



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas**

**DETERMINANTES CELULARES E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DA CABEÇA EM VERTEBRADOS**

KARLA LOUREIRO ALMEIDA COBURN

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO PARA OBTENÇÃO DE GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
MORFOLÓGICAS.

Orientador: José Garcia Ribeiro Abreu Júnior

Universidade Federal Rio de Janeiro
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Anatomia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Determinantes celulares e moleculares envolvidos na formação da cabeça em vertebrados.

Karla Loureiro Almeida Coburn

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – Doutorado

Orientador: Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Júnior

UFRJ/ICB

2008

Determinantes celulares e Moleculares envolvidos na formação da cabeça em vertebrados

Karla Loureiro Almeida Coburn

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor.

Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Júnior – ICB – UFRJ - Orientador

Prof^a. Dra. Helena Maria Marcola Araújo – ICB – UFRJ - Examinadora

Prof^a. Dra. Chao Yun Irene Yan - ICB – USP – Examinadora

Prof^a. – Débora Foguel - IBqM – UFRJ – Examinadora

Prof. – Vivaldo Moura Neto – ICB – UFRJ - Revisor e suplente interno

Prof. Dr. Ricardo Reis - IBCCF - UFRJ – Suplente externo

Rio de Janeiro
Julho – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Coburn, Karla Loureiro Almeida.

Determinantes celulares e moleculares envolvidos na formação da cabeça em vertebrados. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro/PCM, 2008.

XII, 104p

Tese de Doutorado Programa de Ciências Morfológicas

1. Formação da cabeça 2. Wnt 3. Sonic Hedgehog 4. *Xenopus laevis*
5. Teses I. Universidade Federal do Rio de Janeiro II. Determinantes celulares e moleculares envolvidos na formação da cabeça em vertebrados.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, José Garcia Abreu. Você acreditou em mim desde o princípio, dando-me a oportunidade de fazer parte do seu grupo. Você foi muito mais do que um orientador, foi meu Mestre, meu amigo e grande incentivador. Você sempre me deu tarefas que às vezes eu considerava impossíveis e me cobrou uma energia que nem eu mesma sabia que tinha. Hoje eu vejo que você sempre viu mais além e sua estratégia me fez dar saltos mais altos. De coração eu agradeço pelo incentivo, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre se mostrar disposto a me ajudar.

Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Embriologia de Vertebrados (LEV). O grupo já se renovou bastante, mas algumas características sempre permanecem: o valor à amizade, o zelo, a vocação para o trabalho e a boa vontade em ajudar. Agradeço primeiramente àqueles que conviveram comigo desde o princípio e que de alguma forma colaboraram com este trabalho, seja com idéias, seja com experimentos ou seja tornando meu dia-a-dia mais agradável. Vocês acompanharam meus primeiros passos e certamente exerceram influência sobre a pessoa que sou hoje. Agradeço a vocês, meus queridos amigos Fábio, Marcos, Diego, Juliana, Carla Boneles, Kristian, Mariana Trad, Carol, Aline... vocês seguiram seus caminhos e deixaram saudades.

Agradeço aos amigos que, embora não componham a “velha guarda” do LEV, já estão conosco há algum tempo: Débora, João, Alice, Mariana, Nathália. Fora a amizade e alegria que vocês naturalmente imprimem no laboratório, vocês foram peças-chave na consolidação desse trabalho. O apoio de vocês foi fundamental pra que nós pudéssemos chegar ao ponto onde estamos. Nesse contexto, faço um agradecimento especial à Alice, Mariana e Débora, cujas colaborações foram essenciais. Também agradeço a você, querido João, que colaborou indiretamente para este trabalho através dos cuidados com a colônia de *Xenopus* (junto com a “Dona” Luíza, a quem também eu agradeço) e manutenção da organização no laboratório. Obrigada por tornar esse trabalho possível e, principalmente, por ser meu amigo e confidente. Agradeço à Nathália, por ser sempre querida, bem humorada e prestativa. Foi com muita alegria que constatei o quanto você amadureceu profissionalmente no último ano. Por fim, agradeço aos recém-chegados Bárbara e Daniel. O tempo de convivência foi curto, mas deu pra perceber a dedicação que vocês têm pelo que fazem.

Aos professores Vivaldo, Flávia Gomes e Helena Araújo, incluindo todos os amigos membros desses laboratórios: obrigada por terem mantido as portas sempre abertas, seja para a troca de idéias, reagentes ou equipamentos. Agradeço imensamente o apoio do Professor Marcelo Lamas, além de amigo, um grande colaborador desse projeto. À Professora Geórgia Atela e membros do seu laboratório, que também contribuíram muito para o bom andamento desse trabalho. Aos Professores Newton Castro e Marília Zaluar, que abriram as portas do seu laboratório e nos permitiram confeccionar nossas agulhas de microinjeção. Agradeço ainda ao professor Adalberto Vieira, que foi fundamental no desembaraço político da minha ida para Harvard (junto com o Professor Vivaldo e Garcia) e também na questão da importação dos animais. Meu muito obrigada ao Professor Xi He e seu grupo, que me acolheu de braços abertos durante meu doutorado sanduíche. Agradeço especialmente à Chika, cujos ensinamentos e conselhos serviram grandemente para aprimorar meus conhecimentos na área de Biologia do Desenvolvimento.

Agradeço ao Professor Vivaldo pela revisão dessa tese, e aos professores examinadores: Débora, Irene, Helena e Ricardo, por terem aceitado o convite, mesmo tendo sido tão em cima da hora. Agradeço também aos amigos da Secretaria da Anatomia, João, Jane, e Emília, que tantas vezes me ajudaram em questões burocráticas. Agradeço ainda às queridas amigas do pensionato (Eveline, Laura, Helena Decker, Rossana, Marizinha...), onde vivi a maior parte do tempo, e às amadas amigas de Vitória (Judite e Lívia). Obrigada pelo companheirismo, carinho e compreensão. Agradeço também à CAPES, FAPERJ e PCM, pelo suporte financeiro e institucional.

Por fim, e não menos importante, agradeço à minha querida família. Ao meu marido Allen, companheiro de todas as horas, a quem dedico esta tese. Você me ensinou que o amor verdadeiro é paciente, generoso e que não existe distância capaz de afastar duas pessoas que se amam. Você me mostrou que por amor nós somos capazes de mudar completamente o rumo das nossas vidas, só pra poder ficar junto um do outro. Você é o meu amor, a minha vida e por você procuro ser uma pessoa melhor a cada dia, pra tentar ser merecedora do grande amor que você me dedica gratuitamente, sem pedir nada em troca.

À minhas amadas irmãs, Ingrid e Christine. Deus não poderia ter colocado criaturas melhores ao meu lado. Vocês são minhas amigas de todas as horas, aquelas que eu sei que posso contar para o que der e vier. Obrigada por serem exatamente da forma que vocês são! Amo muito vocês Meu amado irmão Thiago, eu que te peguei no colo, quem diria, agora já é papai... Mesmo distante você está sempre presente nos meus pensamentos e orações. À Gorete, minha segunda mãe, obrigada por ajudar na minha criação, por todo cuidado, paciência e amor. Meus sobrinhos amados, Júlia, Lorenzo e agora Laís... Perdoem a tia pela ausência, Deus sabe o quanto eu gostaria de acompanhá-los mais de perto... saibam que eu os amo demais.

Aos meus pais, Carlos e Zélia. Vocês são a razão de tudo, o início de tudo. Vocês me deram a vida, me guiaram nos primeiros passos e me ensinaram o valor da educação, respeito, honestidade e amor. Vocês foram e continuam sendo pais excepcionais, a quem eu devo tudo que sou. Quem me dera ser para meus futuros filhos metade do que vocês foram para mim, um exemplo de amor, de luta, sacrifício e generosidade. Eu os amo de todo o meu coração. Obrigada pelo amor incondicional e apoio em todas as etapas da minha vida.

Finalmente, agradeço a Deus... *ao Pai, toda a Honra e toda a Glória...* Porque eu reconheço que não sou nada sem Sua presença na minha vida e tudo aquilo que conquisei foi graças a Sua mão que me guiava e amparava nos momentos difíceis (que não foram poucos). Obrigada por mais essa conquista, ela também é Sua.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP** – Antero-posterior
- BMP** – Proteína morfogênica do osso
- BMPRI** – Receptor de BMP do tipo I
- BMPRII** – Receptor de BMP do tipo II
- CR** – Domínio rico em cisteína
- DNA** - Acido Desoxiribonucléico
- DRM** – Membrana resistente ao uso de detergentes não-iônicos
- DV** – Dorso-ventral
- Dvl** – Dishevelled
- Ef1- α** - Fator de Elongamento 1 α
- FGF** – Fator de crescimento do fibroblasto
- GBP** - proteína ligadora de GSK-3
- GPI** – Glicosil-fosfatidil-inositol
- GSK-3** – glicogênio sintase kinase 3
- IGF** – Fator de crescimento semelhante à insulina
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- LiCl** - Cloreto de Lítio
- LRP5/6** – co-receptor de Frizzled na via de Wnt,
- M β CD** - metil- β -ciclodextrina
- MM** – microdomínios de membrana
- Ptc** – Patched, receptor da via de Sonic Hedgehog
- RNA** – Acido ribonucléico
- Shh** – Sonic hedgehog
- Smo** – Smoothened, co-receptor da via de Shh
- Tcf3** – Fator de transcrição de *Siamois*
- TGF- β** – Fator de crescimento transformante β
- UV** - luz ultravioleta
- Xnr** – proteína semelhante a Nodal em *Xenopus*

RESUMO

A formação da cabeça em vertebrados requer a atividade coordenada de diversas vias de sinalização. Inicialmente é necessária a inibição das vias de Wnt e BMP para permitir que grupos celulares comprometidos com a formação da região anterior possam formar esses territórios. Uma vez que essas vias são inibidas, a placa neural é formada, mas ainda necessita de padronização. A via de Sonic Hedgehog (Shh) desempenha papel essencial nessa etapa, contribuindo para a ventralização do tubo neural em formação e a posterior migração de células da crista neural. Assim, o controle da ativação ou inibição dessas vias é essencial para a formação das estruturas crânio-faciais. Este trabalho investigou as vias de sinalização de Wnt e Shh no desenvolvimento de *Xenopus laevis*. Contribuímos para esclarecer os mecanismos que levam à ativação da via de Wnt, demonstrando que o complexo Axina-Gsk3 é recrutado para a membrana pela ação de Disheveled e é responsável pela fosforilação de LRP6. Também identificamos um novo gene, M15, expresso no Centro Organizador e cuja proteína tem ação inibitória sobre a via de Wnt, favorecendo a formação da cabeça. Demonstramos que a sinalização de Shh depende de microdomínios de membrana ricos em colesterol (*rafts lipídicas*), visto que a desorganização dessas estruturas através da depleção de colesterol altera o domínio de expressão de componentes da via de Shh e leva ao desenvolvimento de embriões microcefálicos. Esses resultados ampliam o conhecimento sobre os mecanismos de ação das vias de Wnt e Shh e apontam novo paradigma na sinalização celular embrionária envolvendo os microdomínios de membrana ricos em colesterol.

ABSTRACT

Head formation in vertebrates requires coordinated activities of many signaling pathways. Initially, inhibition of BMP and Wnt signaling is necessary to allow prospective neural cells to form anterior structures. Once Wnt and BMPs are inhibited the neural plate is established but still requires further patterning. Sonic Hedgehog signaling is essential at this point; ventralizing the forming neural tube and subsequently inducing neural crest migration. Therefore, control of the activation or inhibition of these pathways is essential in forming craniofacial structures. This work investigated Wnt and Shh signaling during *Xenopus laevis* development. We contributed to the clarification of Wnt signaling activation mechanisms, showing that Axin-Gsk3 complex is recruited to the plasma membrane, by Disheveled, and is required to phosphorylate LRP6. We also identified a new player, M15, which is expressed at the Organizer and codifies a protein that inhibits Wnt signaling, allowing head formation. We demonstrated that Shh signaling depends on the assembly of cholesterol-rich-membrane microdomains (*lipid rafts*), since disruption of these structures by cholesterol depletion modifies the expression domain of Shh signaling components; leading to the development of microcephalic embryos. Altogether, these results improved the current knowledge of Wnt and Shh signaling mechanisms and point towards a new paradigm on embryonic cell signaling involving membrane microdomains

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	O desenvolvimento de <i>Xenopus laevis</i>	2
Figura 2-	Movimentos celulares durante a gastrulação de <i>Xenopus</i>	6
Figura 3-	O acúmulo de β -catenina no lado dorsal leva à formação de dois centros indutores: o centro de Nieuwkoop e o centro BCNE(<i>Blastula Chordin-Noggin Expressing</i>).....	8
Figura 4-	A via de sinalização por BMP e seus novos componentes.....	11
Figura 5-	A via de sinalização de Wnt.....	17
Figura 6-	Microdomínios de Membrana: <i>rafts</i> lipídicas caveolares e não caveolares.....	25
Figura 7-	A via de Sonic Hedgehog.....	29
Figura 8-	A depleção de colesterol provoca o desenvolvimento de embriões sem cabeça.....	32
Figura 9-	A depleção de colesterol provoca a redução na expressão de marcadores anteriores.	33
Figura 10-	M β CD complexado ao colesterol não afeta a expressão de <i>Otx-2</i>	34
Figura 11-	Metodologia do <i>screening</i> funcional.....	43
Figura 12-	M15: uma nova proteína transmembrana que anterioriza embriões de <i>Xenopus</i>	49
Figura 13-	M15 é expresso no Centro Organizador de Spemann.....	51
Figura 14-	M15 bloqueia a formação de duplo-eixo induzida por Wnt.....	54
Figura 15-	M15 associado à inibição de BMP leva ao desenvolvimento da cabeça.....	56
Figura 16-	M15L é homólogo de M15 e também anterioriza embriões de <i>Xenopus</i>	58
Figura 17-	O padrão de expressão de M15L.....	60
Figura 18-	M15L age como M15 na inibição da via de sinalização de Wnt.....	62

- Figura 19-** Baixas doses de M15L são suficientes para inibir a via de Wnt.....65
- Figura 20-** M15L associado à inibição de BMP também leva ao desenvolvimento da cabeça.....67
- Figura 21-** M15L aumenta a expressão de marcadores da região anterior.....69

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica	iv
Agradecimentos	v
Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Índice de Figuras	x
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	01
1.1- Considerações iniciais sobre o modelo experimental	01
1.2- Estabelecimento do primeiro eixo embrionário: o eixo dorso-ventral	03
1.3- A Gastrulação e o estabelecimento do eixo antero-posterior	05
1.4- Mecanismos moleculares durante a gastrulação	07
1.5- A via de sinalização de BMP/Chordin/Noggin	10
1.6- A via de sinalização Wnt e seus antagonistas	15
1.7- Mecanismos de desenvolvimento da região anterior e seus marcadores moleculares	21
1.8- A integração de sinais e a membrana plasmática	23
1.9- Os microdomínios de membrana como plataformas de sinalização	24
1.10- O colesterol e a organização dos microdomínios de membrana	26
1.11- O colesterol e o desenvolvimento embrionário: a via de Sonic Hedgehog	28
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	35
2.1- Objetivos gerais e específicos	35
Parte I: Mecanismos de ativação da via canônica de Wnt	36
Parte II: A identificação de novos componentes envolvidos na formação do eixo AP	37
Parte III- Os microdomínios de membrana e o comprometimento da região anterior	38
CAPÍTULO 3- MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA VIA CANÔNICA DE WNT	41
Artigo 1: <i>Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions</i>	41
CAPÍTULO 4: A IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPONENTES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO EIXO AP	42
4.1- Materiais e Métodos	42
4.1.1 - Screening funcional	42
4.1.2 - Manipulação de embriões, micro-injeções e dissecções	44
4.1.3 - Hibridização <i>in situ</i>	46
4.1.4 - Reação da polimerase em cadeia a partir de um molde de cDNA	46
4.2- Resultados	48
4.2.1 - M15: uma nova proteína transmembrana que anterioriza embriões de <i>Xenopus</i>	48
4.2.2 - O RNA de M15 é expresso no Centro Organizador de Spemann	50

4.2.3 - M15 bloqueia a formação de duplo-eixo induzida por Wnt8	53
4.2.4 - M15 associado à inibição de BMP leva ao desenvolvimento da cabeça	55
4.2.5 - M15L é homólogo de M15 e também anterioriza embriões de <i>Xenopus</i>	55
4.2.6 - O padrão de expressão de M15L	59
4.2.7 - M15L age como M15 na inibição da via de sinalização de Wnt	61
4.2.8 - Baixas doses de M15L são suficientes para inibir a via de Wnt	63
4.2.9 - M15L associado à inibição de BMP também leva ao desenvolvimento da cabeça	64
4.2.10- M15L aumenta a expressão de marcadores da região anterior	66
CAPÍTULO 5- OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA E O COMPROMETIMENTO DA REGIÃO ANTERIOR	70
<i>Artigo 2: A novel role for Cholesterol-Rich Microdomains during embryonic patterning in Xenopus</i>	70
CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO GERAL DA TESE	71
6.1 - A via de sinalização de Wnt e seus mecanismos de ativação	72
6.2 - A identificação de M15 como um novo inibidor da via de Wnt	74
6.3 - O papel dos microdomínios de membrana na formação da cabeça: o envolvimento de Sonic Hedgehog	79
CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES DA TESE	86
CAPÍTULO 8 - GLOSSÁRIO	89
CAPÍTULO 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações iniciais sobre o modelo experimental

Um dos maiores desafios da biologia do desenvolvimento é entender como uma única célula fertilizada é capaz de orientar a formação de outras células, estabelecendo eixos e especificando populações celulares com capacidade de desempenhar múltiplas funções. Os estudos sobre o desenvolvimento embrionário têm sido grandemente facilitados em função da utilização experimental de anfíbios, particularmente de *Xenopus laevis*. Trata-se de um modelo animal cujo desenvolvimento é externo e as fêmeas liberam óvulos durante todo o ano, mediante simples estimulação hormonal. Esses óvulos são de grande diâmetro (1 a 1,3 mm) e, uma vez fertilizados, permitem a distinção dos diferentes blastômeros (Gurdon *et al.*, 2003) (Fig.1). Além disso, em óvulos de *Xenopus* é possível distinguir duas regiões, uma região apical mais escura (o pólo animal) e uma região mais clara e rica em vitelo (o pólo vegetal).

Essas características facilitam a manipulação desses embriões e os experimentos de dissecação e microinjeção de reagentes. A rapidez com que as clivagens ocorrem permite o acompanhamento de importantes etapas do desenvolvimento em um curto período de tempo (cerca de dois a três dias para a formação completa do girino). Esses fatores associados tornam esse anfíbio um modelo favorável para o estudo e identificação de moléculas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário, através de experimentos como os que serão conduzidos neste trabalho.

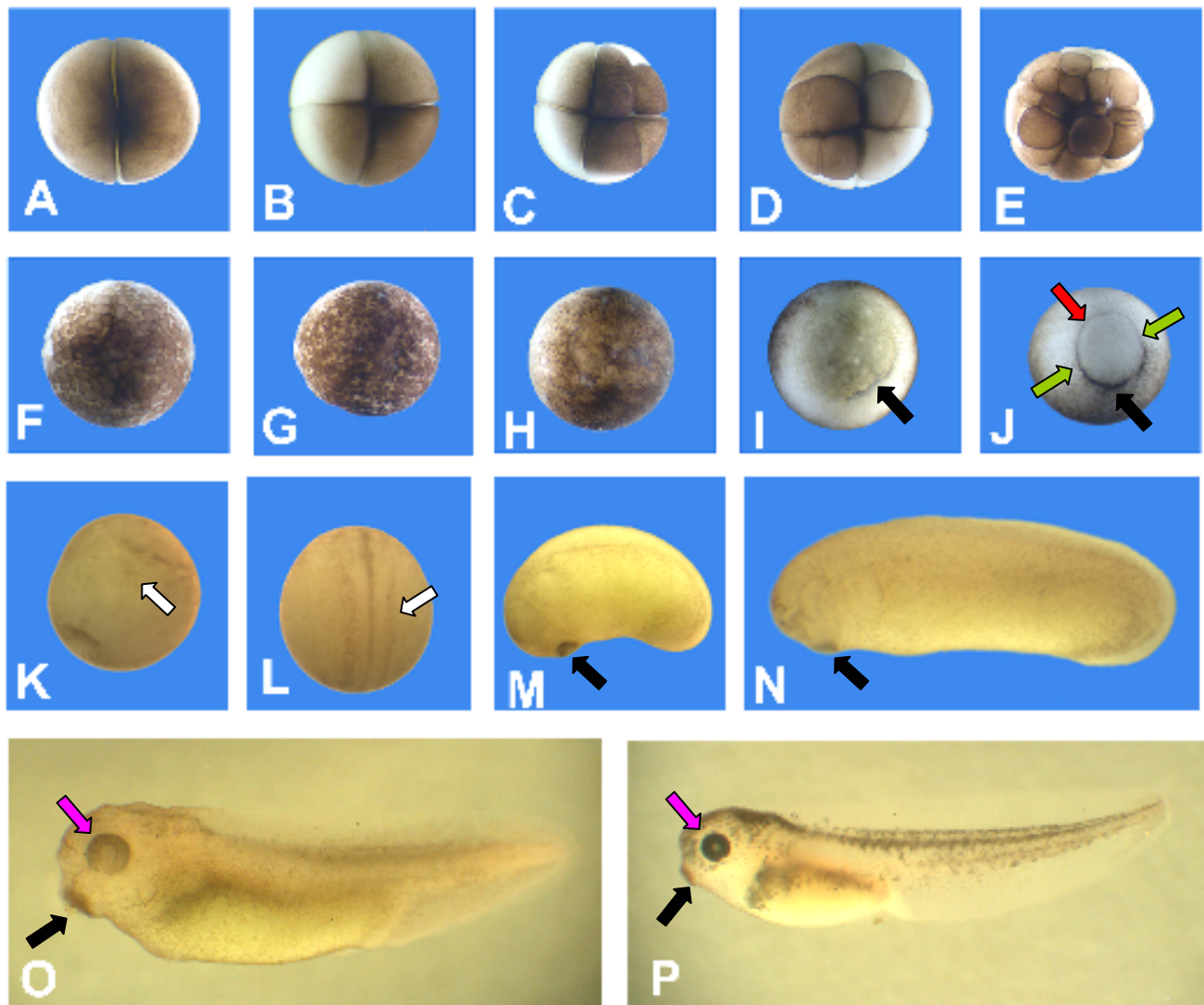


Fig. 1- O desenvolvimento de *Xenopus laevis*.

