



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rita Carolina Rodrigues Abreu

**FUNÇÃO DA ELASTINA NO DESENVOLVIMENTO DAS
CALCIFICAÇÕES ECTÓPICAS DA CARTILAGEM
ASSOCIADAS A UMA DEFICIÊNCIA EM MGP
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DE KEUTEL**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial,
orientada pela Professora Doutora Maria Joana Lima Barbosa Melo e pela
Professora Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca e apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**FUNÇÃO DA ELASTINA NO
DESENVOLVIMENTO DAS CALCIFICAÇÕES
ECTÓPICAS DA CARTILAGEM ASSOCIADAS
A UMA DEFICIÊNCIA EM MGP**
Contribuição para o estudo da Síndrome de
Keutel

Rita Carolina Rodrigues Abreu

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial, orientada pela Professora Doutora Maria Joana Lima Barbosa Melo e pela Professora Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Função da elastina no desenvolvimento das calcificações ectópicas da cartilagem associadas a uma deficiência em MGP

Declaração de autoria de trabalho

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

(Rita Carolina Rodrigues Abreu)

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.” –
Marie Curie*



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Leonor Cancela por ter aceite ser minha orientadora e por todo o apoio e aconselhamento prestado. Um enorme obrigado, ao Doutor Paulo Gavaia e ao Doutor João Santos que estiveram sempre disponíveis para esclarecer as minhas questões e transmitir informação e conhecimento. Obrigado também, à minha orientadora Doutora Joana Barbosa Melo.

Um agradecimento geral a todos os investigadores do *Bioskel*, que de certa forma ajudaram e tornaram mais fácil a realização desta etapa, em particular à Katia Pes que esteve sempre disponível a ajudar.

Queria também agradecer à Carolina Rodrigues e ao Pedro Nascimento por terem sido incansáveis, não só dentro, como fora do laboratório. Obrigado por toda a paciência, dedicação e carinho durante este período.

Um obrigado especial aos meus amigos e “xinhas”, que estiveram sempre presentes nas alturas mais difíceis e nunca me deixaram desistir. Obrigada por terem sido o ombro que necessitava e a amizade que levarei para o resto da vida.

Obrigada Madison Marum e Débora Carmo, por serem as minhas irmãs de coração, que apesar da distância, não deixam de demonstrar o vosso apoio e afeto.

Não podia deixar de agradecer à minha avó por ter sido sempre um exemplo de mulher e por me transmitir os valores que tenho hoje.

Por fim, o maior agradecimento, aos meus pais por todo o amor, esforço e tempo investido em mim e nos meus sonhos. Obrigada por acreditarem sempre e estarem ao meu lado quando mais preciso, por serem o meu porto seguro e a minha maior motivação para crescer e conquistar aquilo que desejo.

Muito obrigado a todos!

Resumo

A elastina é um componente importante da matriz, que tem como principal função conferir elasticidade a diversos tecidos e órgãos. Quando se encontra mutada, a sua função pode ficar comprometida e levar à manifestação de diversas doenças ou síndromes ou contribuir para sintomas mais severos associados a outras mutações.

A síndrome de Keutel é caracterizada pelo aparecimento de calcificações ectópicas em tecidos moles, causadas pela deficiência da proteína Gla da matriz (MGP). Além disso, diversos estudos já demonstraram que a haploinsuficiência de elastina está correlacionada com os processos de calcificação ectópica decorrentes desta síndrome, devido ao seu papel como nucleador mineral.

Assim sendo, decidiu-se investigar se o conteúdo de elastina é um determinante crítico para a calcificação ectópica da cartilagem ou vascular, usando um modelo de peixe-zebra mutante para a elastina. Para tal, caracterizou-se o fenótipo do mutante da elastina, analisou-se a calcificação ectópica devido à exposição com varfarina e observou-se as alterações provocadas por um cruzamento entre um mutante para elastina e um mutante heterozigoto para Mgp.

Alguns dos resultados obtidos apoiam a hipótese inicial, demonstrando que a elastina possui um papel importante na calcificação ectópica vascular.

Palavras-chave: Elastina, Síndrome de Keutel, calcificação ectópica, peixe-zebra.

Abstract

Elastin is an important component of the matrix, whose main function is to provide elasticity to various tissues and organs. When mutated, this function can be compromised, leading to the manifestation of several diseases or syndromes, or contribute to more severe symptoms associated with other mutations.

Keutel syndrome is characterized by the appearance of ectopic calcifications in soft tissues, caused by MGP deficiency. Several studies have shown that elastin haploinsufficiency is correlated with ectopic calcification processes resulting from this syndrome, due to its role as a mineral nucleator.

Therefore, the main objective was to investigate whether elastin content is a critical determinant for cartilage and vascular ectopic calcification, using an elastin mutant zebrafish model. Accordingly, the phenotype was characterized, and both ectopic calcification due to exposure to warfarin and the changes caused by a cross between an elastin mutant and a heterozygous mutant for *Mgp* were analysed.

Some of the results obtained support the initial hypothesis, demonstrating that elastin plays an important role in vascular ectopic calcification.

Keywords: Elastin, Keutel Syndrome, ectopic calcification, zebrafish.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice	IV
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas e Siglas	X
1. Introdução	1
1.1. Elastina	1
1.1.1. Elastogénese	1
1.1.2. Propriedades da Elastina	3
1.1.3. Doenças associadas à Elastina	3
1.1.3.1. Cutis Laxa Autossómica Dominante (gene ELN)	3
1.1.3.2. Síndrome de Williams (SW) ou Williams-Beuren	4
1.1.3.3. Estenose Aórtica Supravalvular (EAS).....	5
1.2. Síndrome de Keutel	6
1.2.1. Patologia e mecanismo associado	6
1.2.2. Descrição clínica.....	7
1.2.3. Relação entre a Elastina e a Síndrome de Keutel.....	7
1.2.4. Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico.....	8
1.3. Proteína Gla da Matriz.....	9
1.3.1. Caracterização do gene.....	9
1.3.2. Caracterização da proteína	9
1.3.3. Vitamina K.....	12
1.3.4. Consequências da ausência de MGP.....	14
1.4. Calcificação do sistema vascular.....	15
1.5. Peixe-zebra como modelo	17
1.5.1. Elastina no peixe-zebra	18
II. Objetivos	20
III. Materiais e Métodos	21
3.1. Linhas de estudo e condições de manutenção	21
3.2. Genotipagem	23
3.3. Análises Biométricas e Análise do fenótipo	26
3.4. Tratamento com Varfarina.....	28
3.5. Protocolo de coloração com Alizarin Red	30
3.6. Protocolo de preparação de lâminas, fixação e obtenção de cortes histológicos em GMA e parafina	31
3.7. Protocolo para a coloração com Von Kossa	37

3.8. Protocolo de coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson.....	38
3.9. Protocolo de imunofluorescência	40
IV. Resultados	42
4.1. Genotipagem	42
4.2. Análises biométricas e análises do fenótipo	44
4.3. Tratamento com varfarina	48
4.4. Coloração com Alizarin Red	51
4.5. Coloração com Von Kossa	54
4.6. Coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson.....	59
4.7. Imunofluorescência	61
V. Discussão	63
VI. Conclusões e perspectivas futuras	67
VII. Referências	69

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática do processo de elastogénese.

Figura 2- Representação clínica de dois doentes afetados pela patologia cutis laxa autossómica dominante, ligada ao gene *ELN*. Adaptada de Okuneva et.al. (2019).

Figura 3- Representação clínica de duas crianças com 10 e 21 meses, respetivamente. Adaptada de Morris C.A. (2010).

Figura 4- Ressonância magnética cardíaca de um doente com estenose aórtica supra-avalvular onde é possível observar a estenose. Adaptada de Carr et.al. (2018).

Figura 5- Dismorfias faciais de um doente do sexo feminino com síndrome de Keutel. Adaptada de Perrone et.al. (2018).

Figura 6- Estrutura molecular da proteína Gla da matriz e os seus domínios. Adaptada de Cancela et. al. (2014).

Figura 7- Processo de ativação da MGP. Adaptada de Wei et. al. (2019).

Figura 8- Secreção da MGP. Adaptada de Wei et. al. (2019).

Figura 9- Ciclo da vitamina K. Adaptada de Imbrescia et. al. (2022).

Figura 10- Ação da varfarina no ciclo da vitamina K. Adaptada de Imbrescia et. al. (2022).

Figura 11- Esquema representativo de fenótipos associados a patologias causadas pela deficiência em MGP.

Figura 12- Imagem de um peixe-zebra adulto com 1 ano e meio de idade.

Figura 13- Vantagens da utilização de peixe-zebra como modelo animal experimental.

Figura 14- Diferentes locais de expressão do gene *elna* e o gene *elnb*.

Figura 15- Representação esquemática do gene *elna* no mutante Sa17177.

Figura 16- Representação esquemática do gene *elna* no mutante Sa42459.

Figura 17- Cruzamentos da linha Sa17177.

Figura 18- Cruzamentos da linha Sa42459.

Figura 19- Cruzamento entre mutantes para a elastina e mutantes para a Mgp.

Figura 20 – Representação do comprimento standard de uma larva de 10 dpf (traço vermelho).

Figura 21- Esquema do primeiro tratamento com Varfarina para a linha Sa17177.

Figura 22- Esquema do segundo tratamento com Varfarina para a linha Sa17177.

Figura 23- Esquema da coloração de Alizarin Red para a linha Sa17177.

Figura 24- Esquema representativo do protocolo de preparação de lâminas em Tespa.

Figura 25- Esquema representativo do protocolo de fixação em GMA para a linhagem Sa17177.

Figura 26- Esquema da obtenção de cortes histológicos fixados em GMA.

Figura 27- Timeline dos protocolos realizados para a linha Sa17177 e para a linha mutante para a elastina e para a Mgp.

Figura 28- Média do comprimento standard (mm) do primeiro cruzamento.

Figura 29- Média do comprimento standard (mm) do segundo cruzamento.

Figura 30- Média do comprimento standard (mm) do terceiro cruzamento.

Figura 31– Malformações na estrutura observadas em 3 peixes homozigóticos no dia 5 pf do primeiro cruzamento.

Figura 32– Malformações na estrutura observadas em 4 peixes homozigóticos no dia 10 pf do segundo cruzamento.

Figura 33– Malformação na estrutura observada em um peixe homozigótico no dia 10 pf do terceiro cruzamento.

Figura 34– Hemorragias encontradas nos peixes-zebra $eln^{+/+}$ e $eln^{-/-}$ durante o tratamento com varfarina.

Figura 35– Taxa de mortalidade do segundo cruzamento ao longo do tratamento com varfarina.

Figura 36– Taxa de mortalidade do terceiro cruzamento ao longo do tratamento com varfarina.

Figura 37- CTCF de peixes-zebra da linha Sa17177 com 30 dpf.

Figura 38- Espaçamento vertebral médio de peixes-zebra da linha Sa17177 com 30 dpf.

Figura 39- CTCF de peixes-zebra da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e Mgp com 20 dpf.

Figura 40- Espaçamento vertebral médio de peixes-zebra da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e Mgp com 20 dpf.

Figura 41- Coração com coloração de Von Kossa – linha Sa17177.

Figura 42- Rim com coloração de Von Kossa- linha Sa17177.

Figura 43- Coração com coloração de Von Kossa – linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp.

Figura 44- Rim com coloração de Von Kossa – linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp.

Figura 45- Coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp.

Figura 46- Imunofluorescência em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp (eln^{+/+}, eln^{+/-}, eln^{-/-} e eln^{+/-} e mgp^{+/-}).

Figura 47- Núcleos marcados com DAPI em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp (eln^{+/+}, eln^{+/-}, eln^{-/-} e eln^{+/-} e mgp^{+/-}).

Lista de Tabelas

Tabela 1- Domínios da Proteína Gla da matriz e as suas funções. Tabela adaptada de Cancela et. al. (2014).

Tabela 2- Diferenças nas características dos genes *elna* e *elnb* do peixe-zebra e do gene *ELN* humano.

Tabela 3- Informações sobre os primers utilizados para a linha Sa17177.

Tabela 4- Informações sobre os primers utilizados para a linha Sa42459.

Lista de Abreviaturas e Siglas

MEC – Matriz extracelular

ELN - Elastina

LOX - Lisil-oxidase

CLAD - Cutis laxa autossômica dominante

SW - Síndrome de Williams

EAS - Estenose aórtica supra-avalvular

MGP - Matrix Gla Protein, em português Proteína Gla da matriz

SK - Síndrome de Keutel

FGF - Fibroblast growth factor

SP - Specificity protein

Runx2 - RUNX Family Transcription Factor 2

KO - Knockout

dp-ucMGP - MGP não carboxilado nem fosfatado

p-cMGP - MGP carboxilado e fosfatado

µg/dia - microgramas por dia

VKOR - Vitamin K epoxide reductase, em português Vitamina K epóxido redutase

elna- Elastina a

elnb - Elastina b

hpf - Horas pós fertilização

mRNA - Rna mensageiro

µS- condutividade

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ml- Mililitro

µL- Microlitro

mM- Milimolares

µm – Micrómetro

NaOH- Hidróxido de Sódio

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

Tris-HCL- Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

PCR- Polimerase chain reaction

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

dNTPs- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

H₂O- Água

TAE- Tampão Tris-Acetato-EDTA

Kb- Kilobases

bp- Pares de bases

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

eIn^{+/+}- *Wild-type*

eIn^{+/-}- Heterozigótico

eIn^{-/-}- Homozigótico

eIn^{+/-}mgp^{+/-}- Heterozigótico para a elastina e para a Mgp

dpf- Dias pós fertilização

PFA- Paraformaldeído

PBS- Tampão fosfato-salino

GMA- *Glycolmethacrylate Embedding*

g- Gramas

PBT- Tampão fosfato-salino mais Triton

DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole

pf- Pós fertilização

CTCF- Corrected total cell fluorescence

Função da elastina no desenvolvimento das calcificações ectópicas da cartilagem associadas a uma
deficiência em MGP – Contribuição para o estudo da Síndrome de Keutel

Mm – Milímetros

% - Percentagem

°C – Graus Celsius

I. Introdução

1.1. Elastina

A matriz extracelular (MEC) é responsável pela integridade estrutural de diversos tecidos e órgãos, além de contribuir para uma variedade de processos biológicos.¹⁻⁵

A fibra elástica, constituída por elastina (aproximadamente 90%) e miofibrilas, é um componente importante da MEC. Estas fibras estão presentes em artérias, pulmões, ligamentos vertebrais, cartilagem e pele, contribuindo assim para o seu normal funcionamento. A sua estrutura e função variam consoante a organização e composição nos respetivos tecidos.^{1-4,6,7}

A elastina (ELN) é uma proteína estável e insolúvel, formada através da reticulação do seu precursor, a tropoelastina, por ação da enzima lisil-oxidase (LOX). A tropoelastina é um monómero com um tamanho variável entre 60 e 70 kDa, dependendo do processamento do RNA resultante da remoção alternada de intrões (*splicing* alternativo).^{1,3,4,7,8}

Quando a função da ELN está comprometida, pode causar doenças, como aterosclerose, diabetes e síndrome de Williams-Beuren, ou contribuir para outras patologias como a síndrome de Keutel.^{2,5,9-14}

1.1.1. Elastogénese

A formação de elastina requer a organização de diversos processos importantes. Inclui o processo de transcrição e tradução da tropoelastina, processamento, secreção e entrega da proteína nos diferentes locais de elastogénese, alinhamento dos monómeros e por fim, a ação da enzima lisil-oxidase que produz o polímero de elastina.^{1,3,4,7,15}

No ser humano, o gene *ELN* que codifica a tropoelastina, está localizado na região 7q11.2, sendo composto por 34 exões. A sua transcrição resulta em diversas isoformas, provenientes do processo de *splicing* alternativo. Estas isoformas são usadas para ajustar a função estrutural da proteína em diferentes tecidos. Contudo,

quando ocorrem mutações ou deleções podem levar a distúrbios, como cútis laxa, estenose aórtica supra-avalvar e síndrome de Williams-Beuren.^{1,2,5,14,16,17}

Nos humanos, a elastogénese começa entre o final do período fetal e o início do período neonatal. A elastina é produzida por diferentes tipos celulares, tais como, células musculares lisas, células endoteliais, células mesoteliais, fibroblastos e condroblastos. Após a sua deposição, não existe mais produção de elastina e a sua renovação é quase nula, exceto se ocorrem lesões nos tecidos.^{1,6,18-20}

Para que ocorra a reticulação da tropoelastina e consequente formação de elastina são necessários dois processos essenciais, a coacervação e o *crosslinking*. A coacervação é o mecanismo de alinhamento e agregação das moléculas de tropoelastina, com o aumento da temperatura. No *crosslinking*, a enzima lisil-oxidase oxida os resíduos de lisina presentes na tropoelastina, transformando-os em alisina. Esta por sua vez, é um precursor ativo das várias ligações cruzadas encontradas na elastina. Este processo fornece integridade estrutural e funcional à proteína.^{1,3,6,8,21}

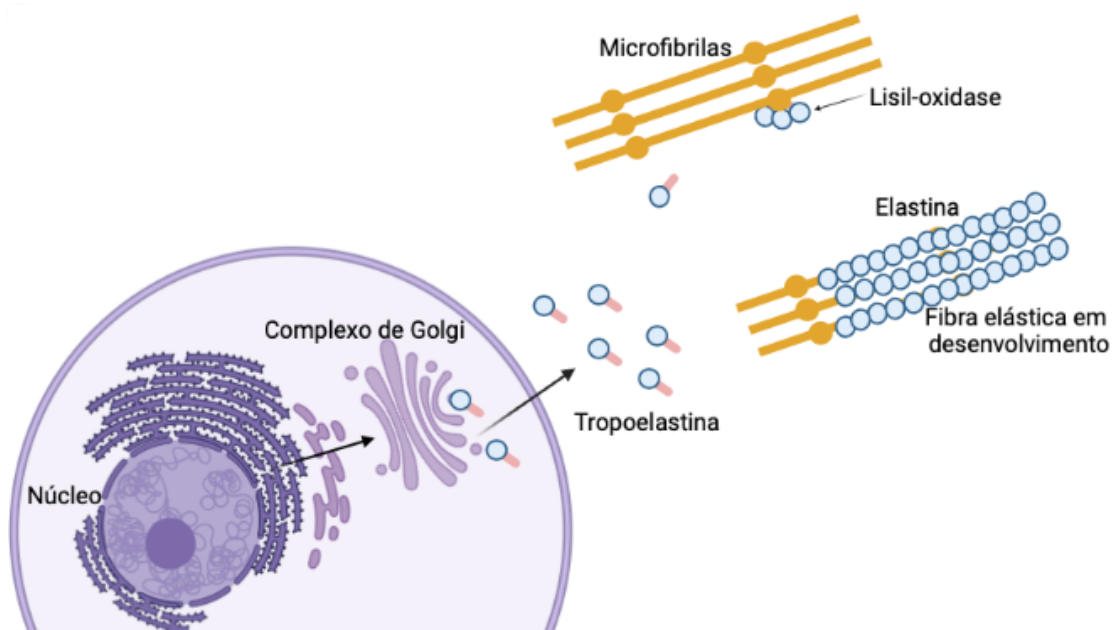


Figura 1- Representação esquemática do processo de elastogénese. Começa com a transcrição, tradução da tropoelastina, processamento, secreção e entrega da proteína seguido do alinhamento dos monómeros e por fim, a ação da enzima lisil-oxidase, que produz o polímero de elastina. Figura produzida através da aplicação BioRender.

1.1.2. Propriedades da Elastina

A estrutura da elastina é dependente da quantidade de água e temperatura envolvida. Quando seca, esta proteína é sólida, dura e frágil, todavia, quando se encontra húmida, torna-se flexível e elástica, sendo capaz de sofrer forças extensivas e compressoras sem fraturar.^{1,2,4,7}

Macroscopicamente a elastina apresenta uma estrutura amorfa. Contudo, observada com maior exatidão, é possível constatar que possui uma subestrutura fibrilar composta por filamentos alinhados paralelamente, em forma de corda torcida.^{1,7}

ELN tem como principal função conferir elasticidade a diversos tecidos e órgãos. Além disso, estudos demonstram que também auxilia na sinalização celular e regula a morfogénese da ramificação de terminais pulmonares e arteriais.^{1,3,4,7}

1.1.3. Doenças associadas à Elastina

1.1.3.1. Cutis Laxa Autossómica Dominante (gene ELN)

Cutis laxa autossómica dominante (CLAD) ligada ao gene *ELN* é uma patologia do tecido conjuntivo caracterizada por traços faciais distintos, dobras e rugas na pele, juntamente com flacidez inelástica, podendo, raramente, afetar tecidos internos, como a raiz da aorta ou a artéria pulmonar.^{5,22–25}

Esta patologia está associada a uma mutação no exão 25 do gene *ELN*, todavia, estudos já demonstraram, que também pode ocorrer devido a uma mutação frameshift no exão 30.^{22,24–26}

É uma doença extremamente rara, que pode ser confundida com outras patologias, como a progeria. O seu diagnóstico é realizado através da história familiar, do caso clínico e de achados histológicos da pele. Para famílias em que a mutação causadora já tenha sido identificada, é possível recorrer a diagnóstico pré-natal.^{22–25}

O tratamento não é específico e consiste em tratar qualquer manifestação sintomática associada, sendo por isso considerada uma doença ligeira. CLAD não é

fatal e a maioria dos doentes possui um bom prognóstico, com uma expectativa de vida normal.^{23–25}



Figura 2- Representação clínica de dois doentes afetados pela patologia cutis laxa autossômica dominante, ligada ao gene *ELN*. É possível observar a pele flácida (setas brancas), bem como, uma aparência envelhecida. Figura adaptada de *Okuneva et.al. (2019)*.

1.1.3.2. Síndrome de Williams (SW) ou Williams-Beuren

A Síndrome de Williams (SW) é uma patologia genética rara que afeta um a cada 7.500 indivíduos. É diagnosticada quando, ao nascimento, as crianças apresentam estenose aórtica supra-vascular. Outras alterações incluem deformações na face, hipercalcemia, irregularidades no tecido conjuntivo, crescimento anormal, baixa estatura, deficiência intelectual e défices de comportamento e personalidade.^{13,14,27–29}

Esta patologia é causada pela deleção de 26 genes no cromossoma 7, sendo um deles o gene *ELN*. O seu diagnóstico pode ser completado através da análise por *microarrays* que permite detetar deleções. Na maioria dos casos ocorre de forma esporádica, contudo, em casos onde existe história familiar, apresenta um padrão de transmissão dominante.^{13,27–30}

O seu tratamento consiste em atuar a diferentes níveis de forma a minimizar os seus efeitos, como cirurgia cardiovascular, endocrinologia, gastroenterologia, nutrição e psiquiatria.^{13,27–29}

Doentes com SW possuem um prognóstico proporcional à complexidade da doença, sendo possível, em certos casos, viverem com qualidade de vida e independência. Sendo a morbidade maioritariamente devida à presença de cardiopatias, é necessário ressaltar a importância do seu tratamento e acompanhamento antes dos 13 ou 14 anos.²⁷⁻²⁹



Figura 3- Representação clínica de duas crianças com 10 e 21 meses, respetivamente. É possível a observação da face com as características típicas da síndrome de Williams (dobras epicânticas, bochechas grandes e dentes espaçados). Figura adaptada de *Morris C.A. (2010)*.

1.1.3.3. Estenose Aórtica Supravalvular (EAS)

A estenose aórtica supravalvular (EAS) é um defeito cardíaco congénito que se desenvolve antes do nascimento e afeta cerca de 1 a cada 20.000 recém-nascidos. É caracterizada pela estenose de uma porção da aorta, logo acima da válvula aórtica, causando assim falta de ar, dor no peito e insuficiência cardíaca. Pode também afetar outros vasos sanguíneos, como a artéria pulmonar.^{5,31-36}

A EAS é causada por translocações, deleções ou mutações pontuais que afetam gene *ELN*, na posição 7q11.23. Estas mutações podem ocorrer de forma esporádica, como uma condição autossómica dominante, ou como um componente da Síndrome de Williams.^{31,33,34,36}

A aorta é composta por cerca de 50% de fibras elásticas. Quando ocorrem mutações no gene *ELN*, ocorre uma diminuição da produção de tropoelastina que é o precursor da elastina e, por sua vez, das fibras elásticas, tornando assim as fibras elásticas da aorta mais finas. Por mecanismos de compensação as células musculares vão aumentar de número, fazendo com que a aorta fique mais espessa e

estreita. Por sua vez, o coração irá ter maior dificuldade para bombear o sangue, resultando nos sintomas e sinais desta patologia.^{31,34,35,37,38}

O diagnóstico é realizado através de eletrocardiogramas ou ressonâncias magnéticas cardíacas e o tratamento envolve a realização de cirurgias cardíacas de modo a evitar a progressão da patologia. Contudo, o prognóstico varia bastante com a intensidade da estenose e as áreas afetadas.^{31,37-39}

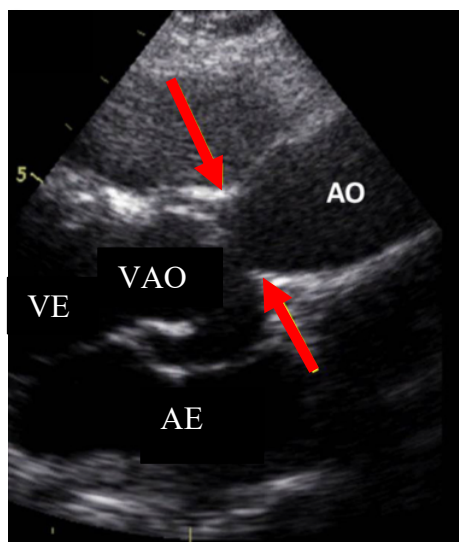


Figura 4- Ressonância magnética cardíaca de um doente com estenose aórtica supraválvular onde é possível observar a estenose (setas vermelhas). AO, aorta; VAO, válvula aórtica; AE, aurícula esquerda; VE, ventrículo esquerdo. Figura adaptada de Carr *et.al.* (2018).

1.2. Síndrome de Keutel

1.2.1. Patologia e mecanismo associado

A síndrome de Keutel (SK) é uma doença autossômica recessiva, extremamente rara, com uma taxa de incidência de 1:1.000.000. Foi descrita pela primeira vez por Keutel, num estudo onde dois irmãos consanguíneos apresentavam múltiplas estenoses pulmonares periféricas, perdas auditivas, cartilagem anormal e ossificações.⁴⁰⁻⁴⁵

Esta síndrome é causada por mutações no gene *MGP* que codifica a proteína Gla da matriz, que ao ser expressa por condrócitos ou células musculares lisas, inibe a calcificação. Até ao momento foram associadas 8 mutações no gene *MGP* à síndrome de Keutel, que levam à perda de função do gene, originando uma proteína não

funcional, causando assim, calcificações ectópicas em diversos órgãos e tecidos.^{40,41,43-45}

1.2.2. Descrição clínica

A gravidez de um feto com esta patologia apresenta os parâmetros sanguíneos e níveis séricos de cálcio e fosfato normais, sendo que, o seu diagnóstico é apenas realizado durante a infância. Contudo, pode permanecer indetetável até à idade adulta ou até ser incorretamente diagnosticada por patologias que apresentem as mesmas malformações, como a doença de Conradi.^{40,46}

A SK apresenta traços bastantes distintos, como displasias faciais, incluindo a inclinação da testa e o queixo retraído, a calcificação anormal da cartilagem, estenoses periféricas pulmonares, perda auditiva, deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, baixa estatura, má oclusão dentária e defeitos cardiovasculares (figura 5).^{40-42,44-47}



Figura 5- Dismorfias faciais de um doente do sexo feminino com síndrome de Keutel (inclinação da testa e queixo retraído - setas vermelhas). Figura adaptada de *Perrone et.al. (2018)*.

