1877-1880. doi:10.1093/jn/130.8.1877
  36. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr.* 2005;25(1):127-149. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092713
  37. Pereira C. The role of vitamin k in osteoarthritis.
  38. El Asmar MS, Naoum JJ, Arbid EJ. Vitamin K Dependent Proteins and the Role of Vitamin K2 in the Modulation of Vascular Calcification: A Review. *Oman Med J.* 2014;29(3):172-177. doi:10.5001/omj.2014.44
  39. Berkner KL. Vitamin K-dependent carboxylation. *Vitam Horm.* 2008;78:131-156. doi:10.1016/S0083-6729(07)00007-6
  40. Danziger J. Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1504-1510. doi:10.2215/CJN.00770208
  41. Piscaer I, Wouters EFM, Vermeer C, Janssens W, Franssen FME, Janssen R. Vitamin K deficiency: the linking pin between COPD and cardiovascular diseases? *Respir Res.* 2017;18(1):189. doi:10.1186/s12931-017-0673-z
  42. Granadeiro L, Dirks RP, Ortiz-Delgado JB, et al. Warfarin-exposed zebrafish embryos resembles human warfarin embryopathy in a dose and developmental-time dependent manner - From molecular mechanisms to environmental concerns. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;181:559-571. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.06.042
  43. Piscaer I, van den Ouweland JMW, Vermeersch K, et al. Low Vitamin K Status Is Associated with Increased Elastin Degradation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Med.* 2019;8(8):1116. doi:10.3390/jcm8081116
  44. Parashar A, Gourgas O, Lau K, et al. Elastin calcification in in vitro models and its prevention by MGP's N-terminal peptide. *J Struct Biol.* 2021;213(1):107637. doi:10.1016/j.jsb.2020.107637
  45. Vilder EY De, Vanakker OM. From variome to phenome: Pathogenesis, diagnosis and management of ectopic mineralization disorders. *World J Clin Cases.* 2015;3(7):556-574. doi:10.12998/wjcc.v3.i7.556
  46. Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Sarang Z, Tsay GJ. Transglutaminase 2 in human diseases. *BioMedicine.* 2017;7(3):1-13. doi:10.1051/bmcdn/2017070315

47. O'Rourke C, Shelton G, Hutcheson JD, et al. Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells and Imaging of Aortic Calcification and Inflammation. *J Vis Exp*. 2016;54017(111):1-13. doi:10.3791/54017
48. Liabeuf S, Bourron O, Olivier B, et al. Vascular calcification in patients with type 2 diabetes: the involvement of matrix Gla protein. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(85):8. doi:10.1186/1475-2840-13-85
49. Kaipainen A, Bielenberg DR. Hemangiogenesis versus Lymphangiogenesis. In: *Encyclopedia of the Eye*. Elsevier; 2010:227-232. doi:10.1016/B978-0-12-374203-2.00125-1
50. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin Degradation and Calcification in an Abdominal Aorta Injury Model. *Circulation*. 2004;110(22):3480-3487. doi:10.1161/01.CIR.0000148367.08413.E9
51. van Varik BJ, Rennenberg RJMW, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*. 2012;3(290):1-10. doi:10.3389/fgene.2012.00290
52. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem*. 2005;70:437-461. doi:10.1016/S0065-3233(05)70013-9
53. Rufino R, Madi K, Souza HSP de, Costa CH da, Saito EH, Silva JRL e. Quantitative assessment of elastic fibers in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):502-509. doi:10.1590/S1806-37132007000500004
54. Bieth JG. The elastases. *J Soc Biol*. 2001;195(2):173-179. doi:10.1051/jbio/2001195020173
55. Lafuma C. Elastases et pathologies pulmonaires. *Pathol Biol*. 1988;36(9):1124-1132.
56. Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Kondo T. Elastase. *Nihon Rinsho*. 1995;53(5):1192-1197. doi:10.1016/b978-0-12-091302-2.50102-x
57. Cranenburg ECM, VAN Spaendonck-Zwarts KY, Bonafe L, et al. Circulating matrix  $\gamma$ -carboxyglutamate protein (MGP) species are refractory to vitamin K treatment in a new case of Keutel syndrome. *J Thromb Haemost*. 2011;9(6):1225-1235. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04263.x
58. Daniele Yoshito. Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células da epiderme.
59. Pubmed: Elastin. Accessed December 21, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=elastin>
60. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):353-367. doi:10.1038/nrg2091
61. Martins G, Diogo P, Pinto W, Gavaia PJ. Early Transition to Microdiets Improves Growth, Reproductive Performance and Reduces Skeletal Anomalies in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2019;16(3):300-307. doi:10.1089/zeb.2018.1691
62. Coutinho CIN. Manutenção e reprodução em peixezebra (*Danio rerio*) - Relatório final de estágio no Biotério de Organismos Aquáticos do CIIMAR. 2018.
63. Dammski AP, Müller BR, Gaya C, Regonato D. *Zebrafish - Manual de Criação*

