

Alene Patrícia Semedo Tavares

**Importância da Região 3'UTR do mRNA do
deltaC no desenvolvimento de Peixe-Zebra**



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2021

Alene Patrícia Semedo Tavares

Importância da Região 3'UTR do mRNA do *deltaC* no desenvolvimento de Peixe-Zebra

Mestrado em:

Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Raquel P. Andrade

Professor Doutor Marco A. Campinho



Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2021

Alene Patrícia Semedo Tavares

Importância da Região 3'UTR do mRNA do *deltaC* no desenvolvimento de Peixe-Zebra

Declaração de autoria do trabalho:

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

Copyright © 2021 Alene Patrícia Semedo Tavares

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.

Agradecimentos

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória premiada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas e alegrias. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas. Manifesto, assim, o meu agradecimento às pessoas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Raquel P. Andrade e Professor Doutor Marco A. Campinho pela orientação exemplar com um elevado e rigoroso nível científico, um interesse permanente, uma visão crítica e oportuna, os quais contribuíram para enriquecer, com grande dedicação e passo a passo todas as etapas do trabalho realizado.

A todos os colegas de curso por compartilharem comigo tantos momentos de descobertas e aprendizado e por todo o companheirismo ao longo deste percurso.

À minha família que sempre me apoiaram e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Resumo

A somitogênese é um processo morfogenético altamente regulado e conservado entre os vertebrados. Durante este processo ocorre a formação de sómitos de forma rítmica e sequencial ao longo do eixo ântero-posterior do embrião a partir de um tecido progenitor não segmentado denominado de mesoderme pré-somítica (PSM). Os sómitos são aglomerados de células da mesoderme, precursores do esqueleto e da musculatura axial. A periodicidade da formação de sómitos a partir da PSM é imposta por um oscilador molecular denominado de relógio molecular que leva à expressão cíclica de um conjunto de genes, que se propaga ao longo da PSM no sentido caudo-rostral. A comunicação celular e a sincronização das oscilações de expressão na PSM através da sinalização intercelular Notch-Delta são fundamentais no controlo da somitogênese e da diferenciação celular. Esta oscilação da expressão dos genes do relógio é controlada por um mecanismo de regulação de *feedback* negativo, onde a instabilidade do mRNA desempenha um papel fundamental. A região 3'UTR geralmente contém vários elementos reguladores que governam a expressão espacial e temporal de diferentes mRNAs.

Estudos anteriores do laboratório demonstraram uma estabilização do mRNA do gene *deltaC* de peixe-zebra na ausência de porções da região 3'UTR. Para melhor compreensão do fenótipo, neste trabalho foi avaliado o papel da região 3'UTR do gene *deltaC* na somitogênese de embriões de peixe-zebra. Para isso foram utilizadas diferentes linhas mutantes em que a região 3'UTR do gene *deltaC* foi editada usando a tecnologia CRISPR/Cas9. Procedeu-se à caracterização do padrão de expressão dos genes *her7* e *deltaC* e caracterização morfológica dos sómitos formados para perceber o impacto destas alterações. Os resultados do presente estudo confirmaram que a região 3'UTR de *deltaC* é importante para a correta expressão de *deltaC* e *her7*, bem como para a segmentação corporal do embrião de peixe-zebra. Embora nos embriões RR2 e RR3 a segmentação não é interrompida, o número total de sómitos é menor e os sómitos anteriores são ligeiramente mais curtos. Usando uma linha transgênica em que o Notch Intracellular Domain (NICD) é expresso constitutivamente após indução térmica observou-se diminuição do tamanho dos sómitos como nos embriões RR3 o que sugere que o fenótipo observado nos embriões mutantes poderá ser devido a um aumento da sinalização Notch durante a somitogênese.

Palavras-chave: Somitogénese, 3'UTR, peixe-zebra, Notch-Delta, mRNA

Abstract

Embryonic somitogenesis is a highly regulated and conserved morphogenetic process among vertebrates. During this process, somites are formed rhythmically and sequentially from a non-segmented progenitor tissue called presomitic mesoderm (PSM) along the anterior-posterior axis of the embryo. Somites are clusters of mesoderm cells that are precursors of the axial skeleton and musculature. The periodicity of somite formation from the PSM is due to an oscillator mechanism called the molecular clock that leads to the cyclic expression of a set of genes that propagate along the PSM in a caudal-rostral direction. Cellular communication and synchronization of expression oscillations in the PSM through Notch-Delta intercellular signaling are fundamental in the control of somitogenesis and cell differentiation. The oscillation of clock gene expression is controlled by negative feedback, where mRNA instability plays a key role. The mRNA 3'UTR region generally includes several regulatory elements that govern the spatial and temporal expression of mRNAs.

Previous studies in the lab suggest that mRNA stabilization in the absence of portions of the 3'UTR region of zebrafish *deltaC* gene might be involved in the regulation of the molecular clock. For a better understanding of the phenotype, this work was designed to evaluate the role of the 3'UTR region of the *deltaC* gene in the somitogenesis of zebrafish embryos. For this study, different mutant lines generated by CRISPR / Cas9 were used, where the 3'UTR region of the *deltaC* gene was edited. The characterization of expression patterns of *her7* and *deltaC* genes was carried out, as well as the morphological characterization of the somites formed in these mutants. The results of this study confirmed that the *deltaC* 3'UTR region is important for proper expression of *deltaC* and *her7*, as well as for zebrafish embryo body segmentation. Although in RR2 and RR3 embryos segmentation is not interrupted, the total number of somites is smaller and the anterior somites are slightly shorter. Using a transgenic line where the Notch Intracellular Domain (NICD) is constitutively expressed after heat-shock was observed a decrease in somite size as observed in the RR3 embryos suggesting that the phenotype observed in the mutant embryos could be due to enhanced Notch signaling during somitogenesis.

Keywords: Somitogenesis, 3'UTR, Zebrafish, Notch-Delta, mRNA

Índice de conteúdos

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Índice de figuras	3
Índice de tabelas	5
Lista de abreviaturas	6
1. Introdução.....	7
1.1 Somitogénese embrionária.....	7
1.2 O relógio molecular da somitogénese	10
1.2.1 A Frente de onda no modelo Clock and Wavefront	12
1.2.2 Sinalização Notch-Delta na somitogénese	15
1.2.3 Mecanismo de feedback negativo	19
1.3 Importância da região 3'UTR na regulação do relógio molecular.....	21
1.4 O peixe-zebra como modelo experimental no estudo do relógio molecular	24
1.5 Objetivos do trabalho	30
2. Materiais e Métodos.....	31
2.1 Linhas transgênicas de peixe-zebra mutantes.....	31
2.2 Manutenção do peixe-zebra.....	31
2.3 Extração de DNA genómico a partir de um corte de cauda de peixe-zebra adulto	31
2.4 Genotipagem por reação de "Polymerase Chain Reaction" (PCR)	32
2.5 Eletroforese em Gel de Agarose	33
2.6 Extração e purificação do DNA Plasmídico para preparação de Sonda de RNA Xirp2a .	34
2.7 Síntese de sondas de RNA de cadeia complementar	35
2.8 Obtenção, Recolha e Fixação dos embriões	36
2.9 Hibridação <i>in situ</i>	37
2.10 Aquisição e análise das imagens.....	39
2.11 Análise Estatística	40
3. Resultados e Discussão	41
3.1 Estabelecimento de linhas mutantes homozigóticas na região 3'UTR de <i>deltaC</i>	41

3.1.1 Genotipagem dos peixes mutantes RR2+RR3	43
3.1.2 Genotipagem dos peixes mutantes RR2	46
3.1.3 Genotipagem dos peixes mutantes RR3	46
3.1.4 Cruzamentos para obtenção de linhagens homozigóticas de peixes-zebra mutantes..	47
3.2 Caracterização do padrão de expressão do gene <i>deltaC</i>	48
3.3 Caracterização do padrão de expressão do gene <i>her7</i>	51
3.4 Caracterização morfológica dos embriões portadores da deleção	54
3.5 Caracterização morfológica de embriões NICD (Tg.hsp70:NICD).....	58
3.6 Comparação dos embriões portadores de deleção RR2 e RR3 com os embriões NICD	60
4. Conclusão.....	64
5. Perspetivas futuras	65
6. Referências bibliográficas	66
7. Anexo	74
7.1 Imunofluorescência para proteína deltaC.....	74

Índice de figuras

Figura 1.1- Representação da vista dorsal da parte posterior de um embrião vertebrado em segmentação.	8
Figura 1.2- Expressão de <i>hairy1</i> na PSM durante a somitogênese do embrião de galinha.. ..	11
Figura 1.3- Relógio molecular e frente de onda.....	14
Figura 1.4- Esquema da via de sinalização Notch-Delta.	15
Figura 1.5- Mecanismos de ação de Notch-Delta na diferenciação celular.....	17
Figura 1.6- Modelo de interações moleculares entre o oscilador HER e a via Notch-Delta. ..	18
Figura 1.7- Esquema da oscilação de expressão genética com um <i>loop</i> de feedback negativo.	20
Figura 1.8- Imagem representativa de peixe-zebra adulto.....	24
Figura 1.9- Fases de desenvolvimento do embrião de peixe-zebra.	26
Figura 1.10- Genes ortólogos que o ser humano partilha com outras espécies..	29
Figura 2.1- Região 3'UTR do gene <i>deltaC</i> no peixe-zebra.....	31
Figura 2.2- Imagem representativa de um embrião de peixe-zebra ilustrando como foram contados e medidos os comprimentos dos sómitos.....	39
Figura 3.1- Geração F1 de peixes mutantes obtidos por Crispr/Cas9..	41
Figura 3.2- Estratégia para a obtenção de peixes mutantes homozigóticos a partir de animais da geração F1..	42
Figura 3.3- Imagem representativa das deleções efetuadas na região 3'UTR do gene <i>deltaC</i> do peixe-zebra.....	43
Figura 3.4- Genotipagem dos peixes da geração F1 da deleção RR2+RR3.	43
Figura 3.5- Genotipagem dos peixes mutantes <i>deltaC</i> RR2+RR3..	44
Figura 3.6- Genotipagem dos peixes mutantes RR2+RR3.....	45
Figura 3.7- Genotipagem dos peixes portadores da deleção RR2.	46
Figura 3.8- Genotipagem dos peixes mutantes <i>deltaC</i> RR3.....	47
Figura 3.9- <i>DeltaC</i> mantém um padrão de expressão dinâmico na PSM de embriões gerados de cruzamentos RR2 e RR3..	49
Figura 3.10- Padrão de expressão do gene <i>deltaC</i> em embriões WT e gerados de cruzamentos RR2 e RR3.	51

Figura 3.11- <i>Her7</i> mantém um padrão de expressão dinâmico na PSM de embriões gerados de cruzamentos RR2 e RR3..	52
Figura 3.12- Padrão de expressão do gene <i>her7</i> em embriões de cruzamentos RR2 e RR3 ...	53
Figura 3.13- Avaliação da morfologia e número de sómitos em embriões de peixe-zebra gerados de cruzamentos RR2 e RR3.....	55
Figura 3.14- Avaliação do tamanho dos sómitos de embriões de peixe-zebra gerados de cruzamentos RR2 e RR3 com 32hpf...	56
Figura 3.15- Caracterização morfológica de embriões de peixe-zebra portadores da deleção RR2 e RR3 com 32hpf...	57
Figura 3.16- Caracterização morfológica de embriões de peixe-zebra transgênicos NICD.....	59
Figura 3.17- Caracterização do número e tamanho dos sómitos em embriões de peixe-zebra transgênicos NICD..	59
Figura 3.18- Comparação entre o número total de sómitos dos embriões portadores da deleção RR2 e RR3 e embriões NICD.....	60
Figura 3.19- Tamanho dos sómitos em embriões RR2, RR3 e NICD..	61
Figura 3.20- Visualização do tamanho dos sómitos dos mutantes relativamente ao WT... Erro!	
Marcador não definido.	
Figura 7.1: Imunofluorescência de embriões de peixe-zebra com 18hpf..	74

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Reagentes e concentração final dos mesmos utilizada para a reação de PCR.	32
Tabela 2.2- Lista dos primers utilizados para realizar PCR.....	33
Tabela 2.3- Lista dos primers utilizados para realizar síntese das sondas para <i>her7</i> e <i>dlc</i>	36
Tabela 2.4- Tempos de digestão com Proteinase K usado nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra.....	38
Tabela 3.1- Cruzamentos de peixes mutantes RR2 e RR3 para obtenção de linhas mutantes homozigóticas.	48

Lista de abreviaturas

3'UTR – *3' Untranslated region* (Região não traduzida 3')

5'UTR – *5' Untranslated region* (Região não traduzida 5')

BCIP - Bromo-5-4-Chloro-3-IndolylPhosphate

cDNA- *complementary DNA* (DNA complementar)

Dig - Digoxigenina

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

FGF – *Fibroblast growth factor* (Fator de crescimento dos fibroblastos)

Hpf - horas pós fertilização

Mesp2 – *Mesoderme posterior protein 2*

mRNA – Messenger RNA (RNA mensageiro)

NBT - 4-nitro blue tetrazolium chloride

NICD – *Notch intercelular domain* (Domínio intracelular de Notch)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação da polimerase em cadeia)

PSM – *Pre-somitic mesoderm* (Mesoderme Pré-somítica)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

Rpm – Rotações por minuto

RR2- Embriões em que a segunda porção da região regulatória de 3'UTR foi eliminada

RR2+RR3- Embriões em que a segunda e a terceira porção da região regulatória de 3'UTR foi eliminada

RR3- Embriões em que a terceira porção da região regulatória de 3'UTR foi eliminada

WT- *Wild Type* (Tipo Selvagem)

Xirp2a - *xin actin binding repeat containing 2a*

1. Introdução

O desenvolvimento embrionário começa após a fecundação do óvulo pelo espermatozoide dando origem ao zigoto, que passará por várias etapas sucessivas de divisão e diferenciação celular até se formar um organismo propriamente dito. Esses eventos ocorrem em diversas etapas como gastrulação, segmentação e organogênese.

A segmentação é iniciada no embrião em desenvolvimento por meio da formação de segmentos chamados somitos, que posteriormente dão origem às vértebras e ao músculo esquelético, bem como a alguma derme (Maroto, 2012). A gastrulação é um dos primeiros eventos morfológicos a se formar no embrião ocorrendo durante as primeiras horas de desenvolvimento. A gastrulação descreve o movimento de um conjunto de células em direção á linha primitiva em que sofrem uma transição epitelial-mesenquimal (EMT) para internalizar e gerar as três camadas germinativas do embrião denominadas de ectoderme, mesoderme e endoderme, das quais todos os tecidos embrionários irão derivar (Acloque *et al.*, 2011). Uma vez que as camadas germinativas são estabelecidas, as células interagem entre si e reorganizam-se para produzir tecidos e órgãos. Este processo é denominado organogênese (Gilbert, 2018). Este processo ocorre quando as células das camadas germinativas começam a trocar sinais umas com as outras resultando na formação de órgãos específicos em locais específicos. Algumas células passarão por longas migrações do seu local de origem até ao seu local final.

1.1 Somitogênese embrionária

A somitogênese é um processo importante para o desenvolvimento de embriões de vertebrados em que ocorre a formação de sómitos, rítmica e sequencialmente a partir de um tecido progenitor denominado de mesoderme pré-somítica (PSM) (Jörg *et al.*, 2016). A PSM é um tecido polarizado com progenitores mesodérmicos imaturos na parte posterior e células cada vez mais diferenciadas na parte anterior (Oates *et al.*, 2012). À medida que novos sómitos são formados na PSM anterior, novas células entram na PSM posterior a partir de uma zona de crescimento chamada de botão caudal. Conforme as células entram na PSM a partir do botão caudal, elas retêm seu estado mesenquimal por algum tempo antes de serem incorporadas num sómito epitelial. As células localizadas na PSM posterior mantêm ainda um

estado indiferenciado e pluripotente (Aulehla & Pourquié, 2010). Essa polaridade é configurada por fatores de sinalização que atravessam o tecido, regulando a diferenciação da mesoderme e a posição na parte anterior onde se formarão os limites do sómito (Aulehla & Pourquié, 2010). Na maioria dos vertebrados, o comprimento da PSM aumenta gradualmente no começo da embriogênese e posteriormente diminui à medida que o embrião se desenvolve, isto porque são removidas mais células do que são adicionadas (Gomez, *et al.*, 2008).

Os sómitos são blocos de células da mesoderme formadas a partir da mesoderme pre-somítica. Cada sómito é um segmento polarizado internamente em metades rostral e caudal tendo propriedades distintas. Essas identidades do segmento são conferidas por meio de um conjunto de genes que são expressos nos compartimentos correspondentes, ainda antes que os limites do segmento morfológico sejam visíveis (Oates *et al.*, 2012). Os sómitos formam-se aos pares (no lado esquerdo e direito do embrião flanqueando a notocorda), segregando da mesoderme pré-somítica em sua extremidade anterior e sendo assim, o primeiro par de sómitos está localizado na porção anterior do tronco e o último produzido está localizado mais posteriormente (Figura 1.1).

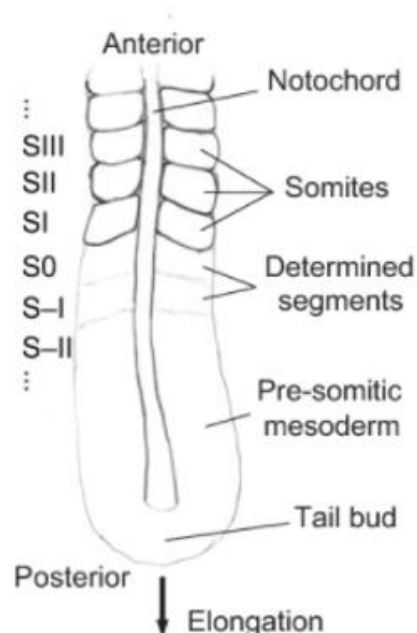


Figura 1.1. Representação da vista dorsal da parte posterior de um embrião vertebrado em segmentação. Os sómitos podem ser observados em cada lado da notocorda (Oates et al., 2012).

Sob a influência de sinais de tecidos vizinhos, na parte mais ventral do sómito desenvolve-se o esclerótomo que dará origem às costelas e ao esqueleto axial, na parte mais dorsal forma-se o dermomiótomo, que dará origem ao miótomo no qual se formam os músculos esqueléticos e ao dermatomo que dará origem a grande parte do tecido conjuntivo da pele (Pourquié, 2001; Chad & Pourquié, 2017).

A formação dos sómitos e a estabilidade dos seus limites morfológicos envolve uma transição mesenquimal para epitelial do tecido da PSM por meio de mudanças coordenadas na forma e adesão celular, e uma deposição de matriz extracelular na fenda somítica (Watanabe & Takahashi, 2010). Algumas células permanecem mesenquimais mesmo após a segmentação e estes encontram-se localizados no centro do sómito, envolvidos pelas células epiteliais. Assim, a estrutura de um sómito recém-formado consiste em dois tipos de células, epiteliais as mais externas e mesenquimais as mais internas, com pouca ou nenhuma proliferação celular e apoptose (Watanabe & Takahashi, 2010).

A formação da fenda (limite do somito) desempenha um papel central na diferenciação das regiões cercadas que dão origem a tecidos e órgãos distintos durante o desenvolvimento inicial. Para formar uma fronteira de tecido físico, é importante identificar quais células atuam na formação da fenda somítica e estabelecer interações entre elas. Em muitos casos, a formação da fenda é impulsionada pela interação Eph-Ephrin, onde as células de um lado da fronteira expressam o recetor Eph, enquanto as do outro lado expressam Ephrin A (Naganathan & Oates 2020). No peixe-zebra, as células da metade anterior de um somito expressam o recetor *EphA4*, enquanto as células da metade posterior de um somito expressam ligandos *ephrinA1* e *ephrinB2a*. Eph é um recetor da superfície celular que interage com seu ligando Ephrin, que também é uma proteína da superfície celular (Watanabe & Takahashi, 2010). A interação Eph-Ephrin leva à desagregação das células associadas, ativação da contratilidade da actomiosina, aquisição da morfologia colunar nas células em ambos os lados, realocização do núcleo e centróssoma para o lado basal e β -catenina para o lado apical (Naganathan & Oates, 2020). A interação Eph / Ephrin é o primeiro elo conhecido entre os processos de padronização e a morfogênese do limite do sómito (Naganathan & Oates, 2020).

O ritmo com o qual novos segmentos formam-se é específico para uma determinada espécie, junto com o número total de segmentos que podem, no entanto, variar entre espécies. Por

exemplo, no peixe-zebra, um novo par de sómitos forma-se a cada 25 minutos, resultando na formação de 33 pares de sómitos, no embrião de galinha um par de sómitos forma-se a cada 90 minutos até se formarem cerca de 50 pares de sómitos, em ratinhos, um par de sómitos forma-se a cada 2 horas resultando na formação de 65 pares de sómitos, e em humanos, estima-se que os sómitos se formam a cada 4-5 horas até que um total de 38-44 pares sejam formados (Dequéant & Pourquié, 2008; Pourquié, 2018). A somitogênese é um processo complexo que necessita de uma regulação muito rigorosa. A ausência desta regulação poderá levar ao aparecimento de doenças congênitas como por exemplo a disostose espondilocostal que é uma condição que conduz a deformações no tronco (atrofiado e curto) e também ao desalinhamento das costelas (Jörg *et al.*, 2016; Bailey, 2015).

1.2 O relógio molecular da somitogênese

A somitogênese é um processo extremamente regulado no tempo e no espaço. Essa precisão na regulação requer um mecanismo que coordena o número de sómitos, a posição e a forma coordenada como eles aparecem e ainda o tempo que estes levam a se formar. Vários modelos já foram sugeridos para explicar esta coordenação: Modelo *Reaction-Diffusion* (Meinhardt., 1986); o *Cell Cycle model* (Stern *et al.*, 1988) mas, o mais aceite foi o modelo *Clock and Wavefront* que envolve a interação do relógio e de uma frente de onda de diferenciação. Neste modelo, o relógio diz respeito a um oscilador molecular existente na PSM que dá às células informação temporal necessária para formação dos sómitos, enquanto que, a frente de onda diz respeito a um gradiente de diferenciação celular que progride ao longo da PSM e dá informação sobre o local da formação da fenda do novo sómito (Cooke & Zeeman, 1976).

A descoberta de um oscilador molecular, "relógio", ocorreu através da observação da expressão periódica do gene *hairy1* na PSM de embriões de galinha (Figura 1.2) (Palmeirim *et al.*, 1997). Palmeirim e colaboradores descobriram que *hairy1*, um fator de transcrição que oscila através da mesoderme pré-somítica, apresentava uma expressão de mRNA oscilatória na PSM que é coincidente com o período de formação do sómito (Palmeirim *et al.*, 1997), ou seja, esta oscilação não apenas repete, mas ocorre em intervalos de tempo regulares.