O grande diâmetro e a rapidez no desenvolvimento fazem dos embriões de *Xenopus* um modelo extremamente favorável para o estudo do desenvolvimento embrionário.

De A até H: processo de clivagem, visões do pólo animal. (A), estágio de 2 células. (B), quatro células. (C), oito células. (D), 16 células. (E), 32 células. (F) estágio 7 da blástula. (G), estágio 8 da blástula (MBT). (H), estágio 9.5 da blástula (I), visão ventral de embrião no estágio 10 da gástrula; seta: lábio dorsal do blastóporo. (J), visão ventral de embrião no estágio 11 da gástrula; seta preta: lábio dorsal; seta vermelha: lábio ventral, setas verdes: lábios laterais. (K) estágio 12.5, formação da placa neural, seta branca. (L), estágio 15 da neurula, seta branca indica tubo neural. (M), estágio 24; seta: glândula de cimento. (N) estágio 28; seta: glândula de cimento. (O), estágio 33; seta preta: glândula de cimento, seta rosa: olhos. (P), estágio 39; seta preta: glândula de cimento, seta rosa: olhos. (Almeida, 2006).

1.2- Estabelecimento do primeiro eixo embrionário: o eixo dorso-ventral

O estabelecimento do eixo dorso-ventral em *Xenopus* ocorre muito cedo, após a entrada do espermatozóide no ovócito. Essa entrada determina uma mudança no citoplasma cortical do ovócito, que sofre uma rotação de cerca de 30 graus em relação ao citoplasma subcortical, a partir do ponto de entrada do espermatozóide (Vincent et al., 1986). Esse movimento, conhecido como rotação cortical, ocorre em função de um arranjo paralelo de microtúbulos que se forma entre a camada citoplasmática cortical e interna, direcionando-os para o pólo vegetal da célula. Esses microtúbulos dispõem-se no ponto oposto ao da entrada de espermatozóide, especificado agora como lado dorsal e local onde futuramente terá início o processo de gastrulação (Elinson & Rowing, 1988; De Robertis e Kuroda, 2004).

Essa rotação leva também à exposição do citoplasma subcortical no lado dorsal e conseqüentemente, à formação de uma área de menor pigmentação neste mesmo lado, conhecida como crescente cinzento ou crescente dorsal (Brachet, 1977; Vincent et al., 1986, De Robertis et al, 2000). Esses microtúbulos carregam consigo vesículas citoplasmáticas, contendo proteínas, acumulando-as no lado dorsal da célula (Miller et al, 1999). Dentre essas proteínas, destaca-se Dishevelled (Dvl), uma inibidora da serina-treonina-quinase GSK-3 (do inglês *glycogen synthase kinase 3*). Essa quinase fosforila β -catenina, fazendo com que esta siga a rota de degradação (Klein & Melton, 1996). Dvl, GSK-3 e β -catenina são elementos integrantes da via de sinalização de Wnt. A ativação dessa via é capaz de modular diversas funções celulares, tais como proliferação, sobrevivência, indução

embrionária, geração de polaridade e especificação de destino celular (Moon, 2005; Cadigan & Nusse, 1997).

Uma vez no lado dorsal, Dvl é liberada das vesículas e se acumula nessa região, onde se liga a GSK-3, através de uma proteína ligadora de GSK-3 (GBP, do inglês *GSK-3 Binding Protein*), bloqueando sua ação (Weaver et al, 2003). Desse modo, essa movimentação de vesículas permite o acúmulo e estabilização de β -catenina no núcleo das células mais dorsais do embrião, aonde irá se associar a promotores de genes essenciais para o desenvolvimento da região dorsal. (Schneider et al, 1996; Schohl & Fagotto, 2002). Em embriões tratados com luz ultravioleta (UV), que age inibindo a polimerização de microtúbulos, a rotação cortical não acontece, inibindo o acúmulo de β -catenina no lado dorsal e, conseqüentemente, os embriões não formam estruturas dorsais, ficando postero-ventralizados. Por outro lado, embriões tratados com cloreto de lítio (LiCl) no estágio de 32 células desenvolvem-se antero-dorsalizados, pois esse fármaco inibe a atividade de GSK-3, permitindo o acúmulo de β -catenina por todo o mesoderma (De Robertis et al, 2000).

O sinal de β -catenina estende-se do pólo vegetal até o topo do pólo animal, no lado dorsal e esse acúmulo leva ao surgimento simultâneo de dois centros sinalizadores após a metade do período de blástula (período MBT, do inglês *Midblastula Transition*), quando a transcrição gênica zigótica tem início (Kuroda 2004; De Robertis e Kuroda, 2004). Um desses centros, localizado nas células dorsais vegetais, é o chamado Centro de Nieuwkoop, que expressa fatores semelhantes a Nodal (Xnr 1, 2, 4, 5 e 6), pertencentes à família de fatores de crescimento TGF- β (Fator de Crescimento Transformante Beta) (Takahashi et al. 2000). Nesse centro também ocorre a expressão da proteína secretada Cerberus,

que futuramente será importante para a formação da cabeça do embrião (Kuroda et al, 2004). As células do Centro de Nieuwkoop induzem a formação do mesoderma dorsal nas células ao redor desse centro, para a formação do futuro Centro Organizador de Spemann, enquanto as próprias células do Centro de Nieuwkoop formarão o endoderma anterior (De Robertis e Kuroda, 2004).

1.3 – A Gastrulação e o estabelecimento do eixo antero-posterior

A gastrulação em *Xenopus* tem início na zona marginal dorsal do embrião, quando as células dessa região adquirem uma morfologia especial (células em garrafa) e sofrem uma invaginação, formando o lábio dorsal do blastóporo (Keller, 1981). Esses precursores mesodermis migram através do teto da blastocele, levando à formação de uma cavidade chamada arquêntero, que desloca a blastocele. Simultaneamente, as células animais sofrem epibolia, convergindo em direção ao blastóporo (Keller, 1980; Winklbauer & Schürfeld, 1999) (Fig.2).

As células que migram através do lábio dorsal estão sempre mudando. As primeiras a iniciarem o processo são as células em garrafa, que darão origem ao endoderma anterior ou faringeal. À medida que essas células passam pelo lábio dorsal, outro grupo de células inicia o processo migratório, para dar origem à placa pré-cordal. As últimas células a migrarem através lábio dorsal são as que compõem a corda-mesoderma, que dará origem à notocorda.

O estabelecimento do eixo antero-posterior ocorre durante a gastrulação, em função do próprio movimento de involução e migração dos precursores mesodermis. As primeiras células que migram dão origem à porção anterior do

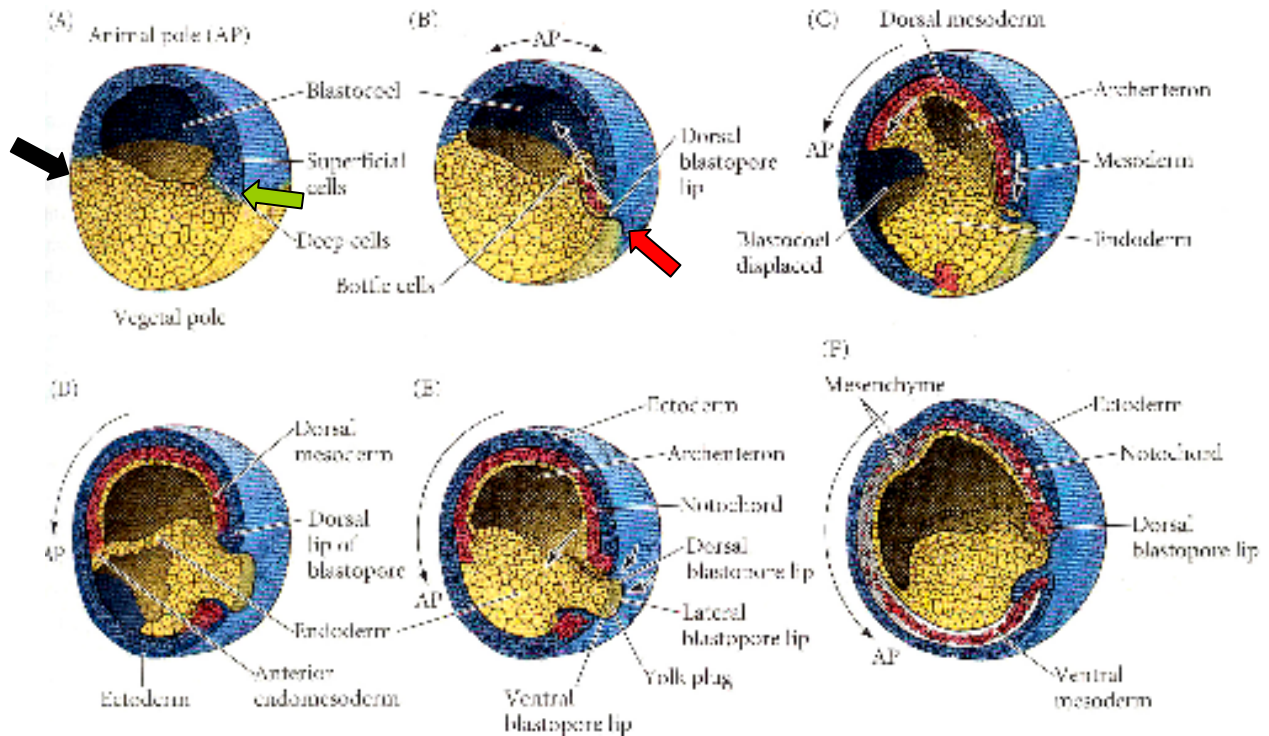


Fig. 2- Movimentos celulares durante a gastrulação de Xenopus.

A e B: início da gastrulação. Seta preta: zona marginal ventral; seta verde: zona marginal dorsal. As células em garrafa sofrem uma invaginação formando o lábio dorsal do blastóporo (seta vermelha) na zona marginal dorsal e os precursores mesodermiais migram sob o teto da blastocoele.

C e D: O arquêntero se forma, desloca a blastocoele e as células marginais migram pra dentro do embrião através do lábio lateral e ventral do blastoporo.

E e F: ao final da gastrulação, a blastocoele é completamente obliterada, o embrião torna-se envolto por ectoderma, o endoderma é internalizado e o mesoderma posiciona-se entre esses dois folhetos (Gilbert, 2003).

embrião, enquanto as células subseqüentes, que migram através dos lábios laterais e ventral, formados posteriormente, dão origem às estruturas ventro-posteriores. Nas etapas finais da gastrulação, a blastocele está completamente obliterada e o embrião encontra-se totalmente revestido pelo ectoderma (Winklbauer & Schürfeld, 1999). Uma porção do ectoderma dorsal é especificada para tornar-se ectoderma neural. Essa região é chamada de placa neural e dará origem ao tubo neural, através de um processo chamado neurulação (Keller et al. 1992; Davidson & Keller, 1999).

1.4- Mecanismos moleculares durante a gastrulação

Para que os eventos celulares da gastrulação se iniciem e ocorram em sua plenitude, faz-se necessária a interação de vários sinais emitidos durante o estágio de blástula. A estabilização de β -catenina no lado dorsal induz à formação de outro centro indutor, que abrange as células acima do Centro de Nieuwkoop, na porção dorsal do capuz animal (*animal cap*) e zona marginal dorsal, sendo chamado de BCNE (do inglês *Blastula Chordin and Noggin Expressing Center*) (Kuroda et al, 2004) (Fig.3). Nesse local o sinal de β -catenina induz à expressão dos antagonistas de BMPs (do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*) *Noggin* e *Chordin* (Wessely et al, 2001). Até o final da blástula, esses dois centros atuam coordenadamente, expressando genes que levarão à formação de um terceiro centro indutor, o Centro Organizador de Spemann. O centro BCNE expressa o gene *Siamois*, que é induzido quando β -catenina se liga ao fator de transcrição Tcf3, formando um complexo que ativa a sua transcrição. No estágio de blástula tardia, o fator de transcrição VegT e a proteína Vg1, pertencente à família TGF- β encontram-se expressos no pólo vegetal,

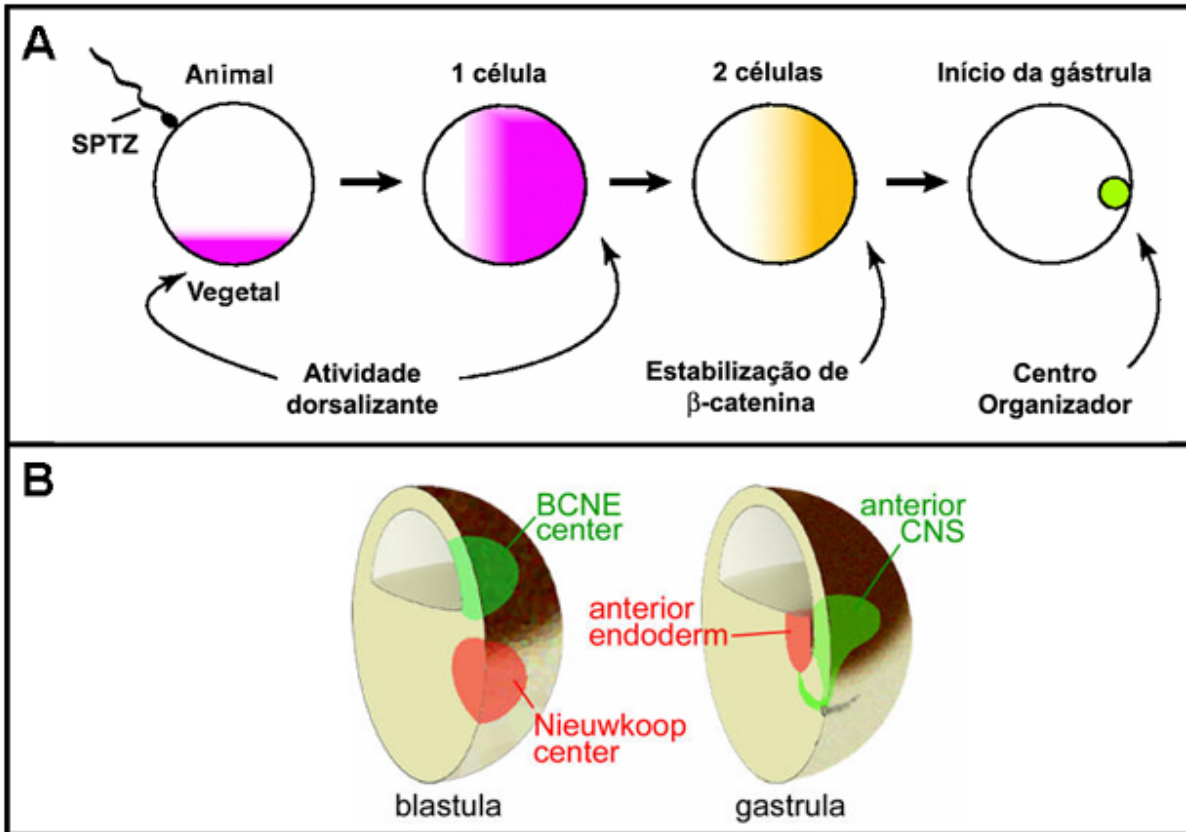


Fig. 3- O acúmulo de β -catenina no lado dorsal leva à formação de dois centros indutores: o centro de Nieuwkoop e o centro BCNE (*Blástula Chordin-Noggin Expressing*).

A- O estabelecimento do eixo dorso-ventral ocorre desde a entrada do espermatozóide no ovócito, determinando o início do acúmulo de β -catenina no núcleo das células dorsais.

B- As células do centro BCNE localizam-se na região animal dorsal, enquanto o centro de Nieuwkoop localiza-se na região vegetal dorsal. Durante a gástrula, o endoderma anterior derivado do centro de Nieuwkoop está em justa aposição à porção anterior do futuro Sistema Nervoso Central, constituindo um duplo mecanismo indutor para assegurar o desenvolvimento cerebral (Kuroda et al. 2004).

enquanto β -catenina se acumula na região dorsal. β -catenina, através da transcrição de *Siamois*, age sinergicamente com VegT e Vg1, ativando genes semelhantes a *Nodal* (Xnr). Isso favorece o estabelecimento de um gradiente maior das proteínas de Nodal na região dorsal. Essas proteínas são potentes indutores mesodermiais, de tal forma que nas regiões em que elas estiverem ausentes ou com pequena expressão, ocorrerão altos níveis de BMP4 e XWnt8, formando mesoderma ventral. Regiões com concentrações intermediárias de nodal tornam-se mesoderma lateral e onde a concentração é alta, o gene *Goosecoide* (Cho et al. 1991) e outros genes característicos do mesoderma dorsal são ativados, tornando esse tecido o Centro Organizador (Agius et al. 2000).

As células do centro BCNE darão origem ao prosencéfalo, à maior parte do mesencéfalo e rombencéfalo, à placa neural e notocorda (Kuroda et al, 2004). Assim, diz-se que o centro BCNE está envolvido com a especificação neural, enquanto o Centro de Nieuwkoop está envolvido com o desenvolvimento do endoderma dorsal, sendo ambos necessários para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central anterior, num duplo mecanismo para assegurar a formação cerebral. (Kuroda et al, 2004). Esses dois centros, portanto, atuarão como os grandes indutores dos eventos que ocorrem durante o período de blástula, sendo cruciais para desencadear a formação do centro organizador e, conseqüentemente, o fenômeno da gastrulação.

O Centro Organizador de Spemann foi identificado por Spemann e Mangold em 1924 (Spemann & Mangold, 1924). Num experimento clássico, eles removeram um fragmento do lábio dorsal do blastóporo de um embrião de salamandra albina e o transplantaram na região ventral de um embrião de salamandra pigmentada da mesma idade. Este embrião se desenvolveu com um eixo secundário, com completa

formação de placa neural, notocorda e somitos, demonstrando o poder indutor do Centro Organizador

O Centro Organizador é capaz de direcionar o desenvolvimento embrionário, não apenas instruindo as células ao seu redor a se diferenciarem em outros tipos de tecido, mas também organizando o tamanho, localização e orientação desses tecidos (Harland and Gerhart, 1997). Essas ações indutoras ocorrem dessa forma pela secreção de uma série de antagonistas presentes no Organizador, que são capazes de se ligar a determinados fatores de crescimento no meio extracelular, prevenindo a ligação destes a seus respectivos receptores (De Robertis, 2000). Dentre esses antagonistas, destacam-se os antagonistas de BMP, os antagonistas de Wnt e os antagonistas de Nodal. Estes fatores induzem fenótipos ventrais e posteriores, sendo, portanto anti-neurais.

1.5- A via de sinalização de BMP/Chordin/Noggin

As BMPs são proteínas solúveis pertencentes à Superfamília TGF- β de peptídeos, que controla diversos processos celulares como proliferação, reconhecimento celular, especificação do destino celular, diferenciação e apoptose durante a embriogênese e organogênese de organismos invertebrados e até mamíferos (Shi e Massagué, 2003). A via de sinalização por BMPs tem início quando o fator extracelular BMP se liga a um de seus receptores, o receptor tipo II (BMPRII), que então reconhece e recruta o receptor do tipo I, (BMPRI), formando um complexo ternário, onde BMPRII ativa BMPRI através de fosforilação (Von Bubnoff & Cho, 2001) (Fig. 4). A fosforilação de BMPRI induz o recrutamento das proteínas

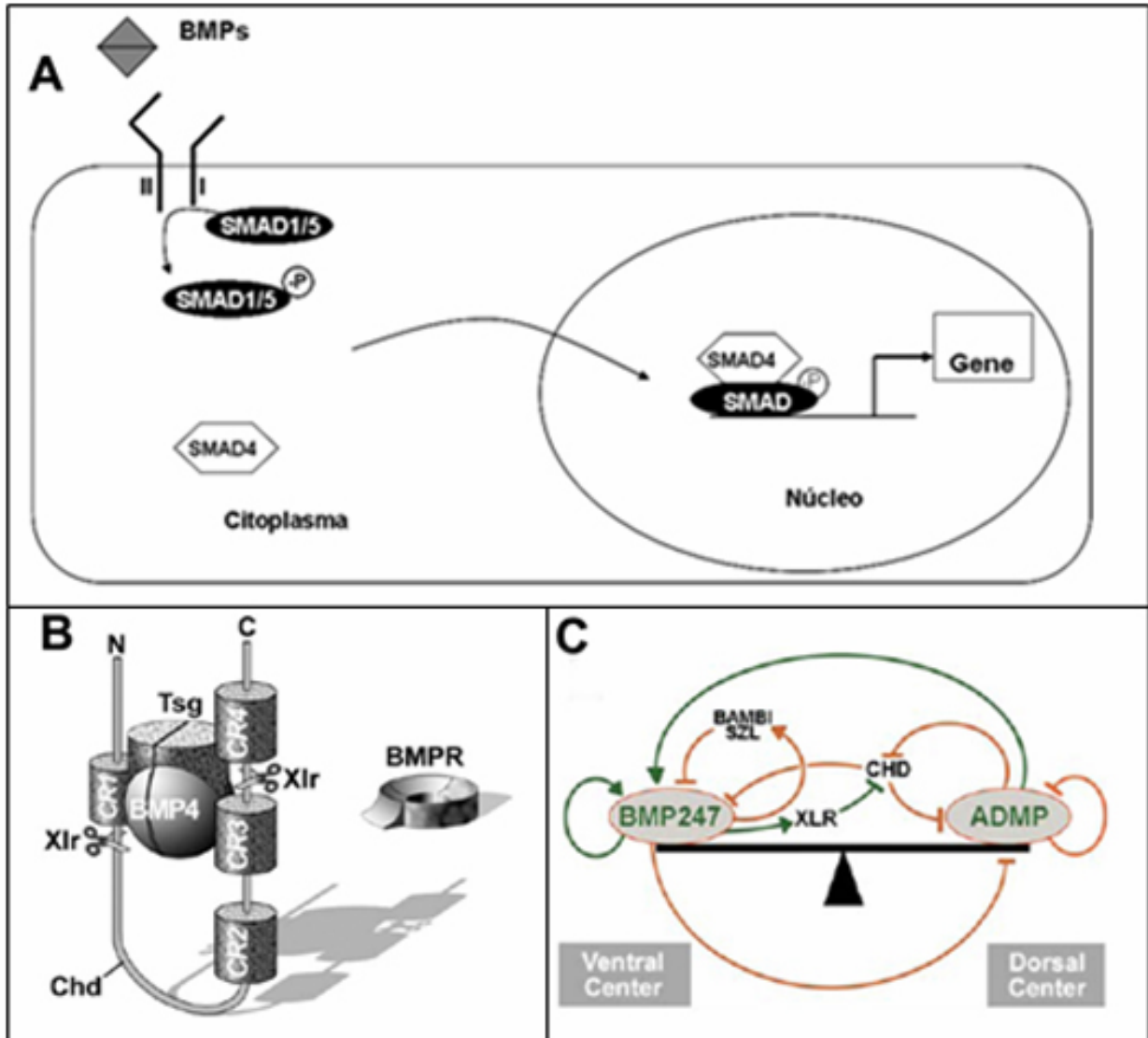


Fig.4- A via de sinalização por BMP e seus novos componentes

A- BMP se liga ao receptor do tipo II (BMPRII), que reconhece e recruta o receptor do tipo I (BMPRI). BMPRII ativa BMPRI através de fosforilação, e uma vez fosforilado BMPRI recruta Smad1/Smad5/Smad8 para a membrana, fosforilando-as e permitindo a ligação destas com uma Smad4. Esse complexo de Smads é translocado para o núcleo, para regular a transcrição de genes alvos da via de BMP.