*Em Biotério.*; 2011.

64. Castaldi MB. Development of a commercial microalgae enrichment of live feed for zebrafish.
65. Santos MCMM. Characterization of microRNAs expression during zebrafish skeletal development.
66. Laizé V, Martel P, Viegas CSB, Price PA, Cancela ML. Evolution of matrix and bone gamma-carboxyglutamic acid proteins in vertebrates. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26659-26668. doi:10.1074/jbc.M500257200
67. Hosen MJ, Vanakker OM, Willaert A, Huyseune A, Coucke P, De Paepe A. Zebrafish models for ectopic mineralization disorders: practical issues from morpholino design to post-injection observations. *Front Genet.* 2013;4(74):1-17. doi:10.3389/fgene.2013.00074
68. Carnovali M, Banfi G, Mariotti M. Zebrafish Models of Human Skeletal Disorders: Embryo and Adult Swimming Together. *Biomed Res Int.* November 20, 2019:1-13. doi:10.1155/2019/1253710
69. Li Q, Uitto J. Zebrafish Models of Ectopic Mineralization-The Paradigm of Pseudoxanthoma Elasticum. *J Invest Dermatol.* 2018;138(11):2301-2304. doi:10.1016/j.jid.2018.07.007
70. Chang Y-S, Wang Y-W, Huang F-L. Cross-linking of ZP2 and ZP3 by transglutaminase is required for the formation of the outer layer of fertilization envelope of carp egg. *Mol Reprod Dev.* 2002;63(2):237-244. doi:10.1002/mrd.10174
71. Deasey S, Grichenko O, Du S, Nurminskaya M. Characterization of the transglutaminase gene family in zebrafish and in vivo analysis of transglutaminase-dependent bone mineralization. *Amino Acids.* 2012;42(2-3):1065-1075. doi:10.1007/s00726-011-1021-0
72. Conceição N, Silva AC, Fidalgo J, Belo JA, Cancela ML. Identification of alternative promoter usage for the matrix Gla protein gene. Evidence for differential expression during early development in *Xenopus laevis*. *FEBS J.* 2005;272(6):1501-1510. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04590.x
73. mgp matrix Gla protein [Danio rerio (zebrafish)] - Gene - NCBI. Accessed April 10, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/402937>
74. ZFIN Gene: mgp. Accessed February 11, 2021. <http://zfin.org/ZDB-GENE-060928-1#summary>
75. Gavaia PJ, Simes DC, Ortiz-Delgado JB, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(6):637-652. doi:10.1016/j.modgep.2005.11.010
76. Palagano E, Zuccarini G, Prontera P, et al. Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1. *Bone.* 2018;114:125-136. doi:10.1016/j.bone.2018.06.013
77. Lopez-Baez JC, Simpson DJ, Lleras Forero L, et al. Wilms Tumor 1b defines a wound-specific sheath cell subpopulation associated with notochord repair. *Elife.* 2018;7:1-26. doi:10.7554/eLife.30657
78. Chu C-Y, Chen C-F, Rajendran RS, et al. Overexpression of Akt1 Enhances