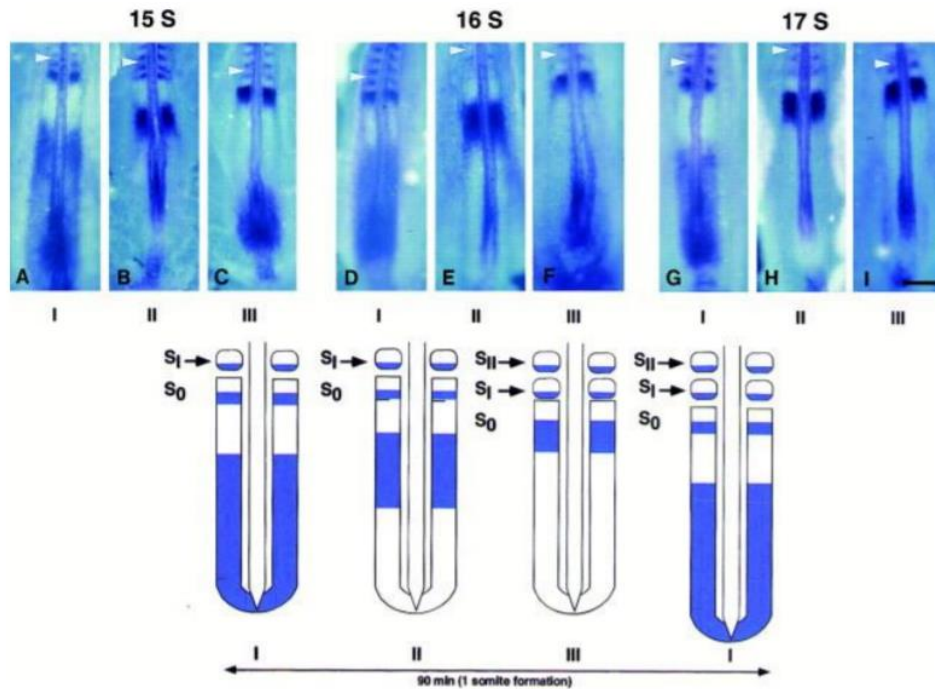


Figura 1.2- Expressão de *hairy1* na PSM durante a somitogênese do embrião de galinha. A expressão do gene é dinâmica com um período de 90 minutos que é o mesmo tempo que leva a formar um par de sómitos no embrião de galinha (Palmeirim *et al.*, 1997).

Padrões oscilantes de expressão genética estão presentes na PSM e na cauda de todos os embriões de vertebrados estudados até ao momento, o que indica que essas oscilações fazem parte de um mecanismo filogeneticamente conservado (Dequéant & Pourquié, 2008). As experiências de hibridização *in situ* de mRNA identificaram um grupo de genes chamados genes cíclicos que exibem padrões de mRNA oscilantes semelhantes. As proteínas codificadas por alguns desses genes cíclicos também têm níveis oscilantes (Bessho *et al.*, 2003), indicando que mRNA e proteínas de genes cíclicos são expressos e degradados em cada ciclo do relógio de segmentação. Esses padrões oscilantes apresentam algumas características observáveis. Apresentam um padrão de expressão genética que move através da PSM, a desaceleração e o encurtamento do padrão de expressão ao longo da PSM e sua permanência na parte anterior da PSM em uma posição que prefigura os limites dos próximos sómitos, e a repetição do padrão para a formação de um novo par de sómitos (Oates *et al.*, 2012).

A maioria dos genes cíclicos pertencem às vias de sinalização Notch-Delta, Wnt e FGF (Giudicelli & Lewis, 2004; Hubaud & Pourquié, 2014). No peixe-zebra todos os genes cíclicos conhecidos até o momento pertencem à via Notch e incluem não apenas genes Hairy/Enhancer of Split, como *her1* e *her7*, mas também os ligandos Notch *deltaC* e *deltaD* (Dequéant & Pourquié, 2008). A perda de função de vários genes cíclicos de ratinho e peixe-zebra produz fenótipos específicos de somitogênese que são caracterizados por limites de sómitos defeituosos e padrões de expressão interrompidos (Bessho *et al.*, 2001; Oates & Ho, 2002). Muitos genes dessas vias são expressos na PSM, e mutações em alguns desses genes, como aqueles que codificam o recetor de sinalização célula-célula Notch1, ou seu ligando Delta-like 3 também interrompem a segmentação (Dunwoodie *et al.*, 2002). Em alguns casos, a proteína codificada é localizada de forma periódica, ou seja, com padrões “on e off”. Por exemplo, um estudo feito por Morimoto e colaboradores (Morimoto *et al.*, 2005) visualizaram os níveis endógenos de atividade Notch1 em ratinhos, mostrando que ela oscila na PSM posterior, mas é interrompida na PSM anterior. Muitas vezes quando os padrões de ondas cíclicas oscilantes são interrompidos, a somitogênese normal também é interrompida. Assim, esses fenótipos são consistentes com a ideia de que os genes cíclicos e suas vias de sinalização ligadas funcionam em um relógio de segmentação molecular que regula a somitogênese.

1.2.1 A Frente de onda no modelo Clock and Wavefront

A frente de onda (*wavefront*) representa um gradiente que varia ao longo da PSM e determina o local onde se formará uma nova fenda somítica, através da tradução da periodicidade que é gerada pelas oscilações dos genes cíclicos do relógio na formação sequencial dos sómitos (Maroto *et al.*, 2012; Bayley, 2015). Sendo assim, um sómito forma-se quando a frente de onda encontra com um grupo de células que estão na fase correta do relógio.

Sabe-se atualmente que este mecanismo é baseado num sistema combinatório de gradientes na PSM que envolve a atividade do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e Wnt que formam um gradiente posterior-anterior, enquanto a via de sinalização ácido retinoico (AR) estabelece um gradiente oposto de atividade (Aulehla & Pourquié, 2010; Bailey, 2015). O local da transcrição de novo *Fgf8* está confinado à região do botão caudal, embora o mRNA *fgf8* possa ser encontrado em um gradiente posterior-anterior ao longo da PSM. O

gradiente de proteína Fgf8 através da PSM é baseado no decaimento do mRNA (Dubrulle e Pourquié 2004b). Conforme as células deixam a região do botão caudal e entram na PSM, a produção de mRNA *fgf8* termina e, portanto, a concentração de mRNA *fgf8* decai ao longo do tempo (Aulehla & Pourquié, 2010). Um outro gradiente de sinalização na PSM é Wnt. O mRNA *wnt3a* codifica um ligando que ativa a via de sinalização WNT canônica. *wnt3a* mostra uma expressão confinada na PSM mais posterior e no botão caudal (Aulehla et al. 2003). Isso levou à proposta de que, à medida que as células deixam a região do botão caudal, a produção de proteína Wnt3a termina. Assim, comparável à situação para Fgf8, foi sugerido que conforme as células deixam o botão caudal, os níveis da proteína Wnt3a diminuirão e, assim, estabelecerão um gradiente de disponibilidade do ligando Wnt3a (Aulehla & Pourquié, 2010). A principal exigência para formação deste gradiente é que as células devem deixar a zona em que o ligando (mRNA e/ou proteína) é produzido exclusivamente, neste caso, o botão caudal. Depois que as células passarem por essa etapa, a concentração do ligando diminui com o tempo. O mRNA de β -*catenina*, o principal mediador da sinalização Wnt canônica, apresenta uma expressão bastante uniforme na PSM de embriões de ratinho. Um gradiente anterior-posterior de proteína β -*catenina* foi observado na PSM, fornecendo evidência da existência de um gradiente de sinalização Wnt / β -*catenina* em embriões de ratinho (Aulehla e Pourquié, 2010).

O estado de diferenciação parece ser controlado pelo sistema de gradientes de sinalização (Figura 1.3). A sinalização FGF/Wnt são responsáveis por manter as células nos tecidos mais posteriores num estado indiferenciadas e proliferativas por um alto nível de ativação destas vias e assim ativar a diferenciação apenas quando atingem o limiar apropriado de atividade de FGF/Wnt que se encontra localizada na parte mais anterior da PSM (Dubrulle e Pourquié, 2004). Oposto a esses gradientes está o ácido retinóico (AR) produzido pela enzima retinaldeído desidrogenase 2 (*Raldh2*) (Blentic *et al.*, 2003). Durante a somitogênese, *raldh2* é expresso nos sómitos e na parte mais anterior da PSM (Kam *et al.*, 2012; Oates *et al.*, 2012), e um gradiente anterior para posterior de AR é assim estabelecido, induzindo a diferenciação das células na PSM. Juntos a combinação desses dois gradientes AR e FGF / Wnt definem a frente da onda e a localização correta da fenda do próximo sómito a formar (Bailey, 2015).

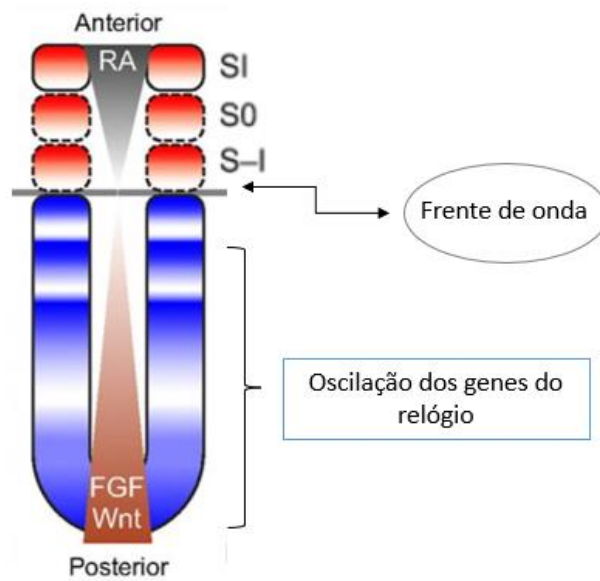


Figura 1.3- Relógio molecular e frente de onda. Representação da parte caudal do embrião de peixe-zebra com indicação dos locais na PSM onde opera o relógio e a frente de onda. A frente de onda (ou frente de determinação) é representada entre o gradiente do ácido retinóico (AR) e gradiente oposto FGF e Wnt. A Azul está representada a PSM indeterminada e a vermelho a PSM determinada para a formação de sómitos (adaptado de Oates et al., 2012).

Essa mudança de desenvolvimento é acompanhada por várias mudanças importantes ao nível molecular e morfológico. Ao nível molecular, quando as células passam na frente de determinação, várias mudanças transcricionais ocorrem, por exemplo, a expressão de *mesp2* (um fator essencial no estabelecimento do pré-padrão segmentar, definindo a futura posição do limite do sómito) é ativada em resposta a um sinal periódico que se acredita ser fornecido pelo relógio de segmentação (Aulehla & Pourquié, 2010). Além disso, vários marcadores da PSM posteriores (por exemplo, *msgn1* e *tbx6*) são concomitantemente reprimidos nessas células.

A ação combinada do relógio e da frente de onda resulta na ativação de genes segmentares específicos numa faixa de células na PSM anterior, que definem o padrão segmentar inicial em que a morfologia do sómito é construída. Assim, o comprimento e a taxa de formação do sómito dependem da frequência com que o relógio está a oscilar e da velocidade com que a frente de onda migra (Oates et al., 2012).

1.2.2 Sinalização Notch-Delta na somitogênese

A via de sinalização Notch-Delta é uma via de comunicação celular com múltiplas funções no desenvolvimento de vertebrados e que é filogeneticamente conservada (Oates *et al*, 2012). Em mamíferos esta via de sinalização é composta por quatro recetores (Notch 1,2,3,4) e cinco ligandos (Delta-like 1,3,4 e Jagged1,2), todos eles proteínas transmembranares (Šučur *et al*, 2020). A ativação desta via ocorre através da interação direta entre recetor e ligando entre células adjacentes (Figura 1.4).

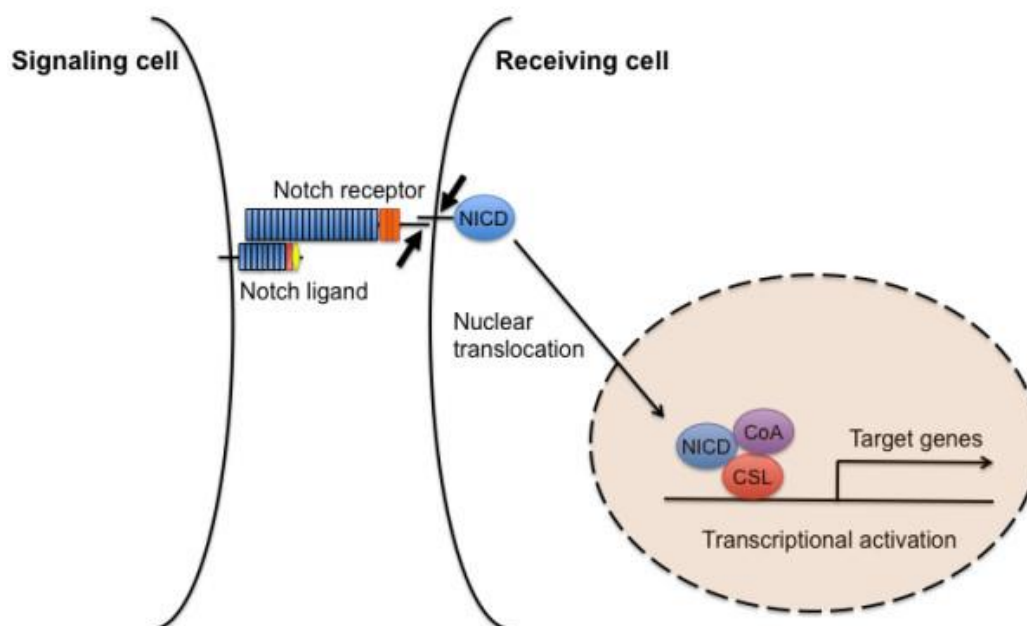


Figura 1.4- Esquema da via de sinalização Notch-Delta. Após a ligação do ligando (ex. Delta) ao recetor ocorre um processo de clivagem, o domínio intracelular Notch (NICD) libertado desloca-se para o núcleo, onde forma um complexo de ativação transcricional induzindo a transcrição de genes alvo (Kume, 2009).

Após a ligação do ligando ocorre a clivagem do domínio intracelular do recetor Notch (NICD- *Notch intracelular domain*) pela ação de um complexo enzimático que envolve uma secretase (Borggreffe & Oswald, 2012). Consequentemente esse domínio migra para o núcleo e age como um co-ativador transcricional, ou seja, não liga diretamente ao DNA para ativar a transcrição, mas heterodimeriza com proteínas ligadas ao DNA e assim ativa a expressão dos genes alvos de Notch.

A sinalização mediada pela via Notch que está envolvida em diferentes mecanismos e apresenta um conjunto de genes alvos nomeadamente genes da família *hes* (*Hairy/Enhancer of Split*) e *her* (*Hes-related repressor*) (Weber *et al.*, 2015). Os genes *hes* e *her* são expressos dependendo do tecido ou da célula em que o recetor Notch é ativado. Nos mamíferos já são conhecidos 7 genes *hes* (Zhou *et al.*, 2015) e 3 genes *her* (Weber *et al.*, 2015) todos estes genes codificam para fatores de transcrição com domínios básicos hélice-base-hélice (bHLH) que se ligam ao DNA com alta afinidade. Estes fatores formam homodímeros para reprimem a transcrição de outros genes o que irá permitir a diferenciação entre células, mas também podem formar heterodímeros (Hes-Her) constituindo repressores transcricionais ainda mais potentes (Fischer & Gessler, 2007).

O sistema de sinalização Delta-Notch é uma via de comunicação célula-célula com múltiplas funções no desenvolvimento embrionário e em doenças (Lai, 2004). Uma das funções do Notch é promover o desenvolvimento de um determinado tipo de célula ou região do corpo, muitas vezes induzindo a expressão de moléculas reguladoras de ação positiva. Em muitos desses casos, a sinalização Notch cria um novo tipo de célula como resultado de interações célula-célula na fronteira entre populações de células distintas. Isso às vezes é referido como sinalização Notch "indutiva" e contrasta com o papel "inibitório" de Notch, onde a sinalização Notch reprime um determinado destino celular entre as células (Lai, 2004). Sendo assim, a sinalização Notch exerce seus efeitos através da inibição lateral (Figura 1.5-A) e de indução lateral (Figura 1.5-B). O mecanismo de inibição lateral ocorre quando dentro de um grupo de células do mesmo tipo, uma única célula começa a diferenciar-se, o ligando ativa a via de sinalização Notch nas células vizinhas, inibindo a diferenciação das restantes células precursoras que permanecem num estado indiferenciado/pluripotente (Collier *et al.*, 1996). No caso do mecanismo de indução lateral na presença de ligando, a via Notch é ativada e uma célula precursora é induzida a adotar um destino celular específico (Borggreffe & Oswald, 2009).

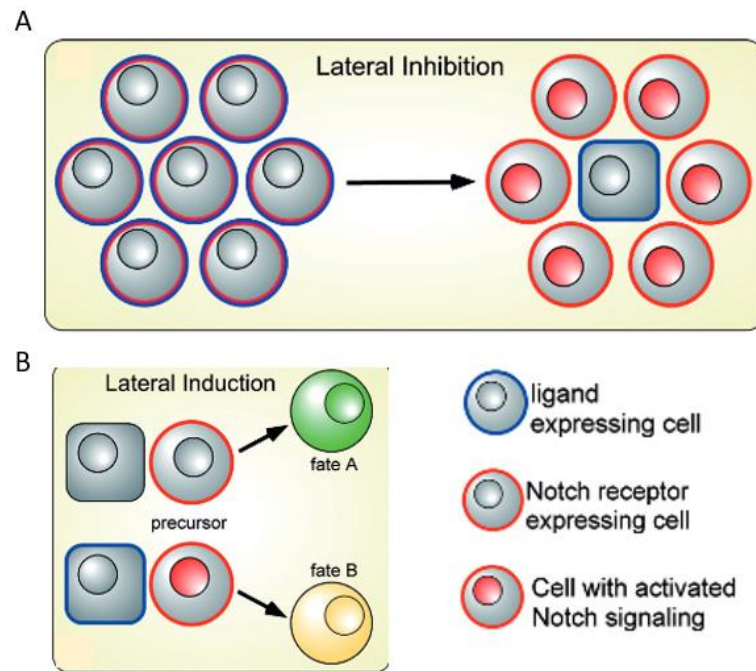


Figura 1.5- Mecanismos de ação de Notch-Delta na diferenciação celular. A- Mecanismo de inibição lateral- Dentro de um grupo de células do mesmo tipo quando uma única célula começa a se diferenciar, o ligando ativa a via de sinalização Notch nas células vizinhas, inibindo assim a diferenciação as restantes células precursoras. B- Mecanismo de indução lateral- uma célula precursora é induzida a um destino específico. (Adaptado de Borggreve & Oswald, 2009).

A sinalização Notch também tem papel importante durante a somitogênese dos vertebrados. A expressão dos genes cíclicos alvo da via Notch e ativação do recetor Notch sugerem que as células PSM sinalizam umas para as outras a cada ciclo do relógio (Maroto *et al.*, 2005). Vários estudos sugerem que a sinalização Notch regula a expressão genética de oscilação síncrona na PSM e acredita-se que essa sincronização seja alcançada através da interação direta entre a via de sinalização Notch-Delta e o loop de *feedback* negativo da família *hes / her* (Naganathan & Oates, 2020). Esta interação ocorre quando o domínio intracelular de Notch ativa a expressão de *hes / her* que por sua vez, reprime a transcrição do ligando delta (Figura 1.6).

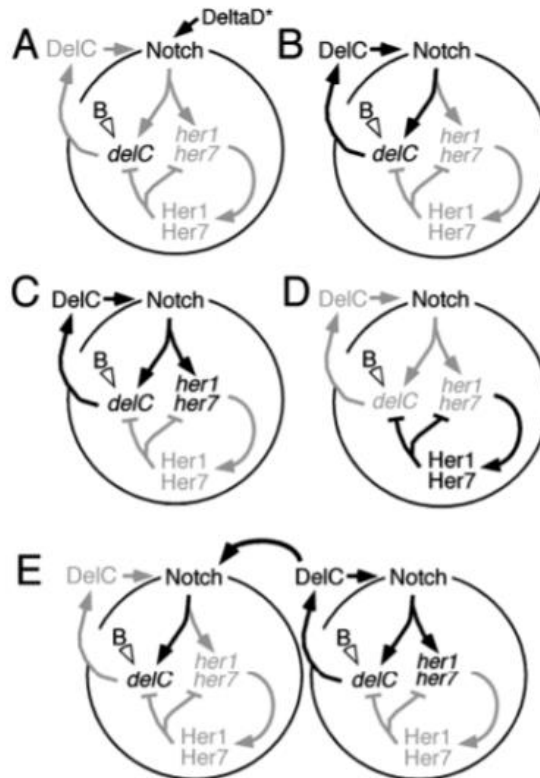


Figura 1.6- Modelo de interações moleculares entre o oscilador HER e a via Notch-Delta. A ponta de seta aberta 'B' representa o nível basal de estímulo para o gene *dlc* em todo o PSM na ausência de atividade do oscilador. O recetor Notch é expresso de forma ubíqua na PSM. A- Expressão *dlc* basal (asterisco indica papel de DeltaD que é limitado ao botão caudal). B- Tradução de mRNA *dlc* para proteína DeltaC e ativação da sinalização Notch. C- Ativação da expressão dos genes *her1* e *her7*. D- Tradução do mRNA dos genes *her1* e *her7* para as proteínas HER1 e Her7 que reprimem a expressão dos próprios *her1*, *her7* e *dlc*. O ciclo retorna para A e se repete. E- Função intercelular: a célula à direita no estágio C (de cima) ativa a sinalização Notch em uma célula vizinha (à esquerda) que foi anteriormente retardada em relação à célula direita e avança a fase do estágio A em B, fornecendo DeltaC exógeno (Oates & Ho. 2002).

A principal função do acoplamento das células da PSM é prevenir a sua dessincronização e a subsequente perda de um padrão segmentar coerente (Oates *et al.*, 2012). Foi demonstrado no peixe-zebra, que uma mutação na via Notch dessincroniza a expressão genética oscilante e essa dessincronização pode levar a uma perda da segmentação coordenada dos sómitos (Holley *et al.*, 2000 ; Jiang *et al.*, 2000 ; Delaune *et al.*, 2012). Experiências em peixes-zebra, demonstraram que as mutações em genes que codificam para ligandos de superfície celular da família *delta*, em recetores transmembranares da família *notch* ou ainda em componentes da via de transdução de sinal do recetor Notch resultam em somitogênese aberrante (Jülich *et al.*, 2005). Esses defeitos são observáveis como sómitos de formato irregular com limites

assimétricos bilateralmente e uma perda de polaridade rostro-caudal dentro de cada sómito. A perda de função de *deltaD* (*dld*) no mutante *after eight* (*aei*), no peixe-zebra, também leva à interrupção da expressão genética cíclica (Oates & Ho, 2002). A mudança de limites de sómitos normais para limites de sómitos interrompidos é nítida ao longo do eixo ântero-posterior no mutante. Subjacente a este fenótipo morfológico, o padrão da expressão genética na PSM perde lentamente sua coerência, tornando-se em um padrão de 'sal e pimenta' (Jiang *et al.*, 2000; Oates & Ho, 2002). Juntos, esses dados sugerem que a sinalização Notch-Delta é um mecanismo de acoplamento que mantém as oscilações das células PSM sincronizadas localmente.

1.2.3 Mecanismo de feedback negativo

Uma questão muito discutida é como as oscilações de expressão dos genes do relógio molecular ocorrem. Experiências em peixe-zebra com morfólino direcionados aos genes *her1* e *her7* levaram a uma diminuição da sua expressão na PSM e revelaram que eles regulam negativamente sua própria expressão e a expressão uns dos outros (Holley *et al.*, 2000; Oates & Ho, 2002). Com base nesse conhecimento foi proposto um modelo (Lewis 2003) em que os genes *her1* e *her7* oscilam como resultado de um *loop* de feedback negativo no qual as proteínas Her1 / Her7 atuam nos promotores *her1* / *her7* para inibir sua própria transcrição (Figura 1.7). Quando o gene é transcrito o mRNA é transportado do núcleo para citoplasma onde é traduzido em proteína. As proteínas são transportadas do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a dimerização para formar um repressor transcricional. Este repressor liga-se ao promotor do gene para inibir a expressão do próprio gene. Quando os produtos genéticos (mRNA, proteína) decaem, a repressão genética é libertada e o ciclo pode começar novamente (Oates *et al.*, 2012).