1.2.3. Relação entre a Elastina e a Síndrome de Keutel

A Síndrome de Keutel é uma doença extremamente rara que provoca calcificações ectópicas em tecidos moles, devido à deficiência de MGP. Vários estudos já demonstraram que existe correlação entre a haploinsuficiência de elastina e a calcificação ectópica provocada pela falta de MGP já que a elastina é um componente

importante da matriz elástica, tendo sido também associada a processos de calcificação exercendo um papel como nucleador mineral.^{4,9,40,48}

No estudo de *Khavandgar et. al.*, utilizaram ratinhos deficientes em MGP (MGP^{-/-}), que geralmente falecem com 2 meses de idade devido à deposição de minerais nas paredes arteriais, de forma a estudar a progressão vascular em diversas idades.⁹

Observaram então, que a calcificação arterial aparece primeiro nas fibras elásticas, comprovando assim a importância da elastina neste processo. Depois, analisaram ratinhos MGP^{-/-} com haploinsuficiência de ELN e notaram que estes possuem uma redução da calcificação arterial. Além disso, foi possível notar que locais deficientes em MGP sofrem um aumento da expressão ELN momentos antes da sua calcificação e, posteriormente, uma redução da mesma, provando, uma ligação evidente entre a presença de MGP e a calcificação ectópica em locais que expressam ELN.⁹

Estes dados, bem como dados do estudo de *Parashar et. al.*, sugerem a hipótese de que a MGP atua como um fator de proteção dos sítios de nucleação mineral na elastina. Assim quando esta está ausente, como no caso da Síndrome de Keutel, não existe esta interação e é iniciado o processo de calcificação ectópica.^{9,48}

1.2.4. Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico

Doentes com síndrome de Keutel tendem a ser diagnosticados na infância através de análise clínica, que permite a observação e deteção de características distintas. Também é viável a realização de raio-X e tomografia computadorizada, de modo a confirmar calcificações anormais. Exames oftalmológicos, otorrinolaringológicos e eletroencefalogramas também podem ser usados.^{40,42,43,46,47}

A sequenciação de Sanger pode ser uma ferramenta bastante útil para analisar o gene *MGP* dos doentes afetados com SK, uma vez que, além de permitir confirmar inequivocamente o diagnóstico, pode ajudar a expandir o conhecimento sobre a ligação entre a gravidade da doença e o tipo de mutação encontrada.^{40,41,43,44}

Não existe tratamento para a síndrome de Keutel, sendo os tratamentos utilizados meramente sintomáticos, de forma a aliviar os sintomas apresentados, como cirurgia traqueal e uso de broncodilatadores.^{40,42}

O prognóstico para indivíduos afetados com SK é relativamente bom. Todavia, a esperança média de vida e a sua qualidade dependem da gravidade da doença e da quantidade e área de zonas calcificadas, podendo muitas vezes ser fatal.^{40,42,46,47}

1.3. Proteína Gla da Matriz

1.3.1. Caracterização do gene

O gene que codifica para a proteína Gla da matriz localiza-se no cromossoma 12, na localização 12p12.3 e possui 5 exões. Apesar de ter sido identificado em 1990, ainda não se conhece muita informação acerca da sua regulação. Até agora, apenas se sabe que o gene da MGP é regulado nos humanos por ácido retinoico, FGF e por mecanismos epigenéticos. Em ratos, é regulado pela hormona paratiroideia através de fatores de transcrição como SP e Runx2.^{40,49–53}

Foi através de estudos realizados com ratos *knockout* (KO) para o gene da MGP que foi possível compreender a função da proteína Gla da matriz e, em 1999, associá-lo à Síndrome de Keutel, uma vez que, os doentes com KS apresentavam traços comuns com os ratos KO, como a calcificação anormal da cartilagem nas aurículas, nariz e trato respiratório.^{40,45,54}

1.3.2. Caracterização da proteína

A proteína Gla da Matriz (MGP) humana caracteriza-se por ser pequena e dependente de vitamina K. Possui um peso molecular de 12 kDa e contém 84 aminoácidos e 5 resíduos de glutamato, sendo excretada por condrócitos e células musculares lisas da parede dos vasos sanguíneos.^{55–57}

A MGP foi descoberta em 1983 por *Price et. al.*, a partir da matriz óssea de bovino, tendo sido demonstrado ser expressa em diversos tecidos e órgãos, tais como, osso, cartilagem, coração, artérias, rins, pulmão, pele, cérebro e olhos.^{55,57}

Tem como função principal a inibição da calcificação ectópica e possui capacidade, não só para impedir a calcificação vascular, como também, para reverter a calcificação arterial removendo matriz extracelular das paredes arteriais.

Possui uma estrutura molecular complexa composta por um péptido sinal, um domínio de fosforilação localizado em resíduos fosfoserina, um local de ligação da

enzima γ -glutamil carboxilase, um sítio de clivagem (ANxF), um domínio Gla, resíduos de cisteína envolvidos numa ponte dissulfito e outro sítio de clivagem entre dois resíduos de arginina conservados (RR) na parte C-terminal (figura 6). Todos estes domínios são importantes para o seu correto funcionamento, como observado na tabela 1.^{49,58-61}

Esta proteína possui ainda cinco resíduos Glu que são carboxilados pela enzima γ -glutamil carboxilase, numa ação dependente de vitamina K e produzindo ácido glutâmico carboxilado (Gla). Estes por sua vez, ligam-se aos minerais, cristais, fosfolípidos e proteínas BMP de forma a impedir a calcificação vascular e dos tecidos.^{54,58,62,63}

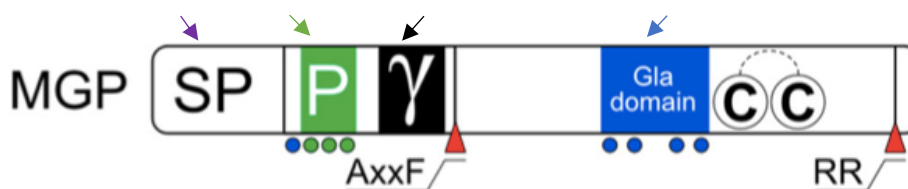


Figura 6- Estrutura molecular da proteína Gla da matriz e os seus domínios. O péptido sinal (SP) (seta roxa), o domínio de fosforilação (seta verde) contendo resíduos de fosfoserina (bolas verdes), o local de ligação da enzima γ -glutamil carboxilase (seta preta), o domínio Gla (seta azul), resíduos Gla (bolas azuis), a ponte de dissulfito dos resíduos de cisteína e os sítios de clivagem (setas vermelhas) ANxF e RR. Figura adaptada de *Cancela et. al.* (2014).

Tabela 1- Domínios da Proteína Gla da matriz e as suas funções. Tabela adaptada de *Cancela et. al.* (2014).

Domínios da Proteína	Funções
Sinal Péptido	Libertação na matriz extracelular
Domínio de fosforilação	Fosforilação da MGP Libertação na matriz extracelular Inibidor da calcificação Inibidor da formação e crescimento de cristais Ligação ao cálcio Ligação às vesículas da matriz
Domínio enzima γ -glutamil carboxilase	Local de ligação da enzima γ -glutamil carboxilase
Sítio de clivagem ANxF	Processamento proteolítico após a tradução
Domínio Gla	Local de ligação a BMP2 e BMP4 Inibidor da calcificação Local de alta afinidade com os iões de cálcio
Ponte dissulfito dos resíduos de cisteína	Estrutura da proteína
Sítio de clivagem RR	Ligação à vitronectina Inibidor da calcificação Clivagem proteolítica

A ativação da proteína Gla da matriz requer duas modificações após a tradução, a fosforilação das serinas nas posições 3, 6 e 9 por uma cinase *Golgi-casein* e a carboxilação de γ -glutamato dependente de vitamina K nas posições 1, 37, 41, 48 e 52, passando assim, de MGP desfosforilada não carboxilada (*dp-ucMGP*) para MGP fosforilada e carboxilada (*p-cMGP*) (figura 7).^{56,64}

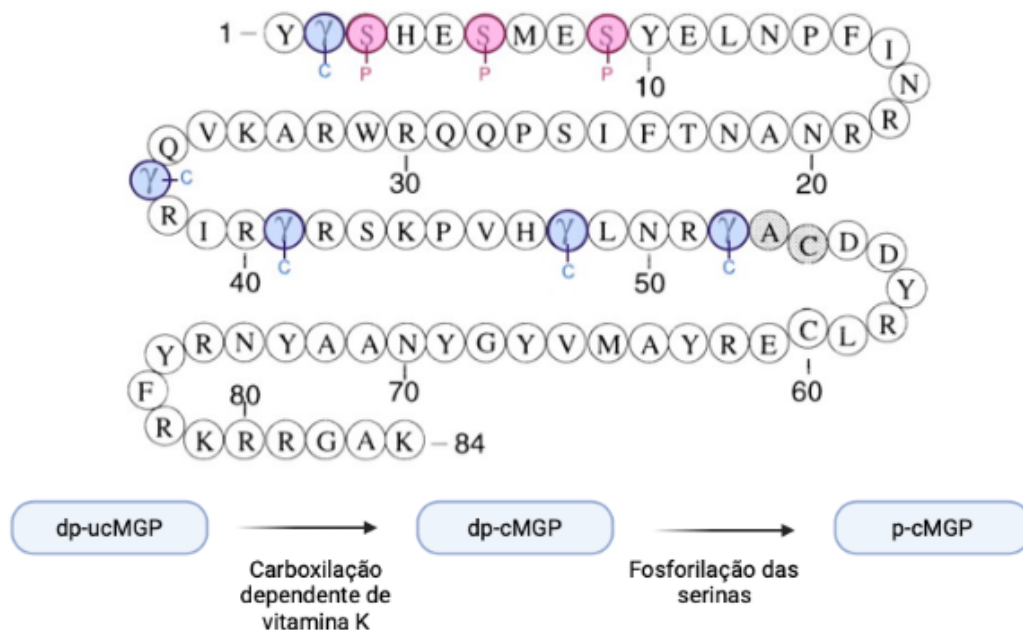


Figura 7- Processo de ativação da MGP. A carboxilação de γ -glutamato dependente de vitamina K nas posições 1, 37, 41, 48 e 52, faz com que a MGP desfosforilada e não carboxilada (*dp-ucMGP*) passe a MGP desfosforilada e carboxilada (*dp-cMGP*). A fosforilação da serina nas posições 3, 6 e 9, produz MGP maturada (*p-cMGP*). Figura produzida através da aplicação BioRender e adaptada de *Wei et. al. (2019)*.

Após a ativação, a MGP é libertada na matriz extracelular ou na corrente sanguínea de forma a inibir a calcificação dos tecidos moles, transdiferenciação de células musculares lisas dos vasos sanguíneos em células osteocondrogênicas e sinalização via BMP.^{56,64}

Esta inibição ocorre, pois a MGP ativa acumula-se em torno das áreas calcificadas e nos vasos sanguíneos de forma a limitar a deposição de fosfato de cálcio nessas regiões. Contudo, esta ligação com o cálcio não é possível com a forma não carboxilada da MGP, acabando por resultar na aceleração do desenvolvimento de calcificação vascular.^{56,64,65}

A MGP não carboxilada (*dp-ucMGP*) também é excretada das células e serve de biomarcador para níveis baixos da vitamina K (figura 8).^{56,64}

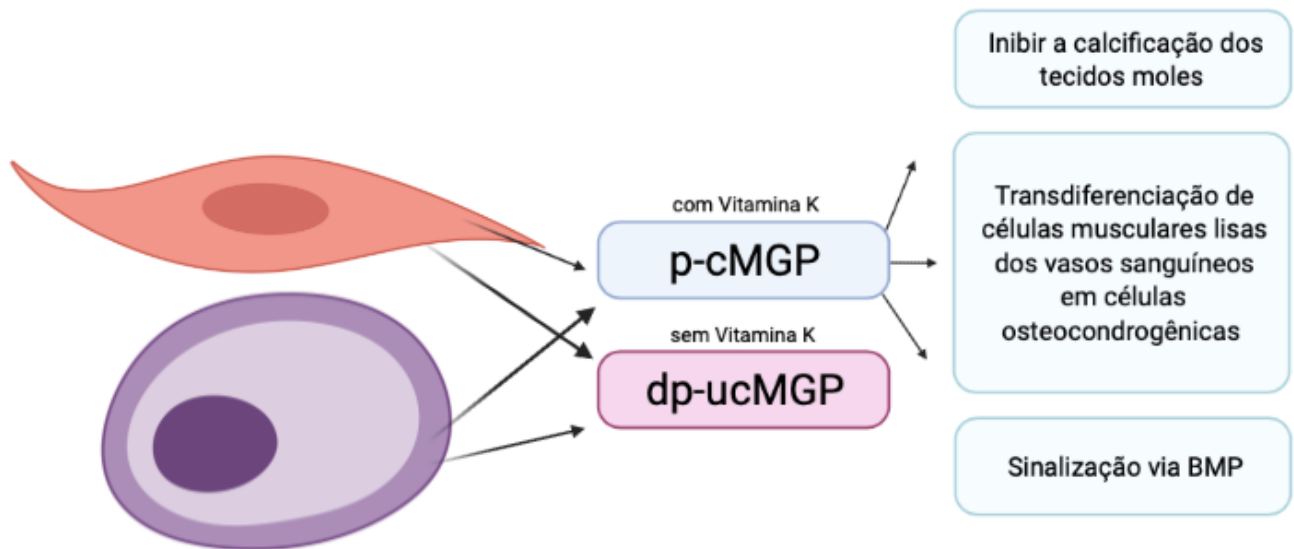


Figura 8- Secreção da MGP. As células musculares lisas e os condrócitos liberam MGP maturada (p-cMGP) quando existe carboxilação pela vitamina K. Esta, por sua vez, vai inibir a calcificação dos tecidos moles, transdiferenciação de células musculares lisas dos vasos sanguíneos em células osteocondrogênicas e sinalização via BMP. Quando não há vitamina K é excretada dp-ucMGP que é a MGP não carboxilada. Figura produzida através da aplicação BioRender e adaptada de *Wei et al. (2019)*.

1.3.3. Vitamina K

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel importante para a função de diversas proteínas, como a proteína Gla da matriz, a osteocalcina e fatores de coagulação entre outras. Esta é uma molécula anticalcificante, anticancerígena, formadora de osso e sensibilizadora de insulina. A vitamina K existe na natureza como vitamina K1, encontrada em vegetais, azeite e óleo de soja, ou como vitamina K2, encontrada em frango, manteiga, ovo e queijo.⁶⁶⁻⁶⁹

Apesar da flora intestinal bacteriana conseguir produzir vitamina K2, a sua quantidade é insuficiente, sendo necessário o consumo da mesma. Os valores recomendados de ingestão são 90 µg/dia para mulheres e 120 µg/dia para homens, de forma a garantir a carboxilação correta e completa de todas as proteínas dependentes de vitamina K.^{66,67,70}

Nas células, a vitamina K passa para vitamina K hidroquinona, por ação da enzima vitamina K epóxido redutase (VKOR). Esta por sua vez, é oxidada pela enzima γ -glutamil carboxilase que também, simultaneamente, carboxila Glu para Gla. Após este processo, a vitamina K oxidada volta a ser transformada em vitamina K hidroquinona, gerando assim o ciclo da vitamina K (figura 9). Desta forma, é mantida a reciclagem constante da vitamina K dentro das células.⁶⁶⁻⁷³

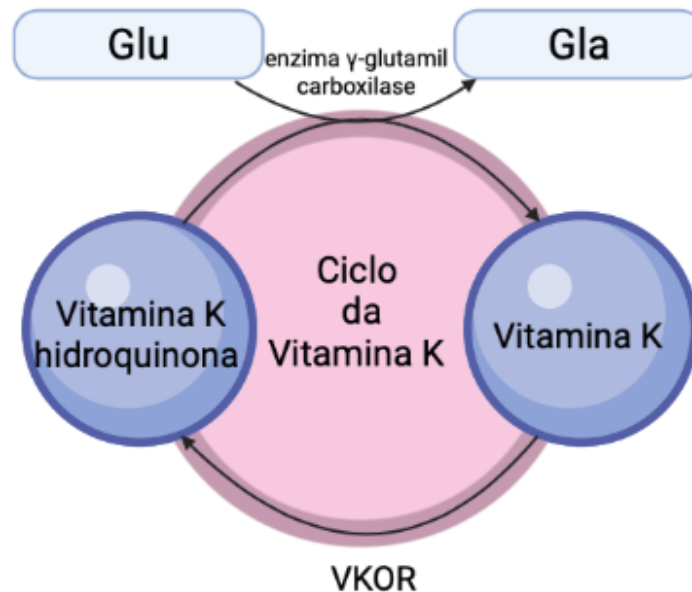


Figura 9- Ciclo da vitamina K. A passagem de vitamina K a vitamina K hidroquinona pela ação da enzima VKOR (vitamina K epóxido redutase) e a oxidação da enzima γ -glutamil carboxilase que em simultâneo torna a vitamina K novamente oxidada e os resíduos Glu em resíduos Gla. Figura produzida através da aplicação BioRender e adaptada de *Imbrescia et. al. (2022)*.

A varfarina é um composto utilizado na prevenção da coagulação sanguínea que bloqueia a ação da enzima vitamina K epóxido redutase (figura 10). Este bloqueio gera a diminuição das quantidades de vitamina K e vitamina K hidroquinona, o não funcionamento da enzima γ -glutamil carboxilase e, conseqüentemente, a não ocorrência da carboxilação. Sem resíduos Gla os fatores de coagulação não conseguem ligar o cálcio e tornam-se inativos, não formando ligações estáveis nos vasos sanguíneos, sendo incapazes de produzir coágulos em situações de lesões vasculares, gerando hemorragias.^{66,67,72,74-76}

Além disso, a MGP também necessita da carboxilação dos resíduos Glu em Gla para promover as ligações ao cálcio; se esta ação é bloqueada pela varfarina, a MGP não irá realizar as suas funções, originando assim o desenvolvimento de calcificações ectópicas.^{64,66,67,72,74–76}

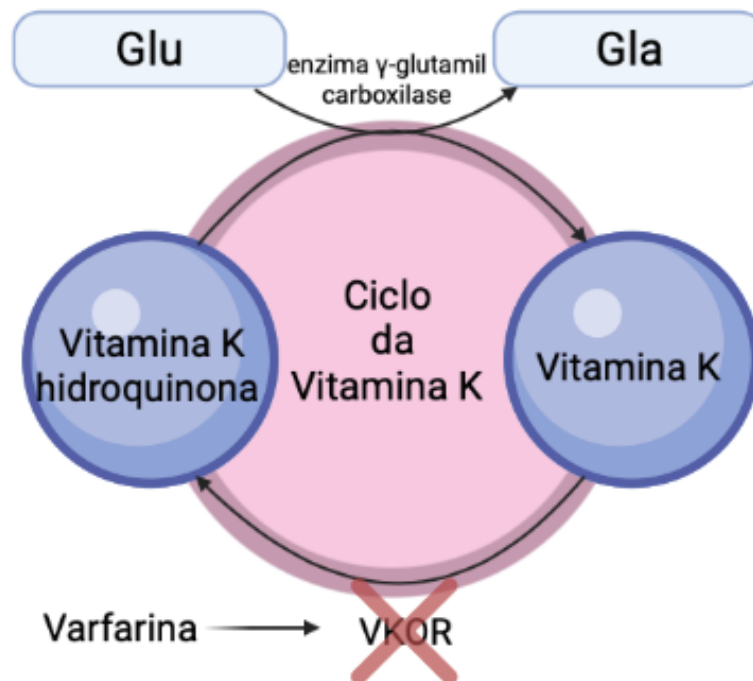


Figura 10- Ação da varfarina no ciclo da vitamina K. A varfarina impede a ação da VKOR (vitamina K epóxido redutase), causando assim, uma falha no ciclo da varfarina. Figura produzida através da aplicação BioRender e adaptada de *Imbrescia et. al. (2022)*.

1.3.4. Consequências da ausência de MGP

A MGP pode estar ausente por diversas causas, tanto por mutações no gene que afetem a transcrição do gene como por falhas ocorrentes no processamento pós tradução como por exemplo falhas na carboxilação da mesma pelo processo dependente de vitamina K. Além disso, pode levar ao aparecimento de diversas doenças como a Síndrome de Keutel, Estenose Pulmonar periférica e Aterosclerose.^{40,64,77,78}

A MGP é importante para diversos tecidos e órgãos, como cartilagem, coração, artérias, rins, pulmão, pele, cérebro e olhos, sendo estes os locais onde a sua ausência é mais sentida.^{40,57,64}

O coração e os vasos sanguíneos são ambos fortemente afetados. Existe uma correlação entre a presença de dp-ucMGP circulante e o aumento da calcificação e rigidez articular. Além disso, essa correlação também é observável no olho, visto que, a falta de MGP ativa gera a calcificação da microvasculatura retiniana e o consequente estreitamento do diâmetro arteriolar da retina. Nos rins o mesmo acontece, a taxa de filtração glomerular desce se a MGP estiver inativa, dado que esta proteína está bastante associada ao epitélio da cápsula de Bowman e aos túbulos proximais.^{40,57,64,78–83}

A MGP desempenha também um papel importante na manutenção da estrutura óssea. Desta forma, é de esperar que o aumento da quantidade de dp-ucMGP na circulação signifique não só a diminuição da densidade óssea, como também lesões no menisco, na medula óssea, osteófitos e cistos subarticulares.^{40,64,84}

1.4. Calcificação do sistema vascular

O sistema vascular, constituído por vasos sanguíneos, como as artérias, veias e capilares, é responsável pelo transporte de sangue, fornecendo oxigénio e nutrientes aos tecidos do corpo.^{85,86}

Uma doença vascular é caracterizada pela sua ação nas artérias e veias, bem como a diminuição ou bloqueio do fluxo sanguíneo. Consequentemente, gera a deterioração de vasos sanguíneos, válvulas e até outros órgãos e tecidos envolvidos. Pode ser causada por aterosclerose, coágulos sanguíneos, inflamação, lesões ou mecanismos genéticos.^{85,86}

A calcificação vascular pode ser dividida entre a calcificação da camada íntima, associada à aterosclerose e onde existe uma acumulação de lípidos e macrófagos na parede dos vasos sanguíneos, ou da camada média, associada a doenças renais crónicas ou diabetes. É na camada média onde irá ocorrer a mineralização da elastina e transdiferenciação de células musculares lisas, contudo este processo ainda não é claro.^{54,65,80,85,87,88}

Em 1997, *Luo et. al.* relatou a relação entre ratinhos deficientes de MGP e a calcificação vascular da camada média de artérias elásticas e musculares, como aortas, carótidas e artérias coronárias.^{54,65}

Mais tarde, em 2009, *Speer et. al.* mostrou que as células musculares lisas das artérias de ratinhos *Mgp-/-* desenvolvem-se normalmente no útero e só após as primeiras semanas de vida se transdiferenciam ao longo da linha condrocítica, levando à calcificação de grandes células condrocíticas com lesões da camada média.^{65,87}

Estes estudos servem, não só para comprovar a importante ligação entre a MGP e a calcificação do sistema vascular, como também para servir de apoio à correlação da elastina neste processo uma vez que a calcificação dos tecidos moles ocorre nas fibras elásticas onde existe uma maior deposição de MGP. Além disso, auxiliam no fornecimento de mais informações sobre a relação entre a elastina e a Síndrome de Keutel e os mecanismos associados (figura 11).^{54,65,87,88}

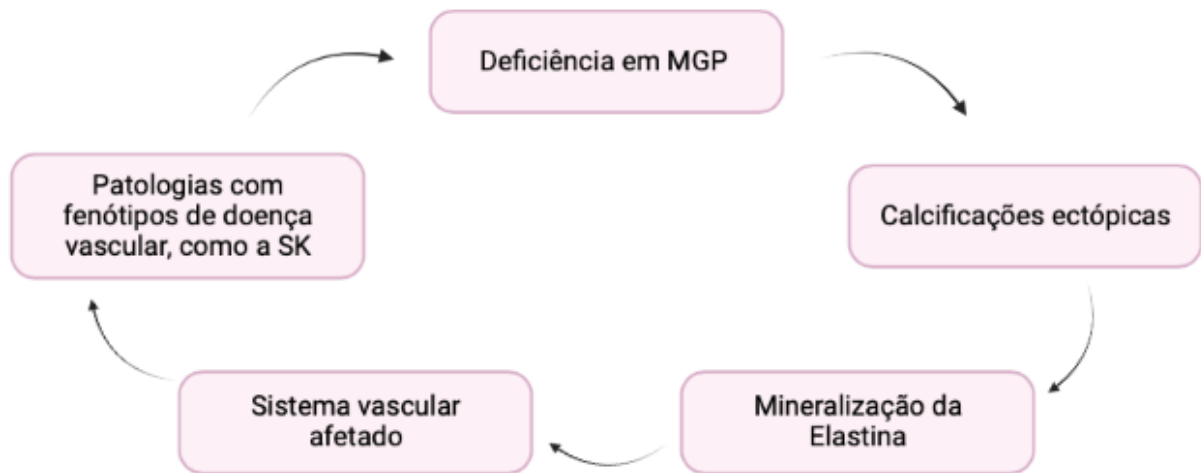


Figura 11- Esquema representativo de fenótipos associados a patologias causadas pela deficiência em MGP. Figura produzida através da aplicação BioRender.

1.5. Peixe-zebra como modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*), pertencente à família Danionidae, é um peixe ósseo, cipriniforme e tropical, com um tempo de vida médio entre três e cinco anos. É uma espécie bastante apreciada como modelo experimental, sendo frequentemente utilizado em investigação genética e análises de biologia do desenvolvimento. Além disso, possui uma capacidade de regeneração muito importante e que é utilizada para a formação de linhagens transgênicas.⁸⁹⁻⁹²



Figura 12- Imagem de um peixe-zebra adulto com 1 ano e meio de idade. Imagem sem ampliação.

