

Declaração

O conteúdo, execução do trabalho experimental e interpretação de resultados são da exclusiva responsabilidade da autora.

Sílvia Filipa Vicente Gregório

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento é dirigido aos meus Pais e Irmãs pois sem eles nada disto teria sido possível. Obrigada por serem a melhor família do mundo, obrigada pelo apoio, compreensão e por nunca terem desistido de mim! Obrigada por todos os ensinamentos que fizeram de mim a pessoa que sou!

Agradeço à Prof.^a Doutora Deborah, pela oportunidade e confiança para levar a cabo este trabalho de investigação. Pelo espírito, interesse, motivação, disponibilidade e orientação. Muito obrigada por tudo.

Agradeço à Bela por tudo o que me ensinou, por ter sido incansável. Obrigada pela confiança, pelas horas, pela partilha de conhecimentos, pela boa disposição e acima de tudo pela amizade.

Agradeço ao Doutor Luca Bergenolli, à Serena e ao Massimo a disponibilidade, simpatia, conhecimentos científicos partilhados e para além disso por me terem recebido tão gentilmente em Pádua. *Grazie mille!*

À Rita Teodósio pela amizade, companheirismo e partilha de conhecimento, em Itália e no laboratório.

À Rita Costa, Ângela e Nádia por me terem ensinado algumas técnicas, e por todo o apoio e disponibilidade! Obrigada por me aturarem sempre com um sorriso!

A todos os meus colegas do Grupo de Endocrinologia Molecular e Comparada, pela boa disposição, amizade e pelo agradável ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Aos meus amigos, saberão certamente identificar-se, pela companhia, pelas experiências, pela diversão, pela boa disposição e pelos bons momentos que me presentearam durante todo o meu percurso académico.

Ao “grupo de combate”, pois sem eles a finalização desta tese teria sido bem mais difícil. Pelas horas que passámos juntos e pelo apoio! Obrigada pelos bifes de atum!!!

À D. Dina e ao Sr. Acácio pela amizade destes últimos anos e ao “staff do Monte Branco”....

Ao Paulo por TUDO ao longo deste tempo. Pela paciência, compreensão e ajuda durante a decurso do estágio e subsequente escrita. Obrigada pelo apoio e motivação!

Por perceberes quando estava mal disposta e sem paciência para nada.... Obrigada!!!!

A todas as pessoas, que embora não tenham sido mencionadas, contribuíram de algum modo para a realização desta dissertação.

Abreviaturas

APES	Aminopropiltrióxilano
ASPIC	<i>Acidic and secreted protein in cartilage</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
cm	Centímetro
COL1	Colagénio do tipo 1
Cy3	Cyanine 3
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ER	Receptor estrogénio
EP	Epiderme
EST	Espressed sequence tag
FU	Fluorescência
GE	Expressão génica (<i>gene expression</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
IHQ	Imunohistoquímica
NOD	Oligomerização do domínio nucleótido
NOD3	Oligomerização do domínio nucleótido-3
OSN	Osteonectina
PAP	Anti-peroxidase
PBS	Solução salina tamponizada com fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCNA	Antigénio nuclear de células proliferativas
PFA	Paraformaldeído
RIN	Número de Integridade do RNA
S	Escama (<i>scale</i>)
SAM	<i>Statistical Analysis of Microarrays</i>
shh	Gene sonic hedgehog
SPL	<i>Scale-pocket lining</i>
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartrato
UV	Ultra-Violeta
µl	Microlitro
3N	Controlo referente aos 3 dias
3WS	Tratado (without scale) aos 3 dias
7N	Controlo referente aos 3 dias
7WS	Tratado (without scale) aos 3 dias

Resumo

Em peixes os mecanismos por detrás da regulação da pele e escamas face a alterações na homeostasia do cálcio estão pouco estudados. Esta tese pretende contribuir para a identificação dos transcriptos presentes na pele de peixe e a forma como eles alteram em resposta a uma modificação, através da remoção de uma grande percentagem de escamas; identificar as células características da escama utilizando de marcadores moleculares e avaliar as consequências morfológicas de remoção de escamas e a sua regeneração durante 3 e 7 dias em relação ao controlo. O organismo usado para este estudo foi a dourada (*Sparus auratus*), recentemente escolhido como um modelo para espécies aquícolas e para as quais existem numerosos recursos moleculares.

A pele removida foi utilizada para extração de RNA e análise histológica. O RNA total de pele/escama foi hibridado com um oligo-array de dourada, de forma a identificar diferenças de expressão entre genes dos grupo controlo e tratados. Da técnica de microarray obtiveram-se resultados reprodutíveis e os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o programa SAM (Significance Analysis of Microarrays). No grupo de peixes 3 dias após a remoção de escamas um total de 247 sondas estavam diferencialmente expressas em relação ao controlo do dia 3, dessas 82 estão up-reguladas e as restantes down-reguladas. Por outro lado, no grupo dos 7 dias após a remoção de escamas apenas 14 sondas tinham uma expressão diferencial.