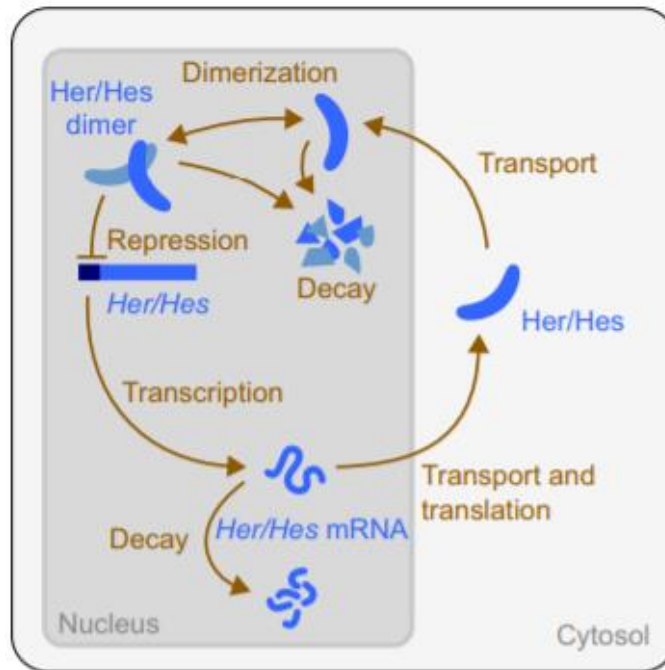


Figura 1.7- Esquema da oscilação de expressão genética com um loop de feedback negativo. O gene *Her/Hes* é transcrito o mRNA é transportado para o citoplasma e traduzido. As proteínas são transportadas para o núcleo, dimerizam para formar um repressor transcricional. Este repressor liga-se ao promotor do gene e inibe a sua própria expressão. Quando o mRNA e proteína decaem o ciclo recomeça (Oates et al., 2012).

O processo de decaimento do mRNA é um evento chave na manutenção da estabilidade das oscilações da expressão genética do relógio (Chen & Shyu, 2011). Tanto no núcleo quanto no citoplasma atuam múltiplos fatores de controle do decaimento do mRNA que monitorizam os transcritos recentemente sintetizados, ou até o mRNA em tradução para garantir propriedades essenciais para o funcionamento, incluindo integridade estrutural dos produtos genéticos (Ghosh & Jacobson, 2010). O decaimento do mRNA inicia-se através da deadenilação por deadenilases específicas em que ocorre o encurtamento gradual da cauda poli (A) ou também através da clivagem por endonucleases para manter a homeostase celular (Schmid., et al., 2008). Após a deadenilação, uma via alternativa pode degradar o mRNA. O exossoma, que é um grande complexo de multissubunidades que atua no núcleo e no citoplasma, pode mediar o decaimento do mRNA através da sua atividade exonucleolítica retirando nucleotídeos que foram incorporados de forma incorreta (Ghosh, & Jacobson, 2010).

Os elementos ricos em AU (AREs) são regiões da sequência do mRNA ricas em adenina (A) e uracil (U) que também atuam controlando o decaimento do mRNA. Alguns mRNA contendo elementos de ligação ricos em AU tendem a desestabilizar transcritos por ação das proteínas desestabilizadoras que se ligam essas sequências e estimulam a remoção da cauda poli-A (Schoenberg & Maquat, 2012). Juntos, os mecanismos de decaimento do mRNA são determinantes importantes da expressão genética e desempenham papéis importantes na manutenção da precisão temporal das oscilações do relógio (Ghosh, & Jacobson, 2010).

1.3 Importância da região 3'UTR na regulação do relógio molecular

O mRNA é uma molécula com sua própria estrutura responsável pela transferência de informações contidas no DNA até as células de modo a exercerem as suas funções (Faure *et al.*, 2016). Esta molécula é composta por regiões codificantes que são traduzidas em proteínas e também por regiões não traduzidas (UTR – *untranslated region*), 5'UTR e 3'UTR. O controle da tradução é efetuado pela interação de diversos fatores reguladores, podendo ser ativadores ou repressores da tradução (Kuersten & Goodwin, 2003).

A região 3'UTR geralmente contém vários elementos reguladores que governam a expressão espacial e temporal de um mRNA. Além disso, vários reguladores da tradução são altamente conservados e parecem controlar muitos mRNAs diferentes (Kuersten & Goodwin 2003). À região 3'UTR do mRNA têm sido atribuídos vários papéis importantes durante a expressão genética como a localização do mRNA, uma vez que essa região pode abranger sequências que permitem: i) que o transcrito seja localizado em regiões específicas da célula para efetuar a tradução; ii) a instabilidade do mRNA, devido a uma afinidade com diversas enzimas que degradam mRNA e por proteínas que podem promover ou inibir a degradação do RNA, e; iii) a eficiência da tradução porque as proteínas que se ligam a essa região irão influenciar a capacidade do ribossoma se ligar ao mRNA (Misquitta *et al.*, 2001).

A região 3'UTR também regula a expressão genética através da ligação de proteínas de ligação a RNA (RBPs). RBPs ligam-se a elementos de 3'UTR e executam as funções 3'UTR por meio do recrutamento de proteínas efetoras. Como os RBPs interagem com diversas proteínas efetoras, cada elemento regulador 3'UTR tem o potencial de realizar várias funções diferentes,

dependendo do tipo de célula ou estado celular. Assim, as consequências biológicas mediadas por 3'UTRs dependem das funções das proteínas efetoras. Por exemplo, a desestabilização do mRNA é alcançada através de RBPs que recrutam deadenilases, enquanto a repressão translacional é realizada por RBPs que recrutam enzimas de remoção da estrutura CAP (capping) que protege o mRNA da degradação (Mayr, 2017).

Os miRNAs são uma família de pequenos RNAs não codificantes, aproximadamente 21 nucleótidos de comprimento que regulam a expressão genética de uma maneira específica de sequência (Vohradsky *et al.*, 2010). Há várias evidências experimentais de que os microRNAs (miRNAs) mostram diversos padrões de expressão e regulam uma ampla gama de processos biológicos como apoptose, metabolismo, desenvolvimento e proliferação celular (Xie *et al.*, 2007). Os miRNAs atuam ligando-se à região 3' não traduzida (3'UTR) de um mRNA, afetando a estabilidade e a tradução do mRNA alvo (Vohradsky *et al.*, 2010). Foi demonstrado que o miRNA pode ligar-se ao mRNA para formar um complexo de silenciamento resultando em repressão translacional (Xie *et al.*, 2007). Estudos recentes também sugeriram que, além de reprimir a tradução, os miRNAs também atuam como reguladores negativos que causam uma diminuição na concentração de mRNAs alvo através do encurtamento da cauda poli A (Guo *et al.*, 2010). Outros estudos revelaram que os miRNAs são usados de forma ubíqua para regular a degradação do mRNA durante o desenvolvimento embrionário e que a maioria dos miRNAs são expressos de maneira altamente específica para o tecido durante a segmentação (Xie *et al.*, 2007).

Lunatic fringe (*Lfng*) é um dos genes cíclicos envolvidos na segmentação do somito em ratinhos. A transcrição de *Lfng* é ativado pela via Notch e a sua expressão oscila de forma sincronizada no PSM posterior com um ciclo de 2 hora (Nitanda *et al.*, 2014). A região 3'UTR do *Lfng* é evolutivamente conservado e pode regular o tempo de meia-vida do RNA (Riley *et al.*, 2013). Uma possível forma de ocorrer essa regulação pode ser através de miRNAs direcionando a repressão pós-transcricional de genes codificadores das proteínas, promovendo o turnover de RNA e / ou diminuindo a eficiência da tradução dos seus transcritos alvos (Riley *et al.*, 2013). Riley e colaboradores identificaram um miRNA (*mir-125a-5p*) que é enriquecido na PSM e tem como alvo sequências conservadas filogeneticamente na região 3' UTR do *Lfng* de embriões de galinha e ratinhos. Inibindo a função *mir-125a-5p* ou prevenindo interações entre *mir-125a-5p* e transcritos endógenos de *Lfng* a somitogênese é

perturbada e a função do relógio na PSM de embriões de galinha em desenvolvimento é interrompida (Riley *et al.*, 2013). Esses dados apoiam a hipótese de que a regulação de genes oscilatórios por miRNAs pode fornecer um mecanismo para o controle pós-transcricional do relógio de segmentação.

O *miR-9* é um miRNA altamente conservado, expresso predominantemente no sistema nervoso central (SNC) do embrião em desenvolvimento (Bonev *et al.*, 2012). Bonev e colaboradores investigaram se o *miR-9* tem um papel no controle da estabilidade do mRNA de *hes1* e se tem um papel importante na oscilação de Hes1 através da utilização de um repórter incorporado a região 3'UTR de *Hes1* (lucHes1 3'UTR WT) ou carregando uma mutação na região complementar de *miR-9* (lucHes1 3'UTR Mut) (Bonev *et al.*, 2012). Neste trabalho demonstraram que o *miR-9* regula a expressão do mRNA de *hes1* diretamente, promovendo sua degradação, e que tanto a super-expressão de *miR-9* quanto a falta de miR-9 diminui as oscilações de *Hes1*, ou seja, que a regulação do *miR-9* é importante para permitir o padrão de expressão oscilatório de *Hes1*.

Gallagher e colaboradores (Gallagher *et al.*, 2017) demonstraram que *Pnrc2* é necessário para uma rápida degradação de transcritos cíclicos durante a segmentação de vertebrados. *Pnrc2* foi descrito como uma proteína adaptadora da maquinaria de decaimento de mRNA que promove a decaimento do mRNA contendo um codão de terminação prematuro (PTC). Demonstraram ainda que a região 3'UTR do *her1* confere instabilidade do mRNA dependente de *Pnrc2*.

Para identificar características do 3'UTR de *her1* que são críticas para o decaimento mediado por *Pnrc2*, Gallagher e colaboradores (Gallagher *et al.*, 2020) desenvolveram uma série de linhas de peixe-zebra transgênicos contendo repórteres indutíveis que transportam diferentes regiões do 3'UTR. Descobriram que os 179 nucleotídeos (nts) terminais do 3'UTR de *her1* são necessários e suficientes para conferir instabilidade rápida. Além disso, mostraram que o 3'UTR de outro gene cíclico, *deltaC* (*dlc*), também confere instabilidade dependente de *Pnrc2*. Fizeram uma análise do motivo de ligação e revelaram que o 3'UTR tanto de *her1* quanto do *deltaC* contém elementos de ligação Pumilio (PREs) e elementos ricos em AU (AREs) localizados no terminal da região 3'UTR. A mutação do motivo PRE ou ARE interrompe parcialmente o efeito desestabilizador do *her1* 3'UTR num mRNA repórter, e a mutação do

PRE e ARE interrompe gravemente o efeito desestabilizador, sugerindo que o PRE e ARE contribuem para a rápida renovação dos transcritos.

1.4 O peixe-zebra como modelo experimental no estudo do relógio molecular

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um vertebrado que pertence à família Cyprinidae (Reed *et al.*, 2011) (Figura 1.8). Apresenta um corpo fusiforme, cabeça relativamente curta e boca direcionada para cima, sendo que o seu comprimento corporal (medido desde a boca até à última vertebra do peixe) aproximadamente 3cm (Wixon, 2000). Em ambiente laboratorial pode sobreviver entre 4 a 5 anos (Schilling, 2002; Spence *et al.*, 2008). O nome comum atribuído a esta espécie é devido à coloração que apresenta, com 5 riscas longitudinais azuis-escuros e prateadas que se estendem até à barbatana caudal. A coloração do peixe-zebra pode ser alterada como estratégia de camuflagem para evitar predação ou em situações de stress (Schilling, 2002; Spence *et al.*, 2008).



Figura 1.8- Imagem representativa de peixe-zebra adulto. A- Peixe-zebra macho adulto mais alongado e na idade reprodutiva apresenta barbatana anal mais amarelada. B- Peixe-zebra fêmea apresenta um corpo mais arredondado devido ao desenvolvimento de óvulos no ovário (Imagem criada em BioRender.com.).

Na maturidade sexual, o dimorfismo sexual desta espécie é facilmente visível sendo que os machos apresentam uma barbatana anal maior e mais amarelada (Figura 1.8-A), e são mais alongados em comparação com as fêmeas. No período de reprodução, a diferenciação sexual entre machos e fêmeas torna-se mais evidente pois a fêmea apresenta um corpo mais arredondado (têm abdômen mais cheio devido ao desenvolvimento de óvulos nos ovários) (Figura 1.8-B) (Reed *et al.*, 2011).

O peixe-zebra tem um ciclo de vida curto, atingindo a maturidade sexual por volta de 3-6 meses e geralmente produz um elevado número de ovos. O padrão de atividade circadiano do peixe-zebra é idêntico ao dos mamíferos, eles estão ativos durante o dia (relacionado à reprodução e alimentação) e descansam à noite (Reed *et al.*, 2011). Quando o peixe-zebra atinge a maturidade sexual e reúne as condições necessárias para reprodução, podem realizar desova diária (Lawrence, 2007). A desova nesta espécie tende a suceder nas primeiras horas de luz. As fêmeas desta espécie podem pôr centenas de ovos numa única desova, e os ovos são libertados diretamente no fundo do tanque, ocorrendo posteriormente a fertilização pelo macho (Spence *et al.*, 2008). Esta espécie apresenta uma maturação rápida, sendo assim, pode originar milhares de descendentes geneticamente semelhantes.

Para definir um padrão do desenvolvimento do peixe-zebra foram estabelecidas fases do desenvolvimento em que é possível identificar diferentes características morfológicas (Kimmel *et al.*, 1995). De acordo com as características que o embrião de peixe-zebra apresenta estes foram divididos em 7 fases principais do desenvolvimento.

A primeira fase é a fase do zigoto (Figura 1.9-A) que compreende o período entre a fertilização do ovulo pela manhã e a primeira divisão celular que demora cerca de 40 minutos á temperatura de 28.5° C (Kimmel *et al.*, 1995). A fase de Clivagem (Figura 1.9-B) é caracterizada por divisão da célula inicial gerando novas células e começa com o estágio de 2 células até ao estágio de 64 células com uma duração de 95 minutos. Após a primeira divisão, as células dividem-se em intervalos de cerca de 15 minutos. As seis divisões que compõem este período frequentemente ocorrem em orientações regulares de forma síncrona (Kimmel *et al.*, 1995). Posteriormente os planos de divisão passam a ser irregulares e assíncronos o que dá início à fase seguinte que é a Blástula (Figura 1.9-C). Nesta fase as divisões celulares irregulares levam à formação de um blastodisco (pequena camada de células presente na superfície da gema do

embrião). Esta fase refere ao período em que o blastodisco começa no estágio de 128 células, e procede até o momento do início da epibolia (Kimmel *et al.*, 1995). As células do blastodisco organizam-se e separam-se do saco vitelino e começam a formar a camada vitelina sincicial (do inglês *Yolk Syncytial Layer-YSL*) que desempenha um papel importante na difusão dos nutrientes desde o vitelo (Kimmel *et al.*, 1995). O início da epibolia é marcado pelo estreitamento e alongamento tanto da YSL como do blastodisco, de modo a englobarem as células vitelinas e continua durante o período de gastrulação que é a próxima fase.

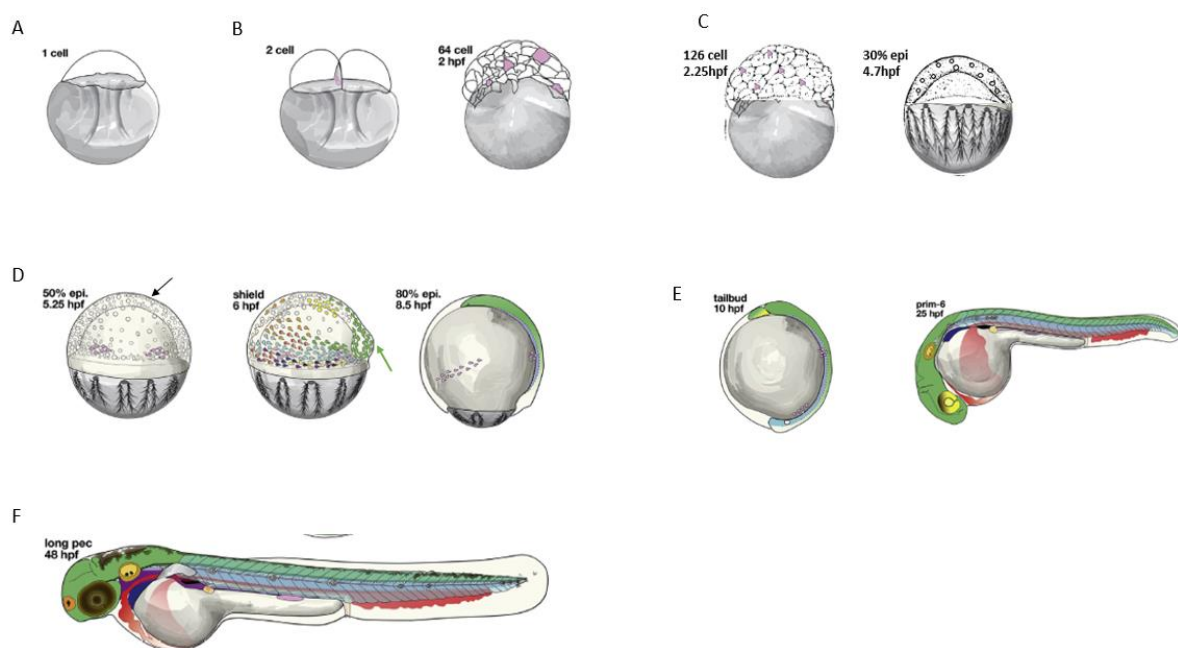


Figura 1.9- Fases de desenvolvimento do embrião de peixe-zebra. A- Zigoto antes de ocorrer a primeira divisão celular. B- Fase da clivagem onde ocorrem várias divisões celulares rápidas e síncronas. C- Fase da blástula onde ocorrem divisões assíncronas e começa a epibolia. D- Fase da gástrula ocorre movimentos morfológicos formando as 3 camadas germinativas. E- Fase da segmentação ocorre formação dos sómitos e a cauda já é visível. F- Fase larval em que o embrião apresenta todas as características básicas do desenvolvimento (adaptado de Kimmel *et al.*, 1995; Barresi, 2020).

O período de gastrulação (Figura 1.9-D) começa em 50% de epibolia e este movimento de extensão continua até produzir as 3 camadas germinativas e o eixo embrionário (Kimmel *et al.*, 1995). As camadas germinativas são a ectoderme - camada mais superficial que formará o tegumento adulto e o sistema nervoso -, a endoderme - uma camada mais profunda que

formará o futuro revestimento do intestino -, e por fim a mesoderme, que é a camada que fica entre ectoderme e endoderme e formará a camada intermediária do plano do corpo adulto (Keller, 2005). Após atingir 50% de epibolia, aparece o anel germinativo (Figura 1.9-D seta preta) uma região marginal espessada ao redor da borda da blastoderme (camada de células germinativas) que muito rapidamente produz no local uma acumulação de células com uma estrutura organizada ao longo do anel germinativo que é denominada de escudo embrionário (representada pela seta verde). No final da gastrulação com 90% epibolia é possível diferenciar que parte do anel germinativo vai dar origem à região da cabeça e a cauda do embrião.

A fase da segmentação (Figura 1.9-E) começa 10 horas pós fertilização. Nesta fase os sómitos começam a formar, aparecem os órgãos primários e o embrião alonga (Kimmel *et al.*, 1995). As primeiras células começam a diferenciar morfológicamente e surgem os primeiros movimentos corporais. Esta fase também é caracterizada pela presença de uma extremidade posterior denominada de *tail bud* formada por tecido mesodérmico que ainda não se organizou para formar os sómitos (Kimmel *et al.*, 1995). Conforme a cauda se estende, o comprimento total do corpo do embrião aumenta muito rapidamente. À medida que a cauda se alonga, ela endireita-se rapidamente, mas, o endireitamento da cabeça ocorre mais tarde, durante o próximo período de desenvolvimento. O fim da segmentação é demarcado 24 horas pós-fertilização e inicia-se a fase da faríngula.

Na fase da faríngula (Figura 1.9-F) os embriões de peixe-zebra já possuem as características básicas, os sómitos bem definidos que se estendem da extremidade anterior até a posterior (Kimmel *et al.*, 1995). Ainda nesta fase começa o desenvolvimento das barbatanas peitorais, o corpo torna-se pigmentado e também o coração e o sistema circulatório. A partir daí os embriões saem do córion e iniciam a natação e nesta altura já se encontram com a maioria dos órgãos formados (Fase da Eclosão). E por último temos a fase larvar em que o peixe já tem 72 horas pós fertilização, o corpo desenvolve, a abertura da boca é mais evidente, inicia a alimentação, e adquire maior mobilidade por isso nadam de forma mais ativa.

O peixe-zebra tem vindo a adquirir destaque em diferentes áreas de investigação, nomeadamente na biologia do desenvolvimento, tornando-se num dos organismos modelo mais utilizados devido às características favoráveis que apresenta em relação a galinhas ou

ratinhos. Os peixes podem ser mantidos em espaços relativamente pequenos, com uma manutenção fácil e de baixo custo, o que não acontece com os animais modelo de maiores dimensões (Guyon *et al.*, 2007; Lele & Krone, 1996). Mas por outro lado o trabalho prático com este organismo modelo torna indispensável a instalação de um biotério com condições para garantir o bem-estar animal, reprodução com sucesso e ensaios experimentais fiáveis. Habitualmente, a manutenção do peixe-zebra no tanque é efetuada através de sistemas aquáticos de recirculação que ajuda a filtrar o excesso de comida e excrementos para garantir a qualidade da água (Avdesh *et al.*, 2012). A temperatura do tanque é geralmente mantida entre 26-28,5 ° C e as condições de iluminação são 14:10 h (claro: escuro) (Avdesh *et al.*, 2012).

Além das características mencionadas acima, esta espécie apresenta também uma elevada taxa de reprodução durante todo o ano o que permite que os utilizadores obtenham um grande número de embriões para trabalho experimental, sem qualquer limitação sazonal. As fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias e uma única desova podem conter várias centenas de ovos (Lele & Krone, 1996; Guyon *et al.*, 2007; Lopez-Olmeda & Sanchez-Vazquez, 2011). A fertilização é externa, o que faz com que os embriões vivos permitam o estudo das influências ambientais sobre o seu desenvolvimento, e também torna o embrião acessível durante todas as fases do seu desenvolvimento (Lopez-Olmeda & Sanchez-Vazquez, 2011).

Pelo fato dos embriões serem transparentes e a existência de inúmera tecnologia de manipulação genética permite a produção eficiente de animais transgênicos no laboratório através de microinjeção através do qual pode ser observado as alterações morfológicas mesmo em camadas mais internas do corpo e também realizar filmagens *in vivo* para compreender eventos em tempo real (Gilbert, 2019). O rápido desenvolvimento do peixe-zebra também é uma vantagem deste modelo. Após 24hpf o embrião já formou os primórdios da maior parte dos órgãos. O peixe-zebra é um vertebrado que partilha imensas características estruturais e fisiológicas com os seres humanos. Os ortólogos da maioria dos genes humanos podem ser encontrados no peixe-zebra (Figura 1.10) e mostram padrões de expressão e funcionalidade bastante semelhante (Guyon *et al.*, 2007). Isto faz com o peixe-zebra seja útil para realizar ensaios para caracterização da função de alguns genes relevantes no desenvolvimento humana, a malformações e situações de doença. Identificar os genes implicados numa doença é o primeiro passo para compreender a biologia da anomalia e projetar uma intervenção terapêutica bem-sucedida. Os modelos animais, portanto,

contribuem amplamente para a compreensão dos mecanismos de doenças e desenvolvimento de terapias (Van Heyningen, 1997).