B- Twisted gastrulation (Tsg) se liga a BMPs (ou ADMPs) e a Chordin, formando um complexo ternário que previne a ligação de BMP ao seu receptor. Xolloid é capaz de clivar chordin e o complexo formado entre chordin/BMP-4, permitindo que Tsg se ligue a BMP, aumentando a afinidade de BMP por seu receptor (De Robertis and Kuroda, 2004).

C- Modelo de interação entre a via de BMP e seus componentes: linhas verdes indicam efeitos pró-BMPs, linhas vermelhas, efeitos anti-BMPs (Reversade and De Robertis, 2005).

Smad1/Smad5/Smad8 para a membrana e a fosforilação destas, que se ligam a uma Smad4. Esse complexo é translocado para o núcleo, para regular a transcrição de genes alvos da via de BMP, como *Sizzled* e *XVent1* (Gawantka et al, 1995; von Bubnoff & Cho, 2001).

Todavia, existem proteínas do tipo Smad que exercem um efeito inibitório sobre a via de BMP. A Smad6 é um inibidor específico dessa via, agindo através da ligação e bloqueio de BMPRI ou competindo com a Smad4 pela ligação com as Smads fosforiladas 1/5/8 (Hata et al, 1998). Durante o desenvolvimento embrionário, as células dos diferentes folhetos, ectoderma, endoderma e mesoderma, seguem diferentes destinos mediante o recebimento de determinados sinais. Em relação ao ectoderma, sabe-se que algumas células seguem o destino neural, enquanto outras se diferenciam em tecido de natureza epidérmica. Vários trabalhos têm demonstrado que as BMPs medeiam a escolha entre o destino neural e o destino epidérmico no ectoderma de anfíbios (Hawley et al., 1995; Sasai et al. 1995; Weinstein and Hemmati-Brivanlou, 1997).

Seguindo a teoria do modelo *default*, as células ectodérmicas têm uma tendência natural de adquirir um destino neural, sendo essa tendência inibida pela expressão de BMPs, que induzem epiderme, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo em vez de tecido neural. Dessa forma, o Centro Organizador secreta moléculas que bloqueiam essa indução, protegendo o ectoderma e permitindo que este folheto adquira um comprometimento neural. Os genes expressos no centro BCNE, *Chordin* e *Noggin*, continuam sendo expressos no estágio de gástrula no Centro Organizador (Agius et al. 2000; Wessely et al. 2001), sendo capazes de se ligar a BMPs no meio

extracelular, e impedir a ligação dessas proteínas a seus receptores (Piccolo et al. 1996; Zimmerman et al. 1996).

Noggin é um transcrito zigótico, cuja proteína é capaz de se ligar a BMP4, inibindo sua ligação ao seu receptor (Smith & Harland, 1992; Zimmerman et al. 1996). Em um trabalho mais recente, foi demonstrado que a proteína de *Noggin* também se liga a BMP7, bloqueando a interface de ligação aos receptores dos tipos I e II (Groppe et al. 2002).

Chordin codifica uma proteína de 941 aminoácidos, que apresenta uma seqüência sinal e quatro domínios ricos em cisteína (CR1 a CR4), cada um com aproximadamente 70 aminoácidos e constituindo módulos de ligação a BMPs (Sasai et al. 1994; Larraín et al. 2000, Abreu et al, 2002). *Chordin* e *Noggin* inibem a fosforilação de Smads, promovendo a expressão gênica neural pelo declínio da atividade de Smad1 (De Robertis e Kuroda, 2004). Microinjeções do RNA mensageiro de *Chordin* levam à formação de duplo eixo e podem resgatar completamente um fenótipo ventralizante (Sasai et al. 1994). Por outro lado, a utilização de morfolino de *Chordin* leva a um aumento significativa da expressão de *Sizzled* no lado ventral de embriões de *Xenopus*, durante o estágio de gástrula, possivelmente devido a um aumento da sinalização por BMP4 (Reversade et al, 2005).

Piccolo e colaboradores detalharam ainda mais os mecanismos de interação entre BMPs e *Chordin* quando demonstraram que a metaloproteinase Xolloid (Xlr, do inglês *Xolloid-related*) é capaz de clivar *Chordin* e o complexo formado entre *Chordin*/BMP-4 em dois sítios específicos, reduzindo a afinidade entre os módulos CR e BMP4 e permitindo que esta volte a se ligar ao seu receptor (Piccolo et al.,

1997). Posteriormente, Oelgeschlager e colaboradores demonstraram que a proteína Twisted gastrulation (Tsg) pode se ligar a BMPs e a Chordin, formando um complexo ternário que previne a ligação de BMP ao seu receptor. Porém, quando o complexo ternário é clivado por Xolloid, Tsg se liga a BMP, aumentando a afinidade de BMP por seu receptor (Oelgeschlager et al., 2000) (Fig.4).

A expressão de Xolloid é aumentada na presença de altos níveis de BMP4 (Dale et al. 2002), de modo que na presença de altos níveis de Xolloid, Tsg promove a sinalização por BMP e a baixos níveis essa sinalização é inibida (Larraín et al. 2001). Tsg, BMP4, Xlr e Sizzled, entre outras, são proteínas integrantes da via de BMP que são secretadas no lado ventral durante a gástrula, formando um centro localizado exatamente no lado oposto ao Centro Organizador dorsal (De Robertis and Kuroda, 2004).

Paradoxalmente, uma proteína da família das BMPs chamada ADMP (do inglês *anti-dorsalizing morphogenetic protein*) é expressa no lado dorsal e recentemente demonstrou-se sua importância na padronização do eixo dorso-ventral (Reversade and De Robertis, 2005). A ligação de ADMP ao seu receptor ALK-2 é bloqueada no lado dorsal por Chordin, mas quando este é clivado por Xolloid, essa inibição deixa de existir (Fig.4). A expressão de ADMP é ativada por baixos níveis de BMP, exercendo uma atividade ventralizante compensatória. Já se demonstrou que mesmo a depleção de toda a fonte de BMPs do lado ventral não é capaz de bloquear completamente a padronização do eixo dorso-ventral, e que isso somente ocorria quando se impedia a formação do centro organizador dorsal no embrião, através de tratamento com luz ultravioleta (Reversade et al. 2005). Através de estudos com perda de função, Reversade e De Robertis demonstraram que somente a depleção

conjunta de BMPs no lado ventral (BMPs2/4/7) e dorsal (ADMP) impede esse mecanismo compensatório, provocando a neuralização de todo o ectoderma em embriões de *Xenopus* (Reversade e De Robertis, 2005).

A proteína Folistatina também age inibindo BMPs, mas de uma maneira diferente: enquanto Chordin e Noggin se ligam a BMPs impedindo a ligação aos seus receptores, Folistatina é capaz de se ligar ao receptor de BMP, através de BMP4, formando um complexo trimérico que impede a sinalização (Iemura et al, 1998).

Mais recentemente, descobriu-se que depois de *Chordin*, o gene mais fortemente induzido pelo sinal de β -catenina é *Xnr-3* (Wessely et al. 2004), que codifica uma proteína semelhante a Nodal, porém sem a atividade de indução mesodermal (De Robertis and Kuroda, 2004). Uma vez superexpressada em explantes ectodérmicos, *Xnr-3* é capaz de induzir a diferenciação neural, possuindo também uma ação inibitória sobre BMPs (Hansen et al. 1997; Haramoto et al. 2004).

Dessa forma, a ação dos antagonistas de BMP secretados pelo Centro Organizador cria um gradiente de distribuição de BMPs no ectoderma durante a gástrula, onde uma alta concentração dessas proteínas induz epiderme e uma baixa concentração, dada pela forte inibição de BMPs, leva à formação de tecido nervoso (Wilson et al. 1997).

1.6- A via de sinalização Wnt e seus antagonistas

Outra classe de antagonistas secretados pelo Centro Organizador inclui os inibidores de Wnt. A família Wnt é constituída por glicoproteínas secretadas ricas em cisteína, cujo nome advém da fusão do nome *Wingless*, um gene pertencente à

drosófila, com o nome do seu homólogo em vertebrados, *Integrated* (Cadigan & Nusse, 1997). Essas proteínas se ligam a proteínas transmembrana de sete passagens do tipo Frizzled (Fzl), que contém um domínio extracelular rico em cisteína, CRD (do inglês *Cystein Rich Domain*) (Bhanot et al.1996). Duas classes de proteínas de Wnt podem ser reconhecidas, as de classe I, que agem através de β -catenina, e as de classe II, cuja transdução de sinal ocorre via fosfoinosítídeos (Brown JD and Moon RT, 1998). As de classe I compreendem as proteínas Wnt1, Wnt8, Wnt8b, e Wnt3a, (Du et al., 1995) que ativam a via canônica de Wnt, regulando o destino e a proliferação celular (Wodarz & Nusse, 1998; Miller et al., 1999). As de classe II compreendem as proteínas Wnt4, Wnt5a, e Wnt11, que ativam a via não canônica de Wnt, controlando os processos de movimentação e polaridade celular (Moon et al., 1997; Kuhl, 2002; Tada et al. 2002).

Para que a via canônica de Wnt seja ativada (Fig.5), é preciso que Wnt se ligue a Fzl e ao seu co-receptor LRP5/6 (do inglês *Low Density Lipoprotein –LDL-receptor Related Protein 5/6*) formando um complexo na superfície celular (Tamai et al. 2000). LRP6 possui cinco domínios intracelulares (PPPSP *motifs*) que são fosforilados por GSK3 membranar e Caseína quinase I (CK1) e essa fosforilação desencadeia a transdução de sinal para dentro da célula (Tamai et al 2004, Zeng et al 2005). Isso ativa a proteína citoplasmática Dishevelled (Dvl) que inativa o complexo protéico responsável pela degradação de β -catenina livre no citoplasma, e que é formado pelas proteínas Axina, APC (do inglês *Adenomatous Polyposis Coli protein*), GSK3 e CK1 (Peifer & Polakis, 2000, Logan & Nusse, 2004).

Recentemente, demonstrou-se que um gene supressor tumoral, WTX (do inglês *Wilms Tumor gene on the X chromosome*), também faz parte desse complexo,

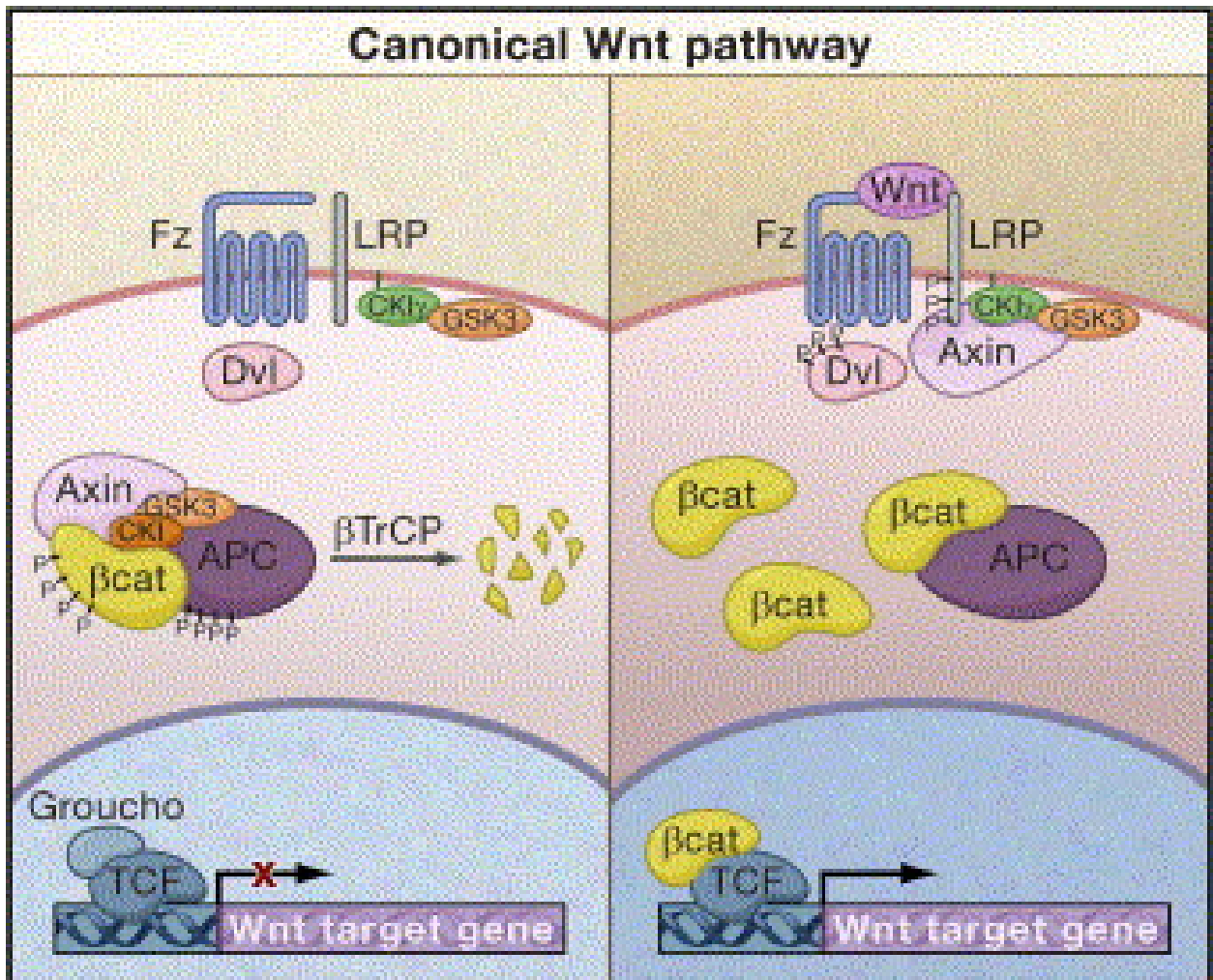


Fig. 5- A via de sinalização de Wnt.

Observa-se à esquerda a via sem a ligação de Wnt. β -catenina é fosforilada por GSK3 e segue a via de degradação, impedindo sua translocação para o núcleo e a transcrição gênica. À direita observa-se ativação dessa via de sinalização após a ligação de Wnt a Frizzled e ao seu co-receptor LRP5/6, formando um complexo na superfície celular. Isso ativa a proteína Dishevelled e promove a fosforilação de LRP6 mediada por GSK3 da membrana. Isso recruta Axina para o complexo, liberando β -catenina, que se estabiliza no citoplasma. Do citoplasma é translocada para núcleo para se associar ao fator de transcrição TCF/LEF e ativar a transcrição de diversos genes alvos da via de Wnt (Clevers H., 2006) .

contribuindo para a degradação de β -catenina (Major et al, 2007). A proteína Dvl apresenta três domínios, o domínio DIX, que permite a ligação de Dvl à Axina e é crítico para a ativação da via de Wnt, o domínio PDZ (através do qual Dvl se liga a Fzl) e o domínio DEP, cuja participação na ativação da via ainda não está totalmente esclarecida (Wallingford & Habas, 2005).

Uma vez que β -catenina torna-se estabilizada no citoplasma, ela é translocada para núcleo onde se associa com o fator de transcrição TCF/LEF, ativando a transcrição de diversos genes. Demonstrou-se que a fosforilação dos domínios intracelulares de LRP5/6 causa o recrutamento da proteína Axina para a membrana celular, aumentando a eficiência da inativação do complexo protéico (Tamai et al., 2004). Esses dados apontam para a possibilidade de Axina estar envolvida num possível processo de ativação da via, o que vai de encontro aos achados até então estabelecidos. Esse mecanismo é muito complexo e ainda faz-se necessário investigá-lo para se chegar a um melhor entendimento sobre a forma pela qual a via é ativada.

Durante o desenvolvimento embrionário de *Xenopus*, a classe I é importante para a padronização do eixo dorso-ventral em dois momentos bastante definidos, antes e depois do estágio MBT, quando tem início a transcrição gênica zigótica (Moon et al 1997). No primeiro momento ou onda maternal de Wnt, essa via de sinalização é importante para a formação dos centros de Nieuwkoop, BCNE e posteriormente o Centro Organizador. Muitos trabalhos já demonstraram que injeções do RNA mensageiro de Wnt no lado ventral do embrião levam à formação de um eixo secundário, demonstrando a relevância dessa via no estabelecimento e especificação do eixo dorso-ventral (Sokol et al, 1991).

A segunda onda de Wnt, por outro lado, ocorre após o período MBT e possui um efeito contrário ao da onda maternal, pois age antagonizando o Centro Organizador, exercendo portanto um efeito ventralizante (Niehrs, 1999). *Wnt8* é naturalmente expresso depois desse período no mesoderma ventrolateral que envolve o Centro Organizador e sua superexpressão leva ao desenvolvimento de embriões sem cabeça (Christian & Moon, 1993).

Dessa forma, para que ocorra a formação da cabeça, o Centro Organizador precisa secretar não só os já mencionados inibidores de BMP, mas também fatores antagonistas da via de Wnt. Esses fatores são capazes de induzir a formação de cabeça quando a sinalização por BMP é simultaneamente inibida (Christian & Moon, 1993, Glinka et al., 1997).

Dentre esses antagonistas, existem aqueles conhecidos como sFRPs (do inglês *secreted Frizzled-Related Proteins*), que constituem uma larga família de proteínas secretadas que possui um domínio amino-terminal rico em cisteína semelhante ao do receptor Frizzled (Kawano & Kypta, 2003). Cerberus e Frzb-1 são membros integrantes dessa família e por isso são capazes de se ligar diretamente a Wnt, inibindo sua ação (Leyns et al. 1997).

Cerberus codifica uma proteína secretada expressa no endomesoderma anterior (Bouwmeester et al. 1996). A proteína Cerberus não é somente antagonista de Wnt, mas também age inibindo as vias de sinalização de BMP e Nodal, ligando-se diretamente a essas proteínas (XWnt8, BMP4 e Xnr-1, respectivamente) no espaço extracelular (Piccolo et al. 1999). A microinjeção do RNA mensageiro de *Cerberus* no lado ventral de embriões de *Xenopus* induz a formação ectópica de cabeça, sem a presença de tronco (Bouwmeester et al. 1996).

Por outro lado, estudos de perda de função utilizando morfolino de *Cerberus* demonstraram que essa construção inibe a formação de cabeça em *Xenopus*, mas não compromete o desenvolvimento do tronco e cauda (Kuroda et al. 2004). Dessa forma, *Cerberus* especifica estruturas anteriores através da criação de uma zona livre de sinalização por BMPs, Nodal e Wnt.

Frzb-1 é uma proteína secretada capaz de se ligar diretamente a Wnt, antagonizando sua ação (Wang et al. 1997; Leyns et al. 1997). Predominantemente presente no endomesoderma em involução, juntamente com os inibidores de BMP Noggin, Chordin e Folistatina, Frzb-1 é capaz de induzir a formação de eixo secundário em *Xenopus* quando associado com a forma dominante negativa do receptor de BMP2/4 (TBR) (Glinka et al. 1997).

Dickkopf-1 (Dkk-1) é um antagonista de Wnt expresso no endomesoderma dorsal (Glinka et al. 1998). Ele se liga ao co-receptor LRP5/6 (Fig. 8) e a uma segunda proteína transmembrana chamada Kremen, formando um complexo que é endocitado, resultando assim na depleção de LRP5/6 da membrana (Mao et al. 2002). Já foi demonstrado em *Xenopus* que microinjeções de anticorpos neutralizantes de Dkk-1 inibem a formação da cabeça e da placa pré-cordal (Glinka et al. 1998; Kazanskaya et al. 2000), da mesma forma que a superexpressão de Dkk-1 no lado dorsal leva à formação de embriões com cabeça aumentada.

