
5 - DISCUSSÃO

O interesse científico na biologia da dourada está continuamente a crescer devido principalmente ao seu valor como espécie de aquacultura. Tal como a posição na taxonomia e o tamanho relativamente pequeno do seu genoma, isto faz com que seja um bom modelo para a biologia evolutiva e genética comparativa (Sarropoulou *et al.*, 2005).

A tecnologia do microarray provou ser valiosa para a tecnologia e melhoria da eficácia das abordagens tradicionais para o estudo da estrutura e função do genoma (Schena, 1995; Lynch, 2004). A tecnologia do microarray permite a análise simultânea de milhares de genes para aplicação a nível do transcriptoma (usado para obter uma visão geral e função do gene) e para comparações genómicas (Lynch, 2004). A técnica de microarray permite a análise comparativa da expressão de vários genes perante uma dada situação experimental, sendo assim possível identificar associações a determinadas modificações experimentais que podem indicar uma função de muitos genes ainda não anotados ou com pouca informação sobre eles. O número relativamente baixo de sequências expressas anotadas parece ser uma grande limitação da maioria dos projectos de sequenciação EST e microarray em peixes para comercialização, mesmo nas espécies onde o transcriptoma já foi caracterizado com profundidade (Ferraresso *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, têm surgido muitos estudos com o intuito de melhorarem os recursos no desenvolvimento de estudos do genoma de vários organismos. O uso da ferramenta do microarray intervém como um recurso utilizado na análise comparativa de vários genes, permitindo descobrir novos marcadores moleculares ou até mesmo ajudando melhorar uma espécie para produção. Por exemplo, descobrir novos marcadores moleculares envolvidos na regeneração da barbatana em medaka e peixe-zebra (Kudo *et al.*, 2007, 2009); encontrar genes candidatos mais sensíveis a biomarcadores de estrogénio em truta juvenil (Larsson *et al.*, 2007); ou melhorar os conhecimentos a nível de mecanismos fisiológicos envolvidos na reprodução, crescimento e sistema imune para otimizar as condições de produção de uma determinada espécie (Cerdà *et al.*, 2008).

Em relação ao modelo de estudo seleccionado para este trabalho, a nível da técnica de microarray, a dourada não apresenta muitos estudos. Avaliou-se o perfil da expressão genética da dourada durante o desenvolvimento precoce e detectaram-se genes relacionados com o stress através da aplicação da tecnologia do microarray de cDNA (Sarropoulou *et al.*, 2005). O outro grupo de investigadores desenvolveu e validou um oligo microarray para expressão de genes com o intuito de cruzar dados para melhorar a compreensão da influência da nutrição, stress e doenças, para melhorar a resposta imune e produção deste organismo para aquacultura (Ferraresso *et al.*, 2008).

No presente estudo pretendeu-se investigar quais os genes envolvidos aquando a manipulação dos reservatórios internos de cálcio na dourada e também estudar o efeito da regeneração das escamas. Para tal, foram amostrados peixes após 3 e 7 dias da manipulação, assim como os respectivos controlos, o tempo de amostragem foi escolhido com base em bibliografia que descreve que ao final de 5 dias a taxa de regeneração é superior a 45% após a remoção das escamas (Ohira *et al.*, 2007). No grupo dos peixes amostrados após 3 dias obteve-se um total de 247 sondas diferencialmente expressas onde, destas, 119 sequências não estavam anotadas. No que respeita ao grupo de 7 dias apenas 14 genes apresentaram diferenças na expressão e destes apenas 50% estão anotados. Contudo a percentagem de transcritos anotados é esperada que aumente num futuro próximo, quando outros projectos de sequenciação de genoma de peixes (p.e. *Nile tilapia*, *Atlantic salmon*) ficarem disponíveis (Ferraresso *et al.*, 2008).

No grupo alusivo ao tempo de amostragem de 7 dias, os resultados demonstram uma resposta específica, pois obtivemos 11 transcritos up-regulated e 8 down-regulated. Os transcritos da base de dados indicam genes relacionados com função a nível da activação das células T (gene NOD3, nucleotide-binding oligomerization domain protein 3) que são essenciais para a resposta imune. O NOD (oligomerização do domínio nucleótido) pertence a um grupo especializado de proteínas intracelulares, que têm um papel importante na regulação da resposta imune host innate (Franchi *et al.*, 2008).