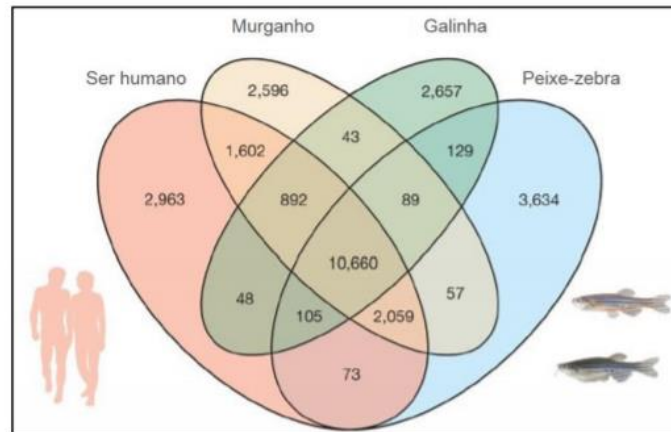


Figura 1.10- Genes ortólogos que o ser humano partilha com outras espécies. Cerca de 73 genes humanos são partilhados exclusivamente com o peixe-zebra (Howe *et al.*, 2013).

O modelo do peixe-zebra permite a utilização de técnicas extremamente úteis, como por exemplo Crispr/Cas9, para abordar questões relacionadas com a função dos genes. A vantagem de utilizar o Crispr/Cas9 no peixe-zebra é a capacidade e simplicidade de gerar diversos modelos de mutantes permitindo a geração de novos modelos de estudo ampliando assim a pesquisa biológica (Hsu *et al.*, 2014).

É de salientar que, mesmo apresentando as vantagens acima mencionadas, este modelo é ainda assim bastante distinto da espécie humana. Nomeadamente, o peixe-zebra apresenta diferenças anatómicas importantes, tais como a ausência de pulmões, de tecido mamário, da próstata, e das articulações sinoviais. Estes aspetos são muito importantes e por isso devem ser considerados antes de começar um ensaio experimental usando este modelo.

1.5 Objetivos do trabalho

Trabalhos feitos anteriormente no laboratório com o objetivo de compreender a relevância da região 3'UTR do mRNA para as oscilações de expressão genética do relógio, levaram à utilização do sistema CrispR/Cas9 para a obtenção de peixes-zebra contendo deleções de diferentes porções da região 3'UTR do gene *deltaC*. Experiências preliminares de hibridização *in situ* em embriões da geração F2 mostraram que alguns embriões com 16 horas pós-fertilização apresentavam uma estabilização do mRNA na PSM.

No seguimento destes resultados, os principais objetivos deste trabalho foram os seguintes:

1. Obtenção de linhas de peixes homozigóticos contendo cada uma das deleções;
2. Caracterização do impacto das deleções na expressão dos genes do relógio molecular;
3. Caracterização do impacto das deleções na segmentação do corpo do embrião.

2. Materiais e Métodos

2.1 Linhas transgênicas de peixe-zebra mutantes

No início deste trabalho foi usado peixes da geração F1 em que a região 3'UTR do *deltaC* foi alterada em diferentes regiões utilizando o sistema Crispr/cas9 (Figura 2.1). Tinha peixes em que a segunda porção da região 3'UTR foi alterada (RR2), peixes em que a terceira porção foi alterada (RR3) e peixes em que a segunda e terceira porção foram deletadas (RR2+RR3).

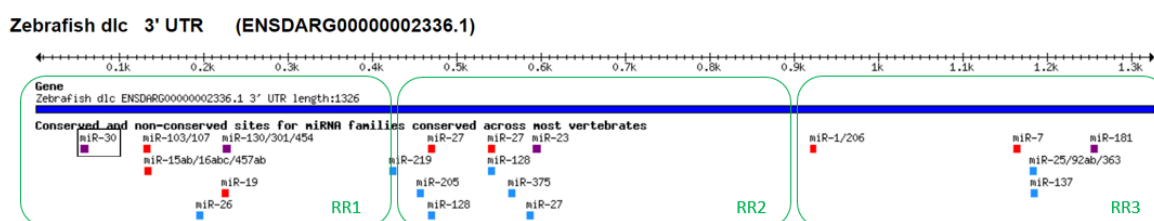


Figura 2.1- Região 3'UTR do gene *deltaC* no peixe-zebra. Para geração de linhas mutantes a região 3'UTR do gene *deltaC* foi repartida em 3 regiões diferentes. Cada retângulo representa uma região regulatória de 3'UTR.

2.2 Manutenção do peixe-zebra

O peixe-zebra foi criado a uma temperatura de 28,5 ° C e mantido sob um ciclo de luz de 14 horas e escuro de 10 horas. Os tanques foram limpos diariamente e os animais alimentados 2 vezes ao dia, com uma dieta que variou entre artémia e ração seca comercial, garantindo uma boa nutrição que é um aspecto fundamental na manutenção desta espécie e também muito importante para sua reprodução, crescimento e desenvolvimento.

2.3 Extração de DNA genômico a partir de um corte de cauda de peixe-zebra adulto

Os peixes adultos foram levemente anestesiados com fenoxietanol (100 mg/L) e foi excisado a região mais posterior da cauda após o pedúnculo caudal. O recobro dos peixes foi efetuado em água do sistema sem anestésico e saturada com ar. Para extração do DNA genômico, o tecido cortado foi colocado em 200µl de "genome extration buffer" (Tris 10mM pH8.2; NaCl 200mM; SDS 0,5%; EDTA 50mM), contendo 200ng/ml de proteinase K e seguidamente as amostras foram incubadas a 50° C durante a noite. No dia seguinte adicionou-se 400 µl de

etanol 100%, misturou-se por inversão e incubou-se no gelo por 30 minutos. Seguidamente as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm (rotação por minuto) a 4° C. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 800 µl de etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos a 14000 rpm a 4° C, retirou-se o sobrenadante e deixou-se o precipitado secar num banho seco a 37 ° C. Após totalmente secas, as amostras foram diluídas em 80 µl de TE (Tris-base 1M pH8 e EDTA 0,5M pH8), incubadas por 5 minutos a 37 ° C e guardadas no frigorífico a 4 ° C.

2.4 Genotipagem por reação de “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR)

PCR é uma técnica laboratorial que permite gerar cópias de uma região específica do DNA. esta reação é repetida ciclicamente através de uma série de temperaturas, o que possibilita a produção exponencial de cópias da região de interesse. Para esta reação de pcr foi desenhado um par de primers que amplifica toda a região 3’UTR do gene *deltaC* um primer amplifica no sentido direto e outro no sentido inverso. Neste trabalho foi feito a genotipagem dos peixes que eram portadores de uma deleção da região 3’UTR do gene *deltaC*. O objetivo foi determinar diferenças na somitogénese em embriões mutantes em comparação com embriões “Wild Type” (WT).

Para se proceder á genotipagem por PCR, retirou-se as amostras do frigorífico a 4°C, aqueceu-se no banho seco por 10 minutos a 95°C, incubou-se no gelo por 5 minutos e a reação de PCR foi preparada (Tabelas 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1- Reagentes e concentração final dos mesmos utilizada para a reação de PCR.

Componentes	Concentração Final
10X PCR buffer	1X
Forward primer	2 uM
Reverse primer	2 uM
dNTPs	2 mM
Taq DNA polymerase	0,06 U/ml
Amostra (1 µl)	(1 µl)
H ₂ O	-

Tabela 2.2- Lista dos primers utilizados para realizar PCR

Primers	Sentido	Sequência (5' -> 3')	Tamanho (pares bases)
P2	Forward	CAGACCCATTTTCCATCCTCTTAAT	25
	Reverse	GTTCAAGTAATCCTCAGTTTCTGTT	25
P3	Forward	CAGGTTCTCTCTGGAACAGTTGATGTC	27
	Reverse	CTGGAGCACCTCAAACACCAAGTGG	24

Foi planeado o número e conteúdo das reações de PCR (volume final 10 μ L) a realizar incluindo os controlos negativos. Preparou-se uma *MasterMix* (mistura única dos reagentes comuns a todas as reações- Tabela 2.1) num *ependorf* de 1,5ml. Essa *MasterMix* foi preparada com um excesso de 10% relativamente ao número de reações. Adicionou-se 9 μ l de *MasterMix* e 1 μ l de amostra a cada tubo de PCR previamente identificado. No caso do controlo negativo, foi adicionado 9 μ l da mistura e 1 μ l de H₂O. Colocou-se os tubos num aparelho de PCR e faz-se correr o com o seguinte programa de temperaturas definido:

- ❖ 95 °C – 5min
 - ❖ 95 °C – 30seg
 - ❖ 55 °C – 30seg
 - ❖ 72 °C – 2min
 - ❖ 72 °C – 7min
 - ❖ 12°C (∞)
- } 34X

2.5 Eletroforese em Gel de Agarose

A técnica de eletroforese consiste na separação de fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular, graças à sua migração através de uma matriz sólida por aplicação de uma diferença de potencial elétrico. Através da utilização de um marcador de peso molecular é possível estimar o tamanho dos fragmentos amplificados por PCR.

Neste trabalho, a eletroforese foi efetuada num gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato-EDTA 1X (TAE: para 50X adicionar 242g de Tris Base + 57,1 mL Ácido Acético glacial + 18,6 g EDTA em água). A agarose foi dissolvida, por aquecimento no microondas, num volume de TAE de modo a ficar a 1%. Posteriormente foi adicionado 2,5 µl da solução de SafeGreen (Nzytech) no gel, misturado e colocado sobre o molde. O SafeGreen é um agente intercalante, que permite a visualização das bandas dos ácidos nucleicos na presença da radiação ultravioleta. Quando o gel de agarose solidificou retirou-se cuidadosamente os pentes do molde, adicionou-se o gel na tina de eletroforese devidamente orientado de acordo com os polos elétricos e encheu-se a tina com tampão TAE 1X até que o nível do tampão ultrapassasse a superfície do gel.

A cada reação de PCR adicionou-se 2,4 µl do tampão OrangeG 5x (OrangeG 0,2% em glicerol 30%) para aumentar a densidade da amostra permitindo que os ácidos nucleicos permaneçam no poço. Carregou-se num dos poços 4 µl do marcador de pesos moleculares λ-PstI e a mesma quantidade de cada amostra para os restantes poços. A eletroforese ocorreu a 80V por aproximadamente 30 minutos. Os resultados foram visualizados no equipamento de sistema de géis ChemiDoc (GelDoc XR+ Bio – Rad) e a imagem do gel foi guardada.

2.6 Extração e purificação do DNA Plasmídico para preparação de Sonda de RNA Xirp2a

O DNA plasmídico é uma molécula de DNA circular de pequena dimensão, com capacidade de autorreplacação dentro de uma bactéria. Este processo é outra forma de preparar uma sonda e não é necessário recorrer ao processo de PCR. Este plasmídeo tem o promotor de T7 RNA polimerase que permite preparar RNA a partir de um *template* de DNA. Neste caso a cadeia de RNA sintetizada (sonda) é inversa e complementar ao mRNA a identificar. Primeiramente foi feita a transformação das células em que foi adicionado a 100 µl de bactérias competentes (E. coli) no plasmídeo de interesse, misturado por inversão, submetido a um choque térmico (42 °C) por 30 segundos e depois 10 minutos no gelo. Posteriormente foi adicionado 800 µl de meio de cultura SOC (sem antibiótico) a cada tubo (controlo e transformadas) e transferido para as respetivas placas de Petri para incubar a 37°C para o dia seguinte.

Para a purificação do DNA plasmídico contendo a sequência do gene, recorreu-se a utilização de um kit comercial – GeneJET Plasmid miniprep Kit (ThermoScientific). Dando seguimento ao protocolo do Kit centrifugou-se as células transformadas com o plasmídeo, o sobrenadante foi descartado e de seguida ressuspendeu-se o *pellet* com uma solução de ressuspensão do Kit. Posteriormente adicionou-se solução de lise, misturou-se por inversão, adicionou-se a solução de neutralização, misturou-se por inversão e centrifugou-se para separar os resíduos resultantes da lise celular. O lisado foi adicionado á coluna de purificação e lavado com solução de lavagem. Depois destes processos o DNA plasmídico que ficou retido na coluna foi eluído e armazenado (-20).

Quantificou-se DNA obtido usando o NanoDrop (ThermoScientific). Após a quantificação foi feito a digestão/linearização de 5µg do DNA plasmídico com a enzima de restrição Sall FastDigest (ThermoScientific). Após a mistura, foi incubado a 37°C por 30 minutos, seguido da inativação da enzima no banho seco a 65°C por 10 minutos. Seguidamente, correu-se 2 µl em gel de agarose 1% e analisaram-se os resultados.

2.7 Síntese de sondas de RNA de cadeia complementar

O processo de síntese da sonda visa a produção de moléculas de RNA de sequência complementar ao mRNA endógeno, a partir de uma sequência molde de DNA por reação de transcrição *in vitro*. A sonda é marcada com um *hapten* (Dig) que permite identificar a sonda de RNA através do uso de anticorpos. Este RNA complementar funciona como uma sonda que durante o processo de hibridação *in situ* se liga ao mRNA produzido pelo embrião. Para fazer a síntese da sonda primeiramente foi feito um PCR com os genes de interesse (Tabela 2.3). Neste caso a amostra utilizada foi o 1 µl de DNA complementar (cDNA) e a reação foi feita para um volume final de 20 µl. Após ter o PCR e o plasmídeo linearizado procedeu-se pipetando nesta ordem descrita 2 µl 10x DIG RNA labelling mix (ThermoScientific), 14 µl de produto de PCR ou do vetor linearizado, 2 µl 10x tampão de transcrição, 1 µl de inibidor de RNase (Promega) e 1 µl de T7 RNA polimerase (Nzytech) e incubou-se a 37° C por 2h. Seguidamente foi adicionado 2 µl de DNase (Promega) e 1 µl de inibidor de RNase e incubou-se a 37° C por 30 minutos. Após ter passado esse tempo o RNA foi purificado seguindo o protocolo do Kit Quick-RNA Miniprep (Zymo Research). No final desta reação, uma alíquota

da amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose de forma a detetar se ocorreu produção de RNA. A sonda foi quantificada no Nanodrop e conservada a -80°C até à sua utilização.

Tabela 2.3- Lista dos primers utilizados para realizar síntese das sondas para genes *her7* e *deltaC*. Lista dos primers utilizados para realizar síntese das sondas para genes *her7* e *deltaC*. O elevado número de pares e bases destes primers é devido a adição da polimerase T7 que vai ligar no local específico do promotor para começar a transcrição reversa.

Gene	Sentido	Sequência (5' -> 3')	Tamanho (pares bases)
<i>her 7</i>	<i>Forward</i>	GAGATTAACCCTCACTAAAGGGAACCTCCACCTGCT ACCTAACAGA	46
	<i>Reverse</i>	GAGTAATACGACTCACTATAGGGTCAGTTAAGGCCAAGGTCTCCAAA	47
<i>delta C</i>	<i>Forward</i>	GAGATTAACCCTCACTAAAGGGAGTGGCCGGAATCGTCTCTT	43
	<i>Reverse</i>	GAGTAATACGACTCACTATAGGGGGTCCATCGGCACAGGTCAT	43

2.8 Obtenção, Recolha e Fixação dos embriões

Para a obtenção de embriões de peixe-zebra, machos e fêmeas reprodutores foram separados no dia anterior à reprodução. Para isso, usou-se um aquário que contém uma barreira de plástico removível central que permite a separação dos peixes. No dia seguinte esta barreira foi removida promovendo o contato entre os reprodutores e a consequente fertilização. Seguidamente, os ovos foram recolhidos com o auxílio de uma rede e colocados em placas de Petri contendo meio E3 (para 1L de solução foi utilizado 17,4g de NaCl, 0.8g de KCl, 2.9g de CaCl₂.2H₂O, 4.89g de MgCl₂.6H₂O e H₂O miliQ), e imediatamente incubados numa estufa a 28.5°C durante o tempo recomendado para a obtenção de embriões a diferentes estágios de desenvolvimento.

Após obtenção dos embriões, estes foram descorionados. Em seguida os embriões foram transferidos para um microtubo de 2mL, o meio em excesso removido e adicionado 2 ml de formaldeído a 4% (FA) e fixados durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte lavou-se os embriões

aspirando o FA e adicionando imediatamente 1 ml de PBS (NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) /Tween deixando atuar por 5 minutos em agitação. Essa lavagem foi repetida 3 vezes sob as mesmas condições. Foi removida a solução de lavagem final de PBS/Tween por aspiração e foi adicionado 1 ml de PBS 50%/ Metanol 50% deixando atuar por 5 minutos. O líquido da lavagem foi aspirado e substituído por 2 ml de metanol 100 % e guardado a -20°C .

2.9 Hibridação *in situ*

Esta técnica laboratorial tem como objetivo a detecção da localização do RNA mensageiro (mRNA) através da utilização de uma sonda complementar marcada com Digoxigenina (DIG). Esta técnica foi utilizada para embriões com 11hpf, 14hpf, 18hpf e 32hpf. Este processo iniciou-se procedendo à re-hidratação dos embriões previamente armazenados em 100% MeOH a -20°C e consistiu numa sequência de lavagens com soluções de metanol em PBT (700 μl de 2:1 MeOH:PBST 1x 15 min, 1:2 MeOH:PBST(PBS + 0,1% Tween) 1x 15 min e 100% PBST 3x 5 min) realizados à temperatura ambiente e com agitação. De seguida, procedeu-se à permeabilização dos tecidos com 200 μl de Proteinase K diluída em PBST para atingir uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O tempo de digestão variou consoante o estágio de desenvolvimento em que os embriões se encontravam (Tabela 2.4) e este procedimento foi executado à temperatura ambiente. Depois da digestão, os embriões foram sujeitos a uma lavagem em PBST com a duração de 1 minuto para parar a reação e foram fixados em 500 μl de FA 4% (em PBST) durante 20 minutos com agitação, seguindo-se novamente lavagens com 700 μl de PBST, 4 vezes durante 5 minutos com agitação de forma a retirar o fixador. Após estas lavagens, os embriões foram incubados em 400 μl da solução de hibridação (Hyb) constituída por 50% Formamida, 5x SSC, 0,1% Tween-20, Ácido Cítrico 1M pH=6, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Heparina, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tRNA e completar o volume com H_2O . Esta incubação teve a duração de pelo menos 2 horas e foi realizada à temperatura de 70°C . Seguidamente, esta solução de Hyb foi descartada e substituída por 200 μl de solução de hibridação contendo 1 ng/ μL de sonda de RNA antisense e os embriões foram incubados a 70°C durante a noite.

Tabela 2.4- Tempos de digestão com Proteinase K usado nos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões de peixe-zebra.

Estadio de desenvolvimento	Tempo de digestão com Proteinase K
Blástula ou Gástrula	30 segundos
Somitogénese inicial	1 minuto
Somitogénese tardio (14 a 22 sómitos)	5 minutos
24 horas pós fertilização	15 minutos
36/48 horas pós fertilização	30 minutos

No dia seguinte, procedeu-se à remoção da sonda e foram feitas lavagens com soluções de soluções de SSC (0.2 e 2X) e Hyb (sem heparina e tRNA) aquecidas durante a noite a 70°C (700 µl de 100 % Hyb, 2:1 Hyb:2xSSC 15 min, 1:2 Hyb:2xSSC 15 min, 2x SSC 15 min, 0.2x SSC 2x 30min) de forma a eliminar a sonda que não tenha hibridado com o RNA de interesse. Seguidamente, os embriões foram lavados à temperatura ambiente e com agitação com 700 µl de 2:1 0.2xSSC: PBST durante 10 min, 1:2 0.2xSSC: PBST por 10 min e finalmente com PBST por 10 min. Depois deste procedimento, os embriões foram incubados em 500 µl de solução de bloqueio constituída por 2% de soro de cabra e 2 mg/ml BSA (albumina de soro bovino) diluídos em PBST, entre 1 a 4 horas à temperatura ambiente. Este procedimento visou bloquear possíveis locais de ligação do anticorpo aumentando a sua especificidade para digoxigenina presente nos ácidos nucleicos marcados das sondas de RNA. Após passar este tempo de incubação, a solução de bloqueio foi removida, os embriões foram depois incubados na mesma solução de bloqueio, mas à qual se adicionou o anticorpo anti-DIG-AP (ThermoScientific) diluição de 1:5000 e ficaram a incubar durante a noite a 4 °C com agitação.

No dia seguinte a solução de anticorpo foi removida e foram efetuadas 6 lavagens sucessivas à temperatura ambiente e com agitação com duração de 15 minutos cada em 700 µl PBST. Finalmente, os embriões foram incubados à temperatura ambiente em PBST durante a noite com agitação, com o objetivo a remover o anticorpo em excesso que não se ligou à digoxigenina. De forma a realizar a reação de coloração para detetar o padrão de expressão dos genes, começou por realizar-se 3 lavagens de 5 minutos cada com 500 µl da solução tampão NTMT, constituída por 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, e 0.1%

Tween-20. De seguida, removeu-se esta solução e adicionou-se aos embriões 300 µl solução de coloração com NBT 100mg/ml (Roche) e BCIP 50 mg/ml (Roche) em NTMT. Os embriões foram depois incubados à temperatura ambiente, no escuro e a reação foi controlada por observação à lupa em múltiplos momentos. Quando se considerou que a revelação se completou, removeu-se a solução de coloração e os embriões foram lavados com 1xPBS/50mM EDTA/0.1xTween e guardados a 4 °C. Os embriões foram posteriormente lavados em soluções gradualmente mais concentradas em glicerol (50% glicerol: 50% PBS, 80%glicerol:20% PBS e 100% glicerol) e guardados a 4°C até a altura de proceder às dissecções e montagem sobre lâmina de forma a prosseguir para a aquisição de imagem.

2.10 Aquisição e análise das imagens

Utilizou-se uma lâmina côncava para colocar os embriões, a aquisição e registo de imagens dos embriões resultante do processo de hibridação *in situ* foi utilizada a câmara Zeiss AxioCam 105 color, acoplada a uma lupa Zeiss, modelo Discovery V12 ligados no computador do laboratório. Para contagem dos sómitos foi feita uma *in situ* para o marcador das fronteiras do sómito *xin* actin binding repeat containing 2a (*xirp2a*) e foi utilizado o programa ImageJ em que cada sómito foi marcado individualmente atribuindo um número e depois foram contados. Ainda foi feito a medição do tamanho dos sómitos anteriores (9 a 13) e posteriores (20-24) da parte mais central do limite de um sómito até a parte mais central do limite do sómito seguinte (Figura 2.2) e assim sucessivamente, usando as ferramentas do programa ImageJ (Rueden *et al.*, 2017).

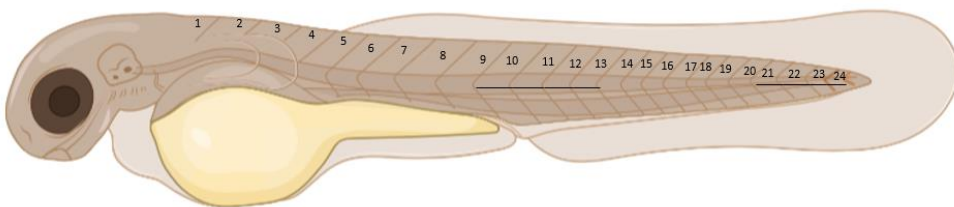


Figura 2.2 - Imagem representativa de um embrião de peixe-zebra ilustrando como foram contados e medidos os comprimentos dos sómitos. Os números representam cada par de sómito marcado e as linhas representam o tamanho de cada sómito medido em micrómetros (Imagem criada em BioRender.com.).