Assim como Dkk-1, Wise (Itasaki et al, 2003) e SOST (Li et al, 2005; Semenov et al, 2005) também antagonizam Wnt através da ligação à LRP6. Shisa, por outro lado, age sob um mecanismo diferente, mantendo Frizzeld no retículo endoplasmático, impedindo a sua maturação e inibindo assim a via de Wnt (Yamamoto et al, 2005).

1.7- O desenvolvimento da região anterior e seus marcadores moleculares

Em *Xenopus*, a formação da cabeça e tronco são processos distintos que requerem diferentes sinais liberados pelo Organizador de Spemann. A formação da cabeça é inibida por fatores de crescimento da superfamília TGF- β e da família Wnt. A presença de Nodal inicialmente induz e mais tarde inibe a porção anterior do Organizador (*head organizer*); BMPs ventralizam o mesoderma dorsal e antagonizam a neurulação do ectoderma, enquanto Wnts exercem as mesmas ações de BMP, além de posteriorizarem o neuroectoderma (Niehrs, 1999).

Dessa forma, antagonistas de TGF- β e Wnt são diferentemente expressos pelo Organizador e seus derivados, conforme se estabelece o eixo antero-posterior. Se no endoderma anterior os antagonistas de Wnt são fortemente expressos, à medida que se avança em direção posterior, eles são progressivamente menos ativos, permitindo que os sinais de Wnt exerçam suas funções, levando à formação do tronco. Assim, a formação da cabeça resulta de uma expressão conjunta de antagonistas de Wnt e BMPs, enquanto a formação do tronco requer a sinalização de Wnt e inibição de BMPs (Glinka et al. 1997; Niehrs, 1999).

As diferentes etapas do desenvolvimento embrionário são caracterizadas pela expressão de diferentes genes em regiões específicas do embrião. O conhecimento do padrão de expressão desses genes facilita a compreensão e distinção temporal dos mecanismos envolvidos nesse processo, bem como permite a identificação morfológica de estruturas embrionárias mesmo em fases iniciais do desenvolvimento. O Sistema Nervoso Central em embriões de vertebrados é morfológicamente subdividido em prosencéfalo, mesencéfalo,

rombencéfalo e medula espinhal. Em *Xenopus*, estas subdivisões começam a ser determinadas no momento da gastrulação, quando o ectoderma neural é induzido no lado dorsal do embrião por sinais originados do mesoderma dorsal, levando à posterior formação da placa neural (De Robertis and Kuroda, 2004). A placa neural, por sua vez, é subdividida ao longo do eixo antero-posterior em duas regiões: a placa pré-cordal e a placa epi-cordal. A primeira dará origem ao prosencéfalo, que posteriormente é subdividido em telencéfalo e diencéfalo, enquanto a placa epi-cordal dará origem a mesencéfalo, rombencéfalo e medula espinhal .

Prosencéfalo e mesencéfalo podem ser molecularmente demarcados através da expressão do gene homeobox *Otx-2* por hibridização *in situ*. Pannese e colaboradores (1995) demonstraram que a expressão de *Otx-2* em *Xenopus laevis* começa já no ovócito, mas aumenta significativamente após o período MBT, localizando-se na zona marginal dorsal no estágio 9.5. No estágio 10.5 é expresso nas células em garrafa e nas células que darão origem ao meso-endoderma pré-cordal e a partir do estágio 10.5, *Otx-2* também é expresso no neuroectoderma anterior, sugerindo um papel na especificação das estruturas mais anteriores do embrião. Já se demonstrou inclusive que *Otx-2* ativa a expressão de *Xag-1*, um marcador da glândula de cemento, contribuindo para a formação dessa estrutura (Gammill & Sive, 1997; Wardle et al. 2002).

Em *Xenopus*, o desenvolvimento dos olhos tem início por volta do estágio 22, a partir de protrusões do diencéfalo. Tanto os olhos quanto a fina faixa de diencéfalo entre eles podem ser reconhecidos através da marcação pelo gene *Six-3*, que já começa a ser expresso durante a gastrulação, na porção anterior da futura placa neural (Zhou et al. 2000). O limite entre mesencéfalo e rombencéfalo é marcado pelo

gene *Engrailed-2 (En-2)* e já se demonstrou que esse gene é alvo direto da via de sinalização de Wnt-1, pois seu promotor possui sítios para LEF/TCF (McGrew et al 1999). Reversade e colaboradores (2005) também demonstraram que a injeção de morfolino de β -catenina leva ao desaparecimento da marcação para *En-2*.

O rombencéfalo de embriões de *Xenopus* apresenta uma série de 7 a 8 segmentações denominadas rombômeros, cuja expressão do gene *Krox-20* pode identificar alguns deles. A expressão desse gene ocorre no neuroectoderma, em locais específicos ao longo do eixo antero-posterior: sua expressão tem início no final do estágio de gástrula e em estágios posteriores os sítios de expressão restringem-se aos rombômeros 3 e 5 e regiões adjacentes aos arcos branquiais (Bradley et al., 1993; Nieto et al., 1992).

1.8- A integração de sinais e a membrana plasmática

As ações entre morfógenos secretados do lado ventral e moléculas inibitórias do lado dorsal definirão os territórios embrionários ao longo dos eixos dorso-ventral e antero-posterior. A formação de estruturas anteriores do embrião como o cérebro depende fundamentalmente da ação coordenada destes fatores e alterações nestas vias provocam sérios defeitos na cabeça do embrião (Günther et al., 1994)

Sendo assim, as células embrionárias estão expostas a uma grande variedade de sinais que devem ser corretamente traduzidos para promover a transcrição de genes específicos às funções celulares e que as diferenciem entre uma população e outra de um determinado território embrionário. Embora sejam bem conhecidos a natureza destes fatores e os domínios embrionários onde eles são expressos, ainda

é obscura a forma pela qual as células embrionárias discriminam a variedade de sinais extracelulares que são apresentados durante as fases de comprometimento do território anterior. Desta forma, entender como componentes envolvidos na sinalização celular são organizados na superfície celular permitirá entender como as populações celulares segregam variados tipos de sinais.

1.9- Os microdomínios de membrana como plataformas de sinalização

A membrana plasmática é constituída basicamente por lipídios, proteínas e hidratos de carbono. Organiza-se sob a forma de uma bicamada lipídica, apresentando permeabilidade seletiva, fluidez e assimetria entre as duas faces da membrana. Os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes, mas também estão presentes o colesterol e os glicolipídios (Jacobson et al, 1995).

Diversos estudos já demonstraram que as membranas celulares contêm microdomínios resistentes à extração pelo uso de detergentes não-iônicos (Brown e Rose, 1992). Análises de composição dessas estruturas, também chamadas de microdomínios de membrana ou *rafts* lipídicas, revelaram a presença de uma grande proporção de colesterol e esfingolipídios, fundamentalmente, bem como proteínas de domínio transmembrana longo, glicolipídios como o gangliosídeo GM1, e proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (Fig. 6). As *rafts* contêm ainda lectinas ligadas a carboidratos, ajudando assim a estabilizar a organização dessas estruturas (Simons e Ikonen, 1997; Brown e Rose, 1992)

Recentemente Pike definiu as *rafts* de membrana como sendo domínios pequenos (10-200 nm), heterogêneos, ricos em esteróis e esfingolipídios, altamente

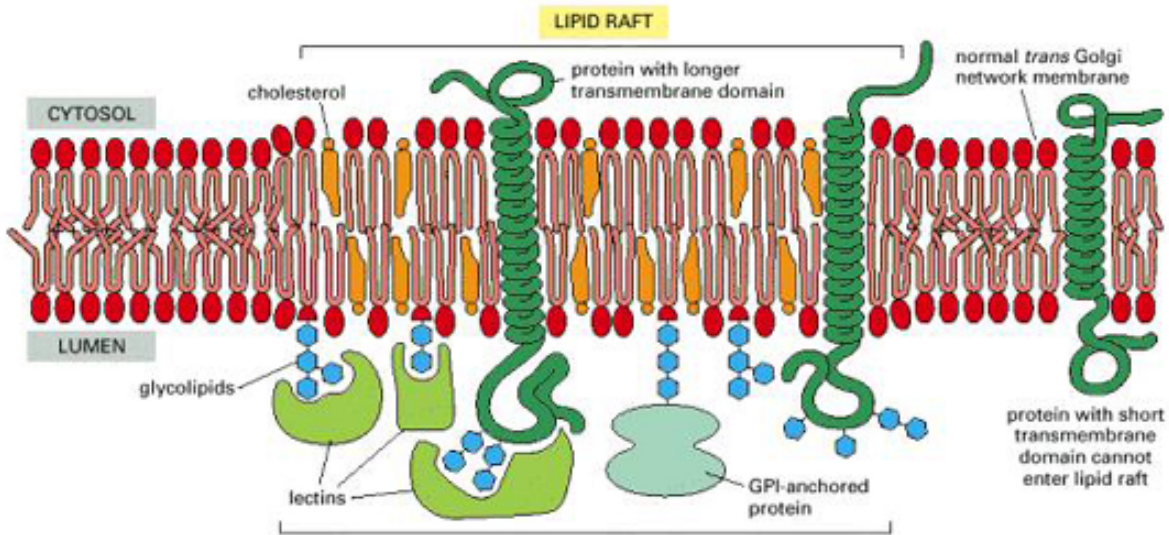
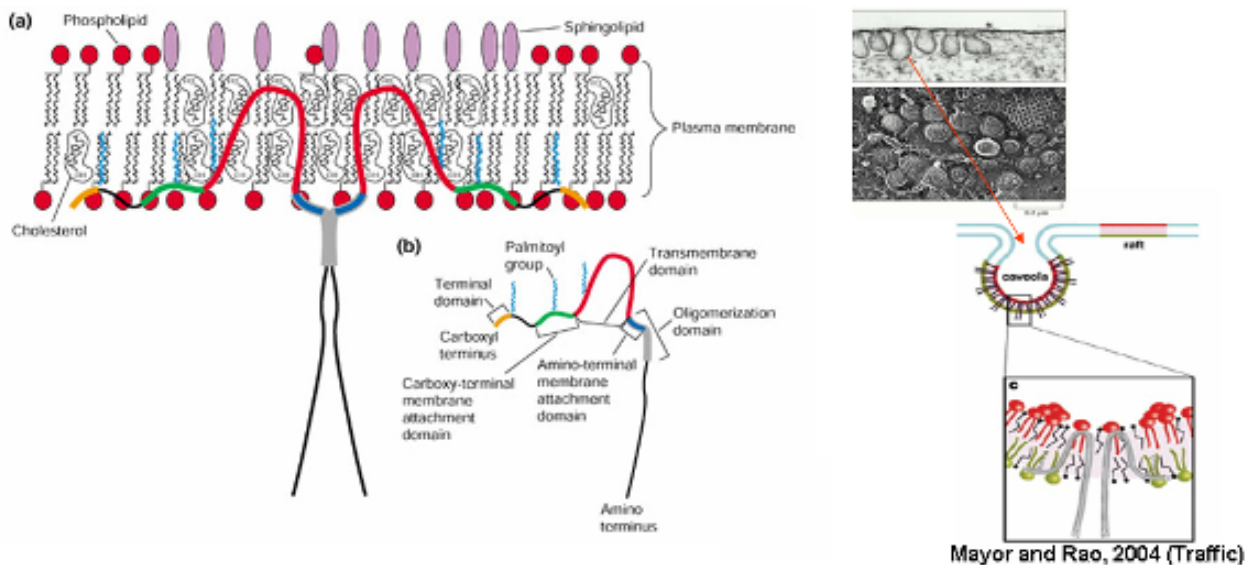
A**B**

Fig.6- Microdomínios de Membrana: rafts lipídicas caveolares e não caveolares

A- Microdomínios de membrana ou *rafts* lipídicas são regiões da membrana plasmática ricas em colesterol, esfingolípídios e o gangliosídeo GM1, bem como proteínas de domínio transmembrana longo. Além disso, contém preferencialmente proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Lectinas, podem ser vistas associadas a carboidratos, ajudando assim a estabilizar a organização dessas estruturas (Alberts et al. 2002).

B- As cavéolas são formas especializadas de *rafts* lipídicas que, além dos constituintes comuns a todas as *rafts*, associam-se a proteínas da família das Caveolinas (Mayor and Rao, 2004).

dinâmicos e que compartimentalizam processos celulares (Pike, 2006). Uma vez que as *rafts* podem mover-se lateralmente através da membrana formando agregados (Harder et al., 1998), a associação de uma proteína a essas regiões pode resultar na sua redistribuição e por isso têm-se proposto que as *rafts* funcionariam como plataformas para a organização de complexos de sinalização e para a migração de moléculas de superfície (Simons and Ikonen, 1997; Stauffer and Meyer, 1997; Viola et al., 1999).

Uma das maiores subclasses de *rafts* lipídicas é a cavéola, uma invaginação da membrana plasmática que se caracteriza pela associação seletiva com uma família de proteínas de membrana, as Caveolinas (Galbiati et al.2001) (Fig. 6). Três tipos de Caveolinas foram identificadas (Caveolinas 1, 2 e 3) e são transcritas a partir de três genes diferentes (Okamoto et al., 1998). A Caveolina-1 é a principal componente da cavéola e está relacionada a diversas vias de sinalização uma vez que pode ser fosforilada em resíduos de tirosina por quinases Src (Corley Mastick et al., 2001).

1.10- O colesterol e a organização dos microdomínios de membrana

O colesterol é uma molécula lipídica precursora de ácidos biliares e hormônios esteróides, sendo um importante componente das membranas plasmáticas, onde se encontra a sua maior fração dentro do organismo (Lange, 1991). Apresenta uma grande variedade de efeitos sobre as propriedades físicas das membranas, tais como a sua permeabilidade e difusão lateral (Yeagle, 1991), sendo importante para a estrutura e função das proteínas que as compõem. Além disso, alterações nos níveis

de colesterol afetam a viscosidade da membrana, a exposição das proteínas de superfície e também a interação das proteínas de membrana com as citosólicas (Shinitzky & Inbar, 1974).

O colesterol é essencial para formação das cavéolas, devido a sua capacidade de se ligar às Caveolinas, além de regular a transcrição destas proteínas (Muratta, 1995, Fielding & Fielding, 2000). As Caveolinas ligam-se aos lipossomos apenas se estes apresentarem colesterol, e esta interação Caveolina-colesterol promove a oligomerização da proteína (Muratta, 1995), sugerindo a dependência do colesterol para oligomerização da Caveolina e sua inserção nas membranas.

Em função da importância do colesterol para a organização e função e *rafts* lipídicas, do tipo caveolares ou não, inúmeros trabalhos têm utilizado a depleção deste lipídio como estratégia para o estudo dessas estruturas. Células tratadas com agentes que removem o colesterol da membrana, tais como a filipina, metil- β -ciclodextrina e nistatina, perdem as cavéolas e as Caveolinas, o que resulta no “achatamento” da membrana plasmática (Rothberg, 1992) e um declínio do transporte intracelular e transcelular de macromoléculas mediado por essas porções da membrana (Rothberg et al. 1990; Chang et al. 1992, Schnitzer et al. 1994).

Diversos estudos têm optado pela utilização da metil β -ciclodextrina (M β CD) para a extração de colesterol da membrana (Ohtani *et al.*, 1989; Kilsdonk *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995, Cooper *et al.*, 2003). Ciclodextrinas são oligômeros cíclicos de glucose que têm a capacidade de seqüestrar lipófilos em seu centro hidrofóbico (Pitha *et al.*, 1988). Três tipos de ciclodextrinas já foram relatados, a α -ciclodextrina, a γ -ciclodextrina e a β -ciclodextrina. As duas primeiras não se mostram específicas para a remoção de colesterol da membrana, sendo a α -ciclodextrina relacionada com

a remoção de fosfolipídios (Ohtani *et al.*, 1989). Metil β -ciclodextrina, entretanto, tem sido a droga de escolha em diversos trabalhos quando se objetiva a depleção de colesterol, pois já se demonstrou sua capacidade de remover seletivamente esse lipídio das membranas (Kilsdonk *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995; Neufeld *et al.*, 1996). Além disso, age estritamente na superfície da membrana, sem que ocorra sua ligação ou inserção no interior desta (Ohtani *et al.* 1989). Todavia, uma vez que M β CD seqüestra o colesterol em seu interior, o complexo formado não é estável e eventualmente pode ocorrer a doação de colesterol para a membrana.

1.11- O colesterol e o desenvolvimento embrionário: a via de Sonic Hedgehog

O colesterol desempenha papel importante durante o desenvolvimento embrionário, influenciando diretamente algumas vias de sinalização. A via de Sonic Hedgehog (Shh) está diretamente relacionada ao colesterol, pois a biossíntese de Shh envolve modificações lipídicas que parecem ser determinantes para sua atividade. A proteína de Shh é sintetizada como um precursor de 45 kDa que sofre um processo catalítico, gerando um fragmento N-terminal de 19 kDa, responsável por todas as atividades de sinalização e um fragmento C-terminal de 25 kDa (Mann, & Beachy, 2004) (Fig. 7). O fragmento N-terminal ativa a sinalização de Shh ao se ligar ao receptor Patched. Patched é uma proteína transmembrana de 12 passagens que na ausência de estimulação de Shh suprime a atividade da via através da inibição de Smoothed (Smo), com o qual se associa (Lum & Beachy, 2004). Smo é uma proteína transmembrana de sete passagens que, uma vez livre da inibição promovida por Patched, ativa a via de Shh, levando a transcrição de genes como Gli-

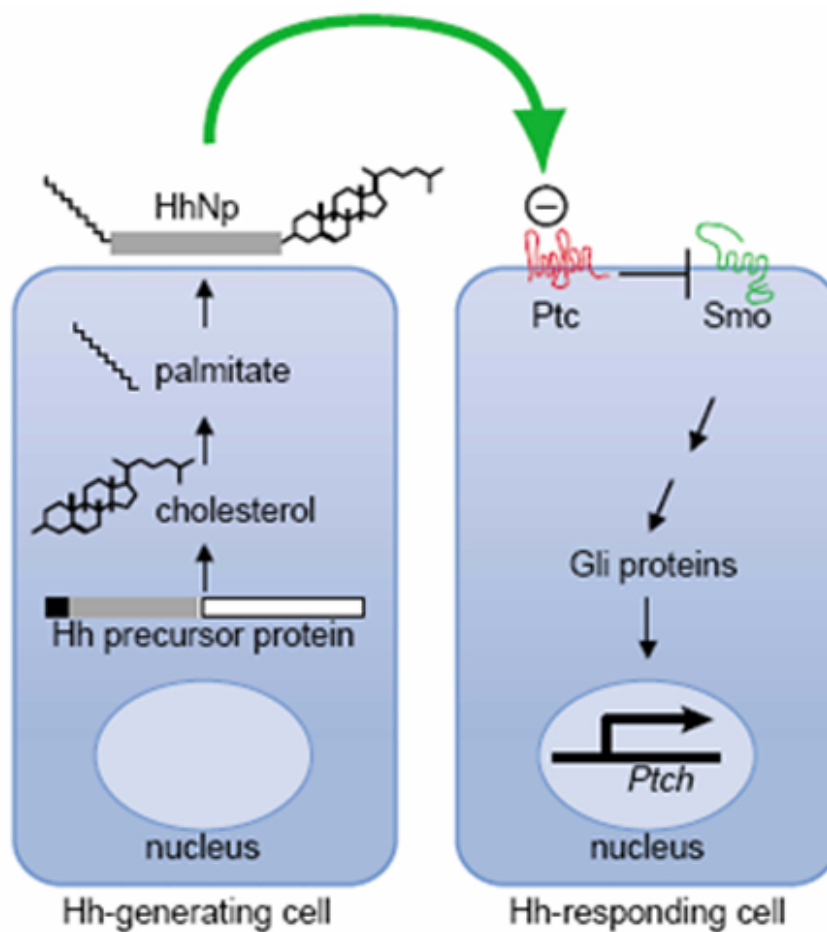


Fig.7. A via de Sonic Hedgehog

À esquerda tem-se uma célula secretora de Shh, mostrando as modificações pós-traducionais sofridas por essa proteína.

À direita, a ativação da via, dado pela ligação de Shh a Patched. Smo, livre da ação inibitória de Patched, ativa fatores de transcrição da família Gli, que levam a transcrição de genes alvo da via de Shh, tais como o próprio *Patched* e *Gli-1*. (Cooper et al, 2003).

1 e o próprio Patched, sugerindo um mecanismo de auto-regulação da via (Riobo & Manning, 2007).

O fragmento C-terminal de Shh é responsável por mediar o autoprocessamento do precursor, levando a uma modificação covalente do fragmento N-terminal pelo acréscimo de colesterol. Além dessa modificação, o fragmento N-terminal sofre ainda palmitoilização, que consiste num processo reversível de adição de palmitato a um resíduo de cisteína da proteína. Essas modificações parecem ser essenciais para a atividade de sinalização de Shh, pois aumentam a lipossolubilidade dessas proteínas, direcionando-as para os microdomínios de membrana (Jeong & McMahon, 2002; Linder & Deschenes, 2003, Mann & Beachy, 2004; Miura & Treisman, 2006).

De fato, já foi demonstrado que Patched está localizado em *rafts* lipídicas caveolares e que a depleção de colesterol mediada pelo tratamento com M β CD remove Caveolina e Patched dessas regiões da membrana (Karpen et al., 2001). Shh desempenha um papel crucial na padronização do tubo neural em desenvolvimento, regulando a polaridade do sistema nervoso central, a formação de neurônios motores, a padronização dorso-ventral dos somitos, a indução de estruturas ventrais do prosencéfalo, bem como a formação dos membros (Fan e Tessier-Lavigne, 1994; Chiang et al., 1996).