- Adipogenesis and Leads to Lipoma Formation in Zebrafish. Bielenberg DR, ed. *PLoS One*. 2012;7(5):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0036474
79. elna elastin a [Danio rerio (zebrafish)] - Gene - NCBI. Accessed March 12, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/790915>
  80. Miao M, Bruce AEE, Bhanji T, Davis EC, Keeley FW. Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish. *Matrix Biol*. 2007;26(2):115-124. doi:10.1016/j.matbio.2006.09.011
  81. Hinits Y, Pan L, Walker C, Dowd J, Moens CB, Hughes SM. Zebrafish Mef2ca and Mef2cb are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation. *Dev Biol*. 2012;369(2):199-210. doi:10.1016/j.ydbio.2012.06.019
  82. elna | ZMP | Busch Lab. Accessed February 15, 2021. <https://zmp.buschlab.org/gene/ENSDARG00000069994#>
  83. ELN elastin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Accessed May 16, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2006>
  84. Ewart AK, Jin W, Atkinson D, Morris CA, Keating MT. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest*. 1994;93(3):1071-1077. doi:10.1172/JCI117057
  85. Alvira CM, Guignabert C, Kim Y-M, et al. Inhibition of Transforming Growth Factor  $\beta$  Worsens Elastin Degradation in a Murine Model of Kawasaki Disease. *Am J Pathol*. 2011;178(3):1210-1220. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.054
  86. Baccarani-Contri M, Vincenzi D, Cicchetti F, Mori G, Pasquali-Ronchetti I. Immunochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Eur J Histochem*. 1994;38(2):111-123. Accessed May 16, 2021.
  87. Eln elastin [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. Accessed May 16, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13717/>
  88. Szychowski KA, Gmiński J. The Elastin-Derived Peptide VGVAPG Does Not Activate the Inflammatory Process in Mouse Cortical Astrocytes In Vitro. *Neurotox Res*. 2020;37(1):136-145. doi:10.1007/s12640-019-00114-x
  89. Hawes JZ, Cocciolone AJ, Cui AH, et al. Elastin haploinsufficiency in mice has divergent effects on arterial remodeling with aging depending on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;319(6):H1398-H1408. doi:10.1152/ajpheart.00517.2020
  90. Zepp JA, Morley MP, Loebel C, et al. Genomic, epigenomic, and biophysical cues controlling the emergence of the lung alveolus. *Science (80- )*. 2021;371(6534):eabc3172. doi:10.1126/science.abc3172
  91. LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim*. 2009;44 Suppl 3(SUPPL. 3):10-22. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x
  92. Leppert PC, Yu SY, Keller S, Cerreta J, Mandl I. Decreased elastic fibers and desmosine content in incompetent cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;157(5):1134-1139. doi:10.1016/S0002-9378(87)80277-6
  93. Granadeiro LCS. Effects of vitamin K deficiency and its mechanisms in vertebrate's early development: zebrafish as a model.
  94. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the

- elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(9):1400-1407. doi:10.1161/01.atv.18.9.1400
95. Krüger T, Oelenberg S, Kaesler N, et al. Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(11):2618-2624. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302244
96. Liu C, Wan J, Yang Q, Qi B, Peng W, Chen X. Effects of atorvastatin on warfarin-induced aortic medial calcification and systolic blood pressure in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008;28(5):535-538. doi:10.1007/s11596-008-0510-1
97. Kazlouskaya V, Malhotra S, Lambe J, Idriss MH, Elston D, Andres C. The utility of elastic Verhoeff-Van Gieson staining in dermatopathology. *J Cutan Pathol.* 2013;40(2):211-225. doi:10.1111/cup.12036

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I - Características clínicas da síndrome de Keutel

**Tabela 8.1.** Resumo das características clínicas da síndrome de Keutel observadas ao longo dos anos. PPS- Estenoses Pulmonares Periféricas; X- corresponde à presença do sintoma no(s) paciente(s) observado(s).