O peixe-zebra atinge a sua maturidade sexual entre os três e os seis meses de idade após a fertilização. Contudo, este tempo varia com as condições ambientais, densidade populacional, temperatura e disponibilidade de alimento. Durante a desova é comum a corte da fêmea pelo macho, posteriormente este nada em paralelo com a mesma de modo a provocar a libertação dos ovos e do esperma, ao mesmo tempo. Cada fêmea consegue produzir centenas de ovos por cada fecundação, sendo que, momentos após estes se encontram transparentes.^{89,91}

Danio rerio apresenta um rápido desenvolvimento pois com apenas 36 horas após a fecundação já possui todos os órgãos formados. Possui também um saco embrionário que garante sustento até à abertura da boca, que acontece por volta dos 5 dias.^{89,91}

Este modelo apresenta uma grande semelhança anatômica com outros vertebrados durante o seu estadio embrionário. Como o embrião é translúcido é possível observar com maior detalhe estruturas internas, o que noutro modelo animal não seria possível. A sua facilidade de obtenção e manutenção são algumas das vantagens que explicam o aumento da sua utilização nas últimas décadas. Além

disso, possui um banco de dados (ZFIN) com informações genéticas, embriológicas, genómicas e de desenvolvimento, que facilita a sua investigação.^{89,91-94}

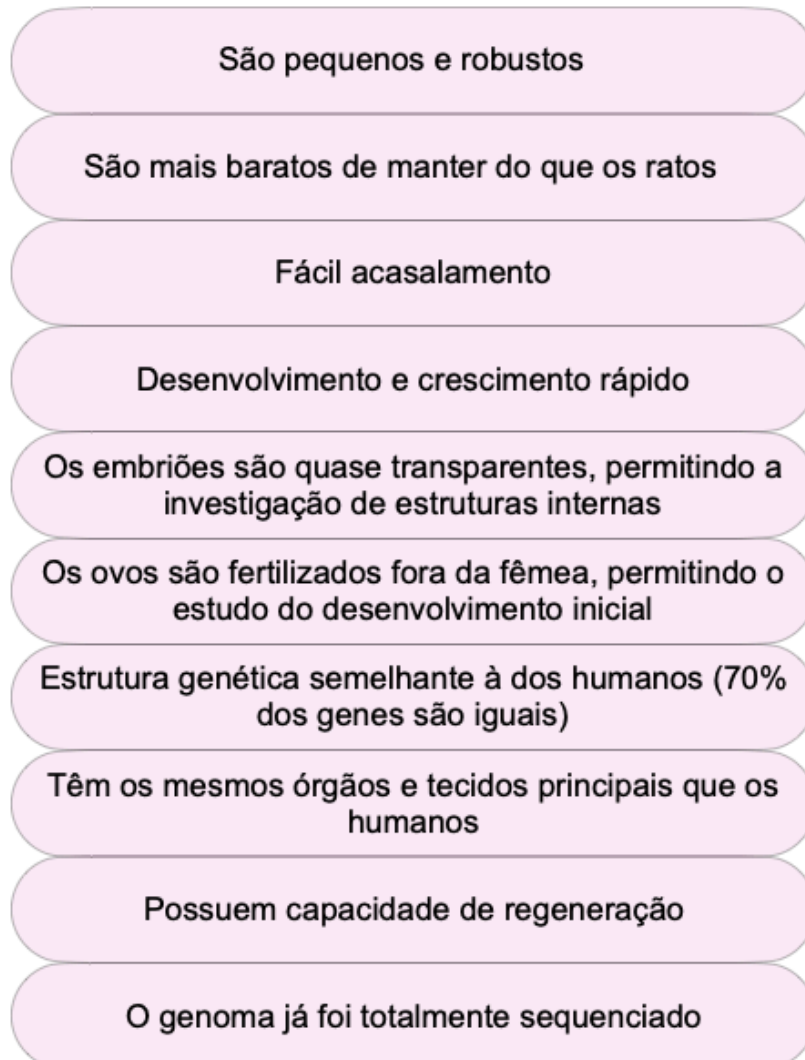


Figura 13- Vantagens da utilização de peixe-zebra como modelo animal experimental.

1.5.1. Elastina no peixe-zebra

O peixe zebra apresenta dois genes para a elastina, *elna* e *elnb*, que por sua vez, geram dois tipos de tropoelastina diferentes.⁹⁵⁻⁹⁷

O gene *elna* ou *eln1* localiza-se no cromossoma 15, enquanto o gene *elnb* ou *eln2* localiza-se no cromossoma 21. Ambos possuem um papel importante na matriz extracelular sendo expressos a partir das 24 hpf até à idade adulta. Os locais de expressão variam, conforme é possível observar na figura 14.^{96,97}

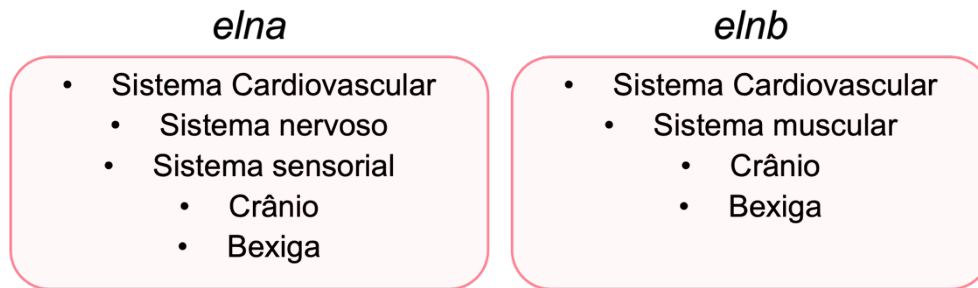


Figura 14- Diferentes locais de expressão do gene *elna* e o gene *elnb*.

Os dois genes apresentam uma região conservada com o gene *ELN* humano, uma vez que são ortólogos. Contudo, as regiões não conservadas produzem alterações a nível do tamanho do gene, número de exões, tamanho da proteína, tamanho do mRNA e peso molecular (tabela 2). O gene *elna* apresenta uma maior similaridade e identidade com o gene humano (41,2% e 36,6%, respetivamente), comparativamente ao gene *elnb* (20,7% e 17,7%, respetivamente).⁹⁵

Tabela 2- Diferenças nas características dos genes *elna* e *elnb* do peixe-zebra e do gene *ELN* humano.

	Peixe-Zebra		Humano
	<i>elna</i>	<i>elnb</i>	<i>ELN</i>
Localização do Gene	Chr15	Chr21	Chr7
Tamanho do gene (kbp)	59,9	40,9	48,8
Número de exões	57	59	34
Tamanho do mRNA (kbp)	3,6	6,1	3,4
Tamanho da proteína (aa)	1164	2054	786
Peso molecular (kDa)	101,1	172,8	68,4

II. Objetivos

A Síndrome de Keutel é uma doença caracterizada por calcificações ectópicas decorrentes de mutações no gene da *MGP* e perda de função da proteína respetiva.

O objetivo desta tese de mestrado é investigar se o conteúdo de elastina da matriz é um determinante crítico para a cartilagem e calcificação ectópica vascular num modelo de peixe-zebra.

Para isso, caracterizou-se o fenótipo de uma linha de peixe-zebra mutante para a elastina (*eln*) e identificou-se os locais e a extensão da calcificação ectópica devido a tratamentos com varfarina. Analisou-se também, a localização e suposta alteração das fibras elásticas nos peixes *wild-type*, heterozigóticos e homozigóticos para a elastina, e observou-se as alterações derivadas de um cruzamento entre um mutante para elastina e um mutante heterozigótico para *Mgp*.

Desta forma, pretendeu-se descobrir mais sobre a função da elastina em estruturas esqueléticas ou vasculares de peixes e como pode ser afetada na presença de mutações e por tratamento com fármacos, uma vez que, ainda pouco se sabe sobre o assunto.

III. Materiais e Métodos

3.1. Linhas de estudo e condições de manutenção

Nesta experiência utilizaram-se três linhas de peixes-zebra, duas linhas transgênicas que afetam a expressão da elastina (Sa17177 e Sa42459) e uma linha mutante heterozigótica resultante do cruzamento de peixes mutantes para a Mgp e para a elastina (Sa17177 x *mgp*).

As linhagens Sa17177 e Sa42459 expressam uma mutação no gene da elastina localizado no cromossoma 15 do peixe-zebra. Na linha Sa17177 ocorre uma troca de uma guanina por uma timina na posição genômica 296216, provocando assim, um codão STOP prematuro. Na linha Sa42459 existe também a troca de uma timina por uma adenina mas na posição genômica 285811.

A linha mutante para a elastina e para a Mgp foi conseguida a partir de um cruzamento entre peixes homozigóticos Sa17177 e peixes homozigóticos para a Mgp. A mutação da Mgp ocorre no cromossoma 12, no exão 4 onde acontece uma deleção de 18 nucleótidos.

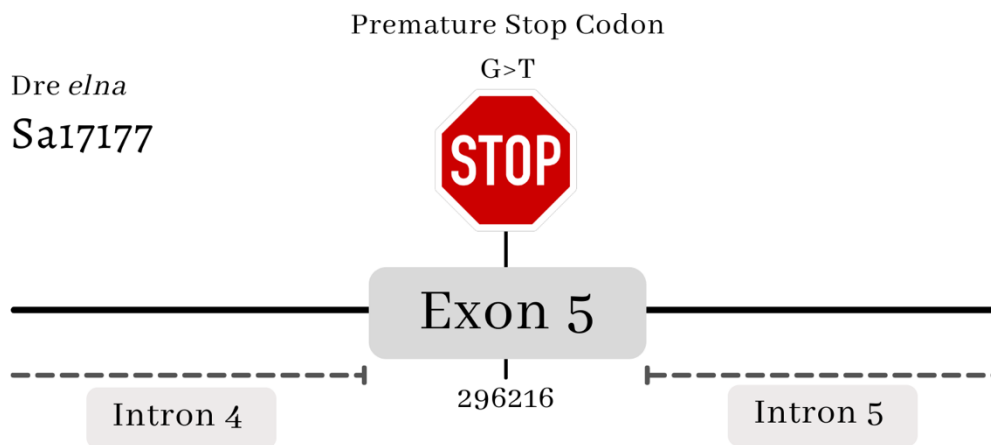


Figura 15- Representação esquemática do gene *eln* no mutante Sa17177. Uma mutação pontual no cromossoma 15, na localização genômica 296216, resultou num codão STOP prematuro. Figura produzida através da aplicação BioRender.

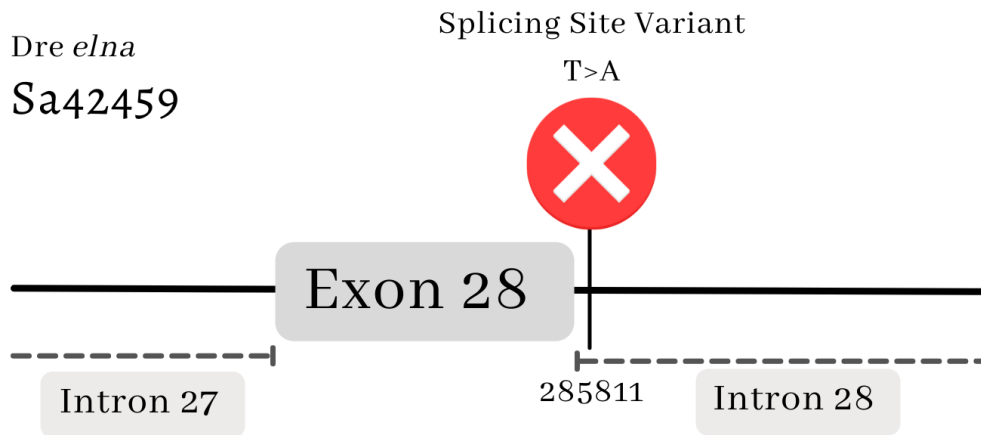


Figura 16- Representação esquemática do gene *eln* no mutante Sa42459. Uma mutação pontual no cromossoma 15, na localização genómica 285811, resultou na alteração do local de splicing. Figura produzida através da aplicação BioRender.

Os peixes-zebra foram mantidos nas condições recomendadas, de forma a garantir o seu desenvolvimento e bem-estar. A temperatura da água manteve-se nos $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com pH de $7,5 \pm 0,1$, níveis de condutividade entre $750 \pm 30 \mu\text{S}$ e um fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Todos os tanques eram limpos e sifonados regularmente, de modo a impedir a acumulação de comida no fundo ou na superfície destes.

Os peixes em estado larvar eram mantidos em tanques com um volume de 2 litros de água, com um máximo de 50 larvas por tanque, com uma temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e eram alimentados três vezes ao dia, duas vezes com artémia (*Artemia nauplii*, da INVE Aquaculture) e uma vez com ração (Zebrafeed®, da Sparos).

Quando atingiam os 20 dias, eram transferidos para o sistema, em tanques com capacidade para 3,5 litros de água, com um máximo de 14 peixes por tanque e alimentados duas vezes ao dia, uma com artémia e outra com ração.

3.2. Genotipagem

Para a realização deste trabalho foi necessário proceder à genotipagem de peixes-zebra das linhas Sa17177 e Sa42459, uma vez que visualmente não era possível identificar os que apresentavam mutações.

Para isso, realizou-se a extração de DNA genómico. Com os peixes previamente anestesiados com uma solução de Tricaina (4,2 ml de Tricaina para 100 ml de água do sistema), cortou-se uma pequena parte da barbatana caudal. Este corte deve ser o mais pequeno possível, de forma a possibilitar a regeneração dessa porção. Posteriormente, e com o auxílio de materiais esterilizados, colocou-se as amostras em tubos de 0,2 ml, previamente identificados e preparados com uma solução de *Alkalyne Lysis Buffer* (25 µL: 25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA pH=8), para promover a degradação e lise dos tecidos.

Após este processo, misturou-se cada uma das amostras com a solução *Alkalyne Lysis Buffer* e colocou-se os tubos no termociclador a 95°C durante 10 minutos (este tempo pode variar consoante o tamanho da amostra). Retirou-se os tubos e adicionou-se 25 µL de Neutralization Buffer (40mM Tris-HCL, pH=8), de maneira a parar o processo de lise e neutralizar as amostras.

Posteriormente, realizou-se a quantificação de DNA presente em cada amostra, usando um aparelho *Nanodrop*. Este processo é realizado antes e após o PCR, de forma a verificar se existiram erros na extração de DNA ou no processo de amplificação.

Antes da realização do PCR procedeu-se à diluição dos *primers* específicos para a mutação da linha Sa17177. Colocou-se 10 µL de *primer* em 90 µL de água *Sigma*.

Tabela 3- Informações sobre os primers utilizados para a linha Sa17177.

Primers Sa17177	Sequência (5'→3')	Temperatura de Melting
Forward	CCT AAC TCC TCA TTT GCT CAG CCA	58,9 °C
Reverse	TTC CAC CAG CAC CTG AAA CAA GAG	59,4 °C

Tabela 4- Informações sobre os primers utilizados para a linha Sa42459.

Primers Sa42459	Sequência (5'→3')	Temperatura de Melting
Forward	GCA GCA CAG CAG CAG TCT TCA AGG	58,9 °C
Reverse	GCA TTC GTC TCA GTT GGT TTA GTT GG	57,6 °C

Relativamente ao PCR, adicionou-se a cada tubo:

- 1,5 µL de DNA genómico
- 2,5 µL de buffer
- 0,75 µL de MgCl₂
- 0,5 µL de dNTPs
- 0,2 µL Taq Polimerase
- 1,25 µL de *primer* forward
- 1,25 µL de *primer* reverse
- 17,05 µL de H₂O

E incubou-se durante 35 ciclos com as seguintes condições:

- 94°C durante 3 minutos
- 94°C durante 45 segundos
- 58°C durante 30 segundos
- 72°C durante 40 segundos
- 72°C durante 10 minutos
- 4°C *infinity hold*

De seguida, realizou-se uma eletroforese para garantir que houve a amplificação da amostra e que havia o fragmento que pretendíamos. Para fazer o gel de agarose a 1% colocou-se 1,2 gramas de agarose em pó e 120 ml de TAE num recipiente e incubou-se 3 minutos no microondas na potência máxima. Após esse tempo, deixámos arrefecer com água corrente e adicionou-se de seguida 1,6 µL de GreenSafe. Verteu-se a solução para o suporte e deixámos solidificar por 20 minutos. Colocou-se o gel numa tina cheia de TAE e carregaram-se os poços com as amostras. No primeiro poço foi colocado 6 µL de Gene Ruler 1Kb DNA *ladder*, para marcar o

tamanho dos fragmentos, nos restantes foi colocado em cada um 19 µL de amostra (15 µL de produto de PCR e 4 µL de *loading* buffer).

Deixou-se migrar as amostras no gel durante 45 minutos a 120 Volts e de seguida observou-se os fragmentos de DNA no transiluminador de luz ultravioleta (UV). Como estes apresentavam o tamanho esperado (568 bp), enviou-se o produto de PCR para sequenciação.

Para analisar os resultados utilizou-se a plataforma NCBI como meio de comparação com a sequência correta de nucleótidos e a aplicação FinchTV para analisar o genoma de cada amostra.

Após os resultados realizaram-se cruzamentos entre os peixes-zebra Sa17177 de modo a garantir posturas que permitissem obter peixes *wild-type*, heterozigóticos e homozigóticos, conforme indicado no esquema.

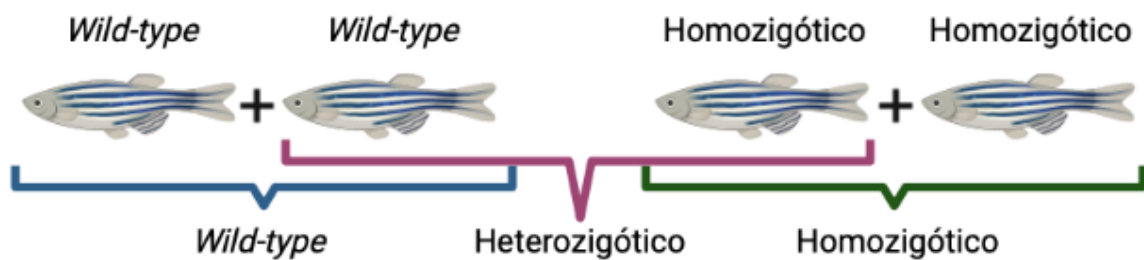


Figura 17- Cruzamentos da linha Sa17177. *Wild-type* com *wild-type* gera 100% de peixes-zebra *wild-type*; homozigótico com homozigótico gera 100% de peixes-zebra homozigóticos; *wild-type* com homozigótico gera 100% de peixes-zebra heterozigóticos. Figura produzida através da aplicação BioRender.

A genotipagem da linha Sa42459 mostrou que havia apenas peixes-zebra homozigóticos do sexo masculino, fazendo com que fosse impossível a continuação da linhagem homozigótica. Sendo assim, cruzou-se peixes heterozigóticos entre si de forma a produzir peixes homozigóticos (figura 18), tendo sido necessário também genotipar os peixes provenientes deste cruzamento, de forma a verificar a mutação existente. Este resultado fez com que não fosse possível a continuação do estudo desta linha durante o período de trabalho do mestrado.

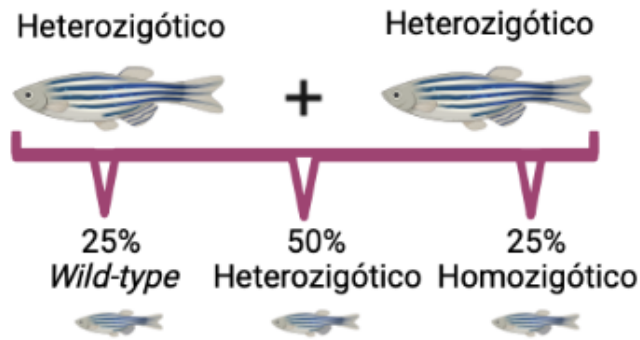


Figura 18- Cruzamentos da linha Sa42459. Cruzamento entre peixes-zebra heterozigóticos para gerar peixes homozigóticos. Figura produzida através da aplicação BioRender.

Já a linha mutante para a elastina e Mgp não precisou de genotipagem, uma vez que todos os peixes provenientes desse cruzamento seriam obrigatoriamente heterozigóticos para a elastina e heterozigóticos para a Mgp ($eIn^{+/-}mgp^{+/-}$), conforme explicado na figura 19.

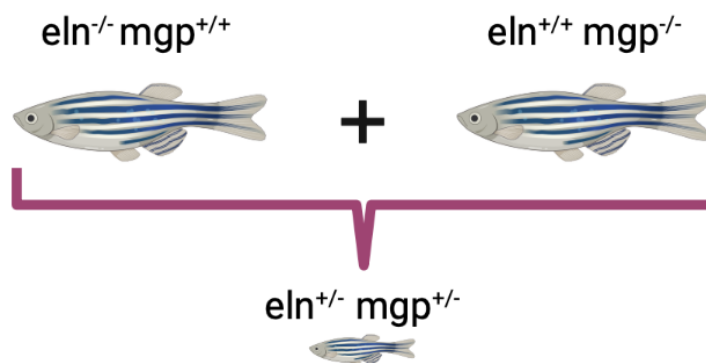


Figura 19- Cruzamento entre mutantes para a elastina e mutantes para a Mgp. Peixes-zebra homozigóticos para elastina ($eIn^{-/-}$) ao cruzar com peixes-zebra homozigóticos para a Mgp ($mgp^{-/-}$) geram peixes-zebra heterozigóticos para ambas as condições. Figura produzida através da aplicação BioRender.

3.3. Análises Biométricas e Análise do fenótipo

Para a realização das análises biométricas dos peixes-zebra da linha mutante Sa17177 e Mgp, foram realizados 3 cruzamentos em datas distintas. Para isto, foi necessário a utilização da ferramenta ImageJ, que permite a medição do comprimento das larvas e dos peixes adultos.

Nestas análises avaliou-se o comprimento standard, que vai da extremidade da cabeça até ao começo da cauda (figura 20), ao quinto, décimo e vigésimo dia pós

fertilização. Para chegar ao valor médio do comprimento standard mediu-se 10 peixes de cada grupo ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) e fez-se a respetiva média.

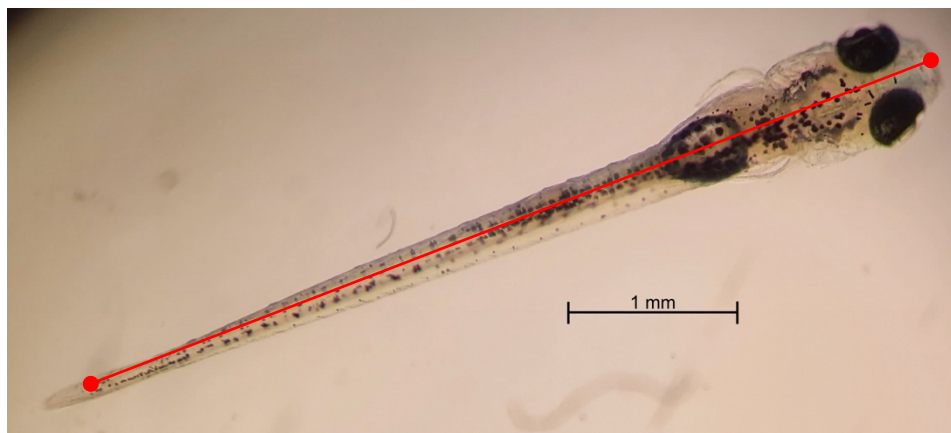


Figura 20 – Representação do comprimento standard de uma larva de 10 dpf (traço vermelho). Fotografia tirada com a câmara do Samsung Galaxy Fe sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 25 (10x2,5).

Além disso, observou-se diariamente o número de ovos e de larvas mortos, de forma a perceber se havia alguma ligação entre a taxa de mortalidade e a forma mutante que estávamos a utilizar.

3.4. Tratamento com Varfarina

Trinta dias após a fertilização (dpf) realizou-se o tratamento com Varfarina para os peixes-zebra da linha Sa17177 de todas as condições (*wild-type*, heterozigóticos e homozigóticos). Para isto, utilizou-se 12 tanques devidamente identificados, com 1 litro de água e colocou-se 10 peixes escolhidos de forma aleatória em cada um. Seis dos tanques serviram como grupo de controlo, enquanto aos outros seis adicionou-se 25 mg/L de varfarina, como mostra a figura 21.

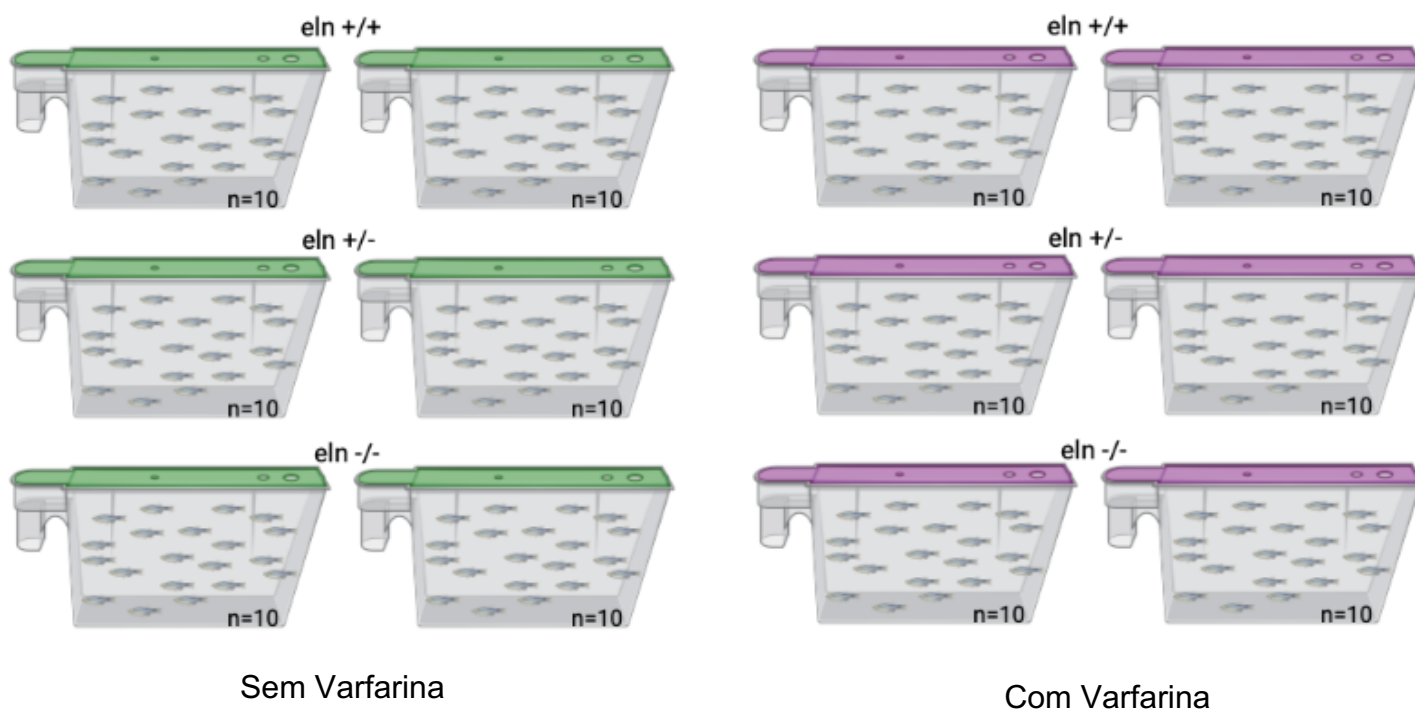


Figura 21- Esquema do primeiro tratamento com Varfarina para a linha Sa17177. Figura produzida através da aplicação BioRender.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, uma vez com artémia (*Artemia nauplii*, da INVE Aquaculture) e uma vez com ração (Zebrafeed®, da Sparos). Os tanques foram sifonados diariamente e a cada dois dias realizou-se a substituição de 800ml de água e da solução de varfarina, durante um período de duas semanas.