Em *Xenopus*, Shh começa a ser expresso na região do Centro Organizador e tardiamente é encontrado no assoalho da placa e nos somitos. Camundongos knockout para Shh apresentam defeitos no estabelecimento ou manutenção de estruturas da linha média, tais como notocorda e o assoalho da placa neural, onde Shh é expresso. Defeitos mais tardios incluem holoprosencefalia, acompanhada ou

não de ciclopia, ausência de extremidades distais dos membros, ausência de coluna vertebral e de células ventrais no tubo neural (Chiang et al., 1996). Trabalhos utilizando embriões de galinha demonstraram que o tratamento com M β CD reduz a sinalização por Shh, levando a defeitos crânio-faciais semelhantes àqueles provocados por inibidores da via de Shh (Cooper et al. 2003).

Uma vez que os microdomínios de membrana já foram relacionados com diversos eventos de sinalização celular, e que o colesterol é um constituinte essencial para a formação e organização dessas estruturas, pareceu-nos razoável imaginar que a depleção desse lipídio e a conseqüente desorganização desses microdomínios pudessem ter alguma implicação durante o desenvolvimento embrionário, período no qual diversas vias de sinalização agem simultaneamente e coordenadamente, num intrincado processo de ativação-inibição.

De fato, a injeção de M β CD na blastocela de embriões de *Xenopus* resultou em microcefalia em aproximadamente 100% dos embriões injetados (Fig. 8) (Almeida, 2006). Análise por hibridização *in situ* mostrou que M β CD aboliu ou reduziu drasticamente a expressão de marcadores anteriores como *Six-3* (olho), *Xag* (glândula de cimento) e *Otx2* (prosencefalo) (Fig.9). Esse fenótipo é de fato causado pela depleção de colesterol, pois a saturação prévia da droga com esse lipídio restringe a sua ação, revertendo o fenótipo provocado por M β CD e ainda restaurando o domínio de expressão de *Otx-2* (Fig. 10).

Estes resultados mostram que a depleção de colesterol é capaz de perturbar o desenvolvimento da região anterior, sugerindo uma correlação entre os microdomínios de membrana e as vias de sinalização necessárias para que ocorra a correta formação da cabeça.

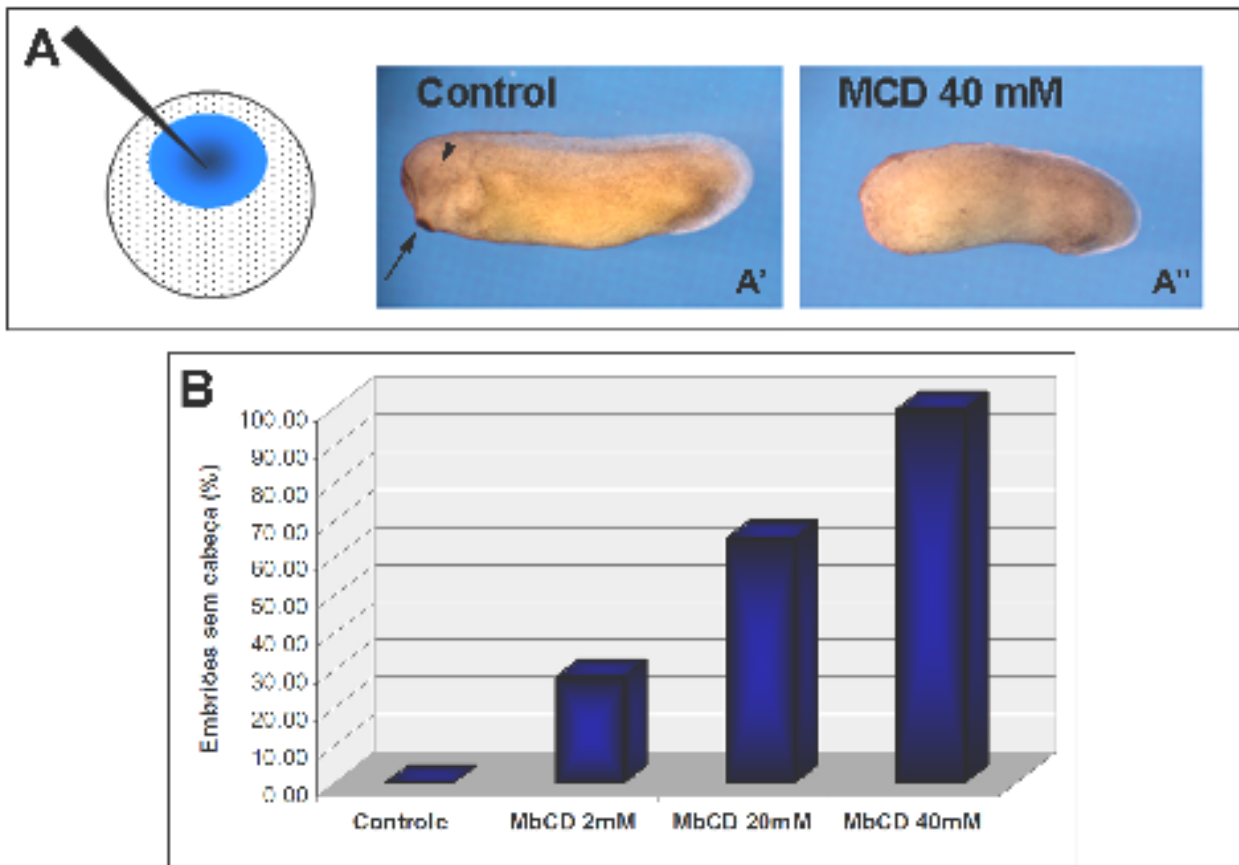


Fig. 8- A depleção de colesterol provoca o desenvolvimento de embriões sem cabeça.

A. Embriões de *Xenopus laevis* injetados com M β CD dentro da cavidade da blastocela. A': embriões injetados apenas com água. Glândula de cimento (seta) e vesículas ópticas (cabeça de seta).

A'': embriões injetados com M β CD desenvolvem um fenótipo específico, caracterizado pela ausência de cabeça, glândula de cimento e vesículas ópticas.

B. A curva dose-resposta: M β CD a 40 mM leva ao desenvolvimento de 100% de embriões microcefálicos. (Almeida, 2006)

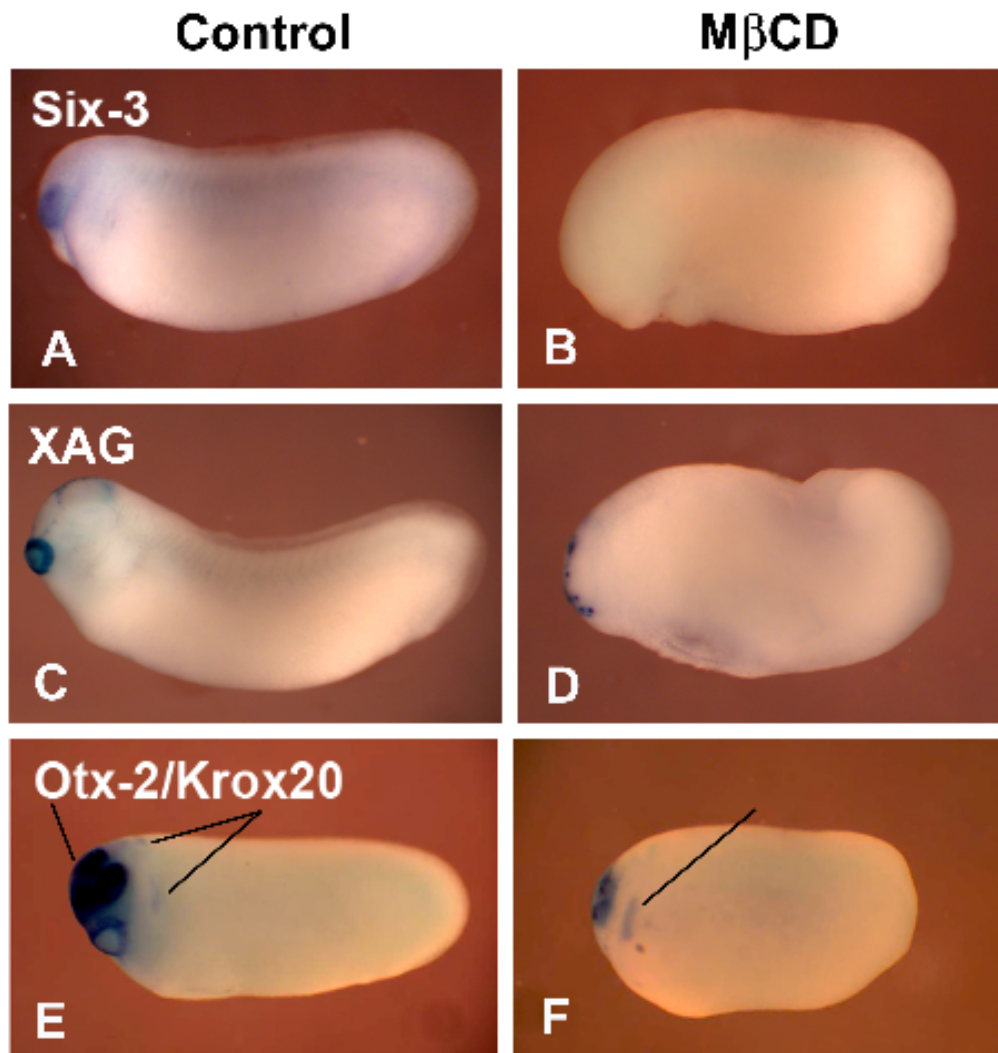


Fig.9- A depleção de colesterol provoca a redução na expressão de marcadores anteriores.

A-C-E: Hibridização *in situ* mostra o padrão de expressão de marcadores da região anterior em embriões controle, sendo A, *Six3* para o olho; C, *Xag-1* para a glândula de cimento; E: *Otx-2* para o prosencéfalo e mesencéfalo e *Krox-20* para os rombômeros 3 e 5 e primeiro arco branquial.

B-D-F: embriões injetados com M β CD: a depleção de colesterol compromete o desenvolvimento das estruturas mais anteriores do embrião, o que pode ser constatado pela grande redução na expressão de *Xag-1* e *Otx-2*, chegando até ao desaparecendo completo da marcação para *Six-3*. A marcação de *Krox-20*, no entanto, foi preservada. (Almeida, 2006)

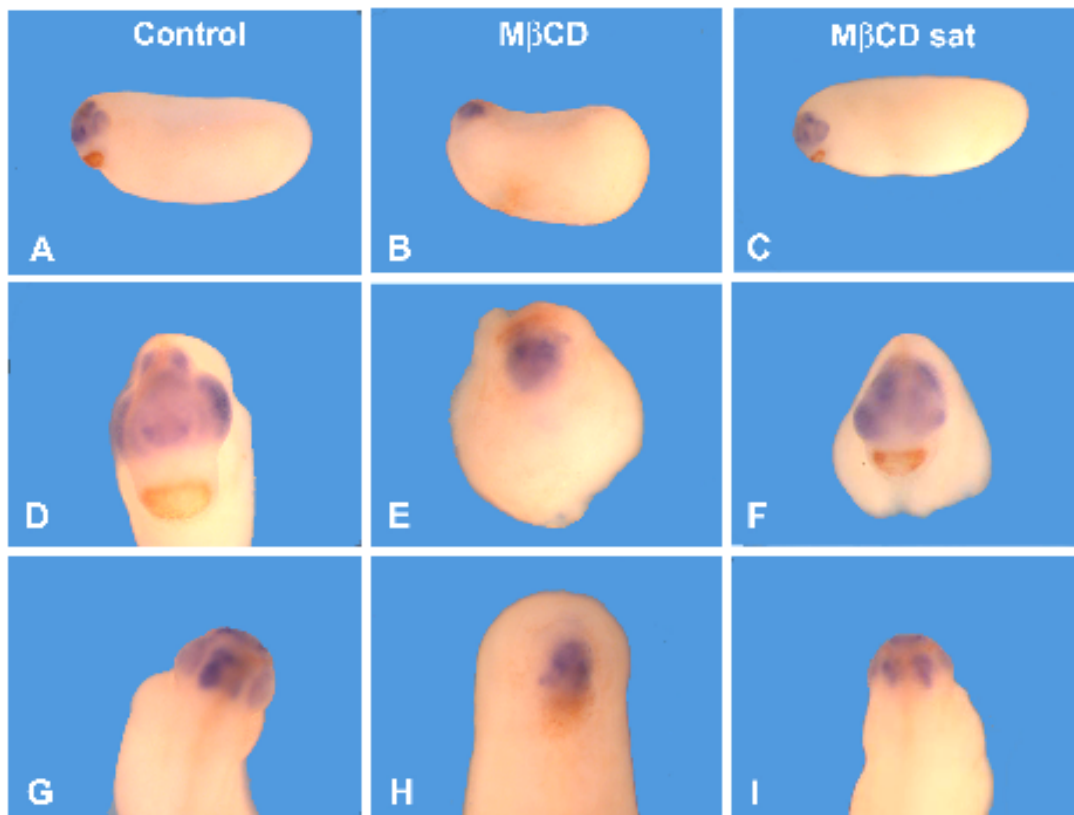


Fig. 10- M β CD complexado ao colesterol não afeta a expressão de Otx-2

A-D-G: hibridização *in situ* em embriões controle mostrando o padrão de expressão do marcador Otx-2 em visão sagital (A), frontal (D) e dorsal (G).

B-E-H: embriões injetados com M β CD 40 mM exibem uma severa redução na expressão de Otx-2, que pode ser visualizada em cortes sagital (B), frontal (E) e dorsal (H).

C-F-I: embriões injetados com a droga complexada ao colesterol exibem um padrão de expressão de Otx-2 bastante semelhante ao dos embriões controle, mostrando que a droga previamente saturada com colesterol apresenta menor capacidade de remover colesterol da membrana, gerando assim um fenótipo mais leve. (Almeida, 2006)

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos Gerais

Durante o estabelecimento do eixo antero-posterior (AP) a formação da cabeça depende de uma série de interações moleculares, nas quais fatores solúveis inibem a ação de moléculas ventralizantes e posteriorizantes sobre as células comprometidas com a formação da região anterior. Nesse contexto, a membrana plasmática exerce um papel fundamental na organização, interação e posicionamento de diversos componentes de diferentes vias de sinalização, tais como ligantes, receptores e co-receptores. O entendimento dessas interações contribuirá para elucidar os mecanismos que controlam o fino processo de comprometimento celular durante esse período. Dessa maneira, os objetivos e resultados desse trabalho serão divididos em três partes:

- **Parte I**, referente ao estudo dos mecanismos envolvidos na ativação da via de Wnt e de que forma os componentes Frizzeld, LRP6, Disheveled e Axina se relacionam durante esse processo.
- **Parte II**, referente à identificação de novos componentes envolvidos na formação do eixo AP, através da realização de um *screening* funcional em embriões de *Xenopus*.
- **Parte III**, referente ao entendimento dos mecanismos moleculares através dos quais microdomínios de membrana estabelecem uma interface com o desenvolvimento da região anterior em embriões de *Xenopus*.

▪ **Parte I: Mecanismos de ativação da via canônica de Wnt**

A via canônica de Wnt, dentre outras vias, desempenha um papel único durante o desenvolvimento embrionário, atuando em diferentes etapas e contribuindo para o estabelecimento e padronização dos eixos dorso-ventral (DV) e antero-posterior (AP). Se para o estabelecimento do eixo (DV) a via de Wnt precisa estar ativada, para a padronização do eixo AP isso deve variar conforme a região a ser formada. A sinalização por Wnt exerce uma ação posteriorizante, devendo ser inibida na região anterior para permitir a formação da cabeça e ativada na região posterior, para permitir a formação de estruturas truncais.

Muitos esforços têm sido empregados na busca do entendimento de como a via de Wnt é ativada, mas ainda não se sabe exatamente a maneira pela qual as proteínas Frizzeld (Fzl), LRP6, Disheveled (Dvl) e Axina, alguns dos elementos dessa via, interagem para ativá-la. Assim, faz-se necessário elucidar de que forma esses componentes se relacionam para gerar o mecanismo de ação que controla essa ativação.

Objetivo Específico

1- Investigar se Fzl, Dvl e Axina são necessários para o mecanismo de fosforilação de LRP6 e conseqüente ativação da via de Wnt. Se sim, determinar de que forma esses componentes interagem entre si e o papel de cada um nesse processo.

- **Parte II: A identificação de novos componentes envolvidos na formação do eixo AP**

A ação morfogênica durante a formação do eixo AP deve ser finamente regulada através do controle da expressão e disponibilidade de fatores para as células embrionárias. Diante disso, temos como objetivo identificar novos componentes envolvidos na formação do eixo AP através de um *screening* funcional de expressão de cDNA em embriões de *Xenopus*. Dada a já mencionada importância da via de Wnt durante a formação desse eixo, atenção particular será dada a genes que, quando superexpressos, aumentam ou suprimem a formação da cabeça do embrião de *Xenopus*, implicando-os com a via de sinalização canônica Wnt. Este *screening* funcional propiciará a descoberta de novas moléculas e a melhor compreensão sobre a regulação dessa via durante o desenvolvimento embrionário, particularmente no que se refere à padronização do eixo AP.

Objetivos específicos

- 1- Realização de *screening* funcional em busca de genes que promovam fenótipo na região anterior (cabeça aumentada ou diminuída).
- 2- Caracterizar o padrão de expressão desses genes ao longo do desenvolvimento embrionário, por RT-PCR e hibridização *in situ*.

3- Avaliar se os genes encontrados relacionam-se com a via de Wnt, baseando-se em 3 aspectos:

(a) se inibem a formação de duplo-eixo induzida por microinjeções ventrais do mRNA de Wnt8;

(b) se inibem a expressão de *Xnr-3* induzida por Wnt8 em explantes ectodérmicos;

(c) se a injeção do RNA mensageiro desse gene com Noggin (inibidor da via de BMP) é capaz de induzir a formação de um eixo secundário com cabeça, em *Xenopus*.

4- Identificar se existem seqüências homólogas a esse gene e, se presentes:

(a) caracterizar o seu padrão de expressão;

(b) determinar se agem da mesma forma que seu homólogo;

(c) caracterizar de que forma microinjeções desses genes afetam a expressão de marcadores anteriores (*Otx-2*, *Xag-1*, *En-2* e *Krox-20*).

▪ **Parte III- Os microdomínios de membrana e o comprometimento da região anterior**

Durante o trabalho de Mestrado demonstramos que os microdomínios de membrana são importantes durante o desenvolvimento embrionário de *Xenopus*. A depleção de colesterol desses microdomínios compromete a formação da região anterior, levando ao desenvolvimento de embriões microcefálicos. Todavia, ainda não é conhecido o mecanismo através do qual esse fenômeno acontece, bem como a via de sinalização que poderia ser afetada pela depleção de colesterol.

Uma das vias que possivelmente pode estar alterada durante a depleção de colesterol é a de Sonic Hedgehog (Shh), pois: (a) essa via é importante para o desenvolvimento da cabeça em vertebrados; (b) a organização de seus componentes depende de microdomínios de membrana; (c) a própria molécula de Shh depende de colesterol para a sua biossíntese e (d) alterações na via de Shh provocam fenótipos semelhantes aos obtidos com microinjeções de M β CD.

Assim, esta parte do trabalho terá como objetivo compreender de que maneira microdomínios de membrana relacionam-se com a formação da cabeça, numa análise que abordará tanto os aspectos bioquímicos, morfológicos e moleculares envolvidos neste processo.

Objetivos específicos

1- Investigar se a depleção de colesterol altera a organização de microdomínios de membrana. Para isso analisaremos o padrão de expressão de toxina da cólera (cholera toxin FITC), em corte de embriões de *Xenopus* no estágio de gástrula. A toxina da cólera se liga ao gangliosídeo GM1, presente em *rafts* lipídicas e considerado marcador dessas estruturas.

2- Isolar frações de *rafts* lipídicas de embriões de *Xenopus*, através da obtenção de extratos embrionários e preparação destes em gradiente de sacarose, seguido de ultra-centrifugação. Serão comparadas as frações obtidas de embriões no estágio de gástrula, injetados ou não com M β CD e realizaremos dosagem dos níveis de colesterol nessas frações.

4- Verificar através de Western blot a expressão da Caveolina-1 ao longo das frações de membrana obtidas com o gradiente de sacarose. Analisar se esse padrão é modificado em amostras provenientes de embriões injetados com M β CD.

5- Verificar através de hibridização *in situ* se o padrão de expressão de genes relacionados a via de Shh (*Shh* e *Ptc-2*) é afetado em embriões injetados com M β CD.

6- Verificar se a adição de M β CD em cultura de células 293T modula a via de Shh.

3- MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA VIA CANÔNICA DE WNT

Vários grupos de pesquisa dedicam-se ao estudo da via de Wnt, seja pelo seu contexto no desenvolvimento embrionário, seja pelo seu envolvimento em diversas doenças. Uma questão chave que continua sem resposta é o mecanismo pelo qual a via é ativada. Ainda não existe um modelo que explique de que forma as proteínas LRP6, Frizzled (Fzl) e Disheveled (Dvl) interagem para promover a estabilização de β -catenina. Embora já se tenha demonstrado que essa estabilização depende da fosforilação de LRP6 (Tamai et al, 2004), os passos que antecedem esse evento ainda são desconhecidos. Assim, decidimos investigar as relações funcionais estabelecidas por essas moléculas, com o intuito de se esclarecer de que maneira elas levam à ativação da via. Demonstramos que após a formação do complexo Fzl-Lrp6, induzida por Wnt, Fz recruta Dvl, que por sua vez recruta o complexo Axina-Gsk3, promovendo dessa forma a fosforilação de Lrp6. Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório do Dr. Xi He (*Harvard Medical School – Children’s Hospital Boston*) durante meu período de doutorado sanduíche e gerou a publicação abaixo descrita, na qual eu contribuí especificamente com a elaboração da figura 4.