Outro gene que surge na base de dados é a ubiquitina que tem como função, entre outras, reparar o DNA. Estudos recentes sobre a reparação do DNA e a via de resposta a danos no DNA, têm aumentado significadamente o papel da ubiquitina, para que esta

.....
possa incluir esta função. Estas vias envolvem a reparação das principais proteínas do DNA que têm funções reguladoras na síntese do mesmo (Huang et al., 2006).

O decréscimo do número de transcritos com aumento significativo de transcrição no peixe tratado relativamente ao peixe controlo, pode indicar que ao final de 7 dias os tecidos estão num processo de regeneração avançado.

A validação dos dados do microarray através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) não foi realizada até ao termo deste trabalho científico, contudo faço uma breve referência a dois genes incluídos nos dados obtidos. A escolha destes genes depreende-se com o facto de ambos estarem ligados com o tema deste trabalho, quer a nível da constituição das escamas (colagénio) quer a nível da mobilização do cálcio (estrogénio).

Baseado em trabalhos realizados com outros vertebrados, uma validação parcial do trabalho foi possível analisando genes candidatos com a previsão de serem modificados pelo tratamento. O colagénio tipo I (COL1) surge numa amostra do grupo dos 3 dias, onde é mais expresso no grupo tratado em relação ao controlo. Este gene codifica as cadeias pró-alfa1 de colagénio tipo I cuja tripla hélice compreende duas alfa1 correntes e uma cadeia alfa2. O tipo I é uma fibrilha formadora de colagénio encontrado na maioria dos tecidos conjuntivos e é abundante no osso, córnea, derme e nervo. Em teleósteos, foi demonstrado que os ossos, escamas, bem como a pele são muito ricos em colagénio (Gomez-Guillen, 2002).

Nalguns tecidos conectivos, as fibrilhas de colagénio estão altamente organizadas formando estruturas compactas de colagénio. Estruturas semelhantes foram descritas na placa basal das escamas dos peixes ósseos (Garrone et al., 1997; Giraud et al., 1978).

O principal componente do osso é o COL1 e foi demonstrado que este afecta a expressão dos fenótipos e funções específicas das células ósseas. O COL1 induz a diferenciação osteoblástica em células da medula óssea e, estudos realizados, mostram que células tratadas com COL1 formam tecidos mineralizados três semanas após o tratamento (Karaplis & Goltzman, 2000).

Por outro lado surge também o receptor estrogénio (ER) numa amostra do grupo dos 3 dias, onde é mais expresso no grupo tratado em relação ao controlo. Estudos sobre a localização da proteína ER podem contribuir para esclarecer o envolvimento de cada subtipo de ER e as funções específicas em peixes, tais como aquelas associadas à

.....
mobilização de cálcio em tecidos calcificados. As escamas constituem um tecido mineralizado de fácil obtenção e contêm tipo de células similares às do osso. (Redruello et al., 2005) Estudos recentes mostram que o ER é abundante nas regiões internas e externas das escamas dos peixes. As proteínas ER foram detectadas em diferentes regiões das escamas e a variação da localização da intensidade do sinal, sugere que o ER pode ter diferentes funções em diferentes espécies de peixes durante o seu “ciclo de vida”. (Pinto et al., 2009).

Em teleósteos, as escamas mineralizadas dentro das concavidades da derme, são regeneradas rapidamente quando são perdidas ou removidas experimentalmente (Sire et al., 2000). O desenvolvimento, a estrutura e a regeneração das escamas nestes peixes sugere que as interações entre a epiderme e a derme estão envolvidas na diferenciação e crescimento da escama. No entanto, a remoção da epiderme numa pequena área (1,5 cm²) do peixe, pode provocar um lento processo de desenvolvimento de regeneração das escamas (Sire & Akimenko, 2004; Sire & Huysseune, 2003). No presente trabalho, a regeneração das escamas foi rápida, mesmo a área de intervenção sendo de cerca de 80% da área total do peixe. Por exemplo, nos peixes da amostragem ao fim de 3 dias após remoção foi possível observar algumas escamas regeneradas.