No final do tratamento os peixes tratados com Varfarina foram sacrificados utilizando uma solução letal de Tricaina (8,4 ml de Tricaina para 100 ml de água do sistema) e os peixes controlos foram colocados de volta no sistema. Adicionou-se uma solução de PFA 4% com PBS (7,5 ml por peixe) durante 1 hora. Após esse tempo, realizou-se 3 lavagens com PBS, cada uma de 10 minutos e colocou-se metanol na mesma quantidade. De seguida, guardou-se os *falcons* no congelador a -20°C durante

24 horas, sendo que podem ser mantidos em metanol durante o tempo necessário. Desta forma, garante-se a conservação dos peixes até ao seu processo de fixação.

Devido à elevada mortalidade observada neste tratamento com Varfarina foi necessário a realização de um segundo tratamento, desta vez já com os peixes mutantes para a Mgp ($eln^{+/-}mgp^{+/-}$).

Sendo assim, realizou-se a mesma experiência, alterando apenas a idade dos peixes (5 dpf) e a quantidade dos mesmos (40 peixes por condição) (figura 22).

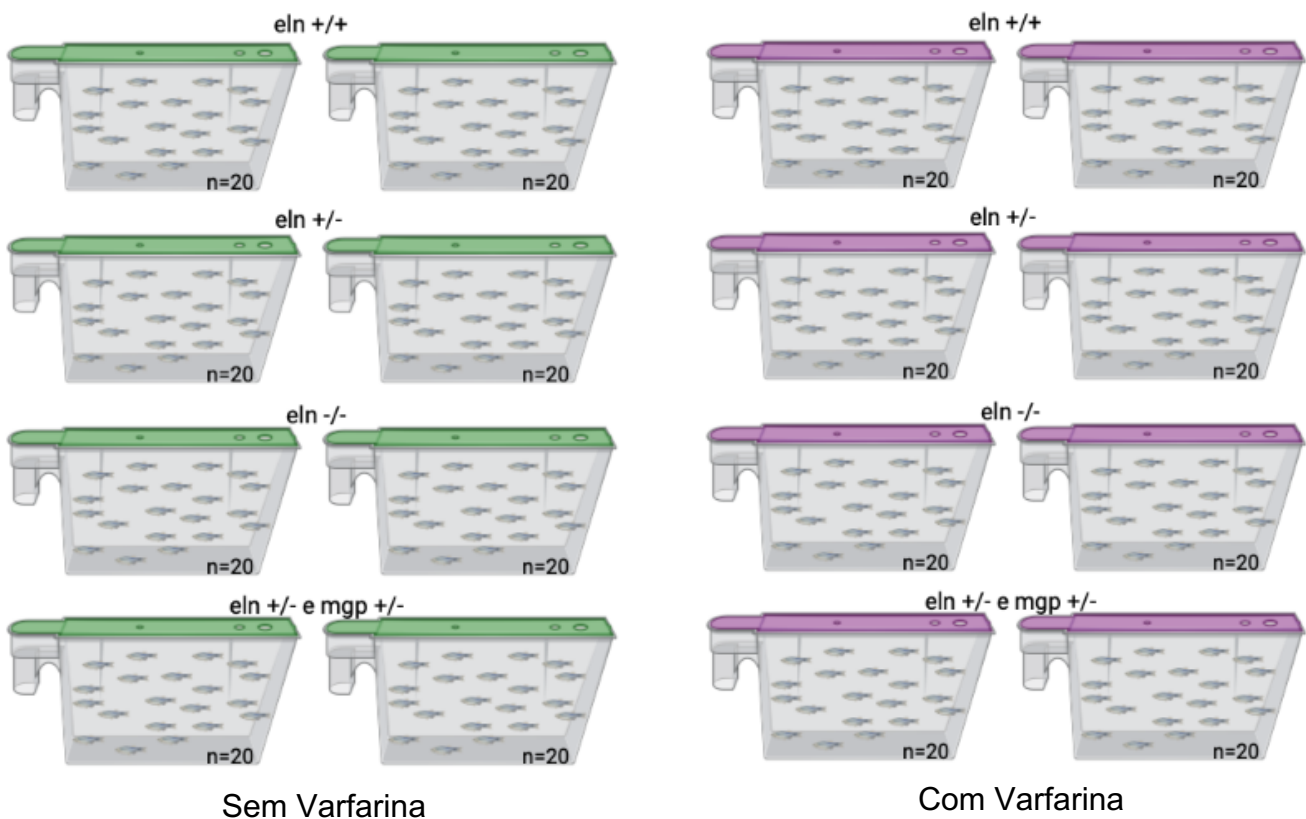


Figura 22- Esquema do segundo tratamento com Varfarina para a linha Sa17177. Figura produzida através da aplicação BioRender.

No final do tratamento, colocou-se os peixes que estiveram em varfarina e 10 peixes controlo de cada grupo (*wild-type*, heterozigótico, homozigótico e heterozigótico para a elastina e para a Mgp), em *falcons* e procedeu-se à realização do protocolo de coloração com alizarin red.

3.5. Protocolo de coloração com Alizarin Red

Para a observação de calcificações ectópicas utilizou-se a técnica de coloração com Alizarin Red. Para tal, preparou-se uma solução de Alizarin Red a 0,3% com um ph de 7,4. Como a concentração final desejada era 0,06% foi necessário a diluição da solução em água do sistema, isto é, colocou-se 16 ml de água mais 4 ml da solução de alizarin red anteriormente preparada.

Primeiramente, observou-se peixes-zebra com 30 dias da linha sa17177 sem tratamento com Varfarina, de forma a observar se havia diferenças na calcificação entre peixes-zebra *wild-type*, heterozigóticos ou homozigóticos.

Para tal, colocou-se 10 peixes juvenis de cada grupo em *falcons* de 50 ml e perfez-se a água dos mesmos até aos 16 ml. De seguida, adicionou-se os 4 ml de alizarin red e deixou-se incubar durante 20 minutos (figura 23). Após este tempo, fez-se 5 lavagens com água do sistema de modo a retirar qualquer resquício de alizarin red. Nestas lavagens retira-se cuidadosamente o líquido que está no *falcon* com recurso a uma pipeta e adiciona-se mais água, repetindo o processo 5 vezes. O objetivo é que no final das lavagens a água que está no *falcon* fique clara e transparente.

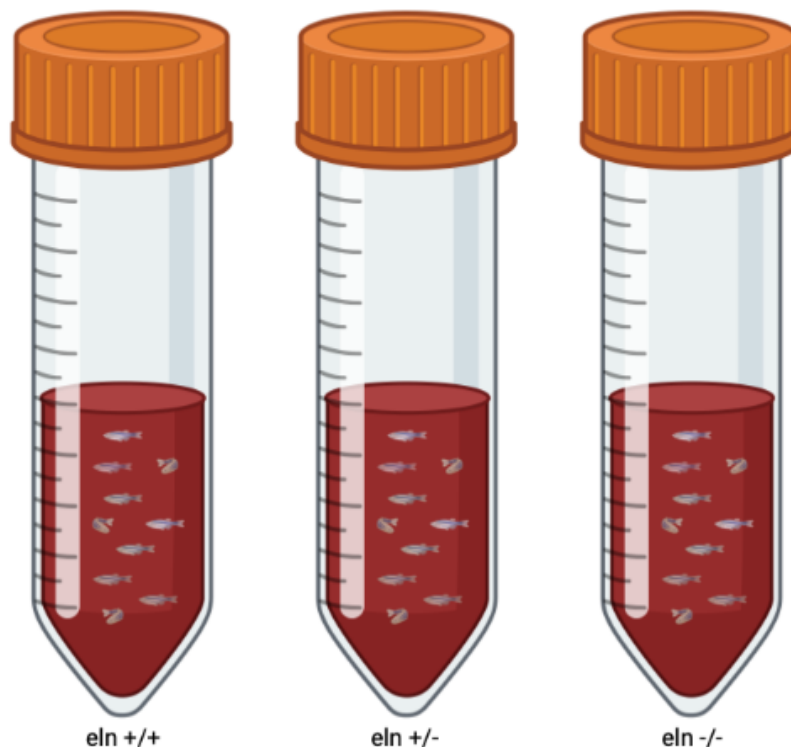


Figura 23- Esquema da coloração de Alizarin Red para a linha Sa17177. Em 3 *falcons* colocou-se 10 peixes-zebra juvenis de cada grupo (*wild-type*, heterozigótico e homozigótico) e adicionou-se 4 ml da solução de alizarin red para um volume final de 20 ml. Figura produzida através da aplicação BioRender.

Após as lavagens foi necessário anestésiar as larvas com uma solução de Tricaina (1,5 ml de Tricaina para 100 ml de água do sistema). Colocou-se as larvas em caixas de petri e com recurso a um microscópio de fluorescência e o programa de *live imaging LasX*, analisou-se as imagens obtidas.

Após o tratamento com Varfarina, realizou-se novamente uma coloração com alizarin red aos peixes-zebra da linha Sa17177 (*wild-type*, heterozigótico ou homozigótico e heterozigótico para a elastina e para a Mgp) com 20 dpf, de forma a observar o papel da varfarina na calcificação ectópica.

3.6. Protocolo de preparação de lâminas, fixação e obtenção de cortes histológicos em GMA e parafina

Para a realização de cortes histológicos tanto em GMA, como em parafina, é necessário a preparação de lâminas tratadas com *Tespa*. Este método é utilizado pois permite obter lâminas adesivas de forma simples, rápida e pouco dispendiosa.

Para tal, começou-se por preparar 5 recipientes com as seguintes soluções e submergiu-se as lâminas nas mesmas, na ordem demonstrada na figura 24. Todo o processo deve ser realizado debaixo da câmara de extração (hote).

-Água destilada: 2 *dips*

-Etanol 100%: 2 *dips*

-Tespa 2% em acetona: 30 segundos

-Acetona 100%: 2 *dips*

-Água destilada: 2 *dips*



Figura 24- Esquema representativo do protocolo de preparação de lâminas em *Tespa*. Figura produzida através da aplicação BioRender.

Após este procedimento, retirou-se as lâminas dos suportes transparentes utilizados para a submersão e colocou-se nos tabuleiros de forma a secar. A secagem também deve ser realizada dentro da *hote* durante 24 horas ou até estarem completamente secas. Posteriormente, guardou-se as lâminas nas caixas de origem, bem identificadas, até serem necessárias.

- Cortes histológicos em GMA

Após o tratamento com varfarina realizou-se a fixação dos peixes com o protocolo de *Glycol Methacrylate embedding* (Oralová *et al* 2019)⁹⁸. Este protocolo foi utilizado de modo a manter as zonas calcificadas e permitir a sua deteção pela técnica de coloração de Von Kossa. Se os peixes-zebra fossem fixados em parafina teria de existir um processo de descalcificação e a técnica de coloração não iria funcionar.

Para tal, começou-se o procedimento lavando os peixes 5 vezes em acetona, cada uma das lavagens com 15 minutos, de forma a retirar todo o metanol. Após este processo, preparou-se o monómero de GMA da seguinte forma:

-(2, hydroxyethyl-metacrylaa): 80 ml	} Mexer a solução por 1 hora.
-ethylenglycolmonobutylether: 12 ml	
-benzoylperoxide: 270 mg	

Com o monómero de GMA fresco, realizou-se 2 lavagens, cada uma com 15 minutos. Colocou-se novamente GMA, sendo que desta vez, deixou-se repousar no gelo e no frigorífico a 4°C durante 1 hora. Após esse tempo, voltou-se a colocar GMA e deixou-se no frigorífico a 4°C durante 48 horas.

Depois de 48 horas, preparou-se o catalisador:

- N,N- dimethylaniline: 1 ml
- poly- ethyleenglycol-200: 10 ml

Como a solução pretendida era GMA + catalisador a 2%, utilizou-se para 10 blocos (15 ml): 14,7 ml de monómero de GMA + 300µL de catalisador

Após a realização do monómero GMA + catalisador a 2%, embebeu-se as amostras em moldes previamente preparados e deixou-se repousar durante 24 horas no frigorífico a 4°C. Posteriormente, passou-se os moldes para a hote e deixou-se mais 24 horas de forma a secarem à temperatura ambiente.

Da linhagem Sa17177, foram fixados do primeiro tratamento com varfarina (com 45 dpf):

- 3 peixes-zebra homocigóticos sem tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra heterocigóticos sem tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra *wild-type* sem tratamento com varfarina
- 1 peixe-zebra homocigótico com tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra heterocigóticos com tratamento com varfarina
- 2 peixes-zebra *wild-type* com tratamento com varfarina

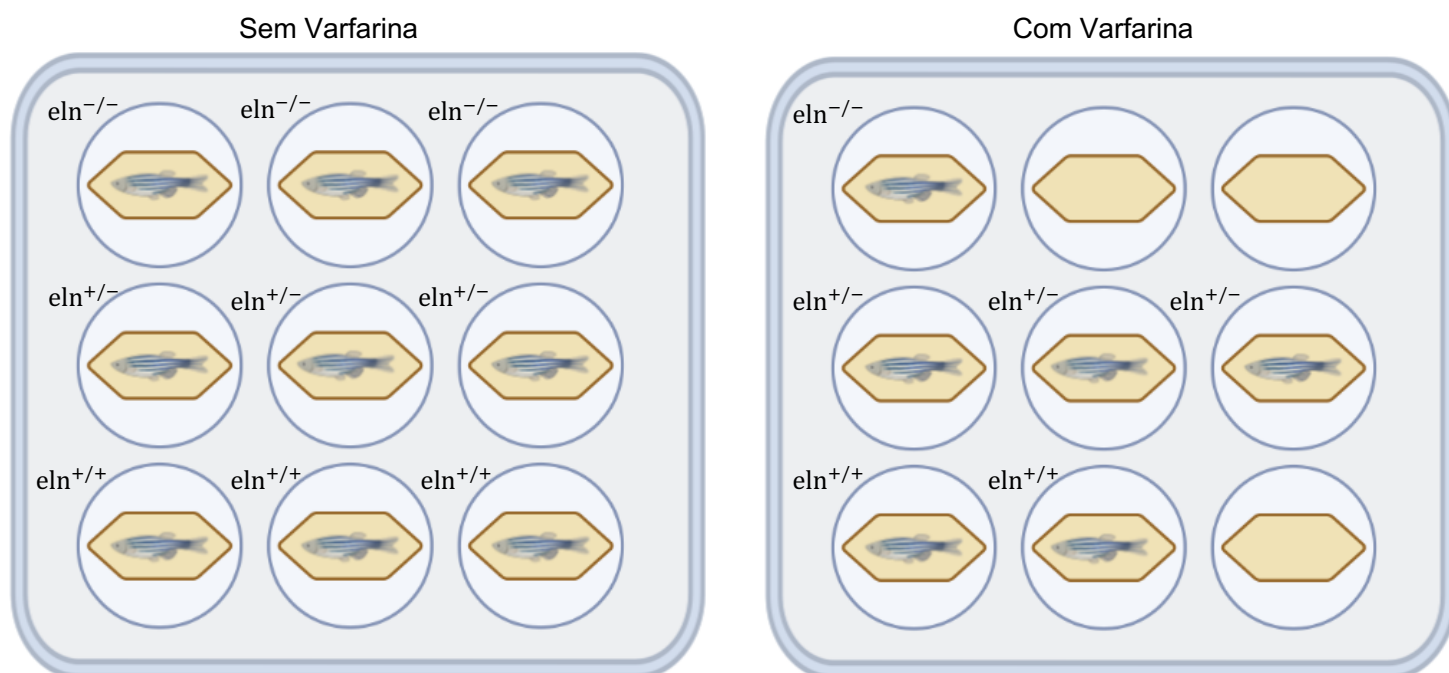


Figura 25- Esquema representativo do protocolo de fixação em GMA para a linhagem Sa17177. Para o grupo que não foi sujeito ao tratamento com Varfarina foram colocados 3 peixes-zebra homocigóticos ($eln^{-/-}$), 3 peixes-zebra heterocigóticos ($eln^{+/-}$) e 3 peixes-zebra *wild-type* ($eln^{+/+}$). Para o grupo sujeito ao tratamento com Varfarina foram colocados 1 peixe-zebra homocigótico ($eln^{-/-}$), 3 peixes-zebra heterocigóticos ($eln^{+/-}$) e 2 peixes-zebra *wild-type* ($eln^{+/+}$). Figura produzida através da aplicação BioRender.

Em relação à linha resultante do cruzamento do mutante Sa17177 com mutante para a Mgp, foram fixados (com 20 dpf):

- 3 peixes-zebra $eln^{+/+}$ sem tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra $eln^{+/-}$ sem tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra $eln^{-/-}$ sem tratamento com varfarina
- 3 peixes zebra $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ sem tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra $eln^{+/+}$ com tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra $eln^{+/-}$ com tratamento com varfarina
- 3 peixes-zebra $eln^{-/-}$ com tratamento com varfarina
- 3 peixes zebra $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ com tratamento com varfarina

Para a realização de cortes histológicos de amostras fixadas em GMA, utilizou-se um micrótomo Microm com lâminas de tungstênio.

Para que fosse possível o aparelho segurar a amostra, colou-se os blocos com as amostras em tacos de madeira quadrados. Após a verificação da orientação do bloco (totalmente paralelo à lâmina), realizou-se o corte rodando a manivela do aparelho. Com o auxílio de uma pinça, retirou-se o corte e colocou-se numa tina com água destilada. Com uma lâmina identificada e previamente tratada com Tespa, retirou-se o corte e deixou-se secar à temperatura ambiente. Depois de secas, guardou-se as lâminas em tabuleiros no frigorífico a 4°C para serem posteriormente usadas.

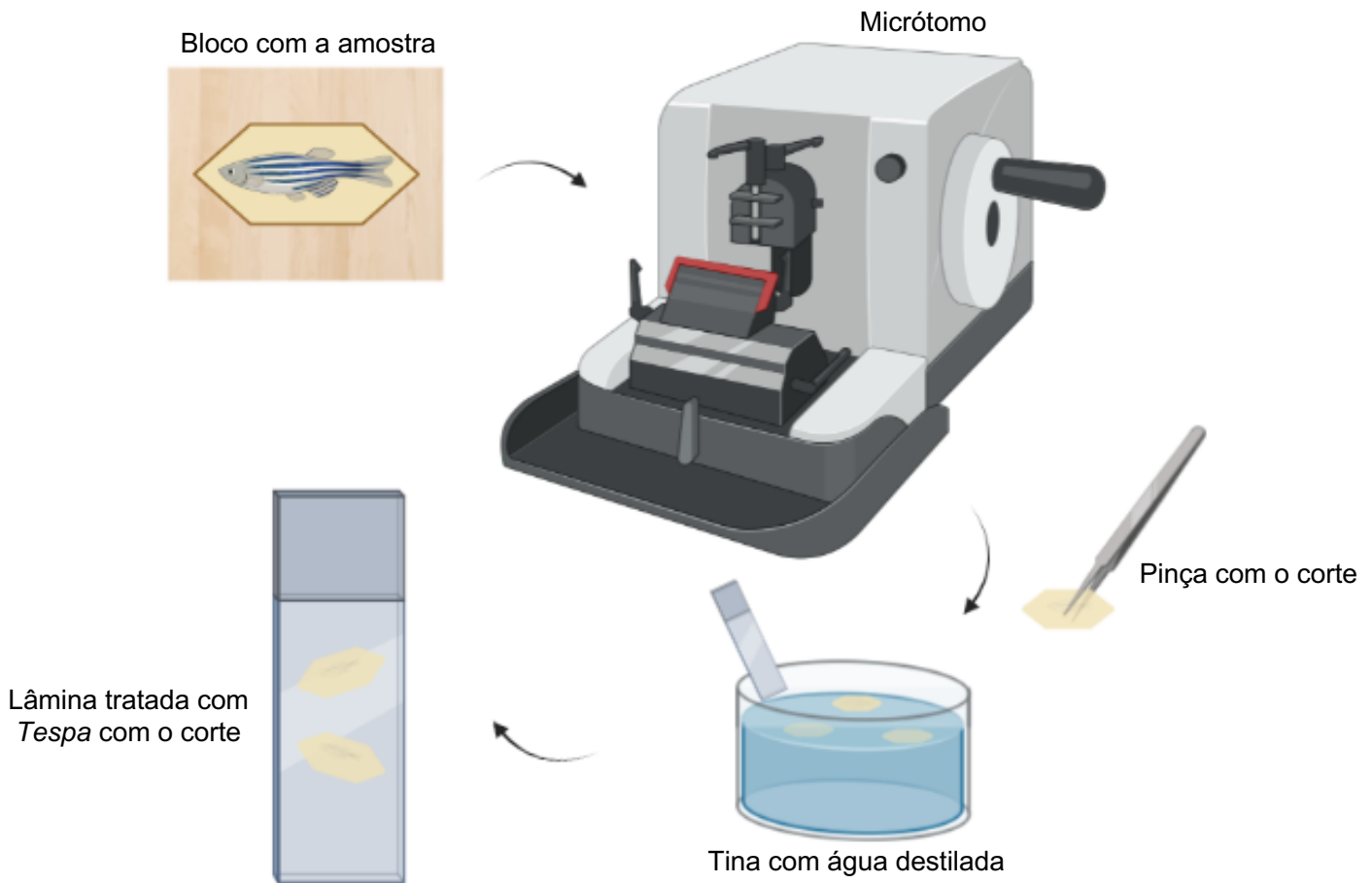


Figura 26- Esquema da obtenção de cortes histológicos fixados em GMA. O bloco com a amostra presa a um taco de madeira é colocado no micrótomo e de seguida cortado. Com o auxílio de uma pinça, os cortes são colocados numa tina com água destilada e retirados para lâminas tratadas com Tespa. Figura produzida através da aplicação BioRender.

- Cortes histológicos em parafina

Com peixes-zebra juvenis de 20 dias pós fertilização (dpf) e após o tratamento com varfarina, começou-se o processo de descalcificação necessário para a inclusão em parafina. Ambas as linhas, mutante Sa17177 e linhagem mutante para a elastina e para a Mgp, foram tratadas simultaneamente neste processo.

Para tal, sacrificou-se os peixes com uma dose letal de Tricaina (5 ml de Tricaina para 100 ml de água do sistema) e colocou-se os mesmos em *falcons* de 15 ml (10 peixes por *falcon*). Adicionou-se a cada um dos *falcons*, 3 ml de uma solução de EDTA 15% + PFA 1%. O EDTA age como um agente de descalcificação, uma vez que

remove os íons de cálcio do tecido mineralizado; já o PFA serve para preservar a morfologia e estabilizar as proteínas.

A solução de EDTA 15% + PFA 1% deve ser trocada regularmente, dado que, quantas mais trocas ocorrerem, maior será o seu poder de descalcificação. Além disso, é necessário ter em conta a idade e o tamanho do peixe a descalcificar, de modo a saber quantas trocas devem ser realizadas. Como os peixes utilizados tinham 20 dpf e eram pequenos, fez-se apenas 4 trocas de solução de EDTA 15% + PFA 1%.

Após a conclusão do processo de descalcificação, procedeu-se à lavagem dos peixes-zebra com uma solução de 3 ml de PBS (3 lavagens de 10 minutos cada).

Posteriormente, realizou-se uma série de imersões com diferentes percentagens de etanol, como apresentado a seguir. Uma vez atingido o etanol 70%, os peixes podem ser guardados nesta solução até serem utilizados.

- Etanol 25% - 10 minutos
- Etanol 50% - 10 minutos
- Etanol 70% - até ser necessário utilizar as amostras

Colocou-se os peixes em cassetes previamente identificadas e mergulhou-se as cassetes num recipiente repleto de etanol 70%. De seguida, colocou-se as cassetes num suporte de metal para serem posteriormente processadas.

No aparelho *Tissue Processor TP1020* prendeu-se o suporte metálico com as cassetes e adicionou-se as seguintes soluções por ordem:

- Recipiente 1 ao 4 – 0h00 – sem solução
- Recipiente 5 – 3h00 – Etanol 70%
- Recipiente 6 – 3h00 – Etanol 96%
- Recipiente 7 – 3h00 – Etanol absoluto
- Recipiente 8 – 3h00 – Xilol
- Recipiente 9 – 3h00 – Xilol
- Recipiente 10 ao 12 – 4h00 – Parafina

No final, retirou-se as cassetes com as amostras e guardou-se as soluções utilizadas. Com moldes retangulares e cassetes limpas, procedeu-se à colocação de parafina nas amostras na máquina *Tissue Embedding*. Deixou-se secar por 30 minutos e guardou-se os blocos no frigorífico a uma temperatura de 4°C.

Para a realização dos cortes para blocos de parafina o procedimento foi semelhante aos blocos fixados em GMA. Alterou-se apenas o tipo de lâmina utilizada (lâminas de aço) e adicionou-se a colocação do corte em banho-maria (com água destilada e a 40°C) e só depois, a sua colocação na lâmina.

Posteriormente, guardou-se as lâminas contendo os cortes no frigorífico a uma temperatura de 4°C, até serem necessárias para as técnicas de coloração.

3.7. Protocolo para a coloração com Von Kossa

A técnica de coloração de Von Kossa permite detetar depósitos anormais de cálcio nos tecidos. Isto é possível, porque ocorre uma substituição de iões de cálcio por iões de prata quando adicionada uma solução de nitrato de prata. Desta forma, os depósitos aparecem corados a preto quando observados em microscopia.

É necessário também outra solução de coloração de forma a identificar outros tecidos. Para isso, utilizou-se a solução de Azul de toluidina 1%. Esta possui alta afinidade com os componentes ácidos dos tecidos, corando assim os ácidos nucleicos de azul e polissacarídeos de roxo.

Com as lâminas secas, colocou-se uma solução previamente preparada de Azul de toluidina 1% (diluída em bórax 1:10), de modo a tapar toda a secção da amostra. Após 3 segundos, retirou-se a solução com um esguicho de água destilada e aplicou-se a solução de nitrato de prata a 2% do mesmo modo. Deixou-se as lâminas ao sol durante o tempo necessário para que aparecesse sinal. No final, retirou-se a solução com água destilada e procedeu-se à montagem com *EUKITT*.

3.8. Protocolo de coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson

Após os cortes em parafina realizou-se a coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson, sendo esta, a combinação de dois protocolos distintos, Verhoeff e Van Gieson.