Artigo 1: Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions.

Xin Zeng^{1,*}, He Huang^{1,*}, Keiko Tamai^{1,†}, Xinjun Zhang¹, Yuko Harada¹, Chika Yokota¹, [Karla Almeida](#)¹, Jianbo Wang², Brad Doble³, Jim Woodgett³, Anthony Wynshaw-Boris², Jen-Chieh Hsieh⁴ and Xi He^{1,‡}

Development 135, 367-75 – 2008.

4- A IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPONENTES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO EIXO AP

Os resultados dispostos no capítulo anterior demonstram que os elementos que compõem a via de Wnt relacionam-se de forma dinâmica, podendo inclusive exercer papéis de natureza oposta. A regulação desse balanço depende da ação de Fzl e Dvl e, fundamentalmente, da disponibilidade ou não de Wnt. O controle dessa disponibilidade pode ser realizado em diversos níveis e vários antagonistas da via já foram identificados. Como a regulação da via de Wnt é essencial durante o estabelecimento do eixo AP, particularmente no que se refere à formação da cabeça, decidimos realizar um *screening* funcional, buscando identificar novas moléculas atuantes nesse processo.

4.1- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1- Screening Funcional

O *screening* foi realizado em coleções de bibliotecas de cDNA de *Xenopus tropicalis*, estágio de gástrula, construídas no plasmídeo vetor de expressão pCS2+, que é um dos melhores vetores de expressão para *Xenopus*. Os cDNAs de *pools* individuais, cada um contendo 96 clones independentes, foram linearizados e transcritos *in vitro* utilizando a polimerase SP6 (*kit mMessage Machine*, Ambion). Para cada síntese de RNA, 8 tubos contendo 12 clones de cDNAs foram utilizados

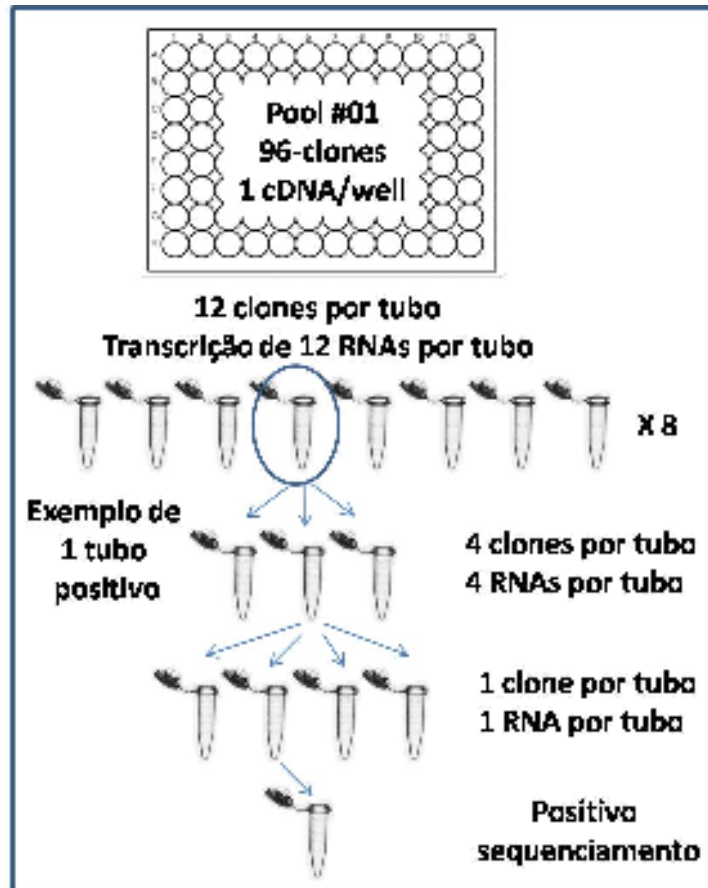


Fig.11- Metodologia do *screening* funcional

Uma placa de 96 poços foi subdividida primeiramente em 8 tubos, cada um contendo 12 clones diferentes. Esses clones foram transcritos e injetados nos embriões. O grupo que gerou um fenótipo tido como positivo foi separado e subdividido novamente em 3 tubos, cada um com 4 clones. Após as etapas de transcrição e microinjeção, o grupo que reproduziu o fenótipo inicial foi subdividido até que se tivesse um só clone, que foi então testado e seqüenciado.

como molde na primeira etapa (Fig.11). Os RNAs mensageiros resultantes foram injetados nos blastômeros dorsais de embriões no estágio de 4 células, numa dose de 10ng mRNA/embrião. A partir do estágio 22, os embriões foram analisados e ranqueados fenotipicamente considerando o tamanho da glândula de cemento e de estruturas cerebrais como o prosencéfalo. Esta análise permitiu a seleção de *pools* potencialmente positivos quando um desenvolvimento anormal da região anterior foi observado nos embriões. Os *pools* selecionados como positivos (por levar ao desenvolvimento de embriões com cabeça aumentada ou diminuída) foram subdivididos em 3 tubos de 4 clones independentes e cada um deles foi testado da mesma forma anterior, buscando a reprodução do fenótipo encontrado no *pool* inicial.

A cada vez que o pool inicial foi subdividido, menores as doses necessárias de mRNA para reproduzir o mesmo fenótipo, visto que a quantidade do clone verdadeiramente responsável pelo fenótipo tornava-se cada vez mais abundante. Quando alcançamos um único tubo contendo um clone individual que reproduziu o fenótipo inicial o cDNA foi então seqüenciado.

4.1.2- Manipulação de embriões, micro-injeções e dissecções

Os embriões de *Xenopus laevis* foram obtidos através de fertilização natural. Os animais foram estimulados com injeção de hormônio Gonadotrofina Coriônica, sendo a dose de 600 UI na fêmea e 200 UI no macho. O casal injetado permaneceu em solução de Steinberg 0,1x (1L Steinberg 10x: NaCl 580 mM, KCl 6.7 mM, CaNO₃-4H₂O 3.4 mM, MgSO₄-7H₂O 8.3 mM, Kanamicina 0.1 g, Tris 50 mM) durante toda a noite e, pela manhã, os embriões foram recolhidos com auxílio de pipetador

automático. Os embriões foram tratados com solução de cisteína a 4,5% e em seguida lavados em solução de Steinberg 0,1 X. A cultura foi feita em placas com agarose a 2% dissolvida em Steinberg 0,1X. Para as micro-injeções, foi utilizado o aparelho *IM300 Microinjector* (Narishige) juntamente com uma lupa *MZ125* (Leica). Foram injetados RNAs mensageiros (mRNA) confeccionados via reação de transcrição *in vitro*, utilizando a polimerase SP6 (*kit mMessage Machine*, Ambion). Após 2 horas de transcrição, esses RNAs foram tratados com Fenol-clorofórmio e precipitados.

As microinjeções de mRNA foram realizadas em embriões no estágio de 2 a 4 células, em Steinberg 1X. Para os experimentos de *screening*, foram injetados os blastômeros dorsais. Para os experimentos de dissecação de capuz animal, o mRNA de Wnt8 (sozinho ou com outro mRNA) foi injetado na porção mais apical dos blastômeros do pólo animal e para experimentos de indução de duplo eixo, o mRNA de Wnt8 ou Noggin, sozinhos ou juntamente com outro mRNA, foram injetados no lado ventral.

Também foi injetado o traçador de linhagem β -Gal nuclear, a uma concentração de 150 pg/embrião. Após fixação de 1 hora em MEMFA 1X (1 parte de MEM 10X: 1M Mops, 20mM EGTA, 10mM MgSO + 1 parte de formaldeído 37% + 8 partes de água), os embriões injetados foram reagidos com o substrato Red Gal (Research Organics), que desenvolve um precipitado vermelho insolúvel resultante da atividade de β -Galactosidase. Após cerca de 30 minutos os embriões foram re-fixados por 1 hora.

4.1.3- Hibridização *in situ*

Foram realizadas reações de hibridização *in situ* em embriões inteiros e seccionados, coletados em diferentes estágios do desenvolvimento. O protocolo está descrito na página <<http://www.hhmi.ucla.edu/derobertis/index.html>>, com as modificações propostas em Reversade & De Robertis, 2005. Os embriões foram fixados em MEMFA 1X por 02 horas e depois desidratados em metanol (25% - 50% - 75% - 100% - 100%), sendo de 6 minutos a duração de cada banho. Para a confecção das sondas de hibridização, os plasmídeos foram linearizados e submetidos a uma reação de transcrição que compreende a adição de 1µg de DNA linearizado, 2 µl do tampão de transcrição 10X, 2 µl de Labelling mix (Roche), 1 µl de RNA guard (Roche), 1 µl de RNA polimerase e água até 20 µl. A mistura foi encubada a 37° por 2 horas.

4.1.4- Reação da polimerase em cadeia a partir de um molde de cDNA (RT-PCR)

Embriões no estágio de 2 células foram injetados no pólo animal e cultivados até o estágio de blástula. No estágio 9, explantes de capuz animal de embriões injetados ou não foram dissecados e cultivados em Steinberg 1X, em placas de agarose 1,5% dissolvida em Steinberg 1X. Esses explantes foram cultivados até que seus correspondentes não dissecados atingissem o estágio 10. Nesse momento esses explantes foram lisados em Trizol[®] (Invitrogen) para a extração do RNA total (20 explantes para 500 µl do reagente). Para embriões inteiros, independente do estágio, utilizamos 03 embriões para cada 500 µl de Trizol. Após a extração

procedeu-se ao tratamento do RNA (2 µg) com DNase I durante 15 minutos, para a eliminação de possíveis traços de DNA genômico. A DNase I foi posteriormente inativada pelo tratamento com EDTA, a 65° C. Para a síntese de cDNA, 0.5 µl de Oligo DT (Invitrogen) foi adicionado a 5.5 ul da mistura anterior, que foi levada à 65° C por 3 minutos, para que ocorresse o anelamento do oligo-DT ao RNA. A transcrição reversa (RT) se deu pela adição de: tampão RT 5X (6µl), dNTP 25 mM (0.6µl), RNA guard (5µl), DTT (ditiotreitól, 0.1µl), enzima MMLV (1µl) e H₂O livre de nucleases (16 µl). As amostras foram incubadas a 42°C por 1 hora e 40 minutos. Para a amplificação das amostras de cDNA utilizamos os oligonucleotídeos de iniciação (“primers”): EF1 α (*Forward*: 5'-CCT GAA CCA CCC AGG CCA GAT TGG TG-3' e *reverse*: 5'-GAG GGT AGT CAG AGA AGC TCT CCA CG-3') e Xnr-3 (*Forward*: 5' -CGA GTG CAA GAA GGT GGA CA- 3' e *reverse*: 5'- ATC TTC ATG GGG ACA CAG GA- 3'). O PCR foi realizado de acordo com o seguinte protocolo: 5 µl de cDNA, 2 µl do tampão 10X, 0.6µl de MgCl₂ (50 mM), 0.18 µl de dNTP 25mM (0,2 mM), 4 µl de primer senso 25 µM, 4 µl de primer anti-senso 25 µM, 0.15 µl de Taq DNA Polymerase (Promega) e H₂O livre de nucleases num volume final de 20,0 µL. Após o término da amplificação, o produto foi analisado em gel de agarose 1.5%, com brometo de etídio.

4.2- RESULTADOS

Os experimentos descritos neste capítulo foram realizados no laboratório do Dr. Xi He (*Harvard Medical School – Children’s Hospital Boston*) durante meu período de doutorado sanduíche, como parte de uma cooperação estabelecida entre aquele laboratório e o Laboratório de Embriologia de Vertebrados.

4.2.1- M15: uma nova proteína transmembrana que anterioriza embriões de *Xenopus*

A realização do *screening* funcional, cujo objetivo era identificar novas moléculas envolvidas na formação do eixo AP, contou inicialmente com 40 *pools*. Todos foram devidamente investigados e, destes, apenas um foi selecionado como positivo por levar ao desenvolvimento de embriões anteriorizados quando super-expresso. O clone identificado como positivo foi chamado provisoriamente de M15, dada a sua posição na placa de *screening*. Em todos os experimentos de super-expressão foi utilizada a seqüência de M15 de *Xenopus tropicalis*, já que a biblioteca de cDNAs foi obtida de embriões dessa espécie. Microinjeções do RNA mensageiro (mRNA) de M15 nos blastômeros dorsais de embriões de *Xenopus laevis* provocaram o desenvolvimento de embriões anteriorizados, semelhantes ao fenótipo resultante da super-expressão de *Dkk-1*, um potente inibidor da via de Wnt (Glinka *et al.*, 1998). Observou-se um alargamento da região anterior, com aumento acentuado da glândula de cemento e entumescimento da região ventro-anterior, enquanto a região posterior desenvolveu-se encurtada (Fig.12 A-B). M15 foi enviado para seqüenciamento no *Molecular Genetics Core* <<http://dnacore.creationproject.com/>>,

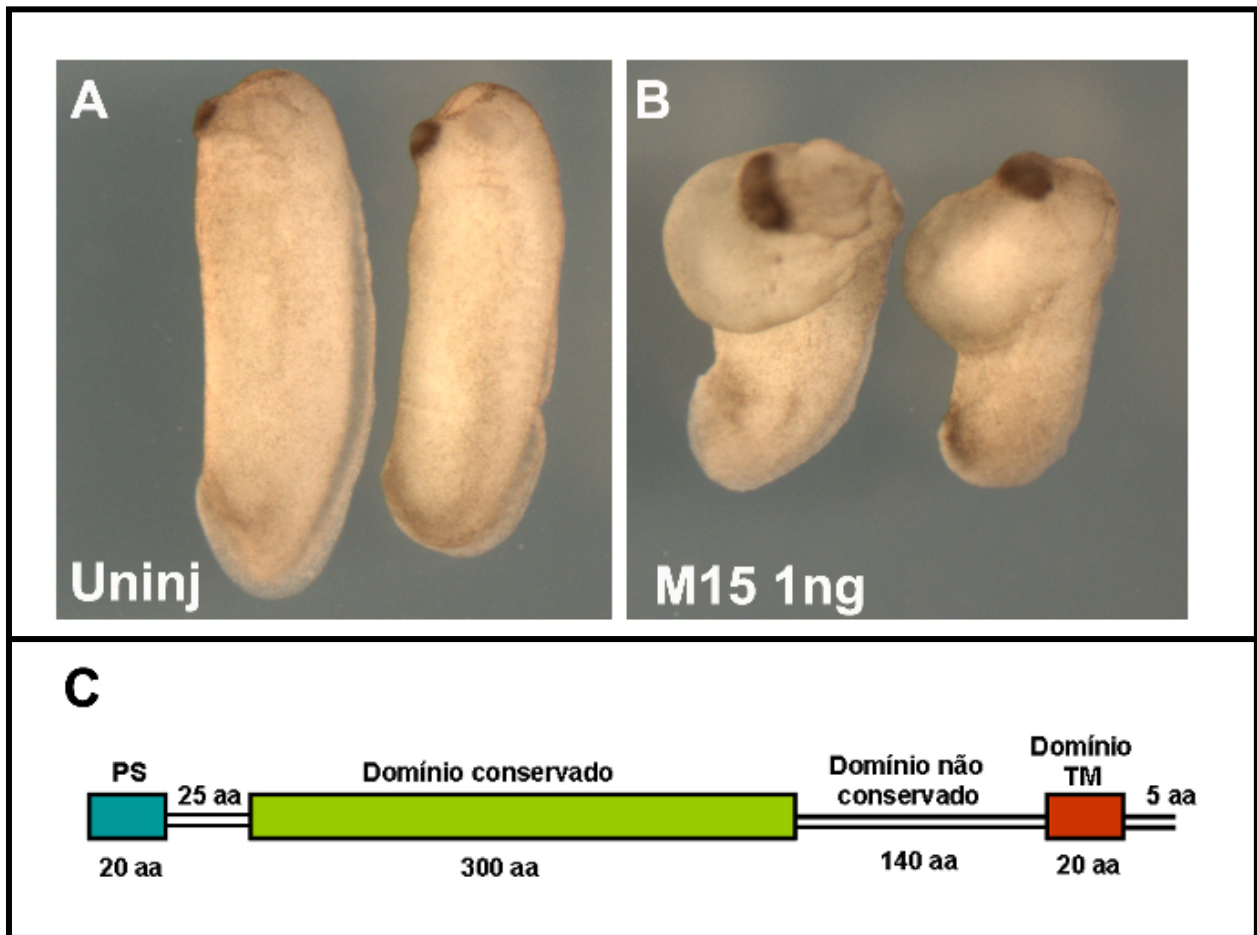


Fig.12- M15: uma nova proteína transmembrana que anterioriza embriões de *Xenopus*

A-B: Microinjeção animal de mRNA de M15 nos blastômeros dorsais leva ao desenvolvimento de embriões anteriorizados (compare B com embriões não injetados, em A), nos quais se observa alargamento da região anterior, com aumento da glândula de cimento e diminuição do tronco.

C: Esquema da estrutura protéica de M15. PS é o peptídeo sinal, composto de cerca de 20 aminoácidos, e seguido por uma seqüência de 25 aminoácidos. Em verde demonstra-se o domínio altamente conservado entre as espécies analisadas, composto de cerca de 300 aminoácidos. Entre este e o domínio transmembrana, em vermelho, está um domínio não conservado, composto de cerca de 140 aminoácidos. Na extremidade C-terminal, à direita, um pequeno número de resíduos citoplasmáticos.

no *Children's Hospital Boston*. A utilização do aplicativo *Sequencher 4.7* mostra que M15 codifica uma proteína de cerca de 500 aminoácidos. A análise da seqüência peptídica no servidor "DAS" - *Transmembrane Prediction* <<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>> sugere que a proteína apresenta um peptídeo sinal amino-terminal, conectado a uma região extracelular amino-terminal longa. Possui um único domínio transmembranar, composto por cerca de 20 aminoácidos hidrofóbicos, seguido de um curto domínio carboxi-terminal, citoplasmático (Fig.12 C). A análise nos bancos de dados *JGI Xenopus tropicalis* <<http://www.jgi.doe.gov/xenopus/>> e NCBI-blast <www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> demonstrou que M15 está presente em diversos outros vertebrados, tais como *Xenopus laevis*, homem, camundongo e peixe-zebra e também no invertebrado *Caenorhabditis elegans*. Comparando-se a seqüência nucleotídica de M15 em outras espécies observa-se que a seqüência de *Xenopus tropicalis* isolada nesse screening possui os seguintes percentuais de identidade quando comparada com as espécies: *Human sapiens* (58.8%); *Mus musculus* (60%); *Dario rerio* (57.6%) e *Caenorhabditis elegans* (38.9%). A maior parte da região extracelular é bastante conservada entre eles e a análise da seqüência de aminoácidos não revela a presença de nenhuma homologia entre domínios funcionais conhecidos, o que faz de M15 uma nova família de proteínas, com um possível papel durante a formação do eixo AP em vertebrados.

4.2.2-O RNA de M15 é expresso no Centro Organizador de Spemann

Com o objetivo de caracterizar o padrão de expressão de M15 no decorrer do desenvolvimento embrionário de *Xenopus laevis*, procedeu-se à realização de hibridização *in situ* em embriões íntegros (Fig 13). A sonda de hibridização utilizada

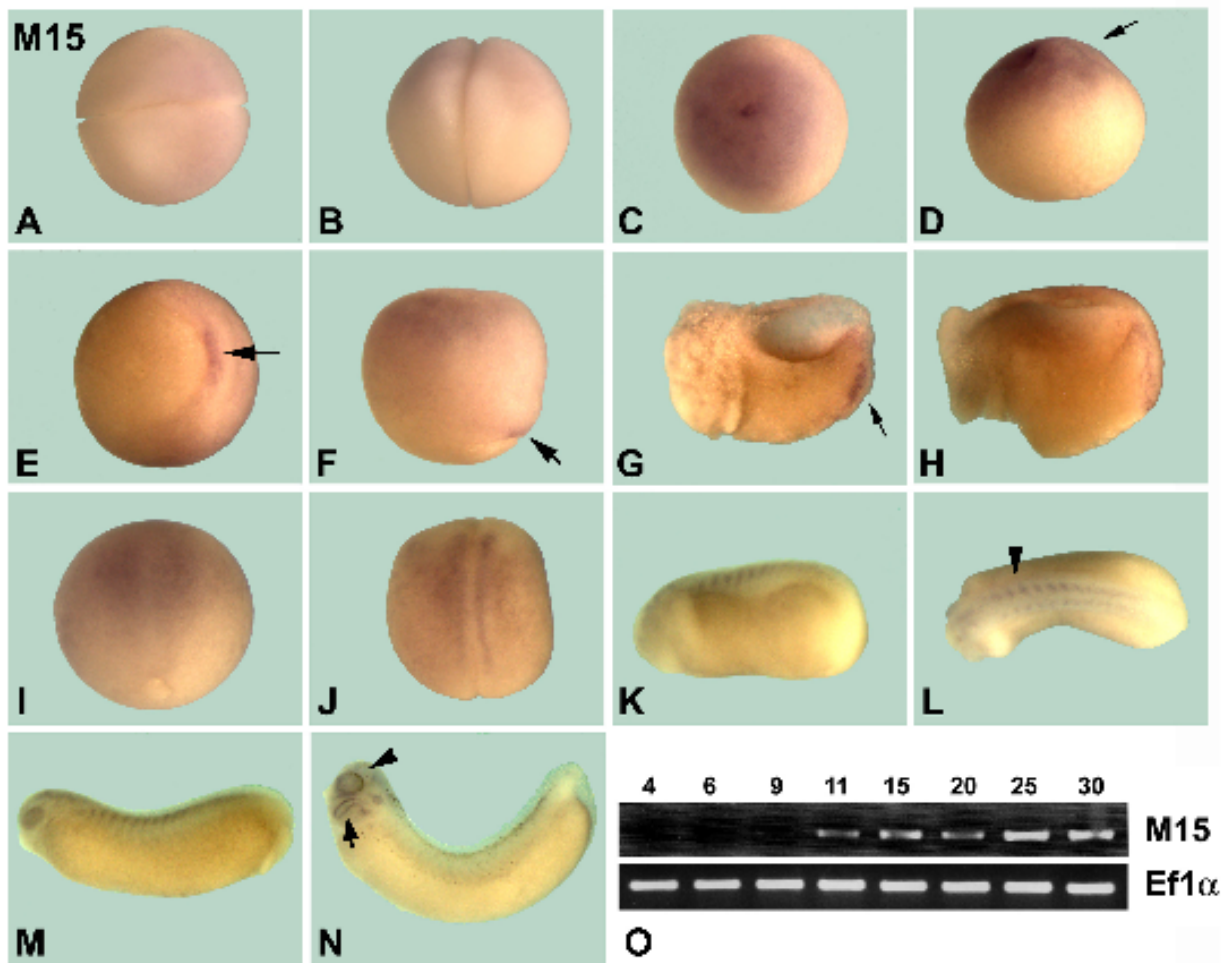


Fig. 13- M15 é expresso no Centro Organizador de Spemann

Padrão de expressão de M15 obtido via hibridização *in situ* (A-N) e RT-PCR (O).