2.11 Análise Estatística

Para analisar se o número de sómitos entre os grupos e se o tamanho dos sómitos de embriões com 32hpf feitas nas mesmas condições são estatisticamente semelhantes ou se são diferentes, foi usado o teste não paramétricos e a comparação múltipla do programa estatístico GraphPad (www.graphpad.com). Para comparação dos embriões da linha RR2 e RR3 com os WT foi utilizado ANOVA (one-way) enquanto que para comparar os resultados dos embriões NICD com os respectivos WT a significância foi calculada pelo teste t de Student e os resultados são significativos para $p < 0.05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Estabelecimento de linhas mutantes homocigóticas na região 3'UTR de *deltaC*

Para avaliar o papel da região 3'UTR do gene *deltaC* (*dlc*) na somitogênese de embriões de peixe-zebra foram utilizadas diferentes linhas mutantes, anteriormente geradas por CRISPR/Cas9, em que a região regulatória 3'UTR do gene *deltaC* foi alterada. A região 3'UTR do gene *deltaC* foi repartida em 3 regiões diferentes e definiu-se as linhas mutantes de acordo com as deleções efetuadas (Figura 2.1). Os peixes doravante designados por RR1 referem-se aos mutantes em que a primeira região do 3'UTR do gene *deltaC* foi deletada, os RR2 referem-se aos mutantes em que a segunda região foi deletada, RR3 refere-se aos mutantes em que a terceira região do 3'UTR do gene *deltaC* foi deletada, RR2+RR3 refere-se aos mutantes em que a segunda e terceira regiões foram deletadas e os RR1+RR2+RR3 referem-se aos mutantes em que foi deletada toda a região 3'UTR do gene *deltaC*.

As linhas utilizadas neste trabalho foram apenas RR2, RR3 e RR2+RR3, isto porque, no caso dos peixes RR1 não foi observado nenhuma alteração nas avaliações preliminares anteriormente feitas, e no caso de RR1+RR2+RR3, quando estas regiões foram removidas os peixes não sobreviveram. Todos os peixes disponíveis para o estudo eram da geração F1, ou seja, resultado do cruzamento entre peixes progenitores machos que foram injetados com Crispr/cas9 dirigido com fêmeas *wild-type* (WT) (Figura 3.1). Os indivíduos da geração F1 resultante podem ou não ser portadores da mutação.

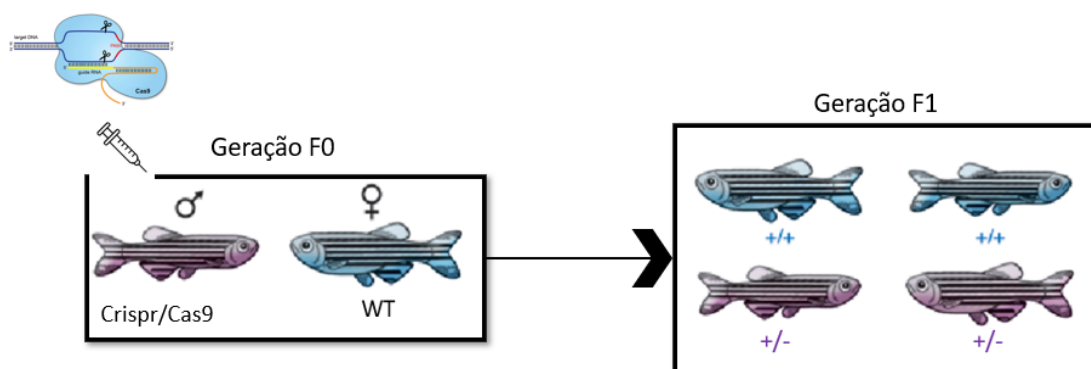


Figura 3.1- Geração F1 de peixes mutantes obtidos por Crispr/Cas9. Os machos adultos foram injetados com Crispr/Cas9 dirigido e depois cruzados com fêmeas do WT para criar uma geração F1 que contém indivíduos com uma mutação no seu genoma (Adaptado de Santoriello & Zon, 2012).

O primeiro objetivo do trabalho desenvolvido foi o estabelecimento de linhas mutantes homocigóticas para posterior avaliação dos efeitos de cada deleção na região 3'UTR de *deltaC* no desenvolvimento do peixe. Primeiramente foi feita a genotipagem dos peixes F1 (Figura 3.2-A) para determinar quais eram portadores heterocigóticos da deleção de interesse para posteriormente cruzar entre eles (Figura 3.2-B) de modo a obter ter peixes mutantes homocigóticos (Figura 3.2-C), permitindo assim estabelecer uma linha mutante homocigótica (Figura 3.2-D).

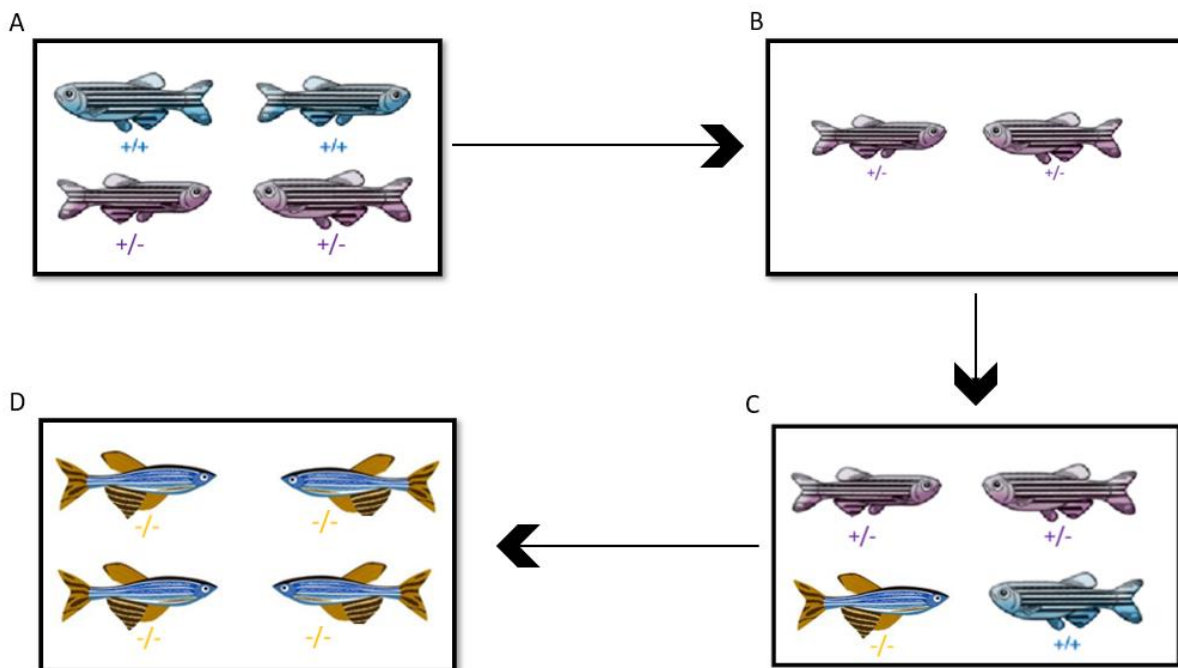


Figura 3.2- Estratégia para a obtenção de peixes mutantes homocigóticos a partir de animais da geração F1. Após a genotipagem dos peixes F1 (A), os peixes heterocigóticos (+/-) portadores da deleção serão cruzados entre si (B) para a obtenção de embriões mutantes homocigóticos (-/-) na geração F2 (C). Posteriormente, estes serão cruzados entre si para se obter uma linha homocigótica pura (D) (Adaptado de Santoriello e Zon 2012).

Para isso, recorreu-se à técnica de genotipagem por PCR utilizando pares de *primers* capazes de amplificar toda a região 3'UTR (Figura 3.3-A). Isto significa que a amplificação realizada com DNA de animais WT dará origem a uma banda com aproximadamente 1300pb, que corresponde ao comprimento total da região 3'UTR do gene *deltaC*. Os portadores homocigóticos das mutações RR2 ou RR3 apresentarão uma única banda por volta de 800pb (Figura 3.3-B, C) e os portadores homocigóticos de mutação RR2+RR3, como não tem as duas porções da região 3'UTR, apresentarão uma banda de 500pb (Figura 3.3-D).

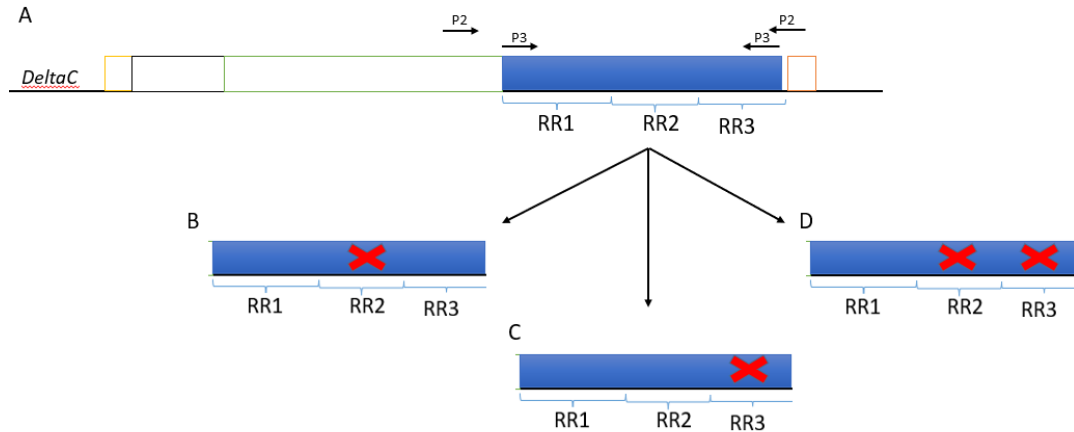


Figura 3.3- Imagem representativa das deleções efetuadas na região 3'UTR do gene *deltaC* do peixe-zebra. A: Região 3'UTR de *deltaC* (caixa azul) incluindo o local genómico que os pares de *primers* utilizados reconhecem (P2 e P3). B: Região 3'UTR com deleção da RR2. C: Região 3'UTR com deleção da RR3. D: Região 3'UTR com deleção das RR2+RR3.

3.1.1 Genotipagem dos peixes mutantes RR2+RR3

Começou-se por aplicar a técnica de genotipagem a 14 animais RR2+RR3 utilizando o par de *primers* P2 e foram obtidas bandas com tamanho por volta de 500pb e/ou 1300pb (Figura 3.4). O tamanho total da região 3'UTR do gene *deltaC* é de aproximadamente 1300pb e como a deleção de cada região é de aproximadamente 400pb logo, uma banda por volta de 500pb indica que os peixes são portadores da deleção.

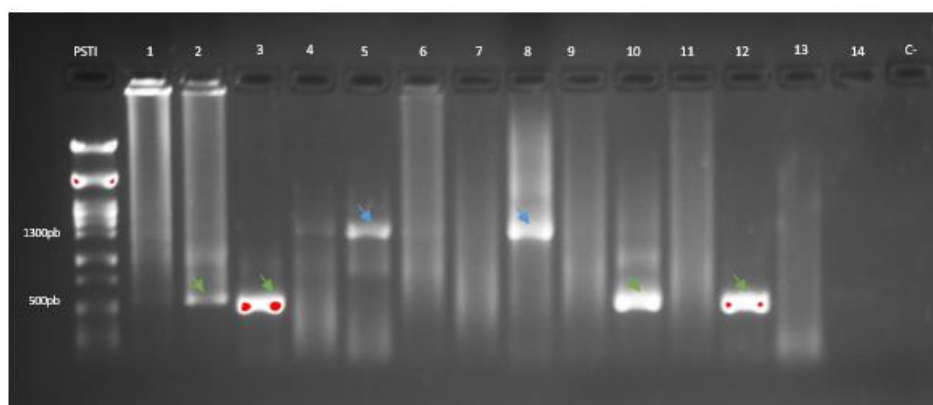


Figura 3.4– Genotipagem dos peixes da geração F1 da deleção RR2+RR3. Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR realizadas com os *primers* P2 em cada um dos peixes mutantes ensaiados (numerados de 1 a 14). λ PstI: marcador de pesos moleculares; C-: controle negativo, sem DNA genómico adicionado; Setas azuis: peixes WT. Setas verdes: peixes homocigóticos.

Continuou-se com a genotipagem de mais peixes da mesma linha (15 a 27), mas deste vez não foi observado nenhuma banda, nem no controlo positivo (WT), e no controlo negativo também apenas se obteve um “arrastão” ao longo do poço (Figura 3.5).

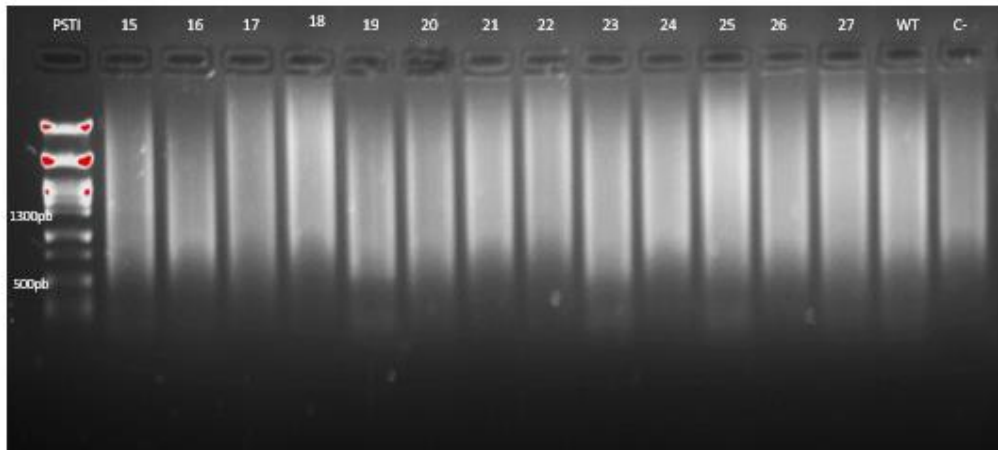


Figura 3.5- Genotipagem dos peixes mutantes *deltaC* RR2+RR3. Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR realizadas com os *primers* P2 em cada um dos peixes mutantes ensaiados (numerados de 15 a 27). λ PstI: marcador de pesos moleculares; WT: animal selvagem, controlo positivo; C-: controlo negativo, sem DNA genómico adicionado.

Foram feitas várias experiências para identificar o problema e otimizar as condições da reação, como por exemplo, utilização de novos reagentes, purificação das amostras com o Kit DNA Clean (Zymo Research) e diminuição do número de ciclos para 25X. Por último, desenhou-se novo par de *primers* (P3) tendo em consideração alguns aspectos importantes como:

- O tamanho em pares e bases (pb 18-24) porque *primers* de tamanho muito curto ou muito longo podem ser inespecíficos (Chuang *et al.*, 2013; Dieffenbach *et al.*, 1993);
- A temperatura de emparelhamento (56 – 62°C), porque temperaturas muito baixas ou muito elevadas podem diminuir a especificidade do processo (Dieffenbach *et al.*, 1993);
- A temperatura de *melting* (T_m entre 65 a 75 °C/ \pm 5); se esta for muito baixa é necessário procurar uma sequência com maior quantidade de G e C, ou aumentar o tamanho do *primer* (Dieffenbach *et al.*, 1993);

- A percentagem de guaninas e citosinas (GC) entre 40 - 60 %, porque se essa região possuir muitos AT pode ocorrer emparelhamento incorreto (Chuang *et al.*, 2013).

Tendo realizado nova genotipagem utilizando os *primers* P3, todos os animais analisados produziram bandas com tamanho 1300pb (Figura 3.6), o que é compatível com a ausência de qualquer deleção no genoma. Portanto, isto indica que os peixes RR2+RR3 de que dispúnhamos eram todos WT. Para comprovar esse resultado foi feito o cruzamento entre estes peixes, foram recolhidos embriões com 20 hpf e posteriormente foi feito novo PCR para genotipagem. Todos os embriões apresentaram um banda correspondente a banda de WT comprovando que não são portadores da deleção.

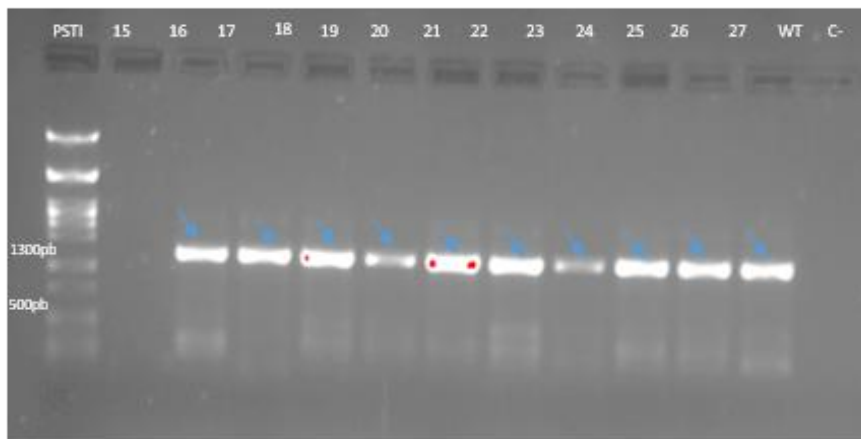


Figura 3.6- Genotipagem dos peixes mutantes RR2+RR3. Electroforese em gel de agarose das reações de PCR realizadas com os *primers* P3 em cada um dos peixes mutantes ensaiados (numerados de 15 a 27). λ PstI: marcador de pesos moleculares; WT: animal selvagem, controlo positivo; C-: controlo negativo, sem DNA genómico adicionado; Setas azuis: peixes WT.

A linha do mutante RR2+RR3 foi descartada do estudo uma vez que nenhum dos peixes eram portadores da deleção e para gerar novamente a linha era preciso fazer um novo Crispr/Cas9 o que não seria possível gerar no tempo disponível para este trabalho. Deste modo, seguiu-se apenas com os mutantes RR2 e RR3.

3.1.2 Genotipagem dos peixes mutantes RR2

Foi feito o estudo por PCR (a partir deste ponto utilizaram-se os *primers* P3) para identificar os peixes portadores da deleção (Figura 3.7). Identificaram-se peixes WT (10%), representados pelas setas azuis, com banda expectável de 1300pb, peixes heterozigóticos (52%) representados pelas setas laranja, com duas bandas, uma de ~1300pb e outra de ~800pb, e também foi possível observar peixes homozigóticos (38%), representados pelas setas verdes com uma banda de ~800pb. Confirmou-se assim a presença de peixes portadores da deleção e estes foram mantidos em tanques isolados para posterior cruzamento e obtenção de uma linhagem homozigótica.



Figura 3.7- Genotipagem dos peixes mutantes RR2. Electroforese em gel de agarose das reações de PCR realizadas com os *primers* P3 em cada um dos peixes mutantes ensaiados (numerados de 1 a 23). λ PstI: marcador de pesos moleculares; C-: controlo negativo, sem DNA genómico adicionado; Setas azuis: peixes WT; Setas Laranjas: peixes heterozigóticos; Setas Verdes: peixes homozigóticos.

3.1.3 Genotipagem dos peixes mutantes RR3

No seguimento da genotipagem por PCR, confirmou-se a existência de peixes RR3 portadores da deleção desejada. Observou-se que todos os peixes apresentaram uma banda por volta de 800pb (Figura 3.8). Estas bandas, representadas pelas setas verdes demonstraram que os peixes são todos homozigóticos para a deleção. No caso desta linha em particular houve uma elevada mortalidade, e os peixes que sobreviveram eram todos machos. Sendo assim, foi

necessário fazer um cruzamento com animais WT, esperar 3 meses para ter fêmeas adultas heterozigóticas, genotipar e então fazer um novo cruzamento para obtenção de uma linha de peixes homozigóticos portadores da deleção para o estudo.

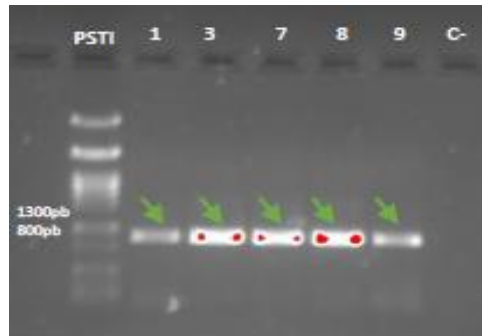


Figura 3.8- Genotipagem dos peixes mutantes RR3. Electroforese em gel de agarose das reações de PCR realizadas em cada um dos peixes mutantes ensaiados. $\lambda PstI$: marcador de pesos moleculares; C-: controle negativo, sem DNA genómico adicionado; Setas verdes: peixes homozigóticos.

3.1.4 Cruzamentos para obtenção de linhagens homozigóticas de peixes-zebra mutantes

Após a genotipagem selecionaram-se os peixes heterozigóticos para cada uma das mutações desejadas, e o segundo passo foi cruzar estes peixes com o objetivo de obter embriões homozigóticos (Figura 3.2). Para tal, foi usada uma razão de 1 fêmea para 1 macho que foram colocados num tanque de reprodução, isolados dos restantes, para no dia seguinte recolher os ovos após a desova.

A Tabela 3.1 apresenta os cruzamentos efetuados e a percentagem de vezes que ocorreu desova. Em todos os casos, houve dificuldades em ter embriões. Apesar de existirem animais homozigóticos para cada uma das mutações (RR2 e RR3), quando estes foram cruzados entre si não foi possível obter embriões, pelo que neste caso suspeita-se que estes animais são inférteis. Na tentativa de ultrapassar este problema foram cruzados animais heterozigóticos com heterozigóticos e foi possível obter embriões na maioria dos cruzamentos feitos. Também foram cruzados heterozigóticos com homozigóticos e tiveram embriões, mas numa percentagem inferior, sobretudo na linha RR2 onde cai para metade. Portanto, concluiu-se

que os animais homozigóticos por si só não são inférteis, mas por algum motivo que desconhecemos, quando são cruzados dois homozigóticos não ocorre a desova.

Tabela 3.1- Cruzamentos de peixes mutantes RR2 e RR3 para obtenção de linhas mutantes homozigóticas.

Nesta tabela está representado o número de vezes que foi feito o cruzamento dos peixes e a percentagem de vezes em que o cruzamento teve sucesso, ou seja, quando ocorreu a desova.

Mutação	Cruzamentos	Nº total de cruzamentos	Cruzamentos com desova
RR2	RR2 ♀ ⁺ - / ♂ ⁺ -	5	80 %
	RR2 ♀ ⁺ - / ♂ ⁻ - ou ♂ ⁺ - / ♀ ⁻ -	5	40 %
	RR2 ♀ ⁻ - / -- ♂ ⁺	3	0 %
RR3	RR3 ♀ ⁺ - / ♂ ⁺ -	13	75 %
	RR3 ♀ ⁺ - / ♂ ⁻ - ou ♂ ⁺ - / ♀ ⁻ -	6	67 %
	RR3 ♀ ⁻ - / -- ♂ ⁺	6	0 %

Sendo assim, como não foi possível obter linhagens homozigóticas, no restante estudo foram utilizados sempre embriões resultantes de cruzamentos entre animais heterozigóticos com heterozigóticos ou heterozigóticos com homozigóticos.