Casos relatados	Características faciais típicas	Calcificações anormais	Braquitelefalangismo	PPS	Infeções/problemas respiratórios	Perda auditiva	Atraso mental	Consanguinidade familiar	Outras observações
1971, Keutel <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X		X	Dispneia, otite/sinusite e convulsões
1984, Fryns <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	Pieira, defeito do septo ventricular, hipertrofia do ventrículo direito, ligeiro atraso no desenvolvimento corporal, fala anasalada
1989, Khosroshahi <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	Pieira, otite/sinusite, bócio e baixa estatura
1993, Ziereisen <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X	X		Dispneia, pieira, otite/sinusite e ligeira dilatação do ventrículo direito
1998, Teebi <i>et al.</i>	X	X	X			X	X	X	Otite/sinusite, convulsões, atraso no desenvolvimento psicomotor, baixa estatura, hipoplasia maxilar, lesões cerebrais, atrofia ótica (miopia), fala anasalada e ofegante

(A tabela continua na página seguinte)

Caracterização de duas linhas de peixe-zebra mutantes para a elastina no estudo da síndrome de Keutel

Casos relatados	Características faciais típicas	Calcificações anormais	Braquitefalangismo	PPS	Infeções/problemas respiratórios	Perda auditiva	Atraso mental	Consanguinidade familiar	Outras observações
1999 Devriendt <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	Dispneia, pieira, alopecia e hipoplasia maxilar
2001, Meier <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X		X	Dispneia, pieira, tosse, DPOC, convulsões, lesões cerebrais, hipertensão sistêmica, aumento da espessura da pele e insuficiência cardíaca (causa de morte)
2005, Hur <i>et al.</i>	X	X	X	X			X	X	Pieira, hipertensão da artéria pulmonar, hipertrofia do ventrículo direito, convulsões, atrofia ótica, lesões cutâneas e cerebrais e encefalomalacia
2012, Sun <i>et al.</i>	X	X	X	X	X				Pieira e sopro sistólico
2014, Khosroshahi <i>et al.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	Problemas de fertilidade, perda de memória a curto prazo, hipertensão arterial sistêmica, lesões cutâneas, dificuldade em recuperar a consciência após anestesia geral, nódulos na tireóide (microcarcinoma papilar), insuficiência pulmonar, DPOC, sinusite, asma e enfisema
2018, Perrone <i>et al.</i>	X	X	X	X	X			X	Dispneia e sopro