A-B: embriões no estágio de 2 células não exibem expressão de M15.

C-D: embriões no estágio 8.5, mostrando expressão de M15 no pólo animal (seta).

E-F: no estágio 10, expressão de M15 no lábio dorsal do blastóporo (seta).

G-H: secção de embrião no estágio 10, mostrando expressão nas células do endomesoderma (seta)

I: embrião no estágio 12.5, exibindo expressão de M15 na região anterior da placa neural.

J: embrião no estágio 20, exibindo expressão de M15 na região antero-dorsal.

K-L: embriões nos estágios 23 e 26, respectivamente, exibindo marcação na região dos somitos (seta)

M: embrião no estágio 28, exibindo expressão de M15 nos somitos e vesículas ópticas.

N: observa-se no estágio 32 a expressão de M15 nos arcos branquiais (seta) e região dos olhos (cabeça de seta).

O: padrão de expressão de M15 obtido via RT-PCR mostra ausência de expressão de M15 até antes do estágio 9. A partir desse estágio, a expressão aumenta gradativamente. O *primer* EF1 α foi utilizado como controle.

foi confeccionada a partir da seqüência de *X. tropicalis*, pois a seqüência de *Xenopus laevis* não estava disponível. Observou-se que M15 não é um gene de expressão maternal, pois nenhuma marcação foi detectada em embriões de 02 células (Fig.13 A-B). Por outro lado, em embriões no estágio 8.5 a expressão do RNA de M15 foi detectada no pólo animal (Fig.13 C-D). No início da gastrulação (estágio 10) detectou-se a expressão de M15 na região do lábio dorsal do blastóporo (Fig.13 E-F) e, quando esses embriões foram seccionamos ao meio, passando pelo lábio dorsal, pôde-se observar que M15 é expresso na região do Centro Organizador de Spemann, nas células do endomesoderma (Fig.13 G-H). No estágio 12.5, notou-se uma marcação leve na porção anterior da placa neural em formação (Fig.13 I) e esse padrão se mantém em embriões no estágio 20, com leve expressão na região dorso-anterior do tubo neural (Fig.13 J). Nos estágios 23 e 26 (Fig.13 K e L, respectivamente) a expressão de M15 é mais evidente na região dos somitos, enquanto no estágio 28, além dos somitos, observa-se ainda expressão no campo das vesículas ópticas (Fig.13 M). No estágio 32 a expressão no campo ocular também foi observada, juntamente à detecção de marcação nos arcos branquiais (Fig.13 N).

A expressão de M15 também foi analisada através de RT-PCR, em embriões de *Xenopus laevis* em diferentes estágios de desenvolvimento. Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados utilizando a seqüência de *Xenopus laevis*. Confirmando os dados obtidos na hibridização *in situ*, também no RT-PCR pôde-se constatar que não há expressão do RNA de M15 antes da transcrição zigótica dos genes. Não se observa expressão no estágio de 4 células ou estágio 6 (Fig.13 O),

somente uma leve expressão que tem início no estágio 9 da blástula e que aumenta gradativamente até o estágio 30, aqui analisado.

Dessa forma, podemos concluir que M15, apesar de mostrar uma expressão tênue durante o desenvolvimento, é expresso no período de transcrição zigótica e num local que potencialmente sugere um papel na inibição da via de Wnt (Centro Organizador).

4.2.3- M15 bloqueia a formação de duplo-eixo induzida por Wnt8

Com o intuito de investigar se M15 atua na via de sinalização de Wnt, o mRNA de *Wnt8* foi injetado na zona marginal ventral de embriões de *Xenopus* no estágio de 8 células. Sabe-se que a super-expressão de Wnt nesse local, em períodos iniciais do desenvolvimento, leva à formação de duplo-eixo, por ativação da sinalização maternal de β -catenina. Dessa forma, embriões no estágio de 8 células foram injetados com Wnt8 (Fig.14) nos 2 blastômeros ventrais, na zona marginal, nas concentrações de 5 ou 10pg ou co-injetados com M15, à concentração de 1ng. M15 também foi injetado de forma separada (sem Wnt8), para investigar se sua expressão ectópica no lado ventral é capaz de induzir a formação de eixo secundário. Os resultados mostram que M15 por si só não induz a formação de duplo eixo (n=40), sugerindo que este gene não atua na ativação da via de Wnt, pelo menos não de forma plena (Fig.14 B e G). Observou-se que a micro-injeção de 5pg de Wnt induz a formação de eixo secundário em 88.5% dos embriões (n=40), enquanto que a co-injeção com M15 reduz esse percentual para 5.5% (n=40) (Fig.14 C-D e G).

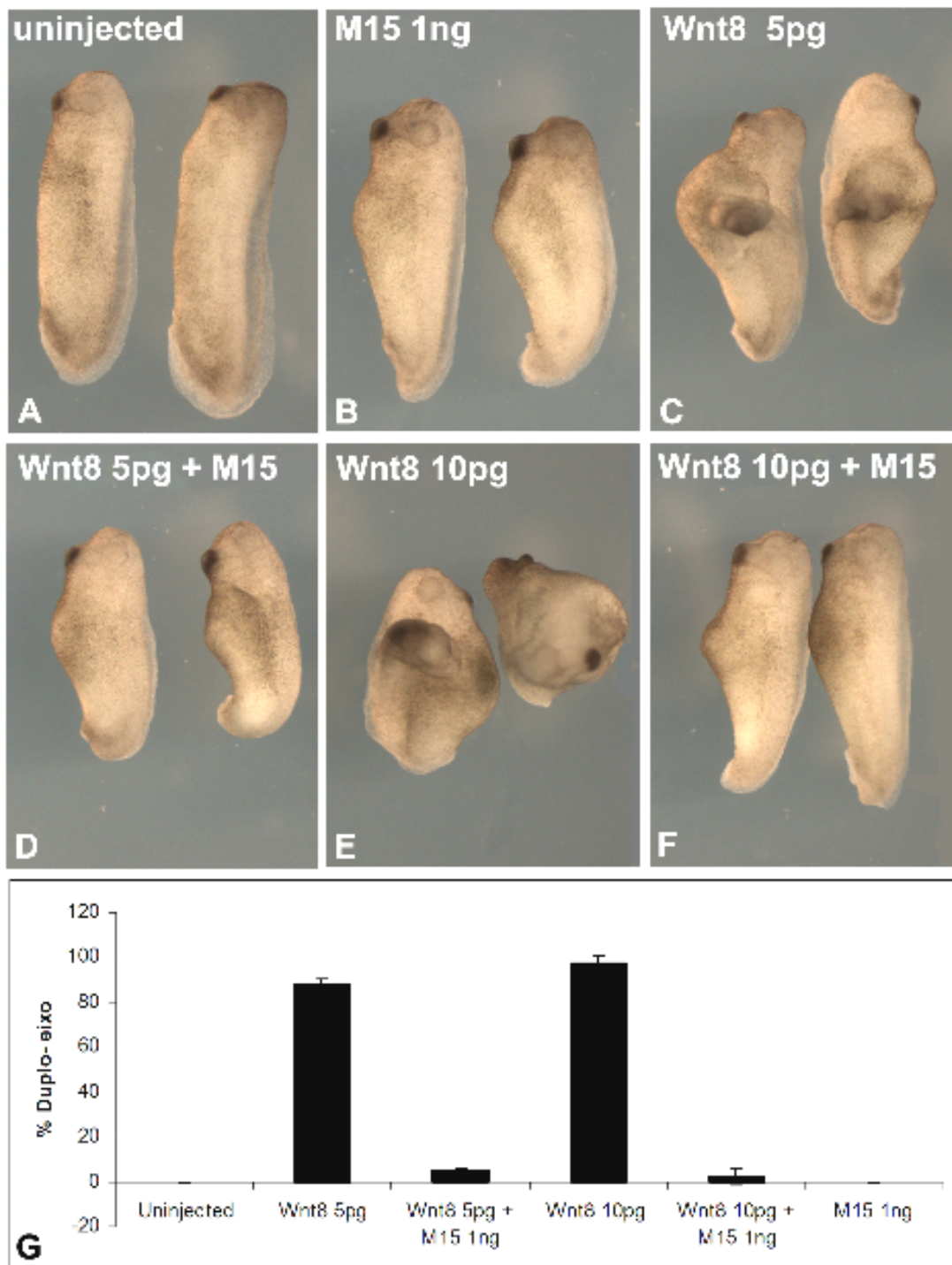


Fig.14- M15 bloqueia a formação de duplo-eixo induzida por Wnt

A: embriões não-injetados, com eixo único. B: a injeção de M15 nos 2 blastômeros ventrais (na zona marginal) de embriões no estágio de 8 células não provoca formação de duplo-eixo. C-D, G: a micro-injeção de 5pg de Wnt no lado ventral induz a formação de eixo secundário (88.5%, n=20) (C e G), enquanto que a co-injeção com M15 inibe essa indução (5.5%, n=20), (D e G). E-F: a micro-injeção de 10pg de Wnt8 induz a formação de eixo secundário em 97.5% dos embriões (n=20, E e G) e a co-injeção com M15 reduz esse percentual para 2.5% (n=20, F e G).

Wnt8 a 10 pg induz a formação de eixo secundário em 97.5% dos embriões (n=20) e a co-injeção com M15 reduz esse percentual para 2.5% (n=40) (Fig.14 E-G). Esses resultados sugerem fortemente que M15 age bloqueando a via de Wnt.

4.2.4 – M15 associado à inibição de BMP leva ao desenvolvimento da cabeça.

Sabe-se que a micro-injeção de inibidores de BMP na zona marginal ventral do embrião de *Xenopus* leva à formação de um tronco secundário, sem cabeça (Graff et al, 1994; Sasai et al 1994). Todavia, a inibição conjunta das proteínas BMPs e Wnt8, expressas no lado ventral, é capaz de gerar um duplo-eixo completo, pois a formação da cabeça depende dessa dupla inibição. Com o intuito de verificar se M15 age de fato inibindo a via de Wnt, decidiu-se co-injetá-lo com Noggin, um inibidor de BMPs (Fig. 15).

Os resultados mostraram que a injeção de 100pg de Noggin nos dois blastômeros ventrais, na zona marginal de um embrião no estágio de 8 células levou ao desenvolvimento de embriões com um eixo secundário. e sem cabeça em 90% dos casos (n=25) (Fig.15 B). Todavia, a co-injeção de 1ng de M15 com a mesma dose de Noggin gera embriões cujo eixo secundário exibe a formação da cabeça (94%, n=23) (Fig.15 C). Esses resultados, aliados aos descritos na figura 14, permitem-nos afirmar que M15 age bloqueando a via de Wnt.

4.2.5- M15L é homólogo de M15 e também anterioriza embriões de *Xenopus*

Análises do genoma de *Xenopus tropicalis* (JGI *Xenopus tropicalis*) e de banco de dados de ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags* - <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>> mostraram que M15 possui um gene

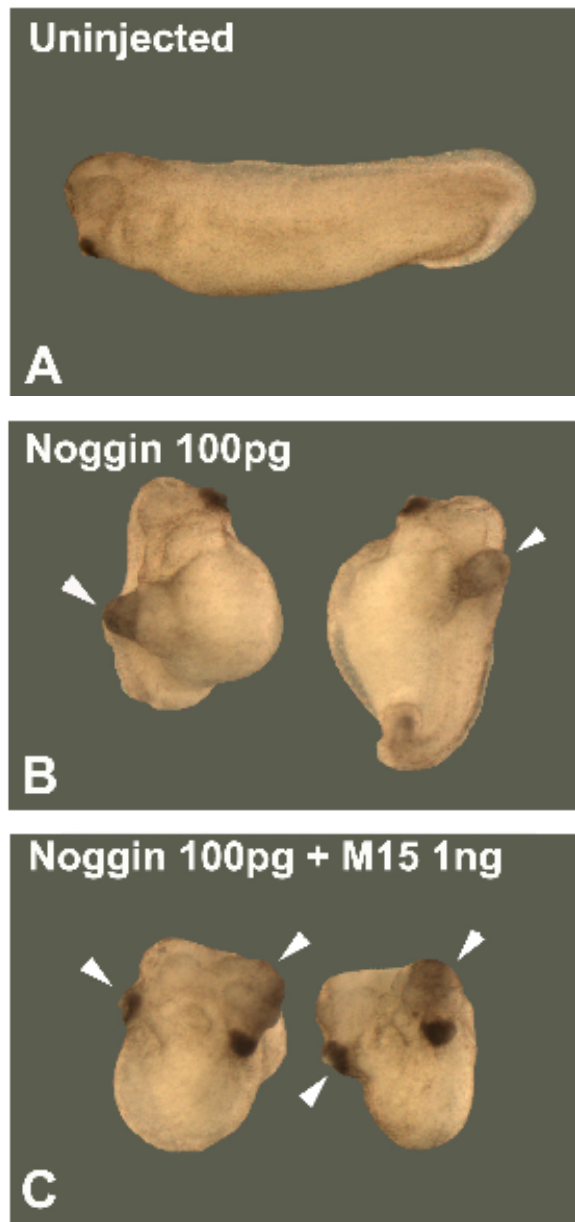


Fig. 15. M15 associado à inibição de BMP leva ao desenvolvimento da cabeça.

A: embrião não injetado, estágio 29.

B: embrião injetado com 100pg de Noggin nos dois blastômeros ventrais, na zona marginal de um embrião no estágio de 8 células, desenvolve-se com eixo secundário, sem cabeça (cabeças de seta).

C: A co-injeção ventral de Noggin com 1ng de M15 leva ao desenvolvimento de embriões com 2 cabeças (cabeça de seta).

homólogo, que foi dado o nome provisório de M15L (de *M15-Like*). Sabe-se que esse variante está presente em *X. tropicalis* e *laevis*, humanos e peixe-zebra. Ainda não conseguimos clonar a sequência completa de M15L de *X. tropicalis* ou *laevis*, mas a sequência parcial de *X. tropicalis* que temos disponível tem um percentual de similaridade de 60% com a sequência de M15 isolada do screening (*X. tropicalis*). Essa sequência parcial codifica uma proteína com as mesmas características peculiares à família M15: presença de um peptídeo sinal e um domínio amino-terminal extracelular conservado entre essas diferentes espécies. O ortólogo de M15L em humanos já tem a sequência completa e apresenta um percentual de identidade de 63% comparada à sequência de M15 de *X. tropicalis*. Dado o grau de semelhança e por estar completa, essa sequência de humanos será utilizada nos experimentos de super-expressão de M15L.

Com o objetivo de investigar se M15L é capaz de anteriorizar embriões de *Xenopus*, como o faz M15, o mRNA de M15L (sequência humana) foi injetado nos 2 blastômeros dorsais de embriões de 2 a 4 células e permitiu-se que estes se desenvolvessem até o estágio 32. M15L foi injetado em 3 diferentes concentrações: 0.6, 1.0 e 1.6ng (Fig.16 B-D) e os embriões foram comparados àqueles não injetados (Fig.16 A). Observa-se que em todas elas o fenótipo obtido foi semelhante ao induzido por injeções de M15. Os embriões desenvolveram-se anteriorizados, com glândula de cimento aumentada e o característico entumescimento na região ventro-anterior (Fig.16 B-D). Dessa forma, esses resultados mostram que injeções dorsais de M15L, no pólo animal, anteriorizam embriões de *Xenopus*, tal como M15, sugerindo que estes genes possam vir a desempenhar o mesmo papel durante o desenvolvimento embrionário, particularmente no que tange à formação do eixo AP.

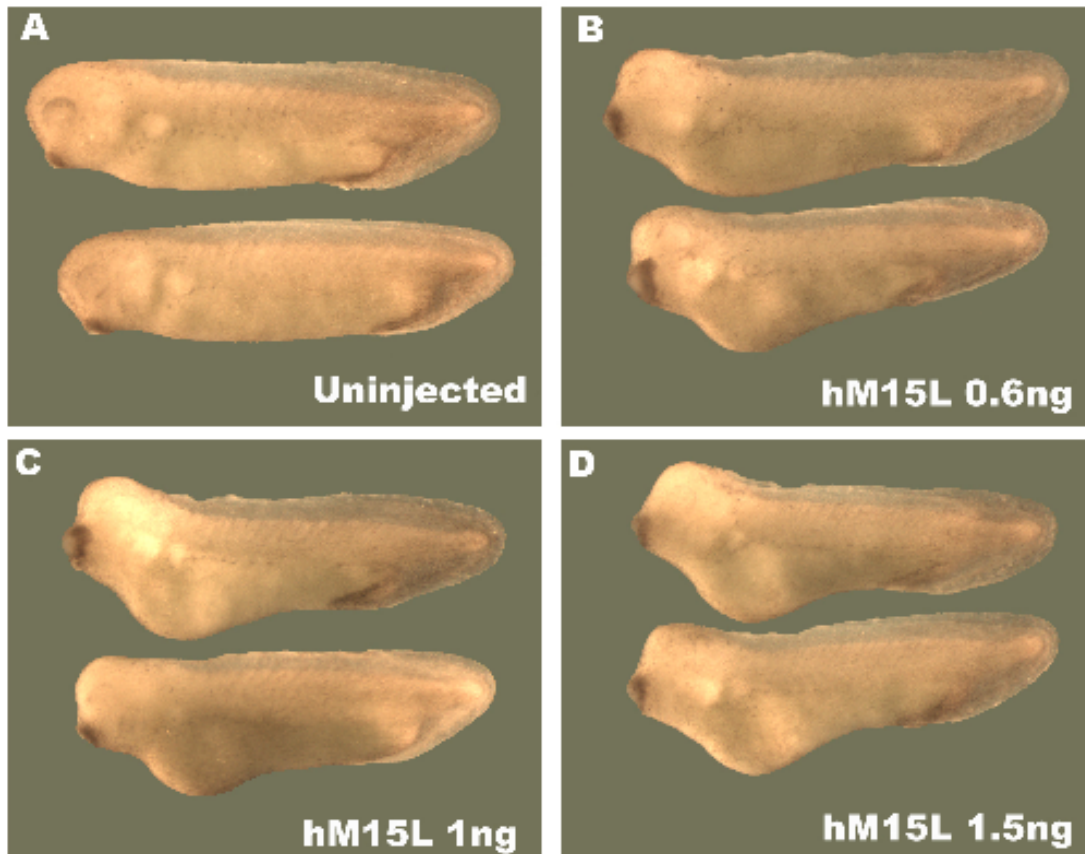


Fig.16- M15L é homólogo de M15 e também anterioriza embriões de *Xenopus*

A: embriões não injetados.

B-D: embriões injetados no estágio de 04 células, no pólo animal dos 02 blastômeros dorsais, com 0.6 a 1.5ng de HsM15L mostram fenótipo anteriorizado, caracterizado por aumento na glândula de cimento e protrusão na região anterior ventral.

4.2.6- O padrão de expressão de M15L

Para determinar se M15L está expresso nas mesmas regiões onde M15 está, procedeu-se à avaliação temporal do padrão de expressão de M15L, através de hibridização *in situ* e RT-PCR (Fig.17). Tal como M15, M15L não é detectado em embriões de 4 células (dado não mostrado), sugerindo que esse gene é de expressão zigótica. Por outro lado, não se detectou expressão de M15L nos estágios de blástula ou gástrula (estágio 10, Fig.17 A), bem como durante diferentes estágios de nêurula (dados não mostrados).