3.2 Caracterização do padrão de expressão do gene *deltaC*

No trabalho desenvolvido previamente no laboratório, foi observado que em alguns peixes mutantes (geração F1) ocorria uma sobre-expressão de *deltaC* na PSM. Para comprovar que esta observação se devia à presença da mutação, recorreu-se à técnica de hibridação *in situ* em embriões em diferentes estádios de desenvolvimento com o objetivo de avaliar o padrão de expressão do gene cíclico do relógio, neste caso, *deltaC*.

Em embriões WT, 50% dos embriões com 11hpf (N=12), 50% com 14hpf (N=22), 17% com 18hpf(N=12) o gene está a ser expresso ao longo da PSM, e nos restantes 50% dos embriões com 11hpf, 50% com 14hpf, 83% com 18hpf o gene é expresso maioritariamente na PSM anterior e nos sómitos já formados (Figura 3.9-A).

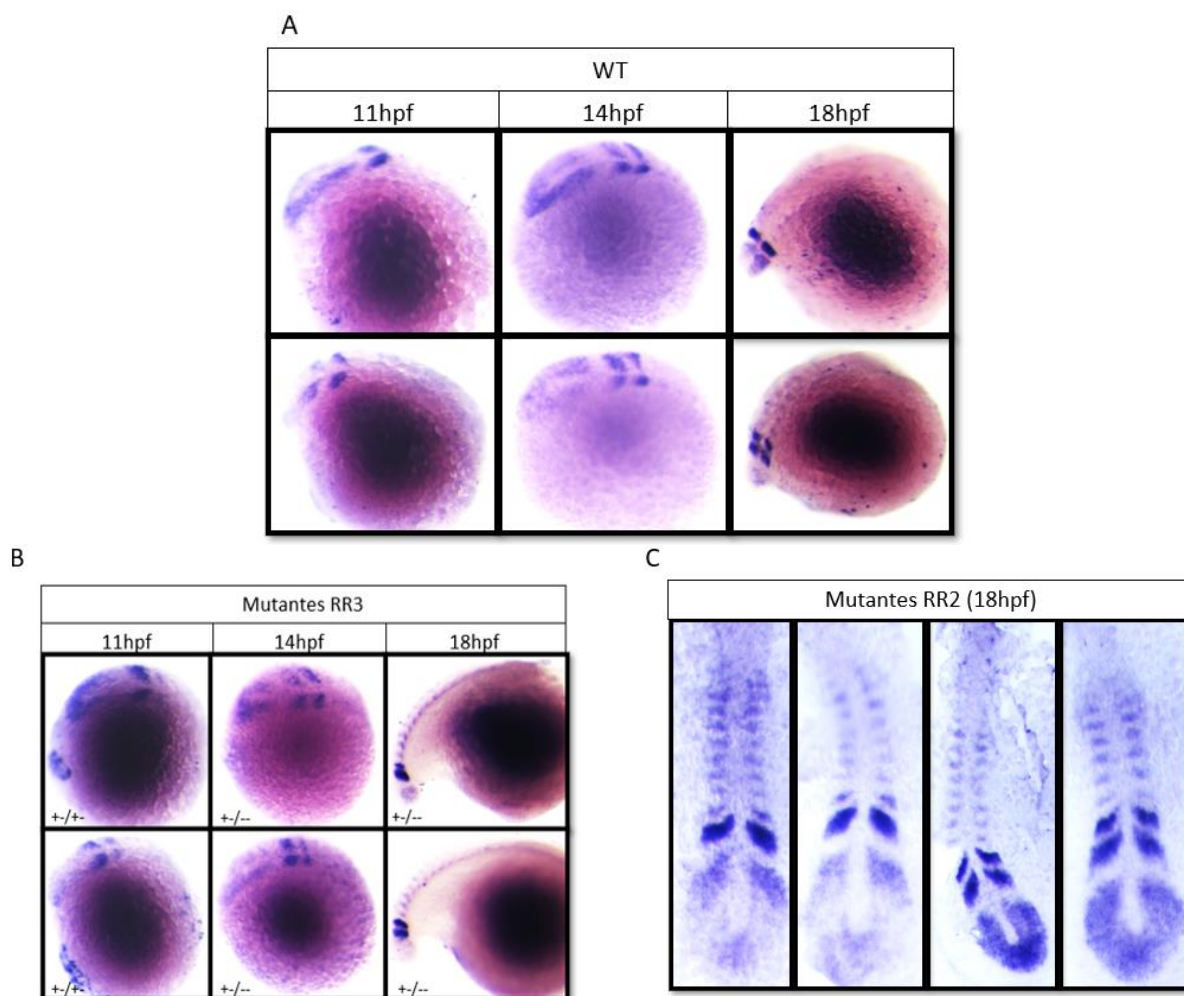


Figura 3.9- *DeltaC* mantém um padrão de expressão dinâmico na PSM de embriões gerados de cruzamentos RR2 e RR3. A – Hibridação *in situ* de embriões WT com 11hpf, 14hpf e 18hpf respectivamente. B – Hibridação *in situ* de embriões gerados de cruzamento RR3 com 11hpf, 14hpf e 18hpf. C – Hibridação *in situ* de embriões gerados de cruzamento RR2 com 18hpf fixados na lâmina (vista dorsal). Em ambos os mutantes o gene *deltaC* apresenta um padrão de expressão dinâmico na PSM.

Nos embriões gerados pelo cruzamento de mutantes RR3, em 46% dos embriões com 11hpf(N=13), 14% com 14hpf(N=14) e 50% com 18hpf (N=14), o gene está a ser expresso em toda a PSM, e nos restantes 54% dos embriões com 11hpf, 86% com 14hpf, 50% com 18hpf o gene não está a ser expresso na PSM, mas apenas nos sómitos formados (Figura 3.9-B). E por fim nos embriões gerados de cruzamento RR2 em 64% dos embriões com 18hpf (N=16) o gene está a ser expresso em toda a PSM, e nos restantes 36% dos embriões com 18hpf o gene é expresso maioritariamente na PSM anterior e nos sómitos já formados (Figura 3.9-C).

O gene *deltaC* pertence ao conjunto dos genes cíclicos do relógio molecular durante a somitogénese do peixe-zebra que oscila de forma dinâmica e com um período de tempo constante durante o desenvolvimento (Dequéant & Pourquié, 2008). Sendo assim estes dados demonstram que nos embriões que carregam as mutações RR2 ou RR3 esta dinâmica na oscilação ainda se mantém, ou seja, mesmo na presença da deleção de porções da região 3'UTR do gene *deltaC*, este continua a ter um padrão de expressão dinâmico na PSM.

Apesar de *deltaC* estar a ser expresso de forma dinâmica mesmo na ausência de uma porção da região 3'UTR, foi possível observar alterações na intensidade de expressão. Para confirmar esta observação, foi feita hibridação *in situ* de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento para o gene *deltaC* com a finalidade de analisar a intensidade do padrão de expressão do gene ao longo do desenvolvimento. Os embriões gerados de cruzamentos RR2 e RR3 com 11hpf e 14hpf não apresentaram nenhuma alteração na intensidade do padrão de expressão do gene em relação aos embriões WT (Figura 3.10-A, B, D e E). No caso dos embriões com 18hpf gerados de cruzamentos RR3, 21% dos embriões apresentaram um aumento da intensidade do padrão de expressão do gene *deltaC* nos sómitos e também na PSM em comparação com o padrão de expressão do gene no WT (Figura 3.10- C e F), e nos embriões gerados de cruzamento RR2 37% dos embriões apresentaram este aumento da intensidade do padrão de expressão comparando com WT (Figura 3.10-C e G).

A sobre-expressão de *deltaC* nos mutantes contendo deleções na região 3'UTR, sugere que o mRNA possa estar estabilizado. Por esta razão, colocou-se a hipótese que esta estabilidade resultaria num aumento do nível proteico de DeltaC. Fomos então analisar a expressão proteica de DeltaC por imunofluorescência, mas, no entanto, não conseguimos otimizar as condições para deteção do anticorpo (Anexo 7.1), pelo que não obtivemos informações sobre alterações aos níveis da proteína

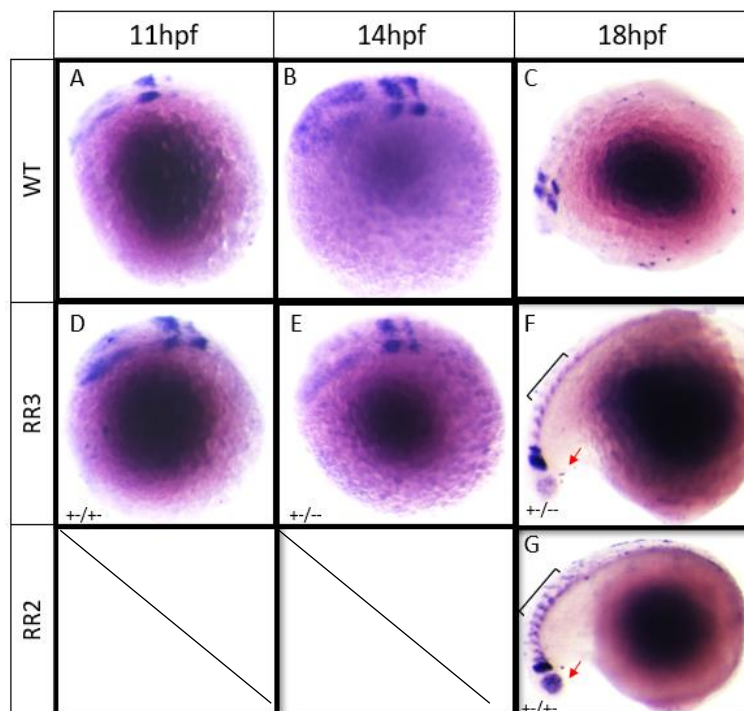


Figura 3.10- Padrão de expressão do gene *deltaC* em embriões WT e gerados de cruzamentos RR2 e RR3. Hibridação *in situ* com sonda que deteta mRNA de *deltaC* em embriões WT (A-C), RR3 (D-F) e RR2 (G).

3.3 Caracterização do padrão de expressão do gene *her7*

Não tendo sido possível obter informações sobre os níveis de proteína DeltaC nos mutantes, fomos avaliar se o aumento de mRNA do *deltaC* tem um efeito na sinalização Notch/Delta, ou seja, se as diferenças do mRNA que foram observadas se repercutiam em diferenças na atividade da via de sinalização. Para isso, fomos estudar um alvo a jusante que depende da via em que *deltaC* participa, neste caso o gene do relógio *her7*.

Para confirmar se as deleções introduzidas no gene *deltaC* do relógio molecular da somitogénese destes mutantes oscila de forma dinâmica determinou-se a expressão do gene *her7* por hibridação *in situ* de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento. Observou-se que em 43% dos embriões WT dos embriões com 11hpf (N=14), 64% com 14hpf (N=14), 38% com 18hpf (N=13) o gene está a ser expresso em toda a PSM, enquanto que nos restantes 57% dos embriões com 11hpf, 36% com 14hpf, 62% com 18hpf o gene apresenta expressão maioritariamente na PSM anterior e nos sómitos já formados (Figura 3.11-A).

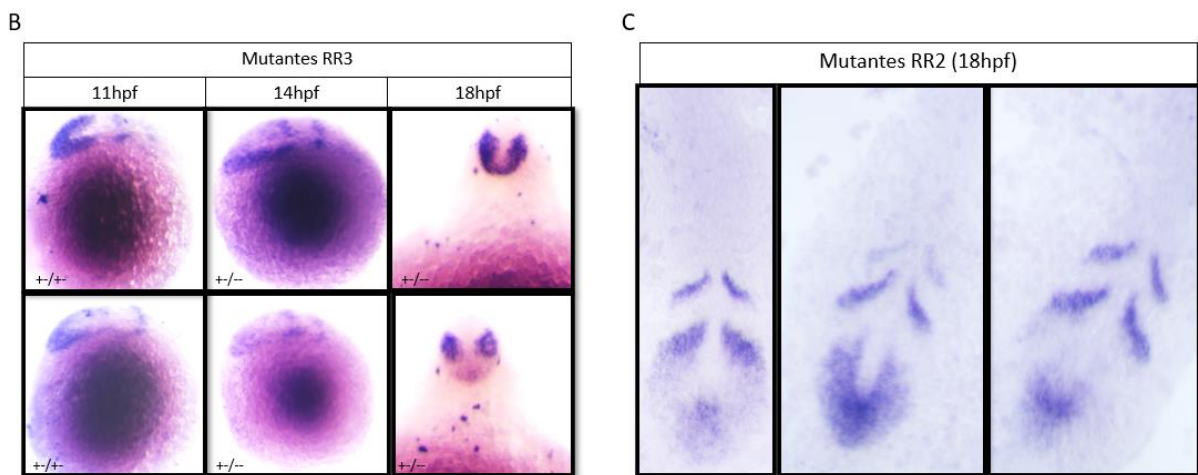
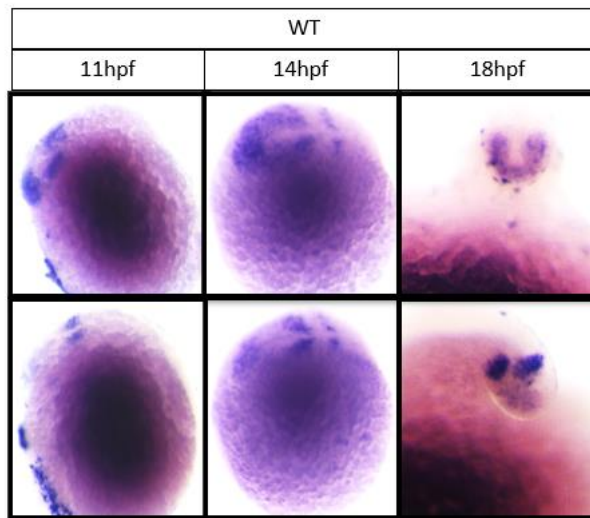


Figura 3.11- *Her7* mantém um padrão de expressão dinâmico na PSM de embriões gerados de cruzamentos RR2 e RR3. A – Híbridaçã *in situ* de embriões WT com 11hpf, 14hpf e 18hpf respectivamente. B – Híbridaçã *in situ* de embriões gerados de cruzamento RR3 com 11hpf, 14hpf e 18hpf. C – Híbridaçã *in situ* de embriões gerados de cruzamento RR2 18hpf fixados na lâmina. Ambos os casos o gene apresenta um padrão de expressão dinâmico na PSM.

Nos embriões RR3, todos os embriões com 11hpf (N=9), 43% com 14hpf (N=7), 50% com 18hpf (N=8) o *her7* está a ser expresso na PSM. Nos restantes 57% com 14hpf, 50% com 18hpf o *her7* está a ser menos expresso na PSM, e a expressão confinada à PSM anterior (Figura 3.11-B). Nos embriões gerados de cruzamento RR2 em 65% dos embriões com 18hpf (N=17) o *her7* está a ser expresso em toda a PSM, enquanto que em 45% dos embriões com 18hpf a expressão do *her7* está confinada na parte mais anterior da PSM (Figura 3.11-C).

O gene *her7* pertence ao conjunto dos genes cíclicos do relógio molecular durante a somitogénese do peixe-zebra, que oscila de forma dinâmica e com um período de tempo constante durante o desenvolvimento (Dequéant e Pourquié, 2008). Estes dados sugerem que numa elevada percentagem de embriões RR2 e RR3 o gene *her7* mantém as oscilações, ou seja, a deleção destas porções da região 3'UTR do gene *deltaC* não impede a dinâmica de expressão do gene.

Para verificar se a intensidade de expressão do gene *her7* estava afetada, fez-se hibridação *in situ* em embriões mutantes em diferentes estadios de desenvolvimento. Os embriões RR2 e RR3 com 11hpf e 14hpf não apresentaram nenhuma alteração na intensidade do padrão de expressão do gene em relação aos embriões WT (Figura 3.12-A, B, D e E). Nos embriões RR3 observou-se, em 12% dos embriões às 18hpf, um aumento da intensidade da expressão do gene *her7* na PSM em comparação com a expressão em embriões WT (Figura 3.12- C e F). Em embriões RR2, 41% destes apresentaram um aumento da intensidade de expressão comparando com embriões WT (Figura 3.12-C e G).

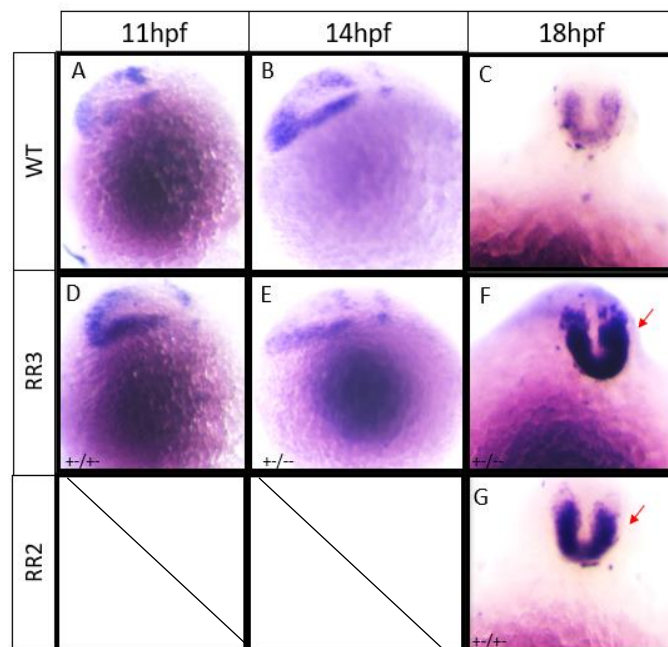


Figura 3.12- Padrão de expressão do gene *her7* em embriões de cruzamentos RR2 e RR3. Hibridação *in situ* com sonda que deteta mRNA de *deltaC* em embriões WT (A-C), RR3 (D-F) e RR2 (G).

O facto de se observar um aumento da intensidade de expressão dos dois genes do relógio *deltaC* e *her7* nos mutantes RR2 e RR3 apenas às 18hpf, e não às 11hpf e 14hpf, sugere que exista uma acumulação de transcritos nos estadios mais tardios da somitogénese. Assim, sugere-se que a transcrição do mRNA de *deltaC* oscila, mas este não é degradado com a mesma dinâmica que a observada nos embriões WT. No entanto, isto não é suficiente para impedir a variação da expressão dos genes *deltaC* e *her7* e, portanto, comprometer a segmentação do corpo do embrião.

3.4 Caracterização morfológica dos embriões portadores da deleção

Para avaliar se as deleções inseridas na região 3'UTR de *deltaC* alteram o número de sómitos formados, recorreu-se a técnica de hibridação *in situ* para o gene *xirp2a* (marcador das fronteiras do sómito) em embriões com 32hpf (após a somitogénese completa) resultantes do cruzamento de RR2 e RR3 de machos e fêmeas heterozigóticos. Nos embriões WT as fronteiras dos sómitos estão bem definidas com uma marcação clara para *xirp2a* (Figura 3.13-A). Foi utilizado a mesma abordagem para analisar os embriões portadores da deleção RR2 e RR3. Nos embriões RR2 e RR3 foi observada uma marcação clara e bem definida dos sómitos, á semelhança dos WT, indicando que os sómitos estão bem formados.

Os sómitos têm um comprimento que é determinado pelo período do relógio e a velocidade da frente de onda (Oates *et al.* 2012). Se o relógio estiver a oscilar mais lentamente, consequentemente serão formados menos pares de sómitos, e se o relógio estiver a funcionar mais rápido, formará mais pares de sómitos. Assim, foi avaliado o número total de sómitos em embriões WT, RR2 e RR3. Observou-se uma diminuição significativa do número total dos sómitos formados (t-test, $p < 0.05$) nos embriões RR2 e RR3 em relação aos WT (Figura 3.13-B). A grande variabilidade observada resulta muito provavelmente do facto de ser uma população heterogénea, visto que não conseguimos distinguir pelo fenótipo mutantes homozigóticos e embriões com fenótipo WT.

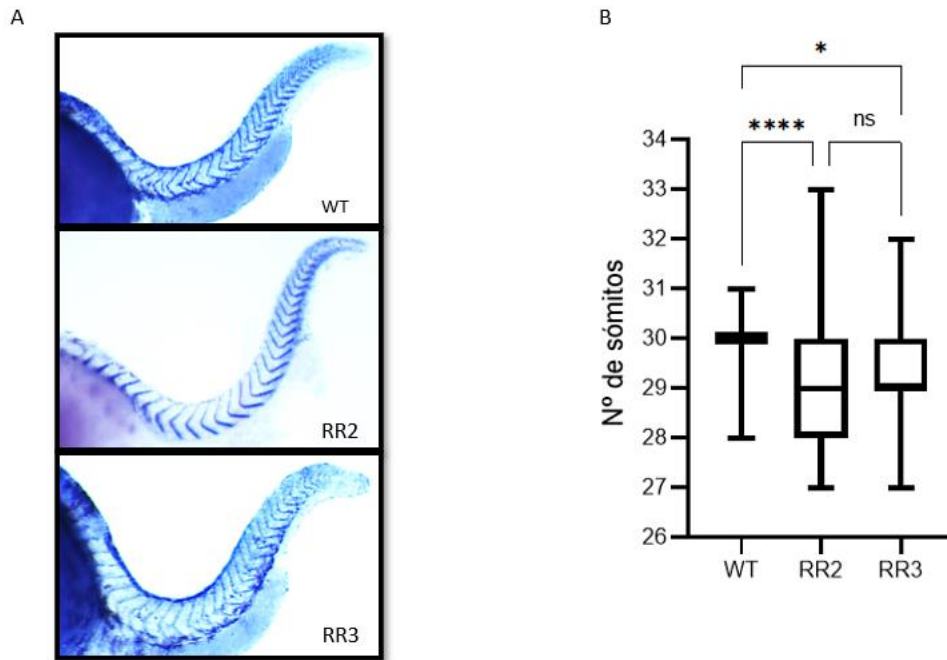


Figura 3.13- Avaliação da morfologia e número de sómitos em embriões de peixe-zebra gerados de cruzamentos RR2 e RR3. A - Imagens da hibridação *in situ* para *xirp2a* de embriões de peixe-zebra com 32hpf. B- Gráfico que mostra o número total de sómitos dos embriões WT (n= 38), mutante RR2 (n=60) e mutante RR3 (n=47). **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, e ns $p > 0,05$.

Foi determinado também o tamanho dos sómitos pois, se o relógio está a oscilar mais lentamente, por exemplo, teremos menos pares de sómitos e estes tendem a ser de maiores dimensões. Foi definido um critério de medição para todos os embriões, tendo sido medidos 4 sómitos da porção anterior do corpo (sómitos 9 a 13) e 4 sómitos posteriores (20 a 24) (Figura 2.2). Os sómitos anteriores são menores nos embriões RR2 (Figura 3.14-A), e nos embriões RR3 essa diminuição é ainda mais evidente com uma diferença muito significativo (t-test, $p < 0.0001$). Em relação aos sómitos posteriores não há diferença significativa entre embriões WT e RR2, mas há diferença significativa ($p < 0,05$) entre WT e portadores da deleção RR3 (Figura 3.14- B).