A técnica de Verhoeff permite detetar a presença de fibras elásticas no tecido através da solução de hematoxilina férrica alcoólica, que ao conter cloreto férrico e iodina proporciona interações com a elastina, uma vez que esta apresenta mais afinidade para o corante que os restantes elementos.

Por outro lado, a técnica de Van Gieson, constituída por ácido pícrico e fucsina ácida, irá corar seletivamente o colagénio presente. Além de servir como coloração de contraste para a técnica de Verhoeff.

De forma a corar os cortes histológicos em parafina, preparou-se os reagentes mencionados abaixo com extremo cuidado. Realizou-se todo o protocolo dentro da hote e com os equipamentos de proteção individuais necessários (bata, luvas de nitrilo e óculos de proteção). Além disso, é necessário ter especial atenção ao ácido pícrico, uma vez que pode tornar-se explosivo se solidificar.

- Hematoxilina de Verhoeff: (fazer de fresco)

1. Hematoxilina alcoólica: 20,0 mL

-Hematoxilina: 5,0 g

-Álcool absoluto: 100,0 mL

Dissolver com calor. Estável por 1 ano.

2. Cloreto férrico a 10%: 8,0 mL

-Cloreto férrico: 10,0 g

-Água destilada: 100,0 mL

Dissolver bem. Estável por 1 ano.

3. Iodo de Lugol: 8,0 mL

-Iodo: 2,5 g

-Iodeto de potássio: 5,0 g

-Água destilada: 50 mL

- Solução de diferenciação (cloreto férrico a 2%): (fazer de fresco)

1. Cloreto férrico a 10%: 10,0 mL

-Cloreto férrico: 10,0 g

-Água destilada: 100,0 mL

Dissolver bem. Estável por 1 ano.

2. Água destilada: 40,0 mL

- Tiosulfato de sódio a 5%:

1. Tiosulfato de sódio: 5,0 g

2. Água destilada: 100,0 mL

- Solução de Van Gieson: (Deixar repousar durante a noite)

Atenção: Apenas estável por 2 semanas. Tóxico.

1. Ácido Fuchsin a 1%: 1,0 mL

2. Ácido pícrico, saturado: 45,0 mL

Começou-se pela desparafinação e hidratação das amostras escolhidas, conforme exemplificado a seguir:

- Xilol 100%: 10 minutos

- Xilol 100%: 10 minutos

- Etanol 100%: 6 minutos

- Etanol 70%: 6 minutos

- Etanol 50%: 6 minutos

- Água destilada: 10 minutos

Após a desparafinação, aplicou-se a solução de hematoxilina de Verhoeff durante 30 minutos e esperou-se até que a coloração estivesse completa. Posteriormente, lavou-se a secção com água destilada (passo repetido sempre que se muda a solução) e colocou-se a solução de diferenciação por cerca de 20 minutos, ou até que fosse possível a visualização de fibras pretas bem definidas. Aplicou-se a solução de tiosulfato de sódio a 5% durante 1 minuto para remover o iodo e, após lavagem com água destilada, colocou-se a solução de Van Gieson durante 5 minutos.

Posteriormente, observou-se ao microscópio as secções e procedeu-se à desidratação (esquema abaixo) e montagem das mesmas em *EUKITT*.

Desidratação:

- Etanol 96%: 10 minutos
- Etanol 100%: 10 minutos
- Etanol 100%: 10 minutos
- Etanol 100%: 10 minutos
- Xilol 100%: 10 minutos
- Xilol 100%: 10 minutos
- Xilol 100%: 10 minutos

3.9. Protocolo de imunofluorescência

O protocolo de imunofluorescência com o anticorpo primário anti-elastina foi realizado, de forma a observar os locais de expressão da elastina nas amostras e permitir uma possível comparação entre tecidos provenientes de peixes-zebra *wild-type* e homozigóticos para a elastina.

Para este protocolo, utilizou-se secções provenientes da fixação em parafina, de todos os grupos da linha mutante Sa17177, bem como a linha mutante para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$).

Utilizou-se também, o anticorpo primário *Anti-Elastin antibody* (ab216681), com uma diluição de 1:100 e o anticorpo secundário *Goat Anti-Rabbit IgG H&L* (Alexa Fluor® 488) (ab150077), com a mesma diluição.

Para tal, seguiu-se o seguinte protocolo:

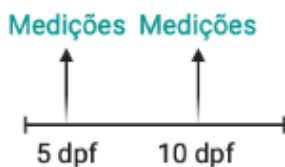
- Lavou-se 3 vezes em PBS (5 minutos cada lavagem);
- Lavou-se 2 vezes em PBT (PBS + 0,1% *triton*) (5 minutos cada lavagem);
- Adicionou-se PBT + 4% soro de cabra às secções e deixou-se por 2 horas;
- Adicionou-se PBT + 4% soro de cabra + anticorpo primário (ab216681) e deixou-se durante a noite a 4°C;
- Lavou-se 3 vezes em PBT + 4% soro de cabra (5 minutos cada lavagem);

Função da elastina no desenvolvimento das calcificações ectópicas da cartilagem associadas a uma deficiência em MGP – Contribuição para o estudo da Síndrome de Keutel

- Adicionou-se PBT + 4% soro de cabra + anticorpo secundário (ab150077) a metade das amostras e à outra metade adicionou-se apenas PBT + 4% soro de cabra, durante 1 hora;
- Lavou-se 3 vezes com PBS (5 minutos cada lavagem);
- Colocou-se a solução de DAPI (1:1000) em PBS, durante 5 minutos (ao abrigo da luz);
- Lavou-se 3 vezes com PBS (5 minutos cada lavagem);
- Montou-se as lâminas em DAKO;
- Deixou-se secar durante a noite num local ao abrigo da luz;
- Selou-se com verniz.

Posteriormente, observou-se as amostras no microscópio de fluorescência, com o auxílio do software *ZEISS ZEN*, e analisou-se os resultados obtidos.

Primeiro Cruzamento Sa17177 - 26/01



Segundo Cruzamento Sa17177 - 09/02



Terceiro Cruzamento Sa17177 e MGP - 01/06



Figura 27- *Timeline* dos protocolos realizados para a linha Sa17177 e para a linha mutante para a elastina e para a Mgp. Figura produzida através da aplicação BioRender.

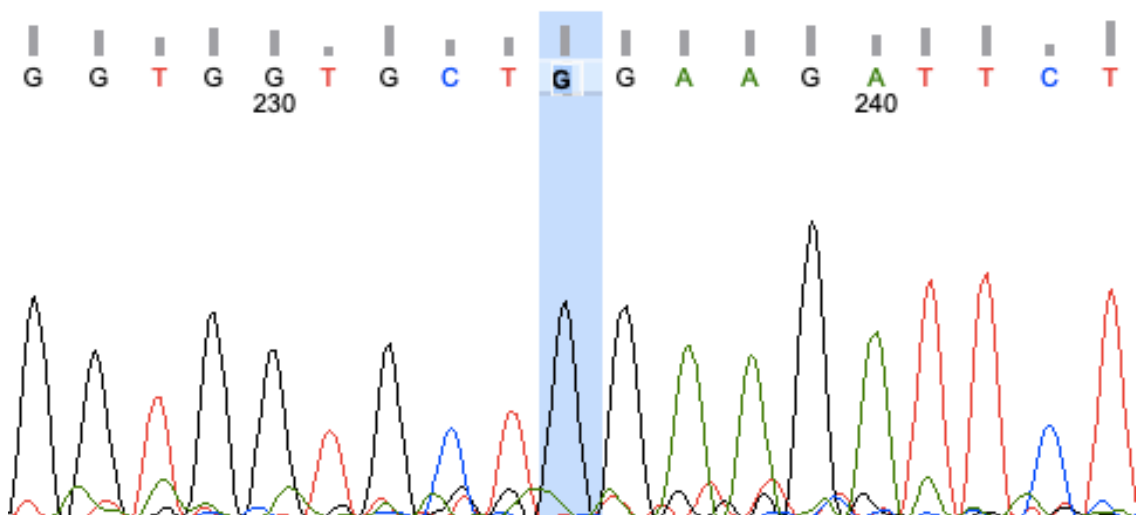
IV. Resultados

4.1. Genotipagem

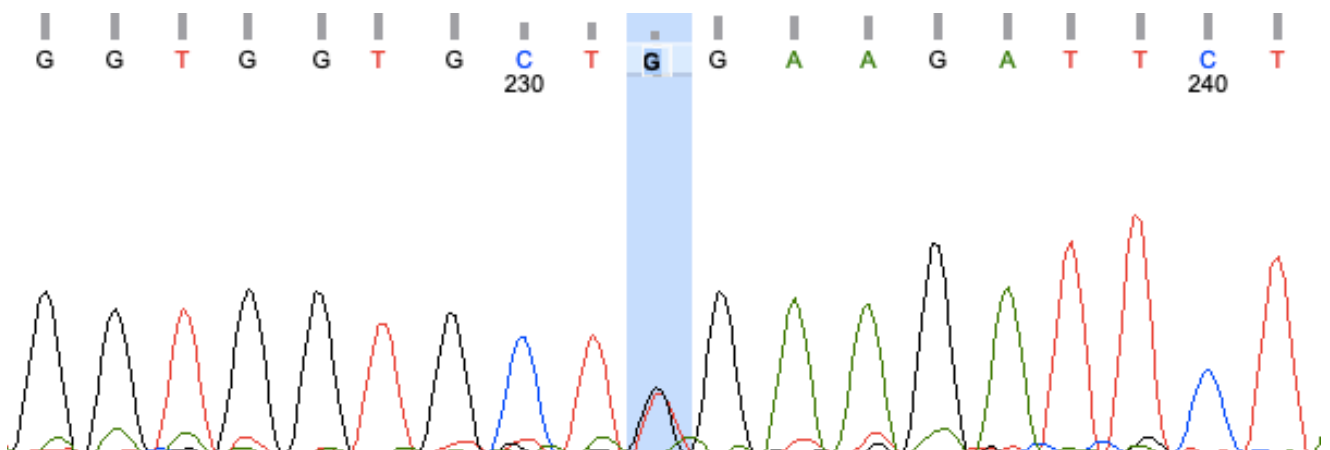
Com os resultados da sequenciação dos peixes-zebra da linha mutante Sa17177 e através da aplicação FinchTV, foi possível identificar quais os peixes que apresentavam mutações e prosseguir com os cruzamentos.

Como mencionado anteriormente, a linha mutante Sa17177 é caracterizada por uma mutação pontual na localização genómica 296216, onde ocorre uma troca de uma guanina por uma timina. Desta forma, e recorrendo à plataforma NCBI como modo de comparação, foi possível obter os seguintes resultados:

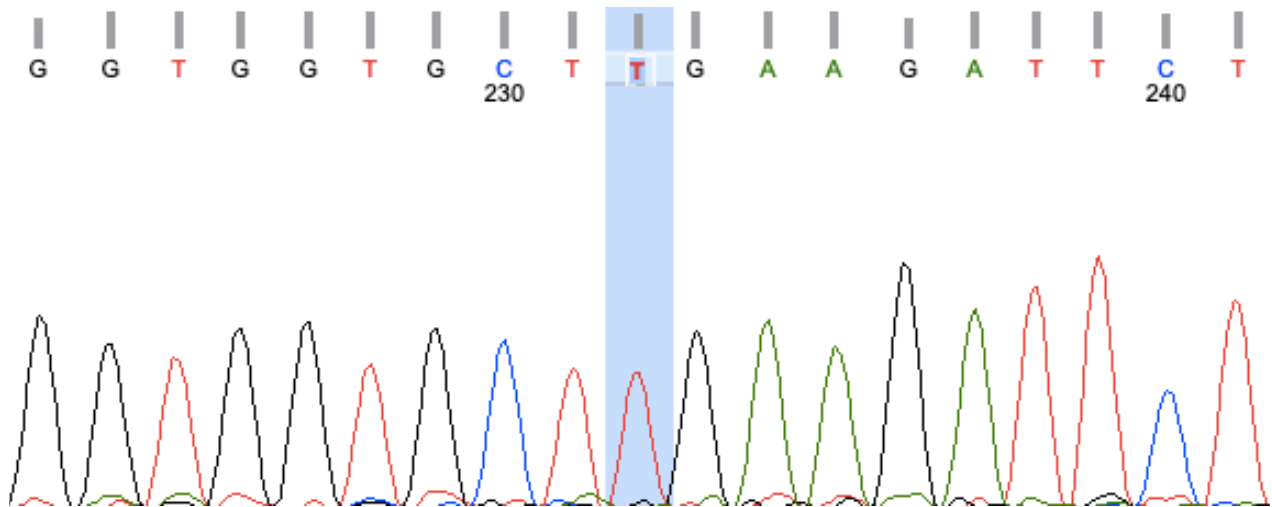
- Peixe-zebra *wild-type* apresenta a guanina no local correto:



- Peixe-zebra heterozigótico apresenta a guanina e a timina no mesmo local:



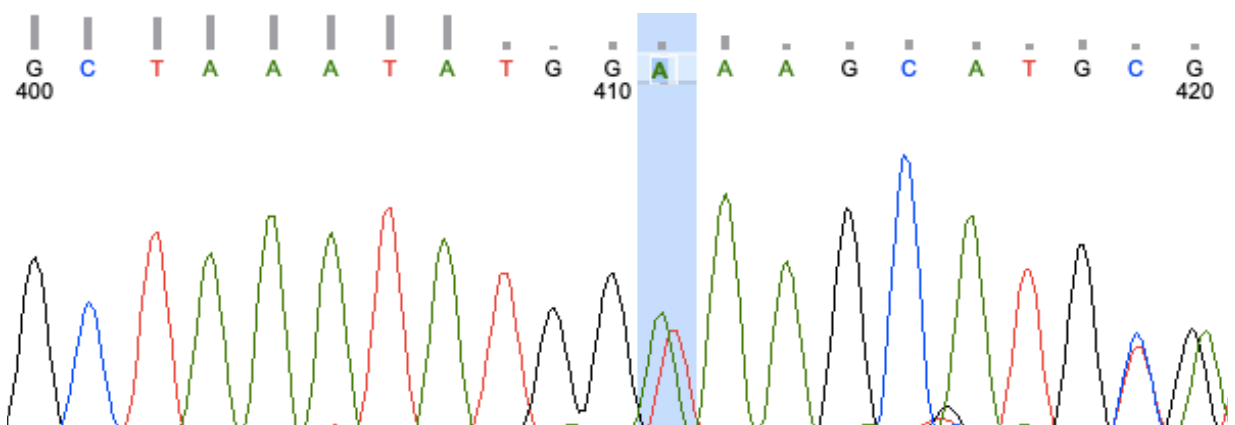
- Peixe-zebra homozigótico apresenta uma timina no local:



Após a análise, concluiu-se que dos 102 peixes-zebra da linha mutante Sa17177 sequenciados, 29 eram *wild-type*, 43 heterozigóticos e 30 homozigóticos. Isto permitiu o começo dos cruzamentos de modo a analisar desde os primeiros dias os fenótipos de cada grupo.

Por outro lado, os resultados da sequenciação da linha mutante Sa42459, caracterizada pela troca de uma timina por uma adenina na posição genómica 285811, foram desfavoráveis. Dos 10 peixes-zebra sequenciados todos apresentaram heterozigotia para a mutação. Assim sendo, não foi possível a continuação do estudo para esta linha mutante.

- Peixe-zebra heterozigótico apresenta a adenina e a timina no mesmo local:



4.2. Análises biométricas e análises do fenótipo

O primeiro cruzamento realizado mostrou que ao décimo dia a média do comprimento standard dos peixes-zebra homozigóticos ($eIn^{-/-}$) era significativamente menor que a dos *wild-type* ($eIn^{+/+}$) (figura 28). Contudo, devido a elevada mortalidade não foi possível continuar a análise por mais tempo.

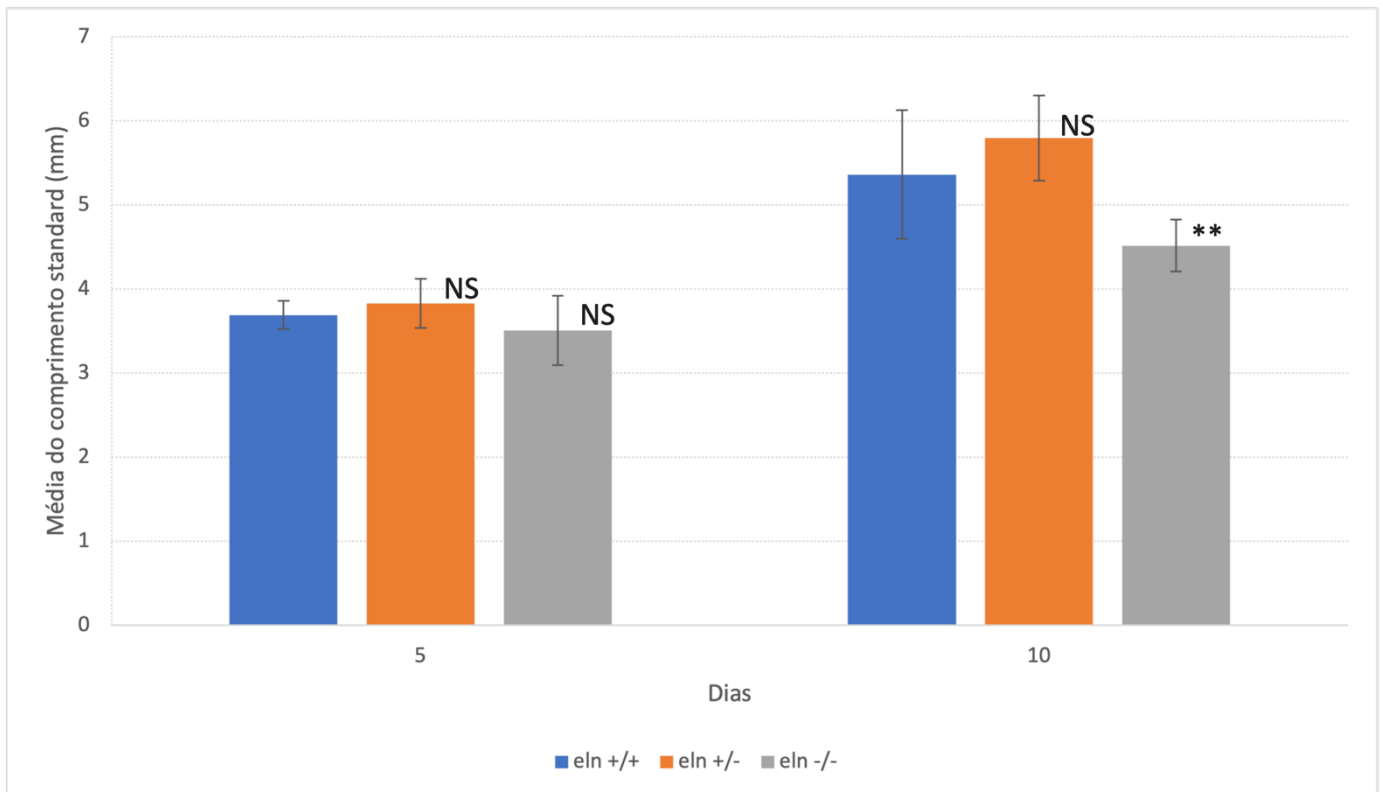


Figura 28- Média do comprimento standard (mm) do primeiro cruzamento. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* ($eIn^{+/+}$). Os peixes heterozigóticos ($eIn^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas, tanto no dia 5 como no dia 10 pf, com um *p-value* NS ($\geq 0,05$). Os peixes homozigóticos ($eIn^{-/-}$) apesar de não apresentarem diferenças significativas no dia 5 pf (*p-value* NS ($\geq 0,05$)), apresentaram elevada significância no dia 10 pf ** com um *p-value* ($\leq 0,01$).

Já a análise do segundo cruzamento conseguiu ter uma maior duração, e além de comprovar os resultados obtidos no primeiro cruzamento, mostrou também que a partir do dia 5 pf já existe uma diferença significativa na comparação entre o comprimento médio standard dos $eIn^{+/+}$ com os $eIn^{-/-}$ (figura 29).

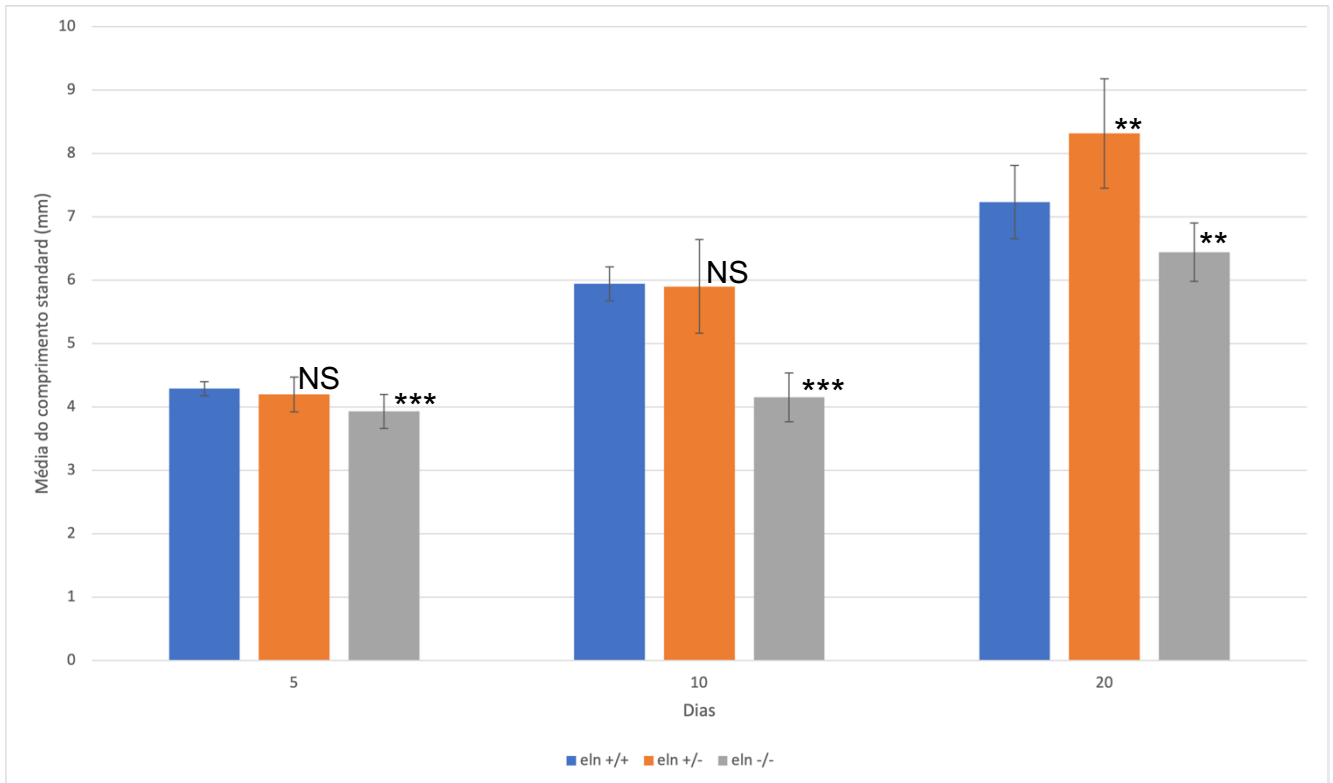


Figura 29- Média do comprimento standard (mm) do segundo cruzamento. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* ($eln^{+/+}$). Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas, tanto no dia 5 como no dia 10 pf, com um p -value NS ($\geq 0,05$), contudo no dia 20 pf apresentaram valores comparativamente mais altos com uma elevada significância ** com um p -value ($\leq 0,01$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** p -value ($\leq 0,001$) nos dias 5 e 10 pf, e no dia 20 pf, apresentaram também valores mais baixos, mas com uma significância apenas elevada ** p -value ($\leq 0,01$).

Os resultados do terceiro cruzamento realizado, não só serviram para corroborar ainda mais os dados obtidos no primeiro e segundo cruzamentos, de como os peixes $eln^{-/-}$ são significativamente mais pequenos, como também permitiram adicionar a análise do comprimento médio standard dos peixes-zebra da linha mutante para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$), e a respetiva comparação (figura 30).

Desta forma, confirmou-se que os peixes-zebra $eln^{-/-}$ da linha Sa17177 são significativamente mais pequenos em comparação aos $eln^{+/+}$, e que os peixes $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ não apresentam diferenças significativas comparativamente.

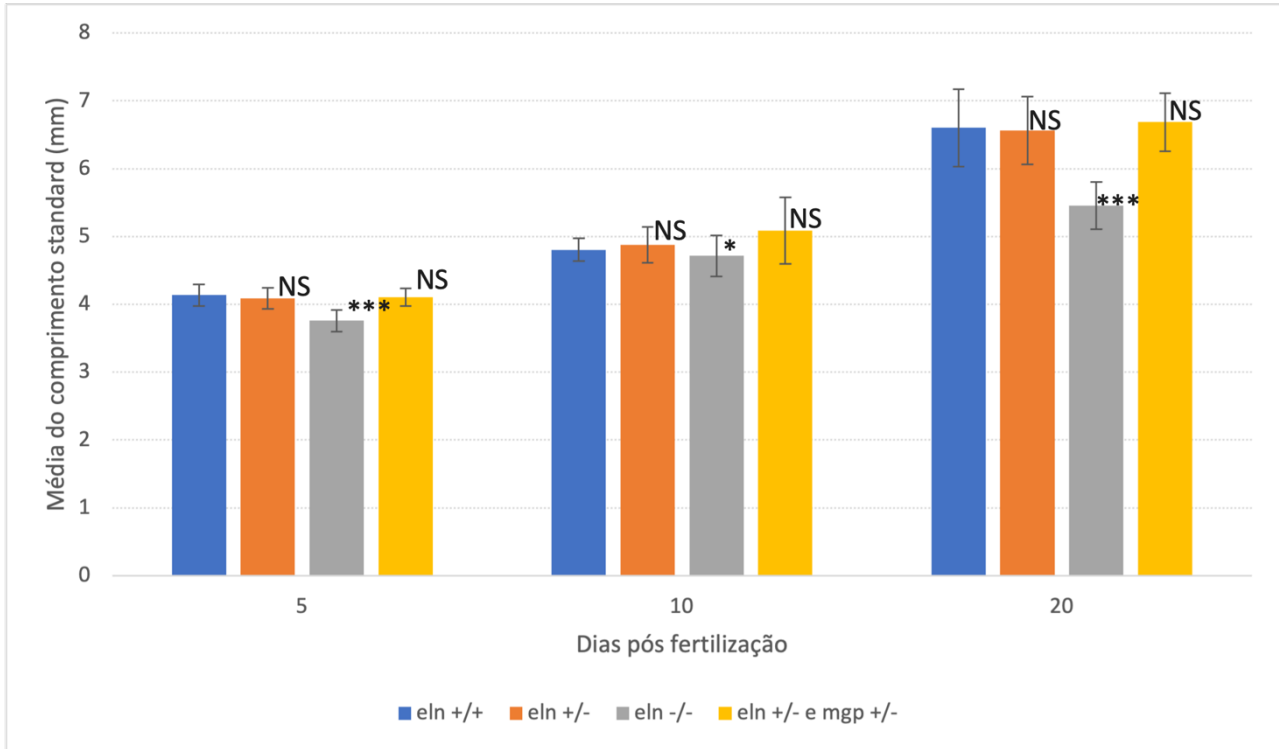


Figura 30- Média do comprimento standard (mm) do terceiro cruzamento. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra wild-type ($eln^{+/+}$). Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas, tanto no dia 5, no dia 10 e no dia 20 pf com um p -value NS ($\geq 0,05$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** p -value ($\leq 0,001$) nos dias 5 e 20 pf, e no dia 10 pf, apresentaram também valores mais baixos, mas com significância * p -value ($\leq 0,05$). Os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas em todos os dias de análise com um p -value NS ($\geq 0,05$).