Para associar as alterações no transcriptoma com morfologia pele, foram realizados ensaios histoquímicos.

Através da utilização de um marcador enzimático (TRAP) foi possível verificar a existência de osteoblastos nos tecidos controlo e tratado, mas não foram observadas mudanças significativas. Em relação à OSN foi realizada imunohistoquímica onde só foi detectado sinal no tecido controlo, com os marcadores pCNA e ASPIC foi detectado um aumento do sinal no tecido controlo para o tratado e para os tempos de amostragem.

Palavras-chave: Dourada (*Sparus aurata*); regeneração; microarray; pele; escamas; histologia.

Abstract

In fish the mechanisms underlying the regulation of skin and the contribution of scales to the maintenance of calcium homeostasis are rarely studied. The present thesis aims to contribute to understanding the regeneration of skin and scales in response to mechanical injury caused by the removal of a large number of scales. Changes in the skin transcriptome during its regeneration is characterised using a microarray and the morphological changes in skin which accompany re-growth of scales are determined using histology of skin samples 3 and 7 days after scale removal. The organism used for the study is the sea bream (*Sparus auratus*), a Perciforme recently chosen as a model for aquaculture species and for which numerous molecular resources exist.

Skin was removed and used for extraction of RNA and histological analysis. Total RNA from skin/scale from intact sea bream or those exposed to mechanical stress was extracted and used in microarray studies using an oligoarray developed for sea bream which contained 19.715 oligonucleotides. The results obtained, using the technique of microarray, are reproducible and the data were statistically analyzed using the program SAM (Significance Analysis of Microarrays). In samples of skin collected 3 days after removal of scales a total of 247 probes were differentially expressed in relation to the control skin samples. In samples of skin collected 7 days after scale removal only 14 probes were differentially expressed in relation to the control fish.

To associate the changes in the transcriptome with skin morphology histochemical studies were carried out. TRAP a marker of osteoblasts revealed the presence of these cells in both control and regenerating tissue but no significant changes were observed. A strong immunoreaction was detected for osteonectin (OSN), but only a weak signal was found in regenerating skin. In contrast, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a marker of proliferation was more abundant in regenerating skin as was Acid secreted protein in cartilage (ASPIC) in regenerating tissue and the immunoreaction was largely associated with the basement membrane.

Key-words: Sea bream (*Sparus aurata*); regeneration; microarray; skin; scales; histology.

ÍNDICE

Agradecimentos	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – A pele	2
1.1.1 A pele dos Humanos	2
1.1.2 - Função da pele no Homem	3
1.1.3 Função da pele/ escamas dos peixes	4
1.1.4 Estrutura e organização da pele nos peixes ósseos	4
1.1.4.1 - Epiderme	4
1.1.4.2 - Derme	5
1.1.4.3 – Hipoderme	6
1.1.5 - Escamas ósseas/ Desenvolvimento	6
1.2 – Sistema Imunitário dos Peixes	9
1.2.1 – Sistema imunológico específico	9
1.2.2 – Sistema imunológico não específico	10
1.3 – Regeneração – danificação do tecido	11
1.4 – Processo morfológico de regeneração das escamas:	12
1.4.1 – Rápida produção da matriz da camada óssea:	13
1.5 – Técnicas para avaliar o processo de regeneração da escama	13
1.6 - A Dourada como espécie modelo	14
2 – OBJECTIVOS	16
3 - MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Material biológico	17
3.2 Manipulação experimental	19
3.3 Desenho experimental	19
3.4 Microarray	20
3.4.1 Extracção de RNA	21
3.4.2 Qualidade e quantificação de RNA	22
3.4.3 Purificação do RNA	23
3.4.4 Amplificação do RNA	23
3.4.5 Normalização	24
3.5 Técnicas de Histologia	25
3.5.1 Cortes histológicos	25
3.5.2 Técnica de coloração – (Hematoxilina-Eosina)	26
3.5.3 Tratamento com fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP)	26
3.5.4. IHC – Imunohistoquímica	26
4 - RESULTADOS	29
4.1 – MICROARRAY	29
4.1.1 – Quantificação do RNA	29
4.1.2 Normalização	40
4.1.3 Análise descritiva em termos de sondas	42

4.1.3.1 Análise estatística dos grupos	42
4.2 – HISTOLOGIA	46
4.2.1 Organização geral da pele dos peixes	46
4.2.2 Histoquímica	47
4.2.2.1 Demonstração da actividade da TRAP – fosfatase acida resistente ao tartarato	48
4.2.3 Imunohistoquímica	48
4.2.3.1 Expressão da osteonectina	49
4.2.3.2 Expressão do PCNA- antígeno nuclear de células proliferativas	49
4.2.3.3 Expressão da ASPIC	50
5 - DISCUSSÃO	52
Referências Bibliográficas	58
Anexos	67