Nos mamíferos, o osso é formado e mantido pela remodelação contínua através da reabsorção do osso por células reabsorventes, os osteoclastos, e a subsequente formação de osso novo por células formativas, os osteoblastos (Manolagas, 2000).

Em relação à actividade enzimática do marcador TRAP, esta foi observada (cor avermelhada característica da reacção enzimática) preferencialmente em tecido sem escamas, tanto para os 3 como para os 7 dias, sugerindo a existência de actividade osteoclástica. Osteoclastos são caracterizados pela sua elevada actividade de fosfatase ácida, particularmente a actividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), sendo este o marcador enzimático mais amplamente utilizado para a identificação dos osteoclastos (Kyoichi Azuma, 2007). Recentemente, para estudar a regulação de precursores que possam controlar a expressão da OSN em estruturas calcificadas, utilizou-se escamas de dourada (*S. autara*) num bioensaio *in vitro* (Redruello et al., 2005). Isto porque, as escamas têm a vantagem de 1) possuírem elevados níveis de

OSN, 2) serem facilmente removidas e cultivadas, 3), a organização do tecido é relativamente simples e 4) porque contém tecido mineralizado que actua como um reservatório de cálcio (Weiss e Watabe, 1979).

Os resultados obtidos na avaliação de expressão de OSN, indicam que houve expressão tanto nos peixes de 3 dias sem escamas como nos de 7 dias, mas com diferentes níveis. A expressão de OSN foi mais frequente e intensa nas zonas próximas da camada basal. Sendo a OSN uma proteína presente na matriz extracelular, esta expressão pode dever-se à mineralização da matriz e subsequente actividade osteoblástica. A existência de uma redução da osteonectina em mRNA de escamas de *Carassius auratus* (Lehane et al., 1999), sugere que esta pode agir sobre as células responsáveis pela mineralização da matriz através da regulação da expressão de proteínas extracelulares envolvidas nestes processos (Pinto et al., 2009).

Demonstrou-se com alguns estudos que a osteonectina (OSN) está presente em vários tecidos de peixes teleosteo (Tang & McKeown, 1997; Redruello et al., 2005). Entre os tecidos calcificados de dourada, nas escamas foram detectados níveis elevados de expressão de OSN, apoiando a ideia de que os osteoblastos são uma fonte da OSN em escamas de douradas (Pinto et al., 2009).

Com o marcador de proliferação foi possível visualizar uma diferença significativa entre os cortes de tecidos com escamas em relação aos tecidos sem escamas. Os tecidos (Figura 22) com sem escamas tanto aos 3 dias como aos 7 dias apresentam células com núcleos intensos na zona basal da epiderme o que indica proliferação das células. Os resultados mostram que há um número elevado de células positivas PCNA no tecido com 7 dias em relação ao de 3 dias e em relação aos controlos. Este facto pode dever-se ao aumento de células em proliferação para remodelação do tecido. Num outro estudo realizado também se verificou que as células proliferativas, identificadas por células PCNA-positivas, foram observadas principalmente nas camadas média e basal da epiderme (Mazon et al., 2007)

A proteína *Acidic and secreted protein in cartilage* (ASPIC) é um marcador de condrócitos, estas células estão descritas como estando presentes na cartilagem. Nas amostras analisadas (Figura 23) a ASPIC é expressa tanto nos controlos como nos

.....
tecidos sem escamas de 3 e 7 dias. Contudo verifica-se um aumento na expressão nos tecidos sem escamas. Esta expressão denota-se na periferia das células (no espaço intracelular).

Posso assim concluir que através da técnica de microarray foi possível constatar que a remoção de uma grande percentagem de escamas na dourada provoca a expressão diferencial de alguns genes em relação ao controlo.

Em relação ao uso de marcadores específicos foi possível identificar a actividade de três marcadores de células características de osso/cartilagem, que estão presentes nas escamas, indicando actividade nos tecidos consoante o tratamento.

Através da complementação dos dados do microarray com os da histologia, verifica-se que ao final de 7 dias é possível observar escamas regeneradas.

As escamas de dourada são um bom modelo para estudar os efeitos nas estruturas mineralizadas quando sujeitas a um tratamento, e poderão ser consideradas como potenciais bioensaios.

Contudo há que validar os resultados do microarray, procedendo à escolha de alguns genes alvo para a realização de um PCR quantitativo em tempo real qRT-PCR.