Além das análises biométricas realizou-se também análises de fenótipo, de modo a observar alterações ou malformações nos peixes-zebra da linha Sa17177 e *mgp*.

No primeiro cruzamento, analisou-se 10 peixes-zebra de cada grupo ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$) e observou-se que no dia 5 pf, 3 dos 10 peixes homozigóticos analisados apresentavam malformações na estrutura (figura 31), enquanto nos *wild-type* e heterozigóticos, nenhum apresentava qualquer alteração.

Em relação ao segundo cruzamento, analisou-se ao dia 10 pós fertilização 50 peixes-zebra de cada grupo ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$) e observou-se o mesmo resultado. Nenhum peixe *wild-type* ou heterozigótico apresentava malformações, mas 4 dos peixes homozigóticos analisados possuíam deformações na estrutura (figura 32).

O terceiro cruzamento serviu também para atestar os resultados anteriores, uma vez que, dos 10 peixes homozigóticos analisados no dia 10 pf, um apresentava alterações na estrutura (figura 33). Além disso, permitiu analisar os peixes $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ e observar a ausência de malformações, tal como os $eln^{+/+}$ e $eln^{+/-}$.



Figura 31– Malformações na estrutura observadas em 3 peixes homozigóticos no dia 5 pf do primeiro cruzamento. As malformações estão evidenciadas com setas vermelhas. Fotografias tiradas com a câmara do Samsung Galaxy Fe sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 20 (10x2).



Figura 32– Malformações na estrutura observadas em 4 peixes homozigóticos no dia 10 pf do segundo cruzamento. As malformações estão evidenciadas com setas vermelhas. Fotografias tiradas com a câmara do Samsung Galaxy Fe sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 20 (10x2).



Figura 33– Malformação na estrutura observada em um peixe homozigótico no dia 10 pf do terceiro cruzamento. A malformação está evidenciada com uma seta vermelha. Fotografia tirada com a câmara do Samsung Galaxy Fe sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 20 (10x2).

Analisou-se também diariamente o número de ovos e de larvas mortos, em todos os cruzamentos realizados, de modo a verificar se haveria uma ligação entre a taxa de mortalidade e a forma mutante utilizada, contudo os resultados foram inconstantes e sem significância.

4.3. Tratamento com varfarina

O segundo cruzamento começou o tratamento com varfarina aos 30 dpf e teve uma duração de 15 dias. Começou-se a observar mortalidade ao terceiro dia e a partir do quinto dia, observou-se o aparecimento de hemorragias e deformações nos peixe-zebra mutados e não mutados ($eIn^{+/+}$, $eIn^{+/-}$, $eIn^{-/-}$) tratados com varfarina (figura 34).

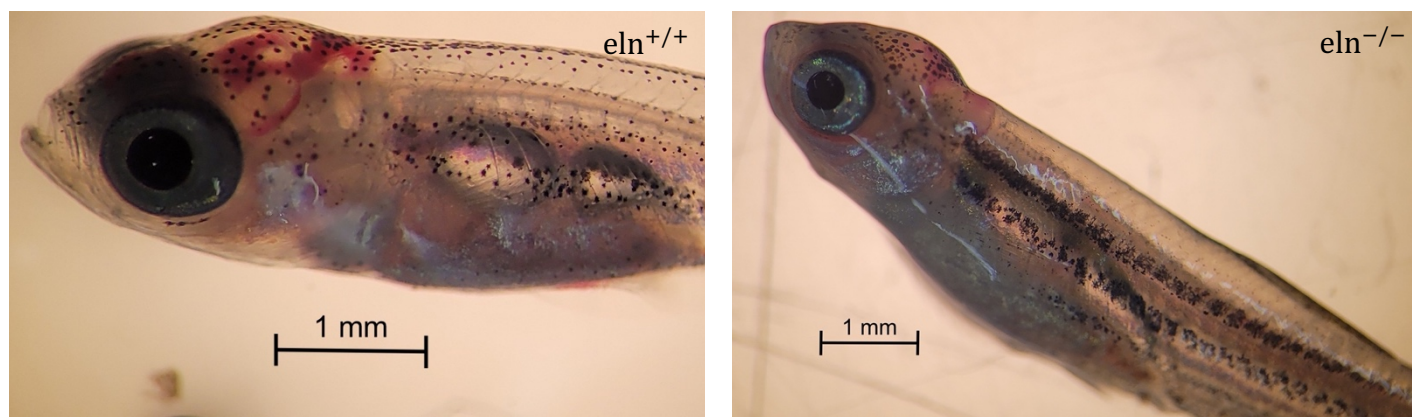


Figura 34– Hemorragias encontradas nos peixes-zebra $eln^{+/+}$ e $eln^{-/-}$ durante o tratamento com varfarina. Observou-se o peixe *wild-type* ($eln^{+/+}$) no dia 11 do tratamento, enquanto, o peixe homocigótico ($eln^{-/-}$) foi observado ao quinto dia de tratamento. Fotografias tiradas com a câmara do Samsung Galaxy Fe sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 20 (10x2).

Observou-se também, que no final da experiência, nenhum peixe do grupo controlo (sem varfarina) tinha falecido, contudo no grupo dos tratados com varfarina restaram 2 *wild-type*, 5 heterocigóticos e 1 homocigótico (figura 35).

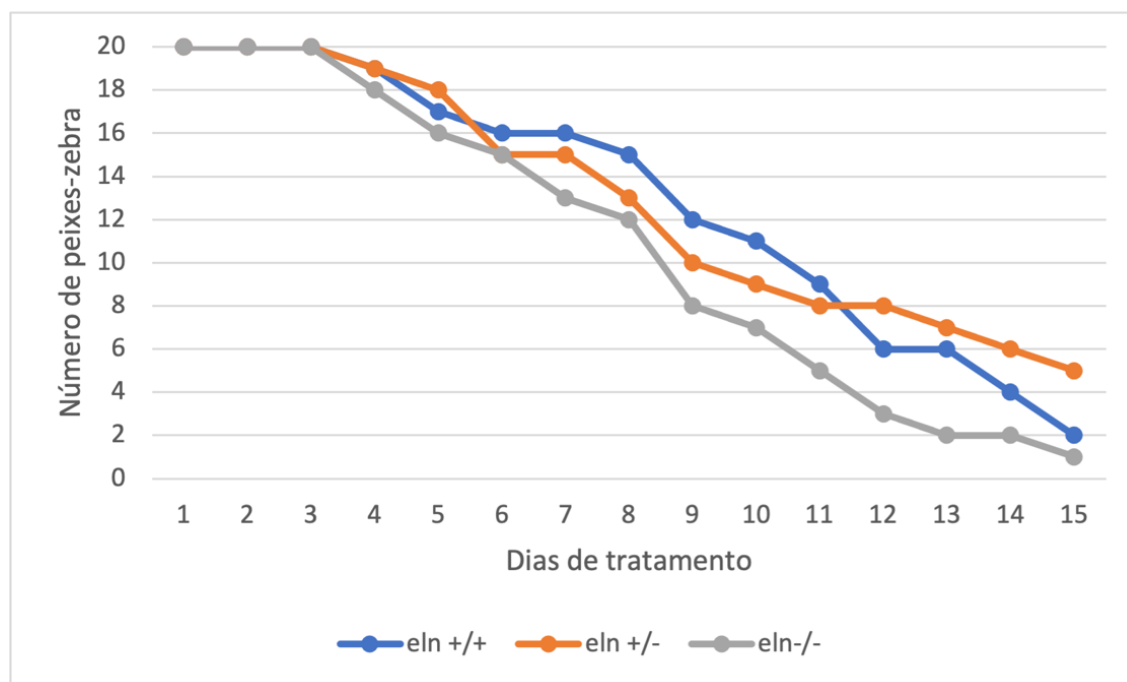


Figura 35– Taxa de mortalidade do segundo cruzamento ao longo do tratamento com varfarina.

No tratamento com varfarina do terceiro cruzamento, já com os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$), observou-se os mesmos resultados, os peixes homozigóticos para a elastina apresentaram uma maior taxa de mortalidade que os *wild-type* da mesma linha (figura 36). Além disso, observou-se também o aparecimento de hemorragias e deformações em todos os peixes colocados em contacto com a varfarina, independente da mutação apresentada, atestando assim o resultado anterior.

Um resultado não esperado, foi a elevada taxa de mortalidade dos peixes $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$, que pode ter sido o produto de diversos fatores. Contudo, seria necessário a realização de outro tratamento de forma a confirmar este resultado e a sua veracidade.

No final do tratamento, dos 40 peixes-zebra colocados no tratamento com varfarina, sobreviveram 34 $eln^{+/+}$, 34 $eln^{+/-}$, 33 $eln^{-/-}$ e 30 $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$, enquanto, os controlos (sem varfarina) sobreviveram todos.

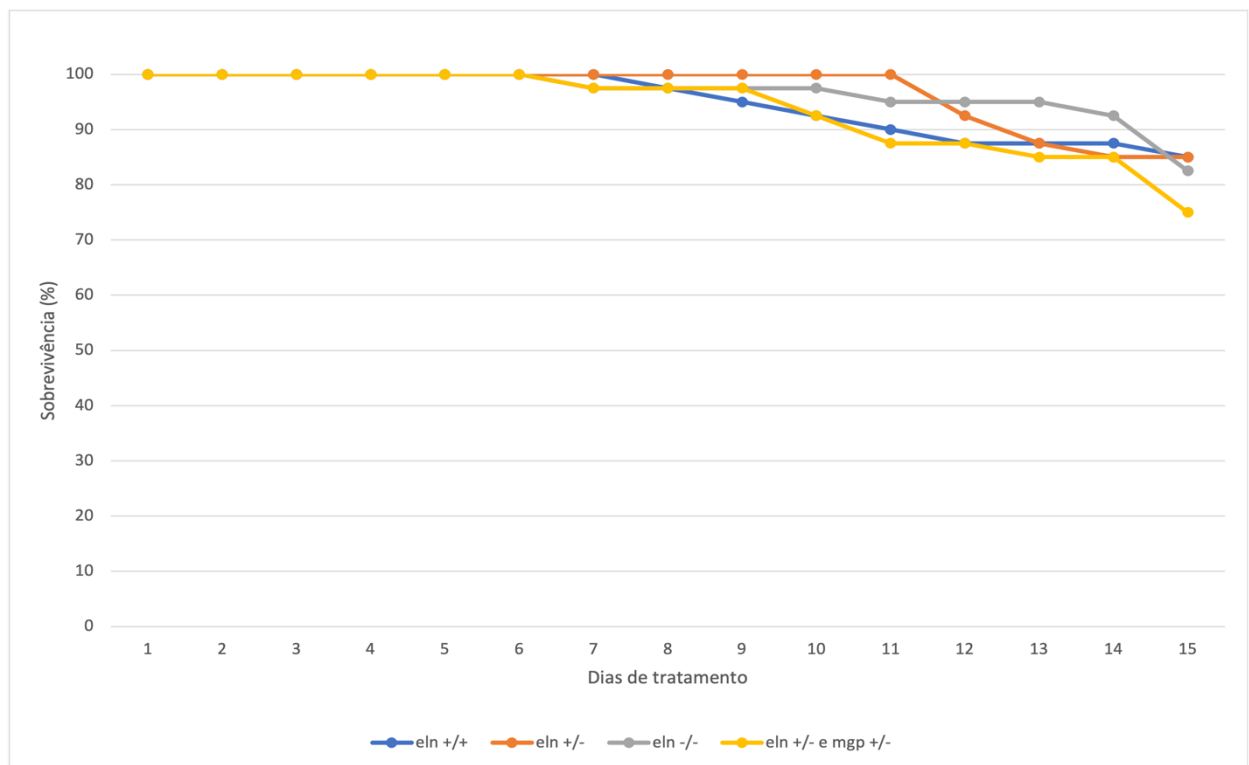


Figura 36– Taxa de mortalidade do terceiro cruzamento ao longo do tratamento com varfarina.

4.4. Coloração com Alizarin Red

A coloração de alizarin red foi feita em peixes-zebra da linha Sa17177 com 30 dias pós fertilização e antes do tratamento de varfarina, de modo a observar se havia diferenças na calcificação entre peixes mutados e não mutados.

Nesta experiência analisou-se o CTCF (*corrected total cell fluorescence*) e o espaçamento vertebral, de forma a quantificar as diferenças observadas, uma vez que, visivelmente, não era claro. Estes dados foram analisados através do *software ImageJ*.

Os resultados observados, demonstram que os peixes-zebra da linha Sa17177 homocigóticos apresentam um CTCF significativamente menor, comparativamente aos peixes *wild-type* da mesma linha. Isto indica que os peixes $eln^{-/-}$ possuem vértebras menos calcificadas que os $eln^{+/+}$ (figura 37).

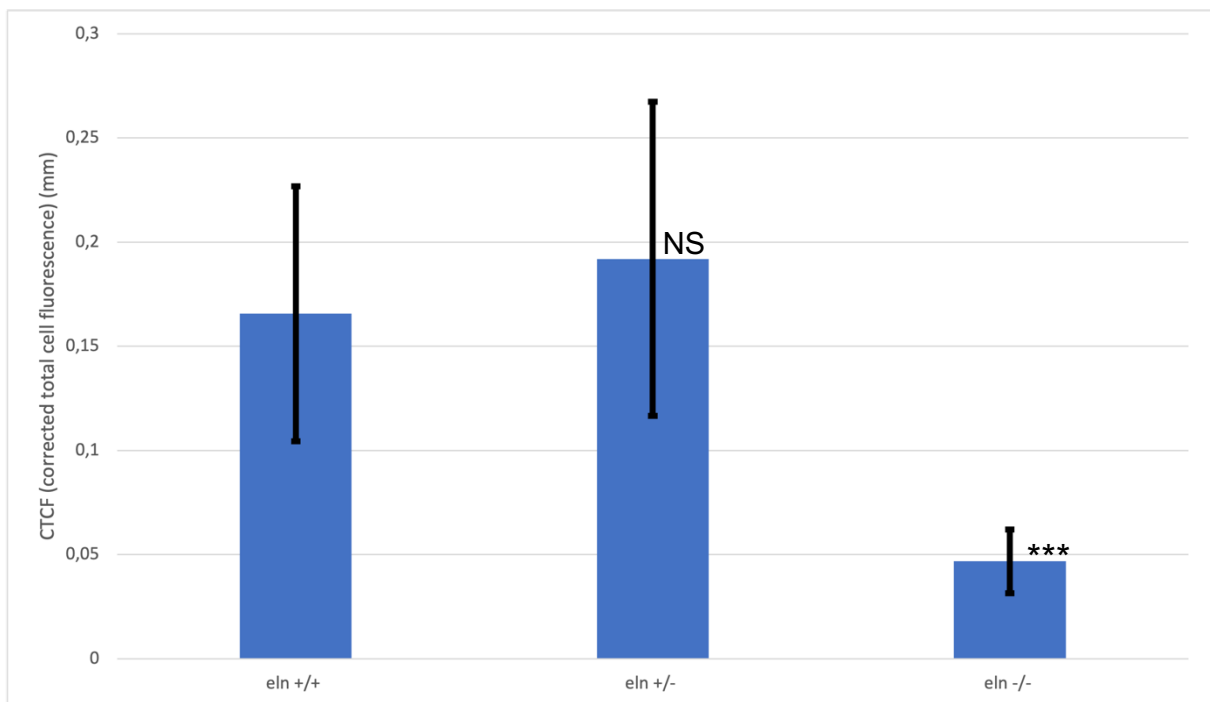


Figura 37- CTCF de peixes-zebra da linha Sa17177 com 30 dpf. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* ($eln^{+/+}$). Os peixes heterocigóticos ($eln^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas com um *p-value* NS ($\geq 0,05$). Os peixes homocigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** *p-value* ($\leq 0,001$).

Além disso, o espaçamento vertebral médio nos $eln^{-/-}$ foi bastante elevado comparativamente aos $eln^{+/+}$, comprovando o resultado anterior que os peixes não mutados da linha Sa17177 apresentam uma maior calcificação que os mutados (figura 38).

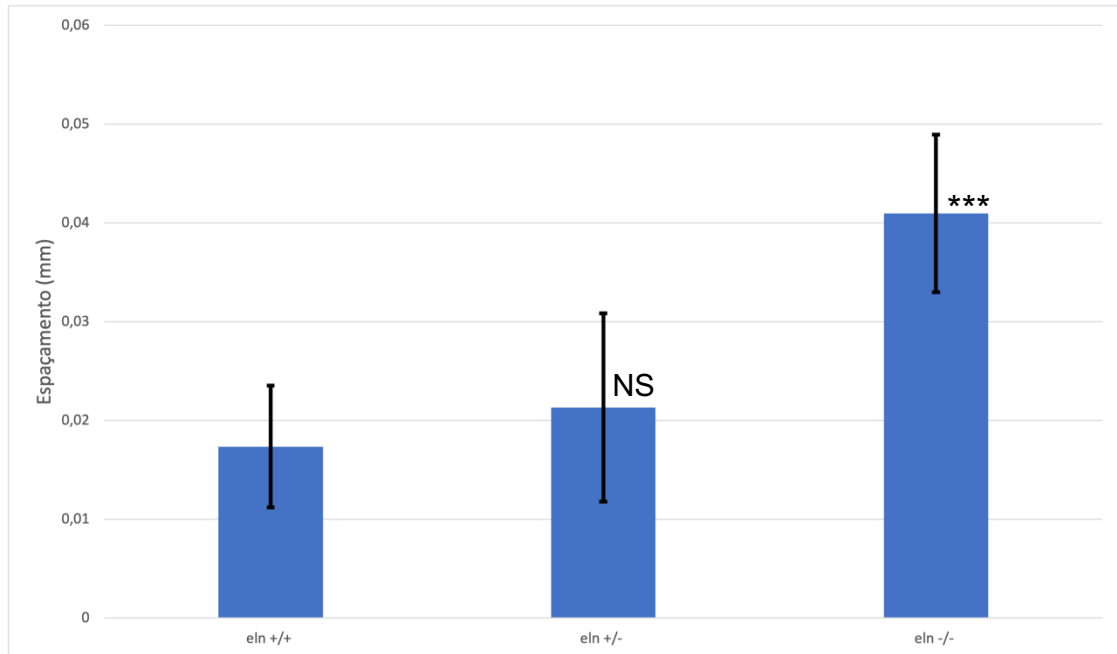


Figura 38- Espaçamento vertebral médio de peixes-zebra da linha Sa17177 com 30 dpf. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* ($eln^{+/+}$). Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas com um *p-value* NS ($\geq 0,05$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** *p-value* ($\leq 0,001$).

Realizou-se também a coloração com alizarin red em peixes-zebra da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e Mgp, mas desta vez, depois de um tratamento com varfarina e com uma idade diferente (20 dpf).

Neste caso, observou-se os mesmos resultados obtidos anteriormente. O CTCF era mais pequeno e o espaçamento vertebral era maior nos peixes-zebra $eln^{-/-}$, analogamente aos $eln^{+/+}$.

Com esta experiência, foi possível analisar também os valores de CTCF e do espaçamento vertebral para os peixes-zebra $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$, que como expectável, foram bastante semelhantes aos valores dos peixes $eln^{+/-}$.

Além disso, conseguiu-se observar o efeito da varfarina na calcificação das vértebras. Os peixes $eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ tratados com varfarina,

apresentaram valores maiores de CTCF comparativamente aos não tratados, enquanto os peixes $eln^{-/-}$ apresentaram valores mais baixos (figura 39).

Já no espaçamento vertebral, os peixes $eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ que estiveram expostos à varfarina, demonstraram um decréscimo do valor médio intervertebral, e os $eln^{-/-}$ um aumento significativo (figura 40).

Desta forma, é possível afirmar que a varfarina tem impacto na calcificação vertebral dos peixes-zebra, seja em peixes-zebra mutados ou não mutados.

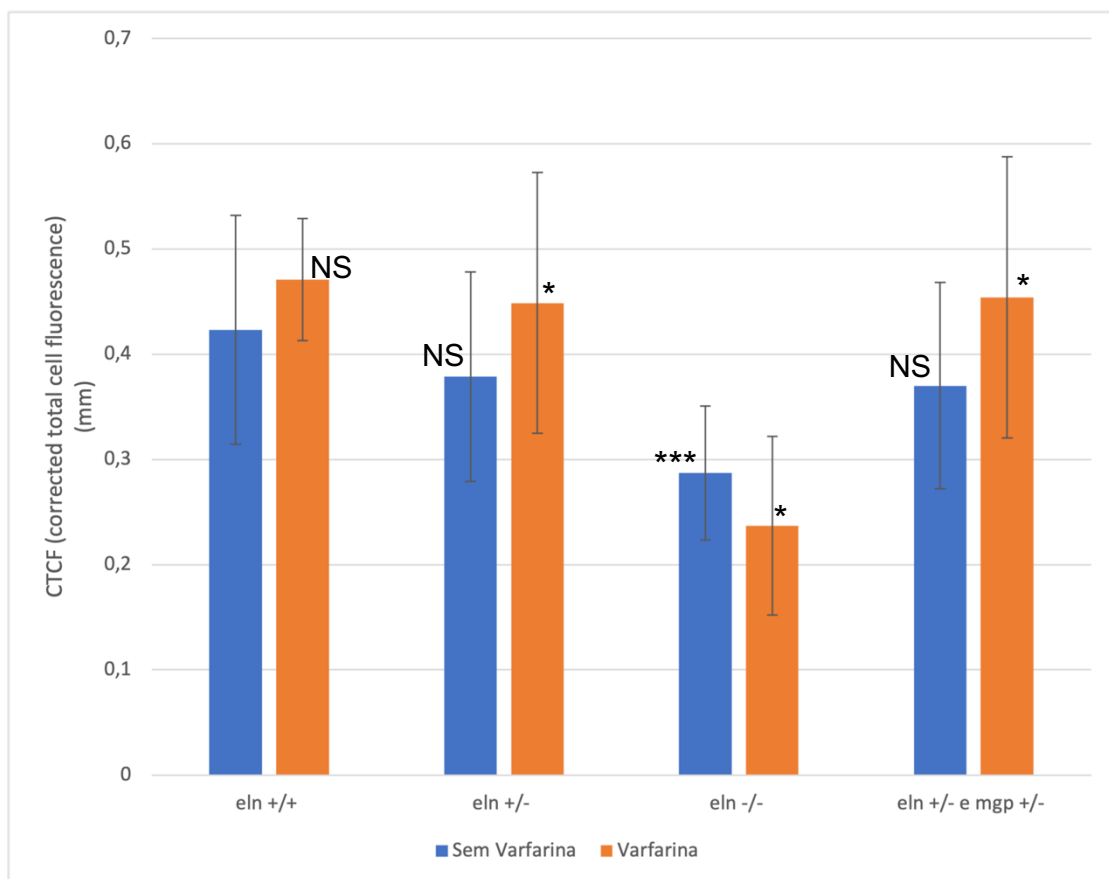


Figura 39- CTCF de peixes-zebra da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e Mgp com 20 dpf. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra não tratados com varfarina. Os peixes wild-type ($eln^{+/+}$), não apresentaram diferenças significativas com um p -value NS ($\geq 0,05$). Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$) e os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) apresentaram valores mais altos com significância * p -value ($\leq 0,05$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com significância * p -value ($\leq 0,05$).

Realizou-se também outra análise estatística comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* sem varfarina. Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$) e os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas com um p -value NS ($\geq 0,05$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** p -value ($\leq 0,001$).

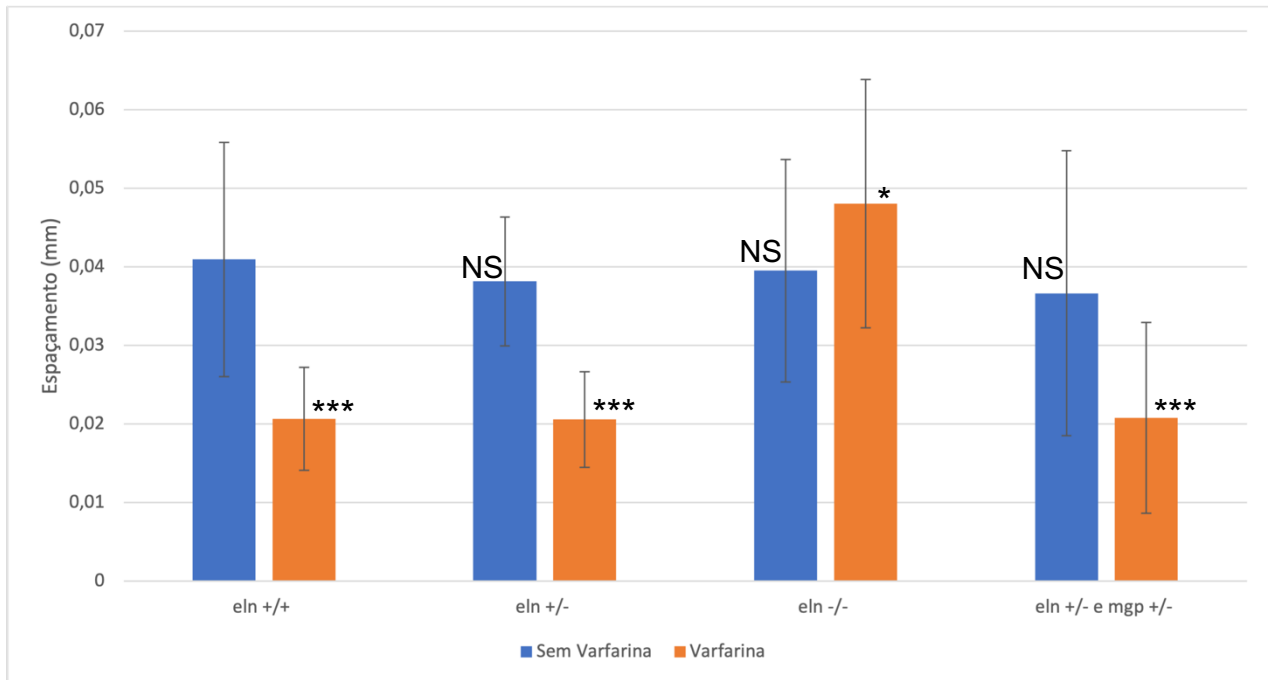


Figura 40- Espaçamento vertebral médio de peixes-zebra da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e Mgp com 20 dpf. A análise estatística foi feita comparativamente aos peixes-zebra não tratados com varfarina. Os peixes wild-type ($eln^{+/+}$), heterozigóticos ($eln^{+/-}$) e os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) apresentaram valores mais baixos com uma significância bastante elevada *** p -value ($\leq 0,001$). Os peixes homozigóticos ($eln^{-/-}$) apresentaram valores mais elevados com significância * p -value ($\leq 0,05$).