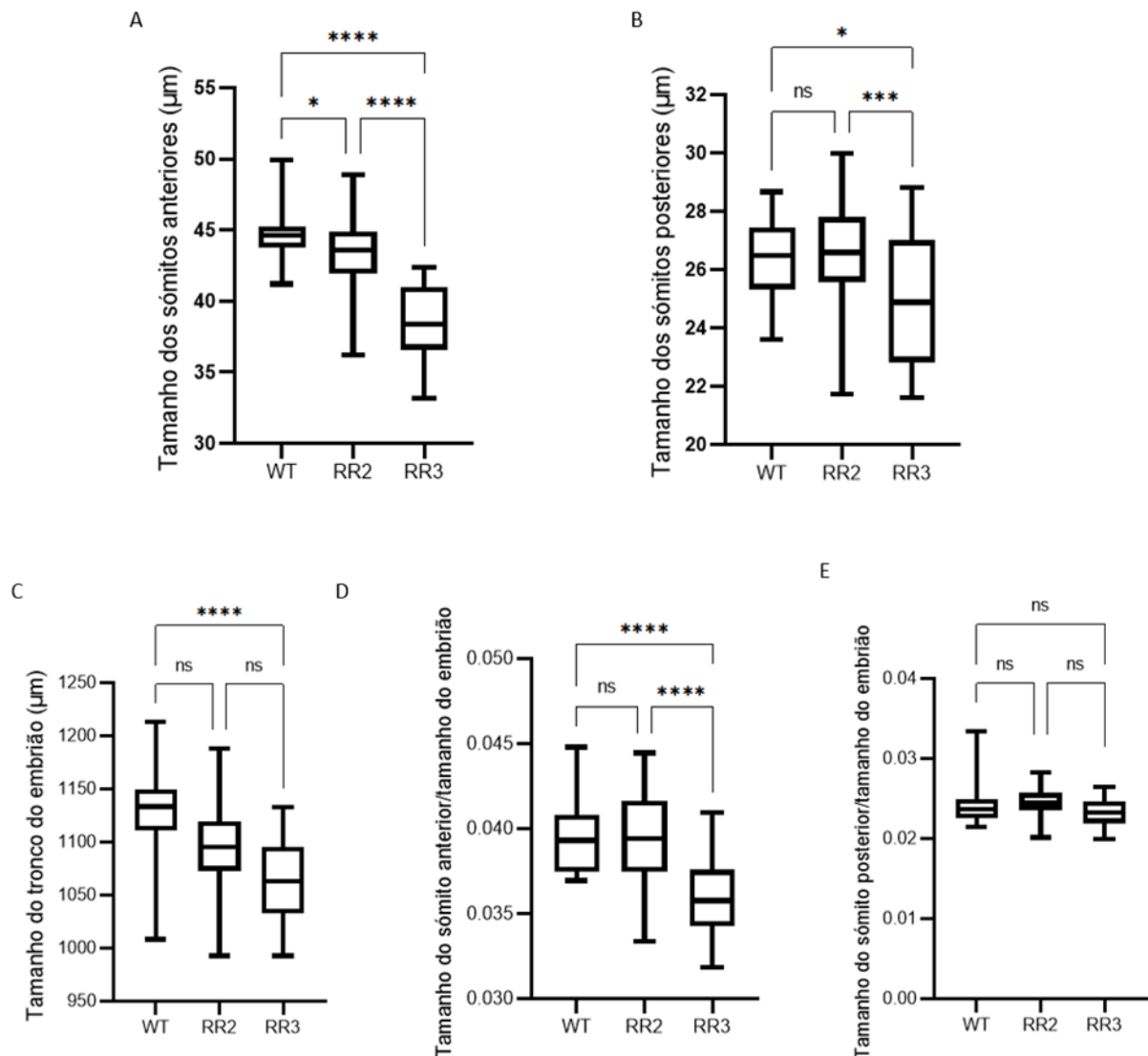


Figura 3.14- Avaliação do tamanho dos sómitos de embriões de peixe-zebra gerados de cruzamentos RR2 e RR3 com 32hpf. A- Tamanho dos sómitos anteriores (9 a 13) em micrómetros dos embriões WT (n= 38), RR2 (n=60) e RR3 (n=23). **** p<0,0001, * p<0,05. B- Tamanho dos sómitos posteriores em micrómetro (20 a 24) dos embriões WT (n= 38), RR2 (n=60) e RR3 (n=23). *** p=0.0004, * p<0,05, e ns p>0,05. C – Tamanho do tronco do embrião medido desde o primeiro sómito até a parte final do tronco. **** p<0,0001 e ns p>0,05. D- Gráfico representando a razão entre o tamanho dos sómitos anteriores e o tronco do embrião. **** p<0.0001 e ns p>0,05. E - Gráfico que mostra a razão entre o tamanho dos sómitos posteriores e o tronco do embrião.

Como os sómitos são ligeiramente menores fomos determinar o tamanho do tronco do embrião, isto porque se os sómitos são ligeiramente menores pode ser que o embrião também seja ligeiramente menor. Então foi medido o tamanho do tronco de cada embrião

(Figura 3.14-C) desde o primeiro sómito até o final da cauda do embrião. Foi observado que, sobretudo nos embriões RR3, o tronco do embrião é mais pequeno do que no WT. Também foi calculada a razão entre o tamanho do tronco do embrião e o tamanho dos sómitos, tanto anteriores (Figura 3.14-D) como posteriores (Figura 3.14-E) para ver se essa diferença é proporcional. A proporção entre o tamanho do tronco do embrião e o tamanho do sómito anterior é mantida nos embriões RR2, mas é significativamente menor ($p < 0.0001$) nos embriões RR3.

Não se verificam diferenças significativas ($p > 0,05$) na proporção do tamanho dos sómitos posteriores relativamente ao comprimento do embrião nos embriões RR2 e RR3 em relação ao WT. Sendo o embrião mais pequeno (particularmente os RR3), tem menos tecido e provavelmente menos número de células para formar os sómitos e assim o tamanho dos sómitos posteriores é menor.

Uma das dificuldades deste trabalho foi a identificação de um fenótipo embrionário claro nos mutantes. Tendo em conta esta dificuldade e para uma melhor interpretação destes resultados, representámos os gráficos em que cada ponto indica um embrião individual (Figura 3.15).

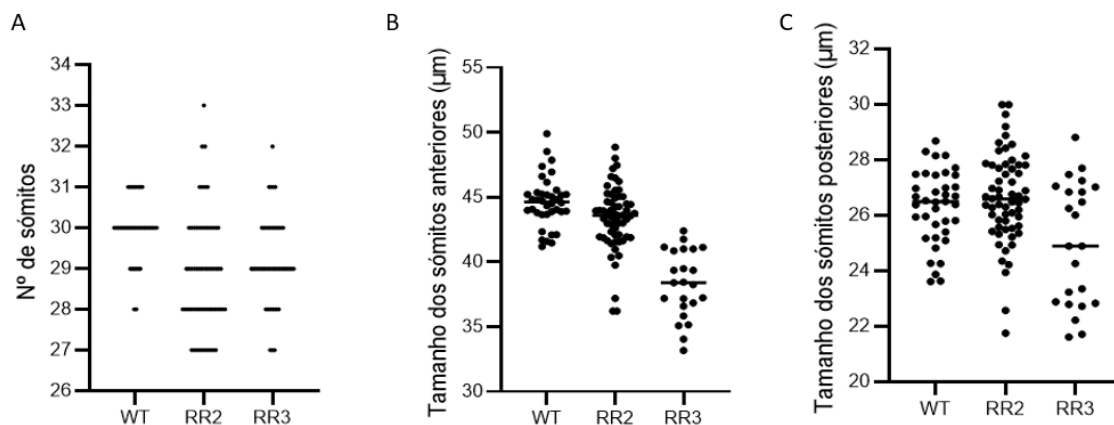


Figura 3.15- Caracterização morfológica de embriões de peixe-zebra portadores da deleção RR2 e RR3 com 32hpf. Os gráficos representam o número total de sómitos (A), o tamanho dos sómitos anteriores (B) e posteriores (C). Estes gráficos mostram que a população dos embriões é heterogénea, sendo que cada ponto corresponde a um embrião analisado.

Estes gráficos dão uma forte indicação que temos populações distintas de embriões (Figura 3.15-A, B e C) uma que provavelmente é constituída por embriões WT e heterozigóticos

porque o nível médio desta população corresponde ao nível médio do WT. A outra população provavelmente é constituída por homozigóticos. Fazendo uma média somente destes o tamanho dos sómitos é menor.

Nos embriões RR2 e RR3 o mRNA do *deltaC* aparenta estar sobre-expresso, possivelmente devido a possuir maior estabilidade. O mRNA de *her7* também está sobre-expresso o que dá fortes indicações de que a proteína DeltaC também estará presente em maior quantidade e, consequentemente a sinalização Notch está aumentada. Para testar esta hipótese, foi usado uma linha transgênica em que o NICD está sobre-expresso após choque térmico e assim testar se a sobre-expressão de *deltaC* e os fenótipos que temos correspondem a um aumento da sinalização Notch.

3.5 Caracterização morfológica de embriões NICD (Tg.hsp70:NICD)

Para confirmar se a sobre-expressão de *deltaC* e os fenótipos que obtivemos correspondem a um aumento da sinalização Notch, foi utilizada uma linha transgênica (Tg.hsp70:NICD; doravante designada por NICD) em que a região NICD do gene *notch1* é expressa sob o controlo de um promotor do gene *hsp70* induzido por incubação a >32 °C. Para tal, foram recolhidos embriões e submetidos a um choque térmico de 37°C durante 90 minutos no início da segmentação (10hpf). Posteriormente os embriões foram recolhidos às 32hpf para análise da expressão do gene *xirp2a* por hibridação *in situ*. Esta análise evidenciará se a segmentação é interrompida e se o embrião consegue formar todos os pares de sómitos.

O fenótipo morfológico observado nos embriões NICD (embriões mais curtos e com uma torção no tronco) não foram observados nos embriões RR2 e RR3. As fronteiras dos sómitos estão bem definidas com uma marcação de *xirp2a* clara, tanto nos WT como nos NICD ativados (Figura 3.16) e, portanto, os sómitos estão bem formados.

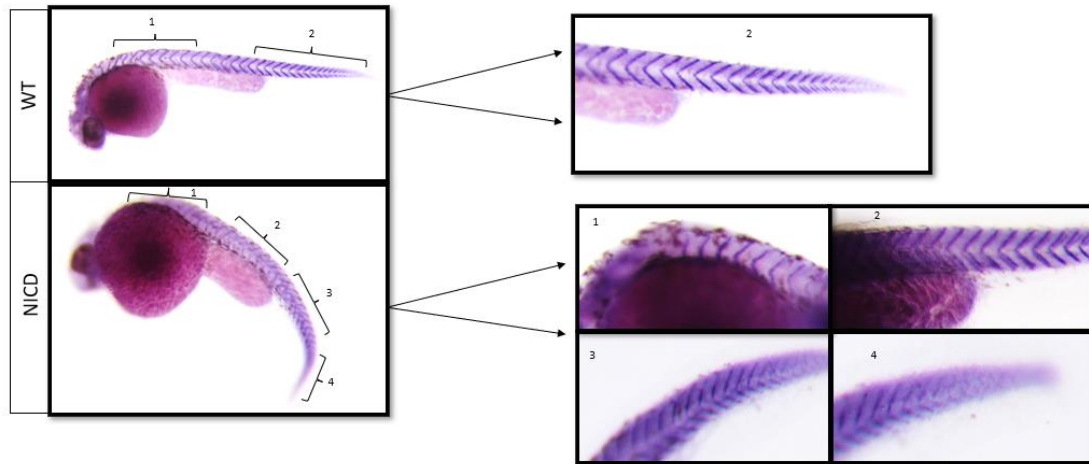


Figura 3.16- Caracterização morfológica de embriões de peixe-zebra transgênicos NICD. Imagens da hibridação *in situ* para *xirp2a* em embriões de peixe-zebra WT e NICD com 32hpf.

Também foi avaliado o número total de sómitos formados em cada embrião. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa (t-test, $p > 0.05$) no número total de sómitos formados entre WT e os embriões NICD (Figura 3.17-A).

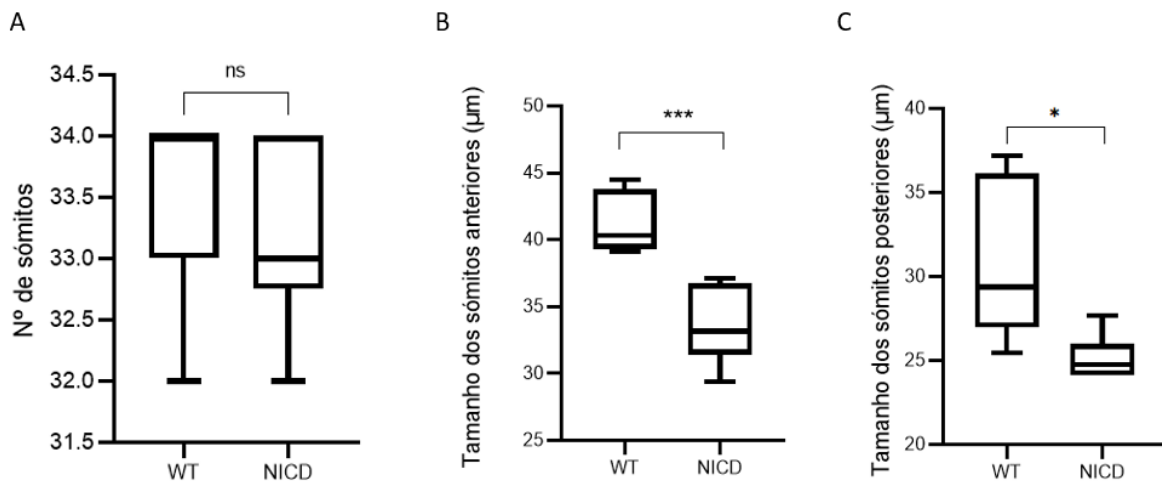


Figura 3.17- Caracterização do número e tamanho dos sómitos em embriões de peixe-zebra transgênicos NICD. A- Número total de sómitos dos embriões WT (n= 18), e NICD (n=14). ns $p > 0,05$. B- Tamanho dos sómitos anteriores (9 a 13) em micrómetro dos embriões WT (n= 6) e embriões NICD (n=6). *** $p < 0,05$. C- Tamanho dos sómitos posteriores em micrómetro (20 a 24) dos embriões WT (n= 6) e embriões NICD (n=6). * $p < 0,05$.

Mesmo não apresentando diferença no número total de sómitos formados, foram medidos 4 sómitos anteriores (9 a 13) e 4 sómitos posteriores (20 a 24), como anteriormente. Houve uma diferença significativa ($p < 0.05$) no tamanho dos sómitos anteriores nos embriões NICD em comparação com os WT (Figura 3.17-B). Em relação aos sómitos posteriores também há diferença significativa ($p < 0.05$) entre NICD e WT (Figura 3.17- C). Isto indica que nos embriões NICD o tamanho dos sómitos é menor do que nos WT.

3.6 Comparação dos embriões portadores de deleção RR2 e RR3 com os embriões NICD

O número total de sómitos formados no peixe-zebra varia entre 30 a 34 pares de sómitos (Dequéant & Pourquié, 2008). No caso dos embriões RR2 e RR3 apresentaram uma diminuição no número total de sómitos formados (em média 29 pares de sómitos) em comparação com os embriões WT que apresentaram em média 30 pares de sómitos conforme descrito na literatura (Figura 3.18-A).

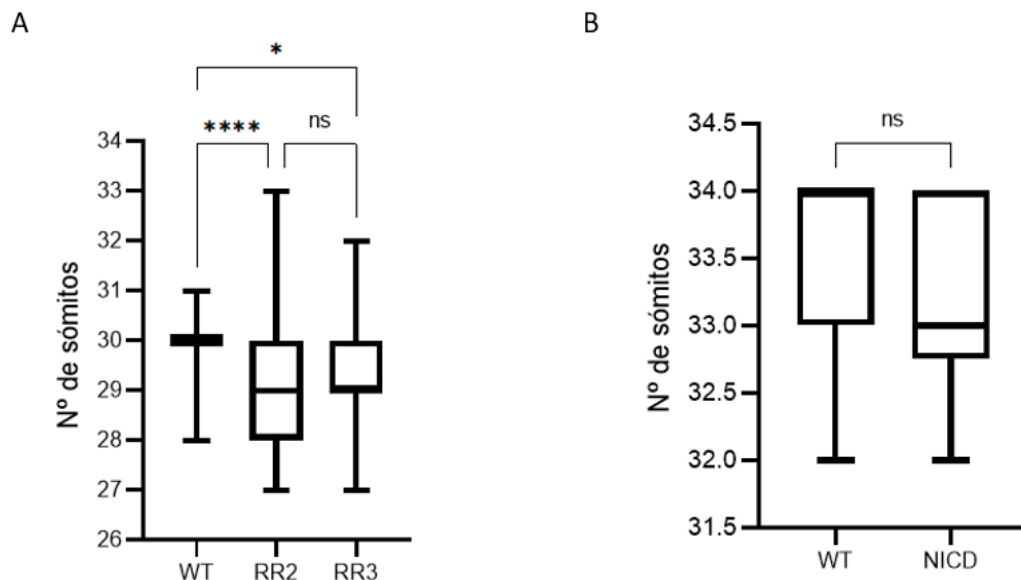


Figura 3.18- Comparação entre o número total de sómitos dos embriões portadores da deleção RR2 e RR3 e embriões NICD. A- Número total de sómitos dos embriões RR2 e RR3. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, ns $p > 0,05$. B- Número total de sómitos dos embriões NICD. ns $p > 0,05$.

Para os embriões NICD o total de sómitos formados foram em média 33 pares de sómitos comparando com os WT submetidos às mesmas condições que formaram em média 34 pares de sómitos (Figura 3.18-B). No laboratório, os embriões de peixe-zebra são comumente criados entre 20 ° C e 30 ° C, e sabe-se que a temperatura tem um forte efeito na velocidade geral de desenvolvimento (Gomez et al., 2008). Visto os embriões NICD foram submetidos a 37° C isto pode explicar um maior número de sómitos do que os RR2 e RR3. Os embriões RR2, RR3 e NICD apresentam uma diminuição do tamanho dos sómitos anteriores comparando com os WT (Figura 3.19-A e B).

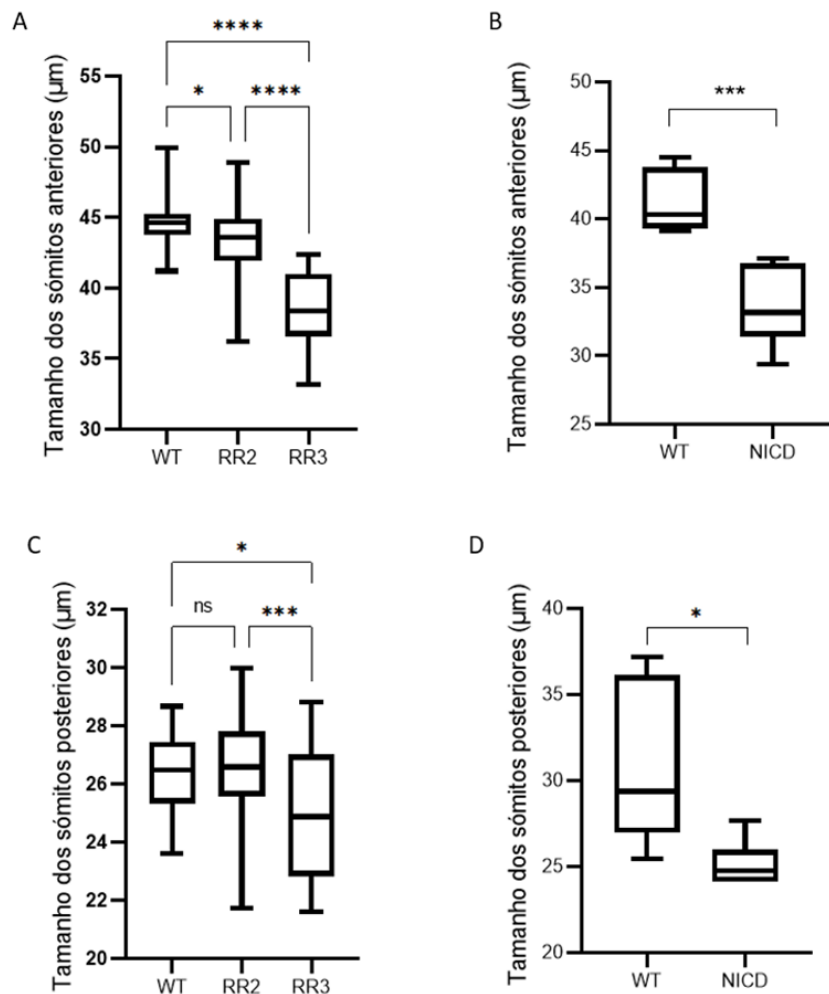


Figura 3.19- Tamanho dos sómitos em embriões RR2, RR3 e NICD. A- Tamanho dos sómitos anteriores dos embriões WT, RR2 e RR3. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$. B- Tamanho dos sómitos anteriores NICD. *** $p < 0,05$. C- Tamanho dos sómitos posteriores dos embriões RR2 e RR3. *** $p < 0,05$, ns $p > 0,05$. D- Tamanho dos sómitos posteriores NICD. * $p < 0,05$.

No caso dos embriões RR2 os sómitos anteriores apresentaram menos $\sim 2 \mu\text{m}$ ($43\mu\text{m}$) do que os WT ($45 \mu\text{m}$), mas nos embriões RR3 essa diminuição é mais evidente, estes apresentaram menos $\sim 7 \mu\text{m}$ ($38\mu\text{m}$) do que os WT. Os embriões NICD também apresentaram sómitos $\sim 7 \mu\text{m}$ ($33\mu\text{m}$) menores do que os WT correspondente ($40 \mu\text{m}$).

Em relação aos sómitos posteriores, estes também apresentaram uma diminuição no tamanho dos sómitos (Figura 3.19-C e D). Os embriões RR2 não apresentaram diferenças no tamanho dos sómitos posteriores em relação ao WT, mas os RR3 apresentaram uma diminuição de $\sim 1.5 \mu\text{m}$ em relação ao WT ($26.5 \mu\text{m}$). Os embriões NICD apresentaram uma diminuição de $\sim 4 \mu\text{m}$ em relação ao WT correspondente ($29 \mu\text{m}$).

Foi calculada a razão da média do tamanho dos sómitos dos mutantes (RR2, RR3 e o NICD) e o tamanho dos sómitos dos WT correspondentes (Figura 3.20).

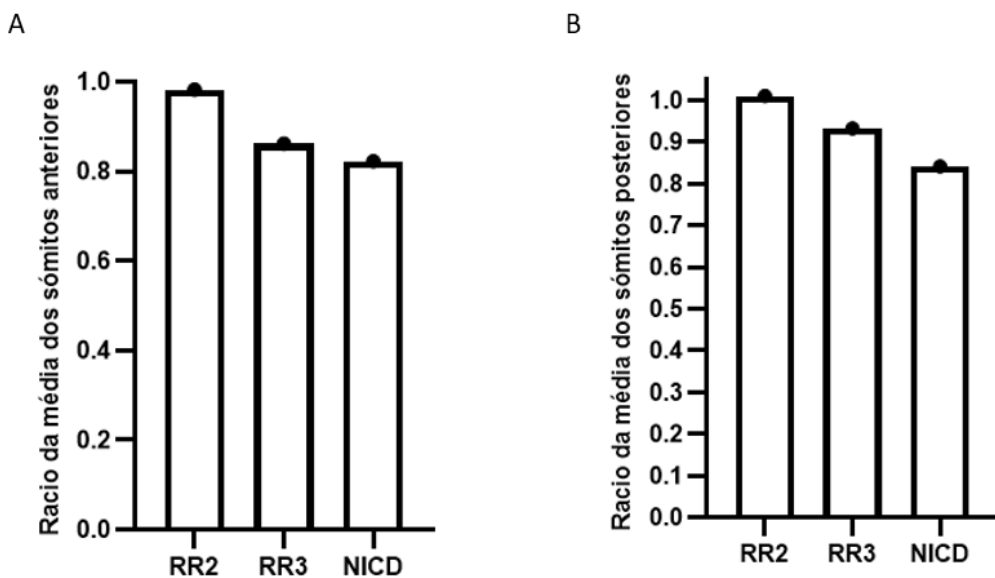


Figura 3.20- Visualização do tamanho dos sómitos em diversos mutantes relativamente ao WT. Gráfico que representa a razão entre a média do tamanho dos sómitos anteriores (A) e posteriores (B) dos embriões RR2, RR3 e do NICD relativamente a embriões WT.