## 8.2. Anexo II – Estrutura do gene que codifica para a Elna no peixe-zebra

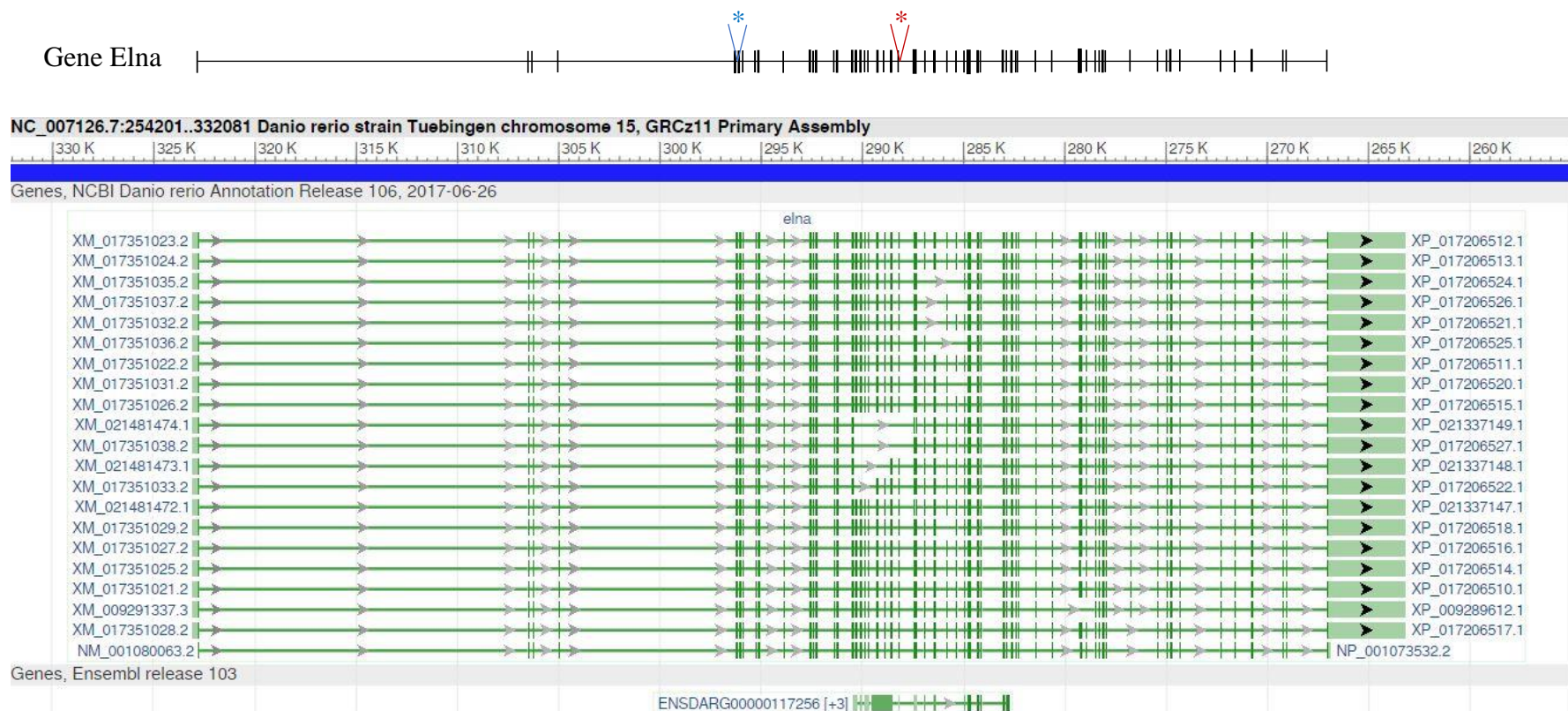


Imagem retirada e adaptada do NCBI ao dia 9 de Março de 2021.

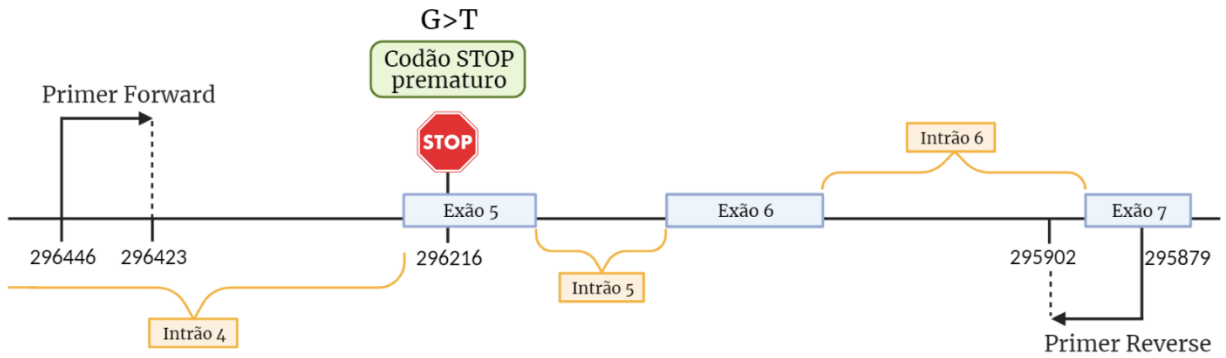
Legenda:

∇\* - Mutação Sa17177

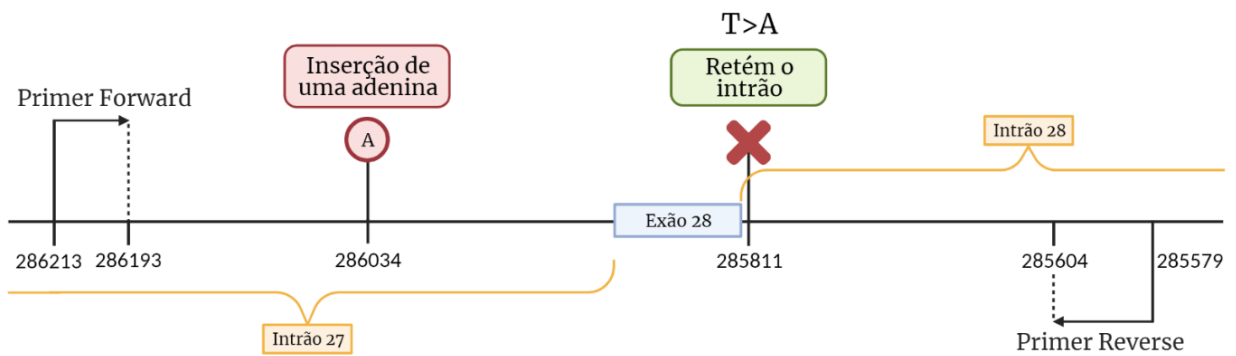
∇\* - Mutação Sa42459

(na página seguinte pode-se observar com mais detalhe cada uma das mutações)

<sup>\*</sup>  
V - Mutação Sa17177:



<sup>\*</sup>  
V - Mutação Sa42459:



### 8.3. Anexo III - Protocolo de fixação das amostras biológicas

#### Sample collection and whole-mount double staining procedures for accessing the larval skeletal development and evaluation of deformities

Paulo Gavaia CCMAR - Centre of Marine Sciences (pgavaia@ualg.pt)

Larval samples for describing the ontogeny of the skeleton should be collected from early post-metamorphosis (day ~20) 45 DAH, end of experiment (if desired use the description of hours post fertilization-HPF- as proposed by Rosenthal at IAFSB-2009).

Specimens for deformities should be kept on flat bottom flasks.

To better preserve the samples during fixation and storage before staining, the containers should be kept at 4°C in the dark.

#### SOLUTIONS:

➤ **0,2 M Phosphate Buffer pH 7,4**

0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Adjust the pH of the solution of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> to 7,4 with the solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Autoclave and store at 4°C.

➤ **(PBS) Phosphate Buffer Saline 0,1 M, pH 7,4.**

Add 500 ml of the buffered phosphate solution to and 400 ml of distilled H<sub>2</sub>O. Add 10 gr of NaCl, dissolve and adjust volume to 1 liter.

Autoclave and store at 4°C.

➤ **PFA 4% (paraformaldehyde)**

Add 40 gr. PFA to a bottle and adjust volume to 500 ml with distilled H<sub>2</sub>O.

Heat to 70° C to dissolve.

Add 500 ml of 0,2 M phosphate buffer saline

Store at 4°C.

➤ **Alcian blue 8GX solution**

30 mg Alcian blue 8GX, 80 ml absolute ethanol, 20 ml glacial acetic acid. The solution is filtered before use. The solution can be stored for a maximum of 3 months at 4°C.

➤ **Alizarin red S solution**

1 g Alizarin red S in 49,5 ml absolute ethanol + 0.5 ml of 5% KOH. The solution must be filtered prior to use.

➤ **Ethanol neutralizing solution**

100% absolute ethanol, 0,05% KOH

**SAMPLE COLLECTION AND FIXATION:**

- Collect random samples of 30 specimens with a 1l beaker cup, taking care not to induce damage the individuals.
- Anaesthetize the samples with 200 ppm 2- phenoxyethanol (0,2ml / liter) or other appropriated anesthetic.
- Place the samples in a dark glass container and remove all the water. Fix the samples with 4% PFA overnight, at 4°C in the dark.
- Remove the fixative by washing the samples for 15-30 min (depending on size) with excess PBS with 0,1% triton X-100 added.
- If needed store the samples with 70% ethanol at 4°C in the dark, or advance directly to the double staining procedure by transferring the samples to distilled water.