Realizou-se também outra análise estatística comparativamente aos peixes-zebra *wild-type* sem varfarina. Os peixes heterozigóticos ($eln^{+/-}$), homozigóticos ($eln^{-/-}$) e os peixes mutantes para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$) não apresentaram diferenças significativas com um p -value NS ($\geq 0,05$).

4.5. Coloração com Von Kossa

A coloração de Von Kossa, realizada em cortes de amostras fixadas em GMA, permitiu observar a presença de calcificações ectópicas oriundas do tratamento com varfarina, em diferentes zonas dos tecidos.

Na primeira coloração, feita nas amostras provenientes do segundo cruzamento de peixes-zebra da linha Sa17177 ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$), observou-se calcificações na zona do bolbo cardíaco (figura 41) e na aorta que faz a conexão ao rim (figura 42). Estas calcificações só foram observadas em amostras tratadas em varfarina.

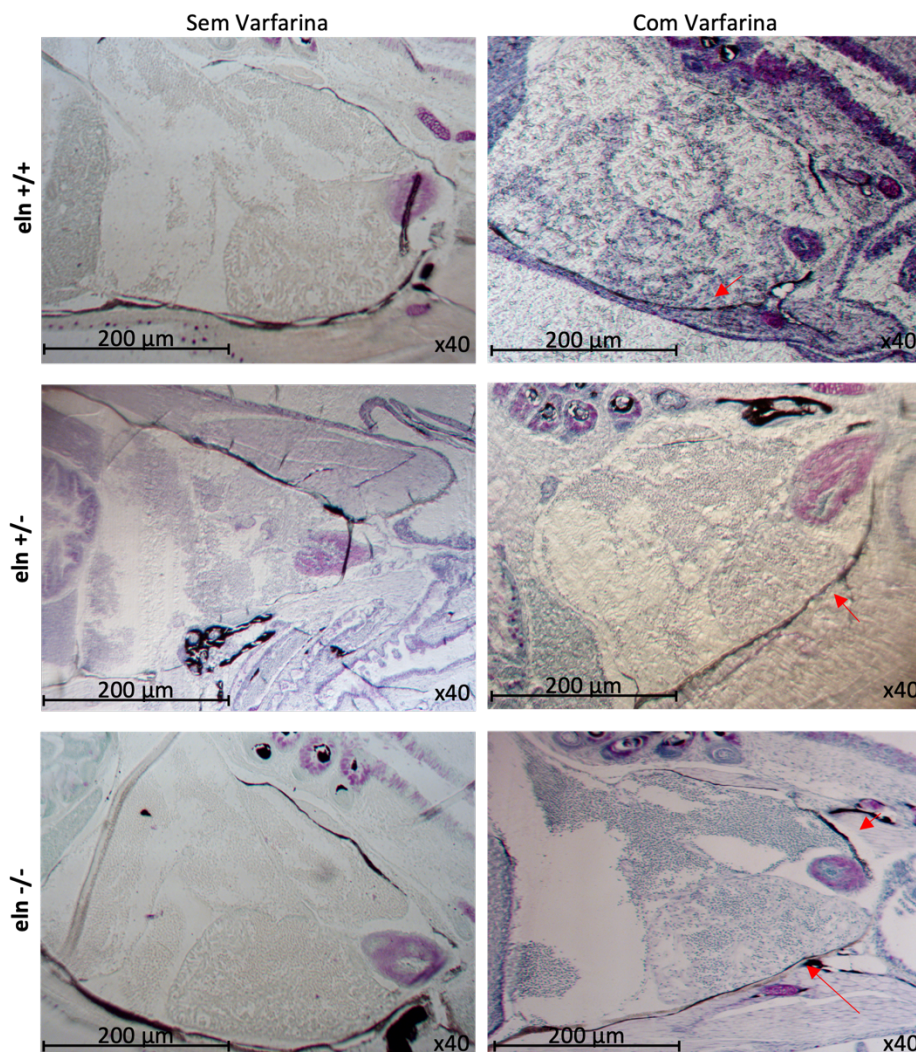


Figura 41- Coração com coloração de Von Kossa – linha Sa17177. É possível observar calcificações no bulbo cardíaco apenas em amostras tratadas com varfarina (setas vermelhas). Fotografias tiradas com a câmara *VisiCam® Plus* sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 400 (10x40).

Todavia, observou-se também um resultado não expectável. Na aorta de peixes-zebra $eln^{-/-}$ não tratados com varfarina foi possível observar algumas zonas de calcificação, indicando assim, que por si só, mutantes da linha Sa17177, já apresentam calcificações ectópicas em tecidos moles (figura 42).

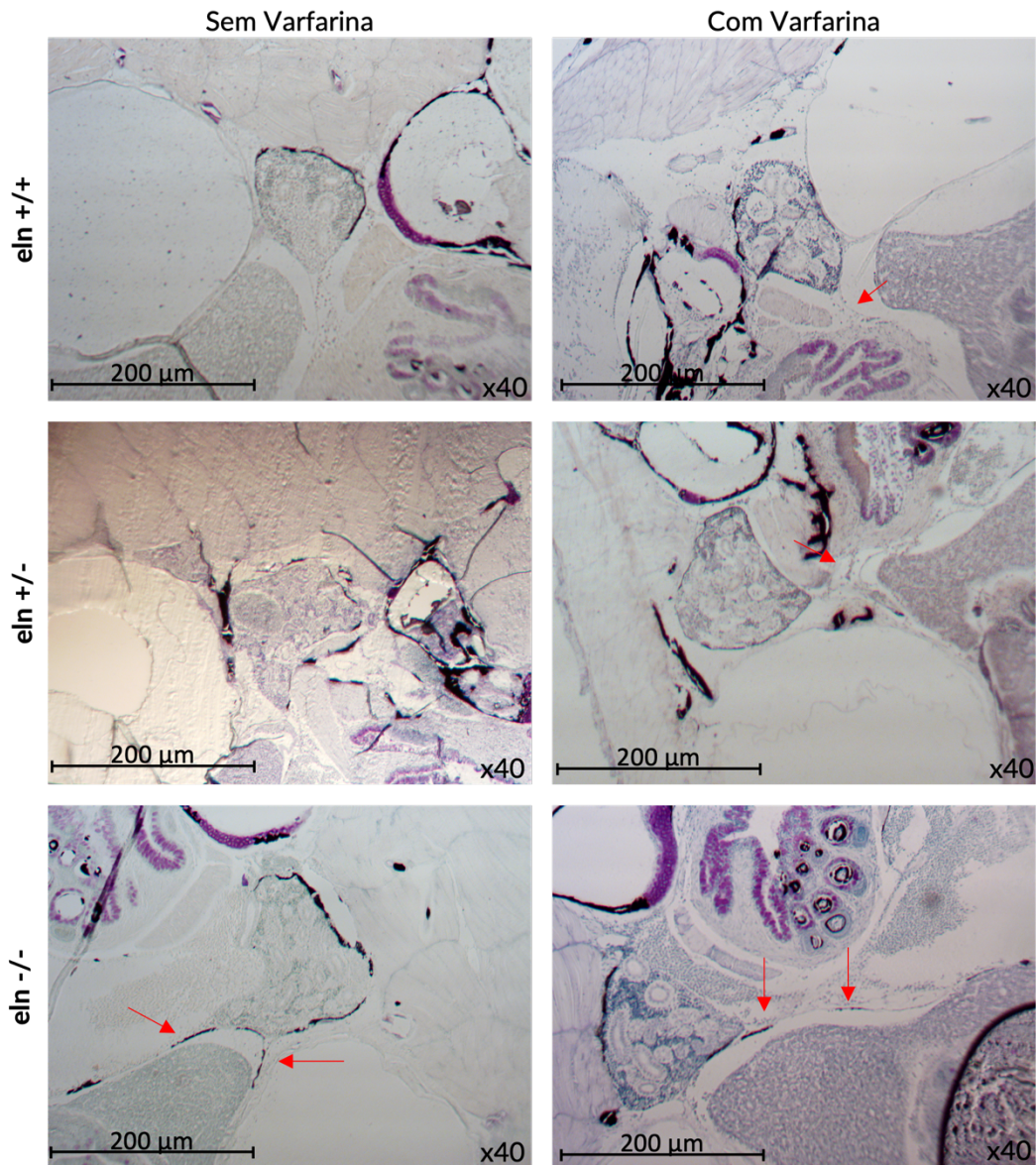


Figura 42- Rim com coloração de Von Kossa- linha Sa17177. É possível observar calcificações na aorta que conecta o rim em amostras tratadas com varfarina e nas amostras de peixes-zebras $eln^{-/-}$ (setas vermelhas). Fotografias tiradas com a câmara *VisiCam® Plus* sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 400 (10x40).

Posteriormente, na coloração com Von Kossa do terceiro cruzamento com peixes-zebra da linha Sa17177 e peixes-zebra mutantes para a elastina e para a Mgp, observou-se os mesmos resultados. Houve o aparecimento de zonas calcificadas tanto no bolbo cardíaco (figura 43), como na aorta (figura 44) de peixes tratados com varfarina, servindo assim, de suporte aos dados anteriores.

Função da elastina no desenvolvimento das calcificações ectópicas da cartilagem associadas a uma deficiência em MGP – Contribuição para o estudo da Síndrome de Keutel

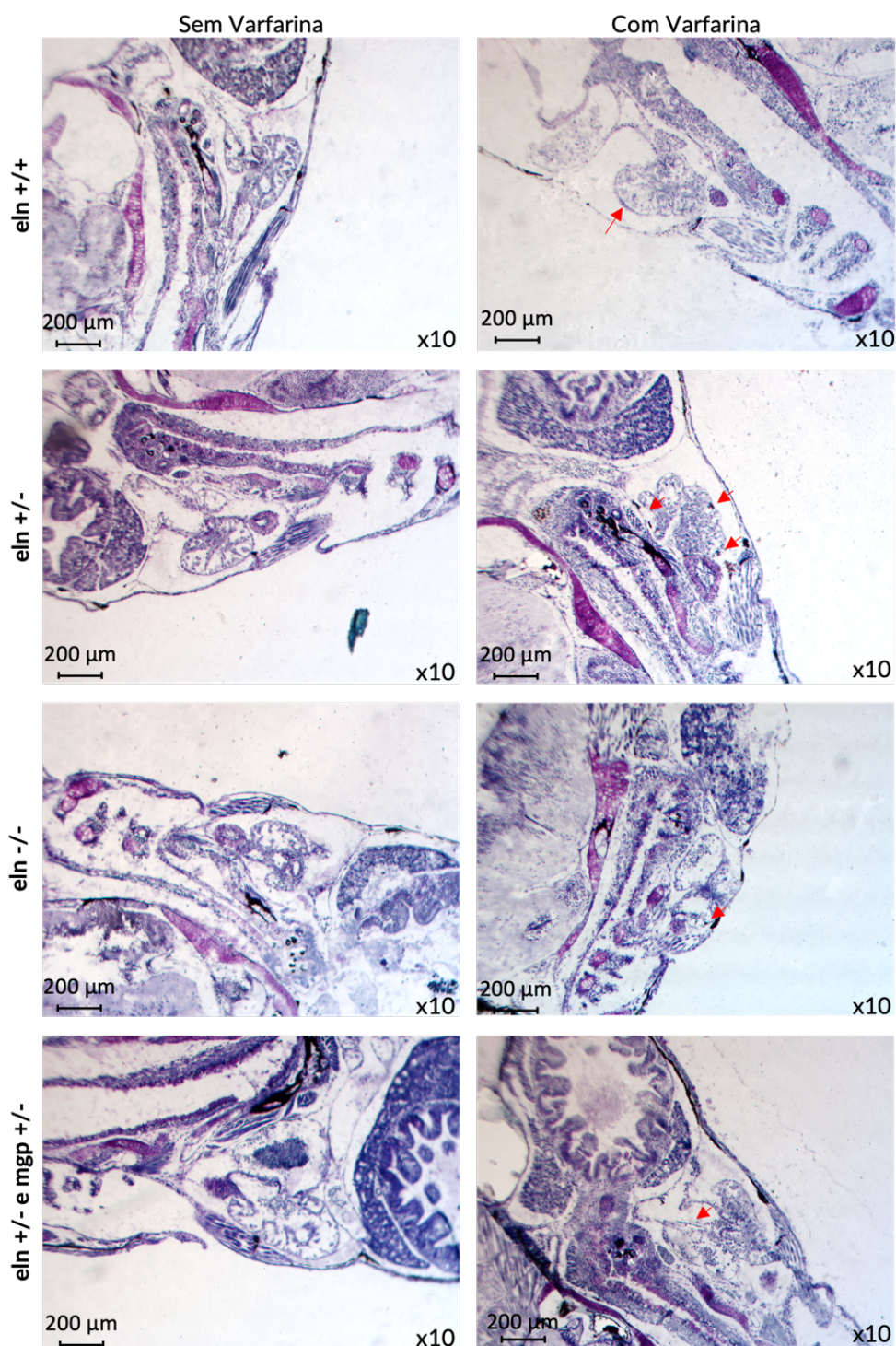


Figura 43- Coração com coloração de Von Kossa – linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp. É possível observar calcificações no bulbo cardíaco apenas em amostras tratadas com varfarina (setas vermelhas). Fotografias tiradas com a câmara *VisiCam® Plus* sem ampliação e a lupa *Leica MZ6* com ampliação de 100 (10x10).

Além disso, foi possível perceber os efeitos da varfarina nas amostras provenientes de mutantes para a elastina e para a Mgp. Nestas, também houve calcificação ectópica em zonas semelhantes às zonas afetadas nos $eln^{+/+}$ e $eln^{+/-}$.

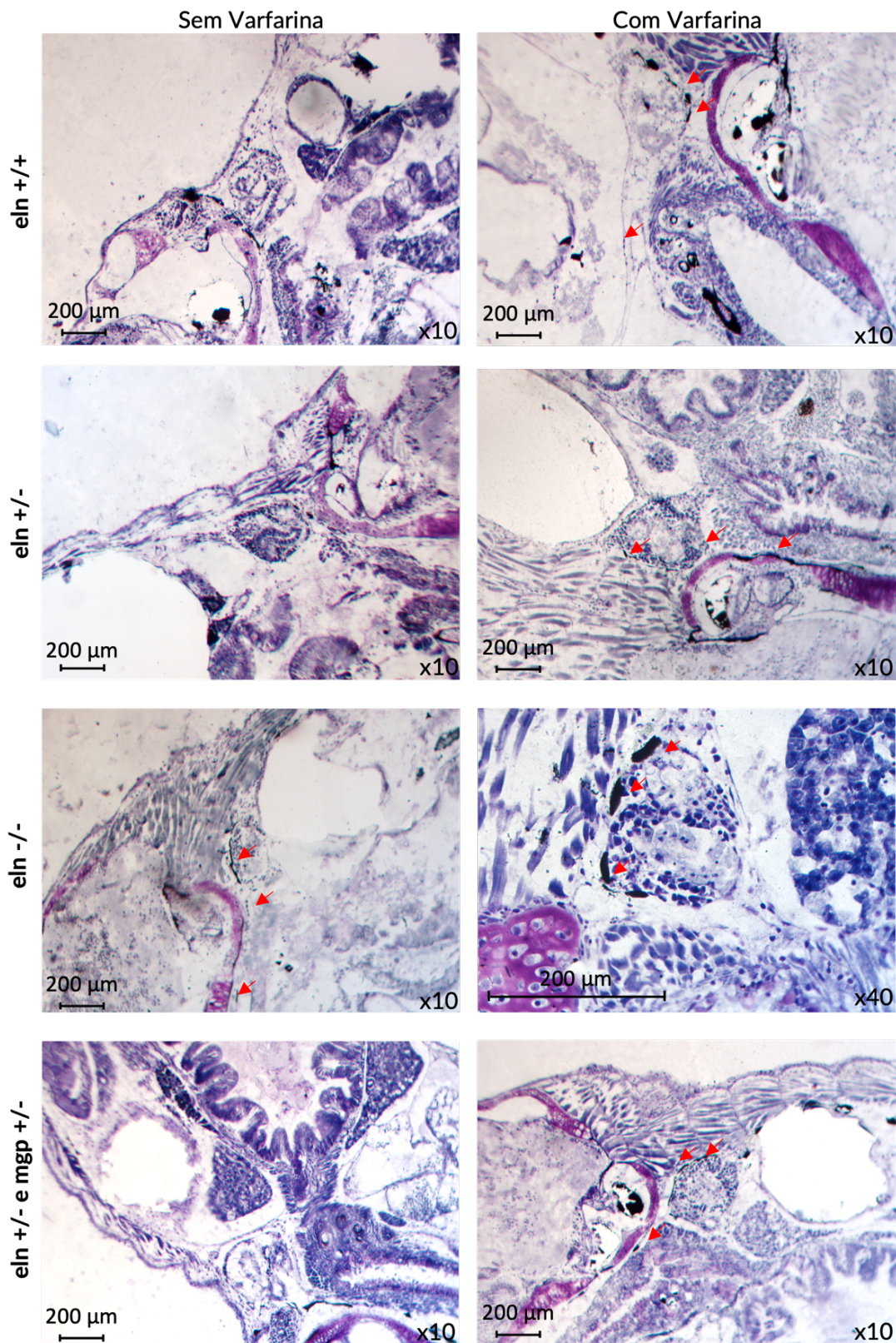


Figura 44- Rim com coloração de Von Kossa – linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp. É possível observar calcificações na aorta que conecta ao rim em amostras tratadas com varfarina e nas amostras de peixes-zebras $eln^{-/-}$ (setas vermelhas). Fotografias tiradas com a câmara *VisiCam® Plus* sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 100 (10x10) e 400 (10x40).

4.6. Coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson

Visto que a técnica de coloração de Verhoeff-Van Gieson permite detetar a presença de fibras elásticas e colagénio, seria expectável observar uma coloração mais intensa nos peixes-zebra não mutados para a elastina.

Contudo, os resultados desta coloração não foram os pretendidos. Tanto os mutantes, como os não mutantes para a elastina, incluindo até o mutante conjunto para a Mgp, apresentaram uma quantidade semelhante de fibras elásticas e colagénio, como se pode observar na figura 45.

Analisou-se também, o papel da varfarina nesta coloração, contudo os resultados foram inconclusivos e muito parecidos aos apresentados pelas amostras sem tratamento com varfarina.

Função da elastina no desenvolvimento das calcificações ectópicas da cartilagem associadas a uma deficiência em MGP – Contribuição para o estudo da Síndrome de Keutel



Figura 45- Coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp. A quantidade de fibras elásticas e de colagénio é muito semelhante entre amostras $eln^{+/+}$ e $eln^{-/-}$ e entre amostras com e sem varfarina. Fotografias tiradas com a câmara VisiCam® Plus sem ampliação e a lupa Leica MZ6 com ampliação de 100 (10x10) e 400 (10x40).

4.7. Imunofluorescência

Na imunofluorescência, seria expectável observar uma maior reação do anticorpo anti elastina nos locais onde houvesse uma maior expressão da proteína, contudo os resultados obtidos não foram os esperados.

Embora seja possível observar um brilho mais acentuado nas amostras de peixes-zebra $eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$, comparativamente às amostras de peixes-zebra $eln^{-/-}$, não é o suficiente para se poder obter alguma conclusão (figura 46). Assim sendo, seria necessário a repetição deste protocolo, de modo a localizar o problema.

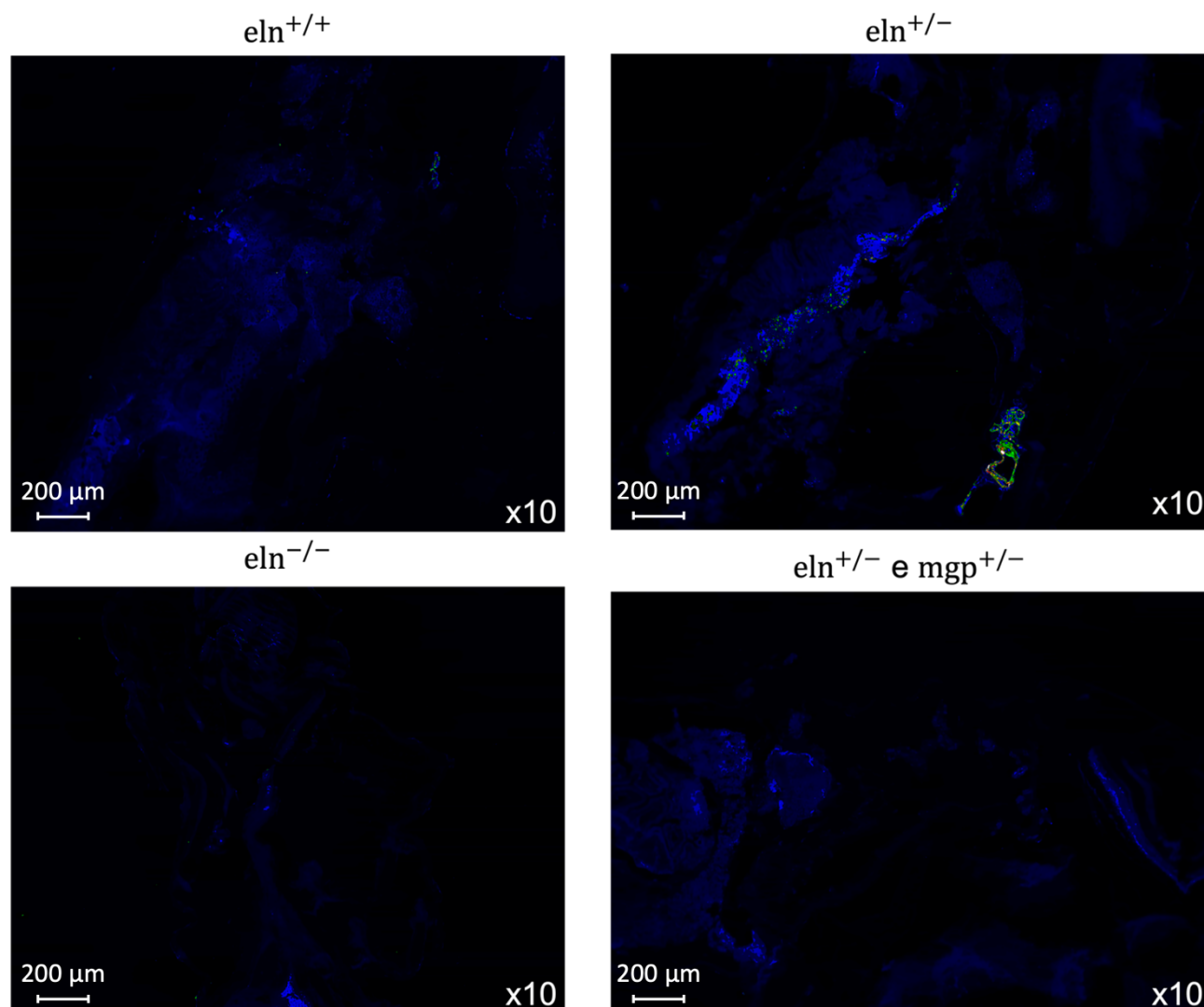


Figura 46- Imunofluorescência em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$, $eln^{-/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$). Fotografia tirada através do software ZEISS ZEN sem ampliação e o microscópio de fluorescência com ampliação de 100 (10x10).

Por outro lado, observou-se também um resultado complementar não tão relevante. Devido à aplicação de DAPI no protocolo de imunofluorescência, foi possível observar a marcação fluorescente dos núcleos das células das amostras utilizadas (figura 47).

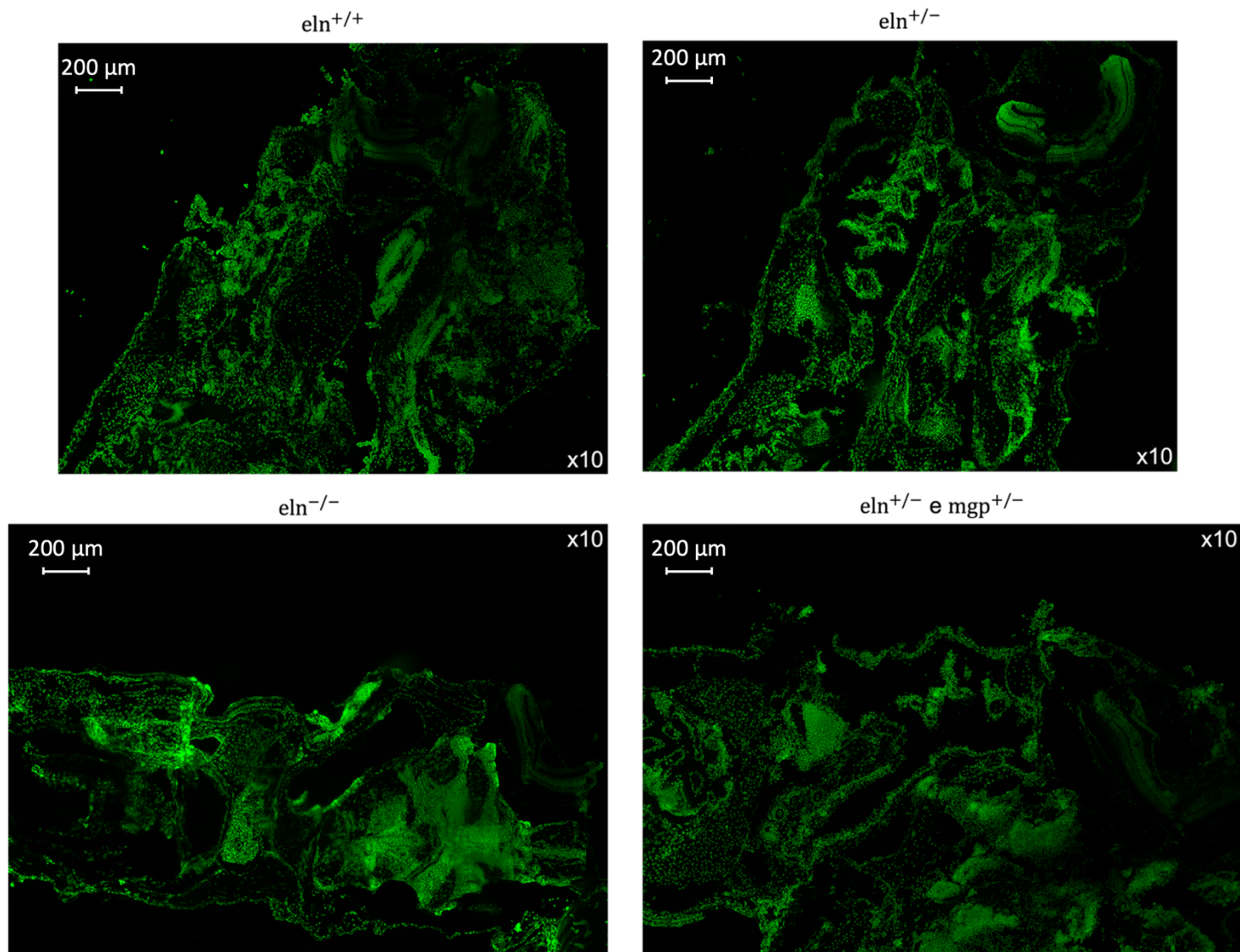


Figura 47- Núcleos marcados com DAPI em amostras da linha Sa17177 e linha mutante para a elastina e para a Mgp (*eln*^{+/+}, *eln*^{+/-}, *eln*^{-/-} e *eln*^{+/-} e *mgp*^{+/-}). Fotografia tirada através do software ZEISS ZEN sem ampliação e o microscópio de fluorescência com ampliação de 100 (10x10).