No caso dos sómitos anteriores (Figura 3.20-A), para os embriões RR2 o tamanho dos sómitos destes é igual ao tamanho dos sómitos anteriores do WT. Para os embriões RR3 o tamanho dos sómitos destes é aproximadamente 80% do tamanho dos sómitos anteriores do WT. Para os embriões NICD o tamanho dos sómitos destes é aproximadamente 80% do tamanho dos sómitos anteriores do WT. Isto sugere que a razão para a diminuição do tamanho dos sómitos

nos embriões RR3 pode ser a mesma razão responsável pela diminuição do tamanho dos sómitos nos embriões NICD. Ou seja, esta diminuição pode ser devido ao mesmo mecanismo. Para os sómitos posteriores (Figura 3.20-B), nos embriões RR2 o tamanho dos sómitos destes é igual ao tamanho dos sómitos posteriores do WT. Nos embriões RR3 o tamanho dos sómitos destes é aproximadamente 92% do tamanho dos sómitos posteriores do WT. Nos embriões NICD o tamanho dos sómitos destes é aproximadamente 85% do tamanho dos sómitos posteriores do WT.

Nos embriões portadores da deleção RR3 observámos alterações semelhantes ao que se verifica nos transgênicos NICD em que o Notch está sobre-expresso. Isto sugere que as alterações observadas nos embriões mutantes *deltaC* RR3 são derivadas da sobre-ativação da via Notch-Delta.

4. Conclusões

No presente trabalho pretendeu-se compreender a relevância da região 3'UTR do mRNA de *deltaC* para as oscilações de expressão genética do relógio da somitogénese. Para isso, foi feita uma caracterização morfológica dos embriões de peixe-zebra mutantes RR2 e RR3, caracterização do padrão de expressão do mRNA do gene *deltaC* e do gene *her7* nos mutantes e ainda foi analisado o impacto da sobre-expressão de Notch nos embriões de peixes-zebra transgênicos.

Através da técnica de hibridação *in situ* verificou-se que os genes *deltaC* e *her7* têm um padrão de expressão dinâmica na PSM mesmo na ausência de porções da região 3'UTR, mas que existe sobre-expressão genética, possivelmente devido à estabilização do mRNA de *deltaC*. Nos embriões RR2 e RR3 a segmentação não é interrompida, mas o número total de sómitos é menor e os sómitos anteriores são ligeiramente mais curtos. Usando uma linha transgênica em que o NICD está sobre-expresso observou-se diminuição do tamanho dos sómitos como nos embriões RR3. Isto sugere que o fenótipo observado nos embriões mutantes poderá ser devido a um aumento da via de sinalização Notch durante a somitogénese.

5. Perspetivas futuras

Tendo em conta as dificuldades encontradas neste trabalho e para uma melhor interpretação destes resultados o próximo passo seria a obtenção de embriões homozigóticos. Com a hibridação in situ não é possível quantificar o mRNA por isso será útil fazer um qPCR que além de acompanhar a reação em tempo real e monitorizar a taxa do aumento de mRNA também é possível determinar com precisão a quantidade de mRNA presente na amostra original. Com isso será possível saber quão mais expresso o mRNA está nos mutantes em relação ao WT.

Seria importante ver se o padrão de expressão do FGF8a que é um gradiente que regula o posicionamento da fenda e determina onde o sómito vai formar isto porque pode ser que não é o relógio responsável por estas alterações, mas sim a frente de onda. Caso o FGF8a estiver aumentado pode ser uma sugestão do porquê que os sómitos são menores nestes mutantes.

Outra questão importante é como estão os níveis da proteína DeltaC. Para isso será útil fazer um Western blot para ver como está a ser expresso a proteína, se esta não estiver aumentada pode ser que a proteína está a ser traduzida em maior quantidade, mas não é exposta a membrana como mecanismo de controlo. Por outro lado, a proteína pode estar aumentada como se encontra o mRNA, neste caso a região 3'UTR não é só importante para o decaimento do mRNA, mas também da proteína.

Seria interessante fazer uma imunoprecipitação para determinar se existe uma interação direta ou muito próxima entre a proteína DeltaC e outras proteínas, como por exemplo o DeltaD para tentar perceber até que ponto os outros ligando do DeltaC estão a contribuir para segmentação e daí ver se há outros mecanismos de compensação.

Por último, sabendo que os motivos PRE e ARE da região do 3'UTR dos genes cíclicos contribuem para a desestabilização do mRNA, uma investigação mais aprofundada de como esses fatores interagem com a maquinaria de decaimento do mRNA, poderá fornecer uma compreensão mais aprimorada sobre os mecanismos pós-transcricionais que regulam expressão dos genes cíclicos.

6. Referências Bibliográficas

- Alan Šučur, Maša Filipović, Darja Flegar, Tomislav Kelava, Dino Šisl, Nina Lukač, Nataša Kovačić, Danka Grčević. Notch receptors and ligands in inflammatory arthritis – a systematic review, *Immunology Letters*, Volume 223, 2020, Pages 106-114, ISSN 0165-2478, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.04.010>.
- Alatorre-Jácome, O., García-Trejo, F., Rico-García, E., & Soto-Zarazúa, G. M. (2011). Aquaculture Water Quality for Small-Scale Producers. In *Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny*, Chapter 7.
- Alexander Aulehla, Christian Wehrle, Beate Brand-Saberi, Rolf Kemler, Achim Gossler, Benoit Kanzler, Bernhard G Herrmann. Wnt3a Plays a Major Role in the Segmentation Clock Controlling Somitogenesis, *Developmental Cell*, Volume 4, Issue 3, 2003, Pages 395-406, ISSN 1534-5807, [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00055-8).
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., & Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*, 93(2), 115–133. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>
- Andreas Fischer, Manfred Gessler, Delta–Notch—and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors, *Nucleic Acids Research*, Volume 35, Issue 14, 15 July 2007, Pages 4583–4596, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm477>
- Andrew C. Oates, Luis G. Morelli, Saúl Ares; Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development* 15 February 2012; 139 (4): 625–639. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.063735>
- Andrew C. Oates, Robert K. Ho. (2002). Hairy/E(spl)-related (Her) genes are central components of the segmentation oscillator and display redundancy with the Delta/Notch signaling pathway in the formation of anterior segmental boundaries in the zebrafish. *Development*, 129: 2929-2946.
- Aulehla, A., & Pourquié, O. (2010). Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), a000869. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000869>
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., Martins, R. N. (2012). Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (69), e4196).

- Barrios, A., Poole, R. J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N., & Wilson, S. W. (2003). Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Current biology: CB*, 13(18), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.030>
- Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., & Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes & development*, 17(12), 1451–1456
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., & Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes & development*, 15(20), 2642–2647. <https://doi.org/10.1101/gad.930601>
- Blentic, A., Gale, E. and Maden, M. (2003), Retinoic acid signalling centres in the avian embryo identified by sites of expression of synthesising and catabolising enzymes. *Dev. Dyn.*, 227: 114-127. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10292>
- Borggreffe, T., Oswald, F. (2012) Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway, *Cell Cycle*, 11:2, 264-276
- Borggreffe, T., Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: Transcriptional Regulation at Notch target genes. *Célula. Mol. Life Sci.* 66, 1631–1646
- Boyan Bonev, Peter Stanley, Nancy Papalopulu. MicroRNA-9 Modulates Hes1 Ultradian Oscillations by Forming a Double-Negative Feedback Loop, *Cell Reports*, Volume 2, Issue 1, 2012, Pages 10-18, ISSN 2211-1247, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.017>.
- Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (2011), Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *WIREs RNA*, 2: 167-183. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
- Ching-Yi Chen, Roberto Gherzi, Shao-En Ong, Edward L. Chan, Reinout Raijmakers, Ger J.M. Pruijn, Georg Stoecklin, Christoph Moroni, Matthias Mann, Michael Karin. AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs. *Cell*, Volume 107, Issue 4, 2001, Pages 451-464, ISSN 0092-8674, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00578-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00578-5).
- Claudio D. Stern, Scott E. Fraser, Roger J. Keynes, Dennis R. N. Primm; A cell lineage analysis of segmentation in the chick embryo. *Development* 1 October 1988; 104 (Supplement): 231–244. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.104.Supplement.231>
- Cooke, J. (1998) A gene that resuscitates a theory-somitogenesis and a molecular oscillator. *Trends Genet.* 14, 85–8

- Cooke, J. and Zeeman, E. C. (1975). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 58(2), 455-76
- Dahm, R., & Geisler, R. (2006). Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, 8(4), 329-345.
- David Weber, Julia Heisig, Susanne Kneitz, Elmar Wolf, Martin Eilers, Manfred Gessler. Mechanisms of epigenetic and cell-type specific regulation of Hey target genes in ES cells and cardiomyocytes, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 79, 2015, Pages 79-88, ISSN 0022-2828, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.004>.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4 (1), 21-40
- Eric C. Lai; Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 1 March 2004; 131 (5): 965–973. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.01074>
- Feng Zhang, Yan Wen, Xiong Guo, (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges, *Human Molecular Genetics*, Volume 23, Issue R1, , Pages R40–R46
- Franco, N. H. (2013). Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals (Basel)*, 3(1), 238-273.
- François Giudicelli, Julian Lewis. The vertebrate segmentation clock. *Genetics & Development*; Volume 14, Issue 4, 2004, Pages 407-414, ISSN 0959-437X, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.06.014>.
- Ghosh, S. and Jacobson, A. (2010), RNA decay modulates gene expression and controls its fidelity. *WIREs RNA*, 1: 351-361. <https://doi.org/10.1002/wrna>.
- GILBERT, Scott F.; BARRESI, Michael J.F. (2019). *developmental biology*. 11.ed. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Gomez, C., Özbudak, E., Wunderlich, J. et al. Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature* 454, 335–339 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07020>
- Guilhem Faure, Aleksey Y. Ogurtsov, Svetlana A. Shabalina, Eugene V. Koonin, Papel da estrutura do mRNA no controle do dobramento de proteínas, *Nucleic Acids Research*, Volume 44, Issue 22, December 2016, Pages 10898–10911, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw671>
- Guyon, J.R., Steffen, L.S., Howell, M.H., Pusack, T.J., Lawrence, C., and Kunkel, L.M. (2007). Modeling human muscle disease in zebrafish. *Bba-Mol Basis Dis* 1772, 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.07.003>

- Hervé Acloque, Oscar H. Ocaña, Ander Matheu, Karine Rizzoti, Clare Wise, Robin Lovell-Badge, M. Angela Nieto, Reciprocal Repression between Sox3 and Snail Transcription Factors Defines Embryonic Territories at Gastrulation. *Developmental Cell*, Volume 21, Issue 3, 2011, Pages 546-558, ISSN 1534-5807, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.005>.
- Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hubaud, A., & Pourquié, O. (2014). Signalling dynamics in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(11), 709–721. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>
- Iso, T., Kedes, L., & Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 194(3), 237–255. <https://doi.org/10.1002/jcp.10208>
- Joanne R. Collier, Nicholas A.M. Monk, Philip K. Maini, Julian H. Lewis. Pattern Formation by Lateral Inhibition with Feedback: a Mathematical Model of Delta-Notch Intercellular Signalling. *Journal of Theoretical Biology*, Volume 183, Issue 4, 1996, Pages 429-446, ISSN 0022-5193, <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0233>.
- Jörg, D., Oates, A., Jülicher, F., Liao, B.-K., Webb, A., Lengyel, I., Valentin, G., Morelli, L., Soroldoni, D., & Pollakis, A. (2016). Genetic Oscillations and Vertebrate Embryonic Development. *Physical Biology*, 13(September).
- Jülich, D., Chiaw, H. L., Round, J., Nicolaije, C., Schroeder, J., Davies, A., Van Bebber, F., Busch-Nentwich, E., Dahm, R., Frank, O., Fronhöfer, H. G., Geiger, H., Gilmour, D., Holley, S., Hooge, J., Jülich, D., Knaut, H., Maderspacher, F., Maischein, H. M., ... Holley, S. A. (2005). *beamter/deltaC* and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Developmental Biology*, 286(2), 391–404.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kin Ting Kam, R., Deng, Y., Chen, Y. et al. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell Biosci* 2, 11 (2012). <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-11>
- Kragtorp, K.A. and Miller, J.R. (2007), Integrin $\alpha 5$ is required for somite rotation and boundary formation in *Xenopus*. *Dev. Dyn.*, 236: 2713-2720. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21280>

- Kuersten, S., Goodwin, E. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4, 626–637 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrg1125>
- Kume, T. (2009). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *Vascular Cell*, 1(1), 8. doi:10.1186/2040-2384-1-8
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1), 120.
- Lele, Z., and Krone, P.H. (1996). The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 14, 57-72. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00004-3](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00004-3)
- Lopez-Olmeda, J.F., and Sanchez-Vazquez, F.J. (2011). Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J Therm Biol* 36, 91-104. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.12.005>
- Ma Y, Zhang L, Huang X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. 281(23):5186-93.
- Manfred Schmid, Torben Heick Jensen.,The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends in Biochemical Sciences*. Volume 33, Issue 10, 2008, Pages 501-510, ISSN 0968-0004, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.07.003>.
- Maroto M., Dal JK, Dequeant ML, Petit AC, Pourquié O. (2005) Synchronised cycling gene oscillations in presomitic mesoderm cells require cell-cell contact. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 309-315.
- Matthews, M., Trevarrow, B., & Matthews, J. (2002). A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *Laboratory Animals*, 31(3), 34-40.
- Maurisa F. Riley, Matthew S. Bochter, Kanu Wahi, Gerard J. Nuovo, Susan E. Cole. mir-125a-5p-Mediated Regulation of *Lfng* Is Essential for the Avian Segmentation Clock, *Developmental Cell*, Volume 24, Issue 5, 2013, Pages 554-561, ISSN 1534-5807, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.024>.
- Mayr C. (2019). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(10), a034728. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- Mayr C. 2017. Regulation by 3'-untranslated regions. *Annu Rev Genet* 51: 171–194.
- Meinhardt H. (1986) Models of Segmentation. In: Bellairs R., Ede D.A., Lash J.W. (eds) *Somites in Developing Embryos*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 118. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2013-3_14
- Miguel Maroto, Robert A. Bone, J. Kim Dale; Somitogenesis. *Development* 15 July 2012; 139 (14): 2453–2456. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.069310>

- Misquitta, C.M., Iyer, V.R., Werstiuk, E.S. et al. The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem* 224, 53–67 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1011982932645>
- Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M. et al. The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435, 354–359 (2005). <https://doi.org/10.1038/nature03591>
- Narendra H. Pathak, Michael J.F. Barresi. Zebrafish as a Model to Understand Vertebrate Development. In *American College of Laboratory Animal Medicine, The Zebrafish in Biomedical Research*, Academic Press, Chapter 45, Pages 559-591, 2020, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00045-2>.
- Oates, A. C., Morelli, L. G., & Ares, S. (2012). Patterning embryos with oscillations: Structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development*, 139(4), 625–639.
- Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, Feng Zhang. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, *Cell*, Volume 157, Issue 6, 2014, Pages 1262-1278, ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.
- R.E. Baker, S. Schnell, P.K. Maini, A clock and wavefront mechanism for somite formation. *Developmental Biology*, Volume 293, Issue 1, 2006, Pages 116-126, ISSN 0012-1606, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.018>.
- Ray Keller, Cell migration during gastrulation. *Cell Biology*, Volume 17, Issue 5, 2005, Pages 533-541, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.006>.
- Reed, B., & Jennings, M. (2011). Guidance on the housing and care of zebrafish, *Danio rerio*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA.
- S.R. Naganathan, A.C. Oates, Patterning and mechanics of somite boundaries in zebrafish embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 107, 2020, Pages 170-178, ISSN 1084-9521, <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.014>.
- S.R. Naganathan, A.C. Oates, Patterning and mechanics of somite boundaries in zebrafish embryos, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 107, 2020, Pages 170-178, ISSN 1084-9521, <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.014>.)
- Schilling, T. F. (2002). The morphology of larval and adult zebrafish. In C. Nusslein-Volhard & R. Dahm (Eds.), *Zebrafish - A practical approach*. United States of America: Oxford University Press

- Schoenberg, D., Maquat, L. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, 246–259 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Sivasubbu, S., Sachidanandan, C., & Scaria, V. (2013). Time for the zebrafish ENCODE. *Journal of genetics*, 92(3), 695–701. <https://doi.org/10.1007/s12041-013-0313-4>
- Sparrow, D. B., Clements, M., Withington, S. L., Scott, A. N., Novotny, J., Sillence, D., Kusumi, K., Beddington, R. S., & Dunwoodie, S. L. (2002). Diverse requirements for Notch signalling in mammals. *The International journal of developmental biology*, 46(4), 365–374.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34.
- Tadayoshi Watanabe, Yoshiko Takahashi. Tissue morphogenesis coupled with cell shape changes. *Current Opinion in Genetics & Development*. Volume 20, Issue 4, 2010, Pages 443-447, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.05.004>.
- Thomas L. Gallagher, Kiel T. Tietz, Zachary T. Morrow, Jasmine M. McCammon, Michael L. Goldrich, Nicolas L. Derr, Sharon L. Amacher. *Pnrc2* regulates 3'UTR-mediated decay of segmentation clock-associated transcripts during zebrafish segmentation. *Developmental Biology*, Volume 429, Issue 1, 2017, Pages 225-239, ISSN 0012-1606, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.06.024>.
- Tietz, K. T., Gallagher, T. L., Mannings, M. C., Morrow, Z. T., Derr, N. L., & Amacher, S. L. (2020). Pumilio response and AU-rich elements drive rapid decay of *Pnrc2*-regulated cyclic gene transcripts. *Developmentalbiology*, 462(2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.03.017>
- van Heyningen, V. Model Organisms Illuminate Human Genetics and Disease. *Mol Med* 3, 231-237 (1997). <https://doi.org/10.1007/BF03401676>
- Varga, Z. M., Lawrence, C., Ekker, S. C., & Eisen, J. S. (2016). Universal Healthcare for Zebrafish. *Zebrafish*, 13 Suppl 1, S1-4.
- Wu, N., Liu, B., Du, H., Zhao, S., Li, Y., Cheng, X., Wang, S., Lin, J., Zhou, J., Qiu, G., Wu, Z., & Zhang, J. (2019). The Progress of CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Generating Mouse/Zebrafish Models of Human Skeletal Diseases. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17(1), 954–962.
- Yuki Sato, Kunio Yasuda, Yoshiko Takahashi; Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic fringe and Notch during somitic segmentation. *Development* 1 August 2002; 129 (15): 3633–3644. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3633>

- Zhong-Ru Xie, Hsih-Te Yang, Wei-Chung Liu, Ming-Jing Hwang. The role of microRNA in the delayed negative feedback regulation of gene expression, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 358, Issue 3, 2007, Pages 722-726, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.207>.
- Zhou, M., Yan, J., Ma, Z., Zhou, Y., Abbood, N. N., Liu, J., ... & Guo, A. Y. (2012). Comparative and evolutionary analysis of the HES/HEY gene family reveal exon/intron loss and teleost specific duplication events. *PloS one*, 7(7), e40649.
- Nitanda, Y., Matsui, T., Matta, T., Higami, A., Kohno, K., Nakahata, Y. and Bessho, Y. (2014), 3'-UTR-dependent regulation of mRNA turnover is critical for differential distribution patterns of cyclic gene mRNAs. *FEBS J*, 281: 146-156. <https://doi.org/10.1111/febs.12582>
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW in *BMC Bioinformatics*, 2017; 18(1):529
ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data.
doi: 10.1186/s12859-017-1934-z
- GraphPad Prism version 9.1.2 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com
- Gavin J. Wright, François Giudicelli, Cristian Soza-Ried, Anja Hanisch, Linda Ariza-McNaughton, Julian Lewis; DeltaC and DeltaD interact as Notch ligands in the zebrafish segmentation clock. *Development* 15 July 2011; 138 (14): 2947–2956.
doi: <https://doi.org/10.1242/dev.066654>

7. Anexo

7.1 Imunofluorescência para proteína deltaC

Para analisar a quantidade de proteínas delta C produzida os embriões foram descorionados e recolhidos com 14hpf e 18hpf depois fixados em formaldeído a 4% durante a noite a 4 °C.

Para a imunodeteção, os embriões foram lavados com 700ul de 75%MeOH/25%PBS, 50%MeOH/50%PBS e 25%MeOH/75%PBS por 5 minutos à temperatura ambiente e em agitação. Seguidamente os embriões foram lavados com 700ul de PBS/0.5% Triton X-100 4X por 5 minutos também com agitação. Posteriormente os embriões foram pré-incubados por 2-4 horas à temperatura ambiente em PBS contendo 0,5% Triton X-100, 2% BSA, 1% DMSO, 10% soro de cabra e depois incubados com anticorpo primário anti-deltaC (1:50) (Wright *et al.*, 2011) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte os embriões foram lavados 6X por 30 minutos com PBS/0.5% Triton X-100, pré-incubados por 2-4h á temperatura ambiente em PBS contendo 0,5% Triton X-100, 10% soro de cabra e depois incubados com anticorpo secundário (IgG 488 anti-coelho 1:400) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte os embriões foram lavados 6X por 30 minutos com PBS/0.5% Triton X-100 e a coloração foi observada ao microscópio Zeiss.

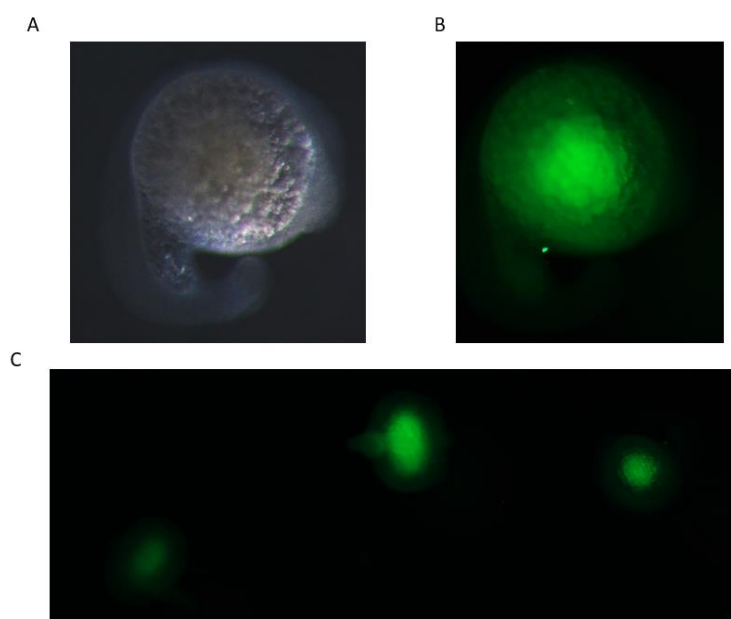


Figura 7.1: Imunofluorescência de embriões de peixe-zebra com 18hpf. A- Fotografia em campo claro. B- Embrião em A, evidenciando autofluorescência. C- Embriões com autofluorescência. A imunofluorescência não funcionou e só foi possível observar a autofluorescência do *yolk*.