V. Discussão

O objetivo desta tese foi investigar se o conteúdo de elastina era um determinante crítico para a estrutura da cartilagem e calcificação ectópica vascular num modelo de peixe-zebra, uma vez que pouco se sabe sobre este assunto.

A elastina é uma proteína bastante importante para a elasticidade de diversos órgãos e tecidos, tais como, artérias, pulmões, ligamentos vertebrais, cartilagem e pele^{2,4}. Assim, quando ocorrem mutações no gene que codifica para o seu precursor (a tropoelastina) e a sua função fica comprometida, surgem também distúrbios associados, como cútis laxa, estenose aórtica supra-avalvar, síndrome de Williams-Beuren e ainda distúrbios em patologias causadas por mutações em genes diferentes como a síndrome de Keutel^{14,32,40}.

A maioria destes distúrbios mencionados anteriormente, resultam de mutações no gene *ELN* e afetam principalmente tecidos onde existe uma maior expressão de elastina, causando efeitos secundários complexos. Já a síndrome de Keutel, resulta de mutações no gene *MGP* e relaciona-se com a elastina pela correlação entre a haploinsuficiência desta proteína e o surgimento de calcificações ectópicas, características desta doença⁴⁰.

De modo a provar a importância da elastina na estrutura da cartilagem e calcificação ectópica, decidiu-se utilizar como modelo animal o peixe-zebra. Este modelo possui imensas vantagens, como o preço de manutenção, o fácil acasalamento, o desenvolvimento e crescimento rápido, uma estrutura genética semelhante à dos humanos, a capacidade de regeneração e um genoma já totalmente sequenciado^{92,93,95}. Tendo em conta estes benefícios e a existência de peixes-zebra mutantes para a elastina no laboratório, procedeu-se à realização do trabalho utilizando este modelo animal.

Como existiam duas linhas de peixe-zebra mutadas para a elastina, Sa17177 e Sa42459, recorreu-se à genotipagem, de modo a identificar quais os peixes que apresentavam mutações. Os resultados obtidos permitiram a continuação da experiência para os peixes-zebra mutantes para a linha Sa17177, uma vez que havia todos os grupos necessários ($eIn^{+/+}$, $eIn^{+/-}$, $eIn^{-/-}$). Além disso, permitiu também o

cruzamento com peixes mutantes para a *Mgp* e a criação de uma nova linha ($eIn^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$). Todavia, os resultados da genotipagem da linha Sa42459 mostraram que não havia peixes-zebra homozigóticos para o seguimento da experiência, sendo necessário um novo cruzamento entre heterozigóticos e outra genotipagem. Infelizmente, e devido aos prazos estabelecidos, não foi possível a continuação do trabalho com esta linha mutante.

Com as análises do fenótipo da linha Sa17177, foi possível observar que os peixes-zebra mutantes ($eIn^{-/-}$), são significativamente mais pequenos comparativamente aos não mutantes ($eIn^{+/+}$). Este resultado é bastante importante, uma vez que, certas doenças relacionadas com a elastina, como a síndrome de Williams ou a síndrome de Keutel, apresentam como uma das características mais acentuadas a baixa estatura^{14,40,42}, provando a importância desta linha mutante neste modelo animal para estudo de doenças humanas. Além disso, observou-se também que apenas os peixes-zebra homozigóticos da linha mutante utilizada apresentavam malformações na estrutura. Este resultado também pode ser observado em doentes com síndrome de Keutel e síndrome de Williams^{14,40,42}. Desta forma, acreditamos que a parte deletada do gene *eIn* que falta na linha Sa17177, possa ter produzido uma proteína alterada de tal forma que afeta a estatura e faz com que os peixes mutados fiquem mais sensíveis a problemas, provocando assim as malformações observadas.

O tratamento com varfarina mostrou que os peixes-zebra $eIn^{-/-}$ da linha Sa17177 apresentaram uma elevada taxa de mortalidade, tendo começado a morrer mais precocemente, comparativamente aos $eIn^{+/+}$ da mesma linha. Contudo, registou-se também uma taxa de mortalidade não tão elevada para os $eIn^{+/+}$ e $eIn^{+/-}$. Estes dados podem ser explicados pela quantidade de varfarina utilizada e pelo tempo de exposição, uma vez que já foi provado em estudos anteriores estes serem fatores importantes^{99,100}. Já a questão da mortalidade mais acentuada nos $eIn^{-/-}$ acreditamos que possa estar associada à sensibilidade mais agravada devido à forma mutada apresentada. Além disso, no segundo tratamento realizado, observou-se não só uma elevada mortalidade para os $eIn^{-/-}$, como também para os peixes $eIn^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$. Este resultado não esperado leva a crer que algum problema possa ter ocorrido durante a realização desta experiência. Desta forma, seria necessário a repetição de um novo tratamento com varfarina de modo a verificar os resultados obtidos.

De modo a perceber se a mortalidade dos $eln^{-/-}$ estava correlacionada com calcificações irregulares procedeu-se à análise dos resultados referentes à coloração com alizarin red. Os primeiros dados observados, mostraram que os peixes-zebra homozigóticos para a linha Sa17177 possuíam um CTCF das vértebras menor que os *wild-type* e um espaçamento maior. Isto significa que as vértebras dos peixes homozigóticos eram menos calcificadas que as dos peixes *wild-type* e heterozigóticos. Já na segunda coloração, confirmou-se os resultados obtidos anteriormente e observou-se os efeitos da exposição com varfarina. Assim, depois do tratamento com varfarina, os peixes-zebra $eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$ aumentaram a calcificação vertebral, enquanto os $eln^{-/-}$ apresentaram uma diminuição da mesma. Acreditamos então, que os peixes mutados da linha Sa17177 apresentam menos calcificação nas vértebras relativamente aos não mutados, uma vez que apresentam menos elastina funcional e não alterada para fazer o seu papel de mediador nos processos normais de calcificação. Depois da exposição com varfarina essa calcificação diminui ainda mais, pois além de continuar a não existir proteína não funcional para atuar como mediador, estará a ocorrer também calcificações ectópicas nos tecidos moles provocadas pela ação da varfarina, logo, observa-se uma diminuição da quantidade de cálcio nas vértebras. Além disso, o estudo realizado por Khavandgar *et. al.* (2014) demonstrou que a haploinsuficiência de elastina impede os processos de calcificação em ratinhos deficientes de MGP, comprovando assim, os nossos resultados⁹. Em relação ao aumento da calcificação vertebral nos peixes não mutados ($eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$), pensamos que possa estar relacionado com o papel da varfarina na inibição da carboxilação dos resíduos Glu em Gla necessária para a ativação da Mgp. Sem esta ativação a Mgp não irá realizar as suas funções^{72,75,76}, causando assim, calcificações ectópicas e um aparente aumento da calcificação vertebral, bem como a diminuição do espaço entre vértebras.

Ambos os resultados das duas colorações com Von Kossa permitiram comprovar que a exposição com varfarina provoca calcificações ectópicas nos tecidos moles, tais como a aorta e o bolbo cardíaco, em amostras provenientes de peixes-zebra mutados e não mutados para a elastina. Além disso, observou-se a presença de calcificações ectópicas em amostras de peixes-zebra mutados ($eln^{-/-}$) sem exposição à varfarina. Como explicado anteriormente, é compreensível o surgimento de calcificações ectópicas devido à exposição com varfarina^{76,77}, contudo, os dados observados

referentes às amostras de peixes mutados não são tão claros. Consideramos que pode haver algum mecanismo ainda não descoberto que relaciona a falta de elastina funcional nos tecidos moles com a deposição de cálcio, provocando assim, calcificações ectópicas. Contudo, seriam necessários mais dados de forma a comprovar esta hipótese.

A coloração através da técnica de Verhoeff-Van Gieson não produziu os resultados esperados. Seria expectável observar uma diminuição das fibras elásticas nos mutantes para a elastina ($eln^{-/-}$), comparativamente aos não mutantes ($eln^{+/+}$), contudo não foi observada qualquer alteração significativa. Assim sendo, seria necessário a realização de uma nova experiência. Além disso, não se observou diferenças relativamente à exposição da varfarina nas amostras, analogamente às sem exposição, deixando em aberto se foi devido a problemas na concretização do protocolo ou se a varfarina não tem atuação na atividade da elastina.

Por fim, a análise dos resultados de imunofluorescência mostrou uma ligeira diminuição de cor e brilho nos $eln^{-/-}$, em comparação aos $eln^{+/+}$, $eln^{+/-}$ e $eln^{+/-}$ e $mgp^{+/-}$, contudo não é suficiente para ser considerado significativo. Seria esperado observar uma diferença muito maior e um brilho e cor mais intensos nos *wild-type*. Desta forma, é necessário a repetição do protocolo de modo a localizar o problema e observar diferenças significativas.

VI. Conclusões e perspectivas futuras

Em suma, podemos concluir que a maioria dos resultados obtidos confirmam a hipótese inicial de que o conteúdo de elastina é um determinante crítico para a cartilagem e calcificação ectópica vascular. Os dados demonstraram que a diminuição do comprimento, o aumento de malformações estruturais, a diminuição da calcificação de vértebras e do espaço vertebral e o aparecimento de calcificações ectópicas vasculares, estão diretamente correlacionados com a mutação da elastina. Provando assim, a sua importância para este processo.

Contudo, é importante ressaltar que algumas experiências realizadas durante este projeto deveriam ser repetidas, de modo a comprovar os resultados mais inesperados e permitir também uma segunda confirmação.

No futuro, seria interessante o estudo da linha mutante Sa42459, que acabou por não ser analisada. A realização dos mesmos protocolos utilizados iria permitir uma comparação entre as duas mutações e uma melhor compreensão da função do gene da elastina no peixe-zebra. Além disso, poderíamos cruzar esta linha com a linha mutante para a Mgp e comparar também aos nossos resultados.

Uma vez que não se observou grandes diferenças na linha mutante para a elastina e para a Mgp, poderíamos voltar a cruzar os peixes mutados, de modo a produzir uma linha que fosse completamente homocigótica para a elastina e para a Mgp ($eln^{-/-}$ e $mgp^{-/-}$). Desta forma, iríamos conseguir analisar se realmente a elastina possui algum papel na calcificação em peixes deficientes em Mgp.

Outra das experiências a repetir seria o tratamento com exposição à varfarina. Seria aconselhável uma repetição do mesmo de modo a observar novamente as taxas de mortalidade mais inesperadas. Além disso, seria útil observar os resultados desta exposição em diferentes períodos de desenvolvimento do peixe-zebra, bem como variar a quantidade de varfarina administrada, de forma a perceber se é ou não um fator com importância.

Em relação à coloração com alizarin red, poderíamos analisar não só as vértebras e o espaço vertebral, como também outras áreas que possam estar afetadas, bem

como aumentar o número de peixes estudados em cada observação. Isto iria promover uma maior confiança nos resultados obtidos.

Tanto a coloração com a técnica de Verhoeff-Van Gieson, como a imunofluorescência deveriam ser repetidas, dado que os resultados obtidos não foram os expectáveis. Na imunofluorescência seria aconselhável o uso de mais anticorpos específicos para a elastina, de modo a perceber se foi esse o erro. Além disso, poderíamos utilizar técnicas de imunohistoquímica com anticorpos específicos para a Mgp e comparar os locais de ação com a elastina.

Acreditamos que apesar de serem ainda preliminares, os resultados obtidos com este trabalho permitiram uma nova compreensão do papel da elastina no processo de calcificação ectópica. Bem como ajudaram a atestar o peixe-zebra como um bom modelo para o estudo de mutações da elastina, visto que muitos dos dados obtidos com a linha mutante Sa17177 são semelhantes às complicações provocadas pelas síndromes de Williams e de Keutel. Foi ainda importante a aprendizagem e compreensão dos fundamentos das múltiplas técnicas utilizadas neste trabalho.

Assim sendo, esperamos ter contribuído para uma melhor compreensão da função da elastina e que os nossos resultados sejam úteis para as próximas investigações.

VII. Referências

1. Williams, D. Fibrous proteins in medical technology. *Med Device Technol* **19**, (2008).
2. Duque Lasio, M. L. & Kozel, B. A. Elastin-driven genetic diseases. *Matrix Biology* **71–72**, 144–160 (2018).
3. Rodgers, U. R. & Weiss, A. S. Cellular interactions with elastin. *Pathologie Biologie* **53**, 390–398 (2005).
4. Mithieux, S. M. & Weiss, A. S. Elastin. *Adv Protein Chem* **70**, 437–61 (2005).
5. Cociolone, A. J. *et al.* Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **315**, H189–H205 (2018).
6. Keeley, F. W., Bellingham, C. M. & Woodhouse, K. A. Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**, 185–189 (2002).
7. Vindin, H., Mithieux, S. M. & Weiss, A. S. Elastin architecture. *Matrix Biol* **84**, 4–16 (2019).
8. Wise, S. G. & Weiss, A. S. Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 494–7 (2009).
9. Khavandgar, Z. *et al.* Elastin haploinsufficiency impedes the progression of arterial calcification in MGP-deficient mice. *J Bone Miner Res* **29**, 327–37 (2014).
10. Shemesh, S. *et al.* Diabetes mellitus is associated with increased elastin fiber loss in ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis: results of a pilot histological study. *Eur Spine J* **27**, 1614–1622 (2018).
11. Zhou, X. *et al.* Multiple functions of autophagy in vascular calcification. *Cell Biosci* **11**, 159 (2021).
12. Maurice, P. *et al.* Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept. *Trends Cardiovasc Med* **23**, 211–21 (2013).
13. Morris, C. A. Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **154**, 203–208 (2010).
14. Kozel, B. A. *et al.* Williams syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 42 (2021).
15. Jacob, M. P., Sauvage, M. & Osborne-Pellegrin, M. [Regulation of elastin synthesis]. *J Soc Biol* **195**, 131–41 (2001).
16. Bhanji, T. *Elastin in Zebrafish and.* (2007).
17. Beyens, A., Boel, A., Symoens, S. & Callewaert, B. Cutis laxa: A comprehensive overview of clinical characteristics and pathophysiology. *Clin Genet* **99**, 53–66 (2021).
18. Maruyama, H. *et al.* Endothelin-1 induces lysyl oxidase expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* **98**, 629–636 (2020).
19. Patel, A., Fine, B., Sandig, M. & Mequanint, K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* **71**, 40–9 (2006).
20. Mecham, R. P., Madaras, J., McDonald, J. A. & Ryan, U. Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol* **116**, 282–8 (1983).
21. Vallet, S. D. & Ricard-Blum, S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem* **63**, 349–364 (2019).
22. Okuneva, E. G. *et al.* A novel elastin gene frameshift mutation in a Russian family with cutis laxa: A case report. *BMC Dermatol* **19**, 1–5 (2019).
23. Orphanet: Cutis laxa, tipo dominante. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=PT&Expert=90348.
24. Rodriguez-Revenga, L. *et al.* A Novel Elastin Gene Mutation Resulting in an Autosomal Dominant Form of Cutis Laxa. *Arch Dermatol* **140**, (2004).
25. Cutis Laxa - NORD (National Organization for Rare Disorders). <https://rarediseases.org/rare-diseases/cutis-laxa/>.

26. Callewaert, B. *et al.* New insights into the pathogenesis of autosomal dominant cutis laxa with report of five ELN mutations. **32**, 445–455 (2012).
27. Williams Syndrome - StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544278/?report=reader>.
28. Orphanet: Williams syndrome. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=904.
29. Williams Syndrome - NORD (National Organization for Rare Disorders).
<https://rarediseases.org/rare-diseases/williams-syndrome/>.
30. Twite, M. D., Stenquist, S. & Ing, R. J. Williams syndrome. *Paediatr Anaesth* **29**, 483–490 (2019).
31. Supravalvar Aortic Stenosis - StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470210/>.
32. Metcalfe, K. *et al.* Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet* **8**, 955–63 (2000).
33. Rodriguez-Revengea, L., Badenas, C., Carrió, A. & Milà, M. Elastin mutation screening in a group of patients affected by vascular abnormalities. *Pediatr Cardiol* **26**, 827–31.
34. Merla, G., Brunetti-Pierri, N., Piccolo, P., Micale, L. & Loviglio, M. N. Supravalvular Aortic Stenosis. *Circ Cardiovasc Genet* **26**, 552–557 (2012).
35. Supravalvular aortic stenosis: MedlinePlus Genetics.
<https://medlineplus.gov/genetics/condition/supravalvular-aortic-stenosis/>.
36. Micale, L. *et al.* Identification and characterization of seven novel mutations of elastin gene in a cohort of patients affected by supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet* **18**, 317–23 (2010).
37. Carr, M., Curtis, S. & Marek, J. EDUCATIONAL SERIES IN CONGENITAL HEART DISEASE: Congenital left-sided heart obstruction. *Echo Res Pract* **5**, R23–R36 (2018).
38. Supravalvular aortic stenosis. doi:10.1038/ejhg.2009.181.
39. Roemers, R. *et al.* Surgical Correction of Supravalvar Aortic Stenosis: 52 Years' Experience. *World J Pediatr Congenit Heart Surg* **9**, 131–138 (2018).
40. Cancela, M. L., Laizé, V., Conceição, N., Kempf, H. & Murshed, M. Keutel Syndrome, a Review of 50 Years of Literature. *Front Cell Dev Biol* **9**, 642136 (2021).
41. Perrone, E. *et al.* A Novel MGP Gene Mutation Causing Keutel Syndrome in a Brazilian Patient. *Mol Syndromol* **9**, 159–163 (2018).
42. Orphanet: Keutel syndrome. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=11660&MISSING%20CONTENT=Keutel-syndrome&search=Disease_Search_Simple&title=Keutel-syndrome.
43. Teebi, A. S. *et al.* Keutel syndrome: further characterization and review. *Am J Med Genet* **78**, 182–7 (1998).
44. Keutel syndrome | Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD) – an NCATS Program. <https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/8449/keutel-syndrome>.
45. Munroe, P. B. *et al.* Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* **21**, 142–4 (1999).
46. Tüysüz, B., Cinar, B., Laçiner, S., Onay, H. & Mittaz-Crettol, L. CLINICAL VARIABILITY IN TWO SISTERS WITH KEUTEL SYNDROME DUE TO A HOMOZYGOUS MUTATION IN MGP GENE. *Genet Couns* **26**, 187–94 (2015).
47. Khosroshahi, H. E., Sahin, S. C., Akyuz, Y. & Ede, H. Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *Am J Med Genet A* **164**, 2849–2856 (2014).
48. Parashar, A. *et al.* Elastin calcification in in vitro models and its prevention by MGP's N-terminal peptide. *J Struct Biol* **213**, 107637 (2021).

49. Cancela, L., Hsieh, C. L., Francke, U. & Price, P. A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* **265**, 15040–8 (1990).
50. Kirfel, J., Kelter, M., Cancela, L. M., Price, P. A. & Schüle, R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2227–32 (1997).
51. Stheneur, C. *et al.* Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes. *Biochem J* **369**, 63–70 (2003).
52. Tiago, D. M., Conceição, N., Caiado, H., Laizé, V. & Cancela, M. L. Matrix Gla protein repression by miR-155 promotes oncogenic signals in breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Lett* **590**, 1234–41 (2016).
53. Suttamanatwong, S. *et al.* Sp proteins and Runx2 mediate regulation of matrix gla protein (MGP) expression by parathyroid hormone. *J Cell Biochem* **107**, 284–92 (2009).
54. Luo, G. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78–81 (1997).
55. Roumeliotis, S., Roumeliotis, A., Dounousi, E., Eleftheriadis, T. & Liakopoulos, V. Biomarkers of vascular calcification in serum. in 91–147 (2020). doi:10.1016/bs.acc.2020.02.004.
56. Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M. & Vermeer, C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci* **10**, 864–70 (2001).
57. Roumeliotis, S., Dounousi, E., Eleftheriadis, T. & Liakopoulos, V. Association of the Inactive Circulating Matrix Gla Protein with Vitamin K Intake, Calcification, Mortality, and Cardiovascular Disease: A Review. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
58. Cancela, M. L., Laizé, V. & Conceição, N. Matrix Gla protein and osteocalcin: from gene duplication to neofunctionalization. *Arch Biochem Biophys* **561**, 56–63 (2014).
59. Price, P. A. & Williamson, M. K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* **260**, 14971–5 (1985).
60. Price, P. A., Urist, M. R. & Otawara, Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* **117**, 765–71 (1983).
61. Alexandra Rosa dos Santos, L. *Interaction studies of Gla-rich protein with bone morphogenetic proteins.*
62. Beazley, K. E., Reckard, S., Nurminsky, D., Lima, F. & Nurminskaya, M. Two sides of MGP null arterial disease: chondrogenic lesions dependent on transglutaminase 2 and elastin fragmentation associated with induction of adipsin. *J Biol Chem* **288**, 31400–8 (2013).
63. Moshi, J. *Regulation of Matrix Gla Protein Gene Expression by an Intronic Sequence.* (2017).
64. Wei, F.-F., Trenson, S., Verhamme, P., Vermeer, C. & Staessen, J. A. Vitamin K-Dependent Matrix Gla Protein as Multifaceted Protector of Vascular and Tissue Integrity. *Hypertension* **73**, 1160–1169 (2019).
65. Hruska, K. A. Vascular Smooth Muscle Cells in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Circ Res* **104**, 710–711 (2009).
66. Imbrescia K & Moszczynski Z. Vitamin K - StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551578/#!po=35.0000>.
67. DiNicolantonio, J. J., Bhutani, J. & O’Keefe, J. H. The health benefits of vitamin K. *Open Heart* **2**, e000300.
68. Gröber, U., Reichrath, J., Holick, M. F. & Kisters, K. Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. *Dermatoendocrinol* **6**, e968490.

69. Elder, S. J., Haytowitz, D. B., Howe, J., Peterson, J. W. & Booth, S. L. Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the u.s. Diet. *J Agric Food Chem* **54**, 463–7 (2006).
70. Booth, S. L. & Suttie, J. W. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* **128**, 785–8 (1998).
71. Tie, J.-K. & Stafford, D. W. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* **14**, 236–47 (2016).
72. Stafford, D. W. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* **3**, 1873–8 (2005).
73. Oldenburg, J., Bevans, C. G., Müller, C. R. & Watzka, M. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal* **8**, 347–53.
74. Warfarin - StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470313/>.
75. Lurie, Y., Loebstein, R., Kurnik, D., Almog, S. & Halkin, H. Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. *Br J Clin Pharmacol* **70**, 164–70 (2010).
76. Rishavy, M. A. *et al.* Warfarin alters vitamin K metabolism: a surprising mechanism of VKORC1 uncoupling necessitates an additional reductase. *Blood* **131**, 2826–2835 (2018).
77. Mihaila, R. G. Warfarin involvement, in comparison to NOACs, in the development of systemic atherosclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2022) doi:10.5507/bp.2022.008.
78. Roumeliotis, S. *et al.* Vitamin K Supplementation for Prevention of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease Patients: Are We There Yet? *Nutrients* **14**, (2022).
79. Dalmeijer, G. W. *et al.* Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women. *J Nutr Biochem* **24**, 624–8 (2013).
80. Liabeuf, S. *et al.* Vascular calcification in patients with type 2 diabetes: the involvement of matrix Gla protein. *Cardiovasc Diabetol* **13**, 85 (2014).
81. Wei, F.-F. *et al.* Inactive matrix Gla protein is a novel circulating biomarker predicting retinal arteriolar narrowing in humans. *Sci Rep* **8**, 15088 (2018).
82. Wang, J. J. *et al.* The long-term relation among retinal arteriolar narrowing, blood pressure, and incident severe hypertension. *Am J Epidemiol* **168**, 80–8 (2008).
83. Schurgers, L. J. *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 568–75 (2010).
84. Evenepoel, P. *et al.* Poor Vitamin K Status Is Associated With Low Bone Mineral Density and Increased Fracture Risk in End-Stage Renal Disease. *J Bone Miner Res* **34**, 262–269 (2019).
85. Berridge, B. R., van Vleet, J. F. & Herman, E. Cardiovascular System. *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition* 153–194 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-809841-7.00009-5.
86. Overview of the Vascular System | Johns Hopkins Medicine. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/overview-of-the-vascular-system>.
87. Speer, M. Y. *et al.* Smooth Muscle Cells Give Rise to Osteochondrogenic Precursors and Chondrocytes in Calcifying Arteries. *Circ Res* **104**, 733–741 (2009).
88. O'Rourke, C. *et al.* Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells and Imaging of Aortic Calcification and Inflammation. *J Vis Exp* (2016) doi:10.3791/54017.
89. Danio rerio · iNaturalist. <https://www.inaturalist.org/taxa/49977-Danio-rerio>.

90. Danio rerio. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/7955/>.
91. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253–310 (1995).
92. Lebedeva, L., Zhumabayeva, B., Gebauer, T., Kisselev, I. & Aitasheva, Z. Zebrafish (Danio rerio) as a Model for Understanding the Process of Caudal Fin Regeneration. *Zebrafish* **17**, 359–372 (2020).
93. Why use the zebrafish in research? | Facts | yourgenome.org. <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-zebrafish-in-research>.
94. ZFIN The Zebrafish Information Network. <https://zfin.org/>.
95. Hoareau, M., el Kholti, N., Debret, R. & Lambert, E. Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
96. ZFIN Gene: elnb. <https://zfin.org/ZDB-GENE-061212-2#summary>.
97. ZFIN Gene: elna. <https://zfin.org/ZDB-GENE-061212-1#summary>.
98. Oralová, V. *et al.* Beyond the whole-mount phenotype: high-resolution imaging in fluorescence-based applications on zebrafish. *Biol Open* **8**, (2019).
99. Granadeiro, L. *et al.* Warfarin-exposed zebrafish embryos resembles human warfarin embryopathy in a dose and developmental-time dependent manner - From molecular mechanisms to environmental concerns. *Ecotoxicol Environ Saf* **181**, 559–571 (2019).
100. Gomes, T. *et al.* Rates of hemorrhage during warfarin therapy for atrial fibrillation. *CMAJ* **185**, E121-7 (2013).