M15L apresenta-se expresso inicialmente em embriões de estágio mais adiantado do desenvolvimento (estágio 27, Fig.17.B-C). Observa-se uma expressão na região ventro-anterior, na região de mesoderma pré-cardíaco. No estágio 30 essa expressão é aumentada e mostra-se mais restrita à região da base dos arcos branquiais. Além disso, pode-se observar expressão de M15L na região dorsal da cabeça (Fig.17 D-E) que, quando dissecada, revela a presença de M15L no assoalho do tubo neural (Fig.17 J). Em estágios mais adiantados a expressão de M15L fica mais evidente na região dos somitos e também na região basal dos arcos branquiais (Fig.17 F-I). A análise por RT-PCR, também demonstra que M15L não está expresso em embriões de 4 células (Fig.17 K). Todavia, percebe-se que, diferentemente do resultado obtido via *in situ*, a expressão de M15L pode ser percebida bem antes, já em embriões no estágio 9, o que se assemelha aos resultados obtidos para M15. Para confirmar se M15L é expresso no lado dorsal, embriões no estágio 10 foram seccionados em porções animal, vegetal, dorsal e ventral, mantendo-se alguns inteiros para controle (Fig.17 L). Percebe-se que M15L é de fato expresso no

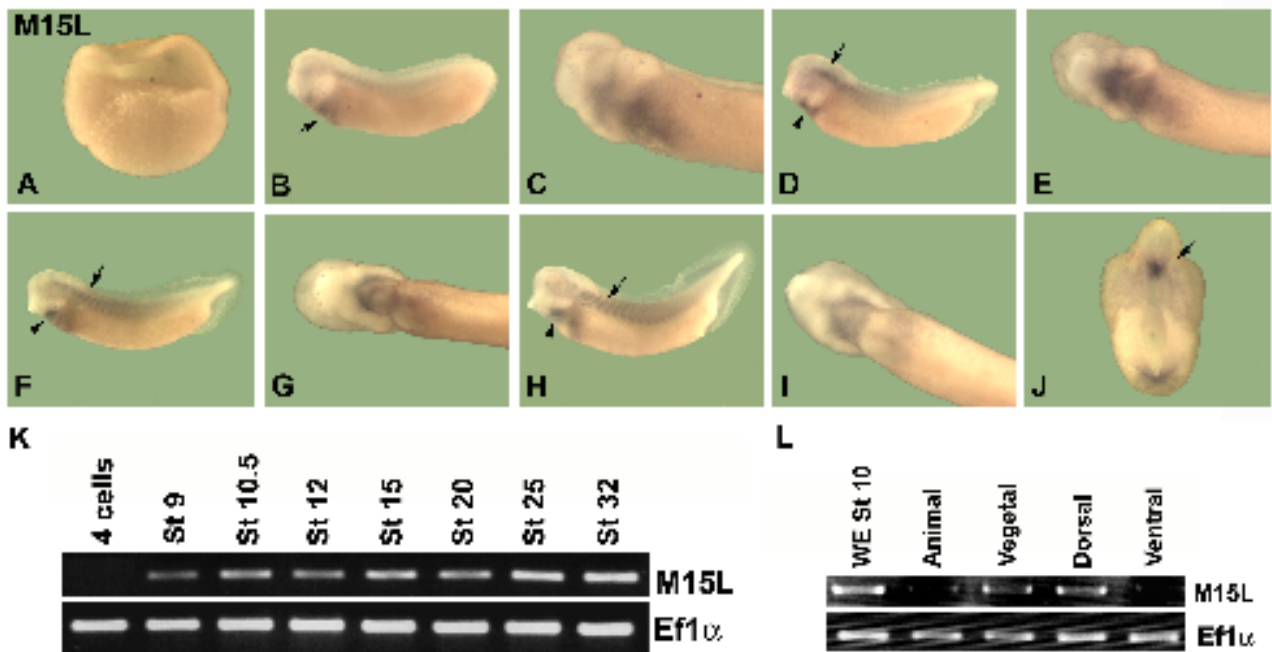


Fig.17- O padrão de expressão de M15L

Padrão de expressão de M15L obtido via hibridização *in situ* (A-J) e RT-PCR (K-L).

A: embrião no estágio 10, no qual não se vê expressão de M15L.

B: No estágio 27, observa-se expressão de M15L na região antero-ventral (seta)

C: mesmo embrião mostrado em B, só que sob uma visão ventral.

D: No estágio 30, M15L continua sendo expresso na região antero-ventral e agora também na porção basal dos arcos branquiais (cabeça de seta) e na cabeça (seta) E mostra o mesmo embrião da figura D, só que do ponto de vista ventral.

F-I: No estágio 32 (F-G) e 35 (H-I) M15L é expresso de forma mais evidente nos somitos e nos arcos branquiais.

J: corte transversal do embrião representado em D e E, no qual se observa nitidamente a expressão de M15L no assoalho do tubo neural.

K: RT-PCR mostra ausência de mRNA de M15L em embriões de 4 células, mas que este está presente já no estágio 9, aumentando gradativamente até o estágio 32.

L: RT-PCR de embriões no estágio 10, inteiros (coluna 1) ou dissecados nas porções animal, vegetal, dorsal e ventral. M15 está presente em embriões inteiros nesse estágio e enriquecido nas porções dorsal e vegetal. O *primer* EF1 α foi utilizado como controle.

embrião inteiro no estágio 10 e tem expressão enriquecida no lado dorsal e vegetal desses embriões.

4.2.7- M15L age como M15 na inibição da via de sinalização de Wnt.

Com o objetivo de investigar se M15L desempenha o mesmo papel de M15 no que tange à inibição da via de Wnt, repetiu-se o experimento de indução de duplo eixo mediada por Wnt8. Assim, o mRNA de Wnt8 foi injetado nos dois blastômeros ventrais, na zona marginal de um embrião no estágio de 8 e observou-se que a micro-injeção de 5pg induz a formação de eixo secundário em 92.5% dos embriões (n=40) (Fig.18 B e G). Como controle negativo foi realizada a co-injeção de Wnt8 com LDLR (receptor de LDL, trata-se de uma proteína transmembrana que sabidamente não está relacionada com a indução ou inibição da via de Wnt). Essa co-injeção, como era de se esperar, não inibiu a formação de duplo-eixo induzida por Wnt8 (95% dos embriões, n=40) (Fig.18 C e G). Como controle positivo utilizou-se a co-injeção de Wnt8 com o próprio M15, o que reduziu o percentual de duplo-eixo para 6% (n=40) (Fig.18 D e G). Também foi testada a atividade de HsM15 (*Homo sapiens*) e constatou-se que este age da mesma forma que XtM15 (*Xenopus tropicalis*), reduzindo para 2.5% o percentual de eixo secundário induzido por Wnt8 (Fig.18 E,G). Por fim testou-se a atividade de HsM15L e pôde-se observar que sua co-injeção com Wnt8 reduz para 2.5% a formação de eixo secundário (n=40) (Fig.18 F,G).

Numa outra abordagem, investigou-se a capacidade de M15 e M15L de bloquear a expressão de *Xnr-3* induzida pela injeção de Wnt8. Dessa forma, Wnt8. foi injetado na porção apical de embriões de *Xenopus* no estágio de 2 a 4 células.

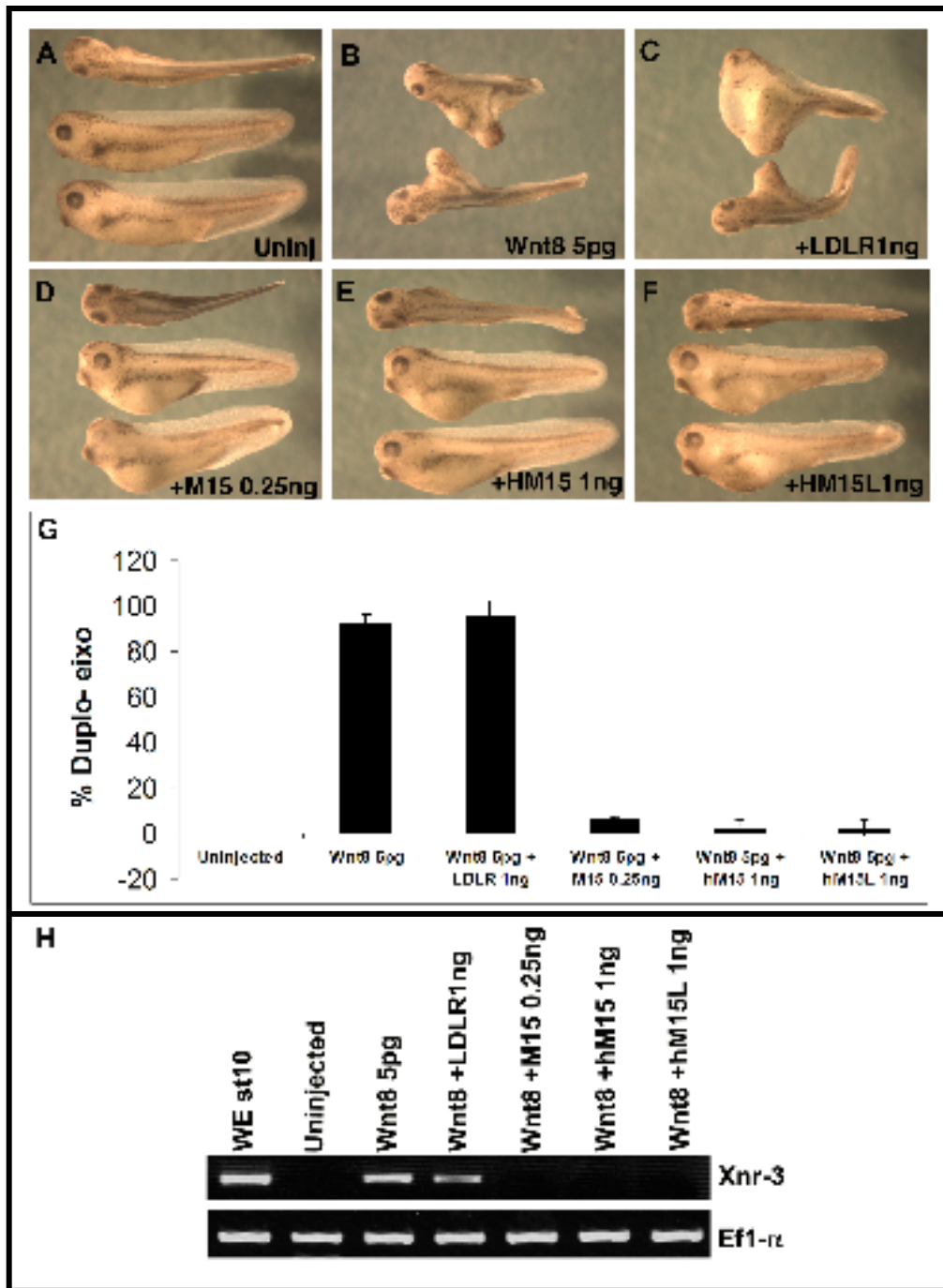


Fig.18- M15L age como M15 na inibição da via de sinalização de Wnt.

A: embriões não-injetados, com eixo único. B,C e G: a micro-injeção marginal de 5pg de Wnt8 nos 2 blastômeros ventrais de embriões no estágio 8 induz a formação de eixo secundário (B) em 92.5% dos embriões. (C) Essa indução não é reduzida pela co-injeção de LDLR, sendo de 95% o percentual de indução. D: a co-injeção de Wnt8 com apenas 0.25ng de M15 inibe a formação de duplo-eixo (D), originando apenas 6% de embriões com esse fenótipo (G). E-F: a co-injeção de Wnt8 e HsM15 (1ng, E) ou HSM15L (1ng, F), também inibe a formação de duplo-eixo, reduzindo o percentual para 2.5%, nas 02 co-injeções (G). H: Embriões do estágio 10 expressam Xnr-3 (coluna 1), o que não se vê em explantes ectodérmicos de embriões não injetados com Wnt8 (coluna 2). XtM15, HsM15 e HsM15L (colunas 5, 6 e 7, respectivamente) bloqueiam a expressão de Xnr-3 induzida por Wnt-8 (colunas 3), mas LDLR não (coluna 4). Ef1- α foi utilizado como controle.

Quando estes atingiram o estágio 9 da blástula, os explantes de capuz animal foram dissecados, cultivados até que embriões correspondentes não dissecados atingissem o estágio 10 e processados para RT-PCR. Pôde-se observar que embriões inteiros no estágio 10 expressam *Xnr-3* (Fig.18 K, colunas 1). Os explantes de embriões não injetados não expressam *Xnr-3* (Fig.18 K, coluna 2), já aqueles cujos embriões foram injetados com Wnt8 ou Wnt8 e LDLR juntos, o expressam (Fig.18 K, colunas 3 e 4). De forma bastante intensa, a microinjeção de M15, HsM15 ou HsM15L junto com Wnt8 inibe completamente a expressão de *Xnr-3* induzida por este último (Fig.18 K, colunas 5-7).

Estes resultados mostram que M15L possui a mesma habilidade de M15 na inibição da via de Wnt, seja na inibição da formação de duplo eixo, seja na inibição da expressão de *Xnr-3*. Mostram ainda que a função inibitória de M15 é conservada entre as espécies aqui utilizadas, embasando o uso de HsM15L em experimentos de super-expressão.

4.2.8- Baixas doses de M15L são suficientes para inibir a via de Wnt

A super-expressão de fatores solúveis geralmente requer uma dose menor de mRNA para exercer sua atividade, haja vista o próprio Wnt, que com até menos de 5pg é capaz de promover a formação de duplo eixo, quando injetado ventralmente. Com o intuito de determinar qual a dose mínima na qual M15L é capaz de bloquear a via de Wnt, M15L foi injetado em diferentes concentrações no experimento de duplo-eixo. O mRNA de Wnt8 foi injetado nos 02 blastômeros ventrais de embriões no estágio de 8 células, na zona marginal e observou-se que a micro-injeção de 5pg

induz a formação de eixo secundário em 94% dos embriões (n=40) (Fig.19 B e I). A co-injeção de Wnt8 com LDLR não inibiu a formação de duplo-eixo induzida por Wnt8 (97.5% dos embriões, n=40) (Fig.19 C e I). A co-injeção de Wnt8 com M15L a 0.1ng reduziu o percentual de duplo-eixo para 10.5% (n=40) (Fig.19 D e I). Doses pouco maiores que essa inibiram fortemente a via de Wnt, sendo o percentual de duplo-eixo igual a 3.5% (n=40) quando M15 foi injetado a 0.2 ng (Fig.19 E e I); 2% (n=40) quando injetado a 0.35 ng (Fig.19 F e I); 1,5% (n=40) quando injetado a 0.5ng (Fig.19 G e I) e 1% (n=40) quando injetado a 1ng (Fig.19 H e I).

A análise por RT-PCR mostra que a expressão de Xnr-3 está ausente em explantes ectodérmicos cujos embriões não foram injetados com Wnt8 (Fig. 19 J, coluna 1). A injeção de 5pg desse mRNA, todavia, foi capaz de induzir essa expressão (Fig. 19 J, coluna 2), a qual não foi inibida pela co-injeção de LDLR (Fig. 19 J, coluna 3). A expressão de Xnr-3 induzida por Wnt8 em explantes ectodérmicos foi fortemente reduzida mesmo quando M15L foi injetado à baixa dose de 0.1ng (Fig. 19 J, coluna 4). Às doses mencionadas acima (0.2, 0.35, 0.5 e 1ng), M15L bloqueia completamente a expressão de Xnr-3 nesses explantes (Fig. 19 J, colunas 5-8, respectivamente). Esses resultados demonstram que M15L apresenta uma forte atividade inibitória sobre a via de Wnt, sendo esses efeitos já visíveis à 100pg, uma dose considerada relativamente baixa para uma proteína transmembrana.

4.2.9- M15L associado à inibição de BMP também leva ao desenvolvimento da cabeça.

Mostrou-se anteriormente que *M15* coopera com injeções de *Noggin* para levar à formação da cabeça, sendo *Noggin* responsável por inibir BMPs e M15

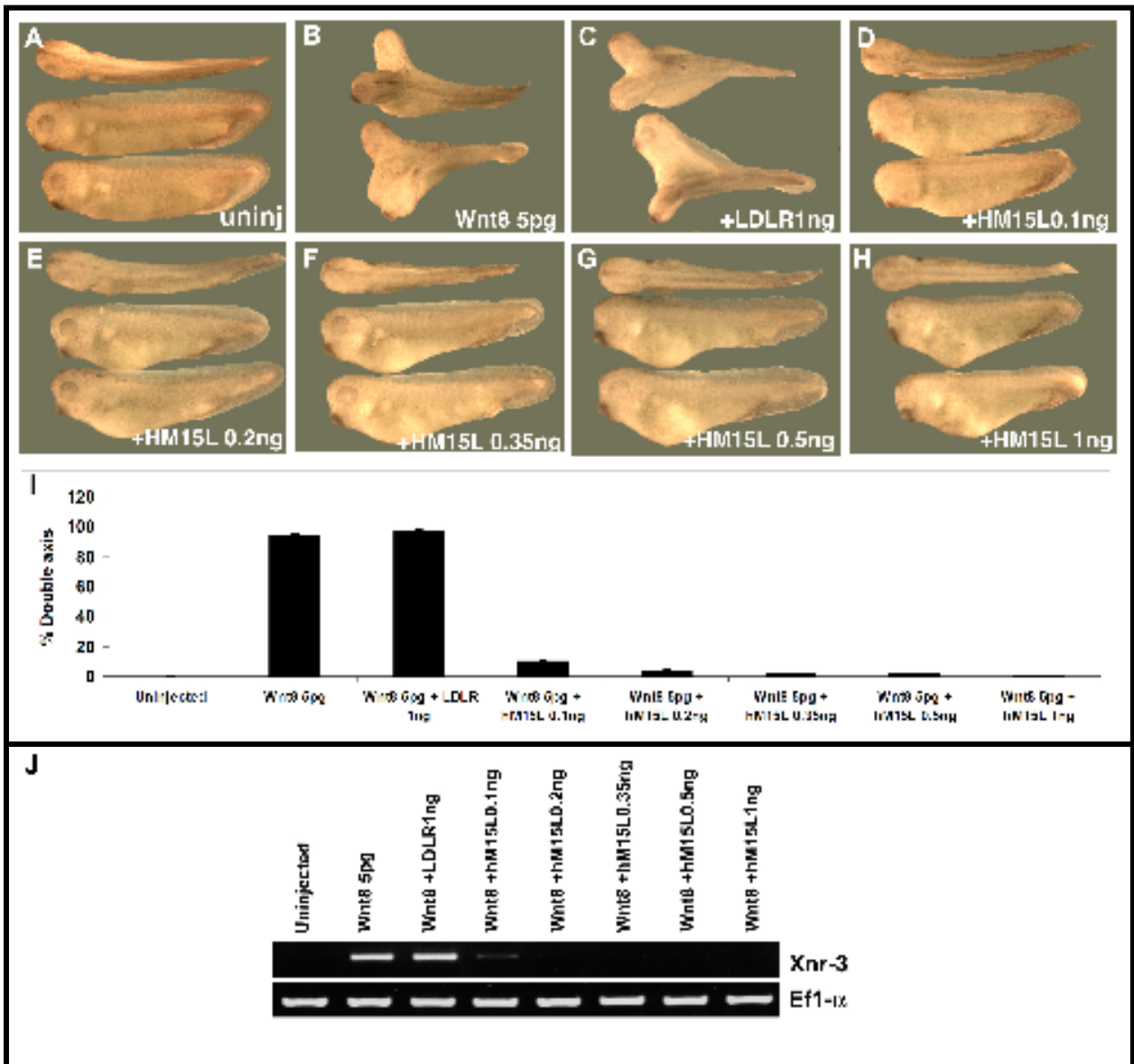


Fig.19- Baixas doses de M15L são suficientes para inibir a via de Wnt

A: embriões não-injetados, no estágio 32, com eixo único.

B,C e I: a micro-injeção de 5pg de Wnt8 nos blastômeros ventrais de embriões no estágio de 8 células induz a formação de eixo secundário (B) em 94% dos embriões (I) e essa indução não é reduzida pela co-injeção de LDLR (C), sendo de 97.5% o percentual de indução (I).

D: a co-injeção de Wnt8 com apenas 0.1ng de M15L inibe a formação de duplo-eixo (D), originando apenas 10.5% de embriões com esse fenótipo (I).

E-H: a co-injeção de Wnt8 e M15L a 0.2, 0.35, 0.5 e 1ng (E,F,G,H, respectivamente) inibe fortemente a formação de duplo-eixo, reduzindo o percentual para 3.5, 2.0, 1.5 e 1.0%, respectivamente (I).

J: em explantes ectodérmicos de embriões não injetados com Wnt8 não há expressão de Xnr-3 (coluna 1). A injeção de Wnt8 promove essa expressão (coluna 2), a qual não é inibida pela co-injeção de LDLR (coluna 3). M15L a 0.1ng reduz drasticamente a expressão de Xnr-3 (coluna 4), e doses maiores que essa (0.2, 0.35, 0.5 e 1.0ng – colunas 5, 6,7 e 8, respectivamente) bloqueiam completamente a expressão de Xnr-3. Ef1-α foi utilizado como controle.

responsável por inibir Wnts. Com o intuito de verificar se *M15L* é capaz de reproduzir os resultados acima descritos, esse experimento foi repetido e os embriões foram analisados no estágio 37. Novamente a injeção de 100pg de *Noggin* no lado ventral levou ao desenvolvimento de embriões com um eixo secundário e sem cabeça (93% dos casos, n=25) (Fig.20 B). A co-injeção de 1ng de *M15L* com a mesma dose de *Noggin* gera embriões cujo eixo secundário exibe a formação da cabeça (90%, n=25) (Fig.20 C). Esses resultados demonstram que *M15L* exibe a mesma atividade de inibição da via de Wnt mostrada por *M15*. Esse experimento em especial mostra a importância de *M15* e *M15L* para a formação do eixo AP, mais precisamente para que se dê a formação da cabeça.

4.2.10- *M15L* aumenta a expressão de marcadores da região anterior

Uma vez que a super-expressão de *M15* e *M15L* leva ao desenvolvimento de embriões anteriorizados (Fig. 12 e 16) resolvemos avaliar se a expressão de marcadores da região anterior também é afetada por essas micro-injeções. *M15L* a 1ng foi injetado no pólo animal de embriões de *Xenopus* no estágio de 4 células, sendo que apenas 01 dos blastômeros dorsais foi injetado. Junto a *M15L* foi também co-injetado mRNA de β -Gal para que se pudesse identificar o lado injetado. O desenvolvimento desses embriões foi interrompido no estágio 20 ou 22 e após a reação de coloração com o substrato Red Gal (*Research Organics*) os embriões foram re-fixados e submetidos ao protocolo de hibridização *in situ*. A micro-injeção de *M15L* não afetou a expressão de *Engrailed-2* (*En-2*) (Fig. 21, A,D,G e H, compare o lado injetado, em vermelho, com o lado oposto, não injetado). Todavia, o domínio

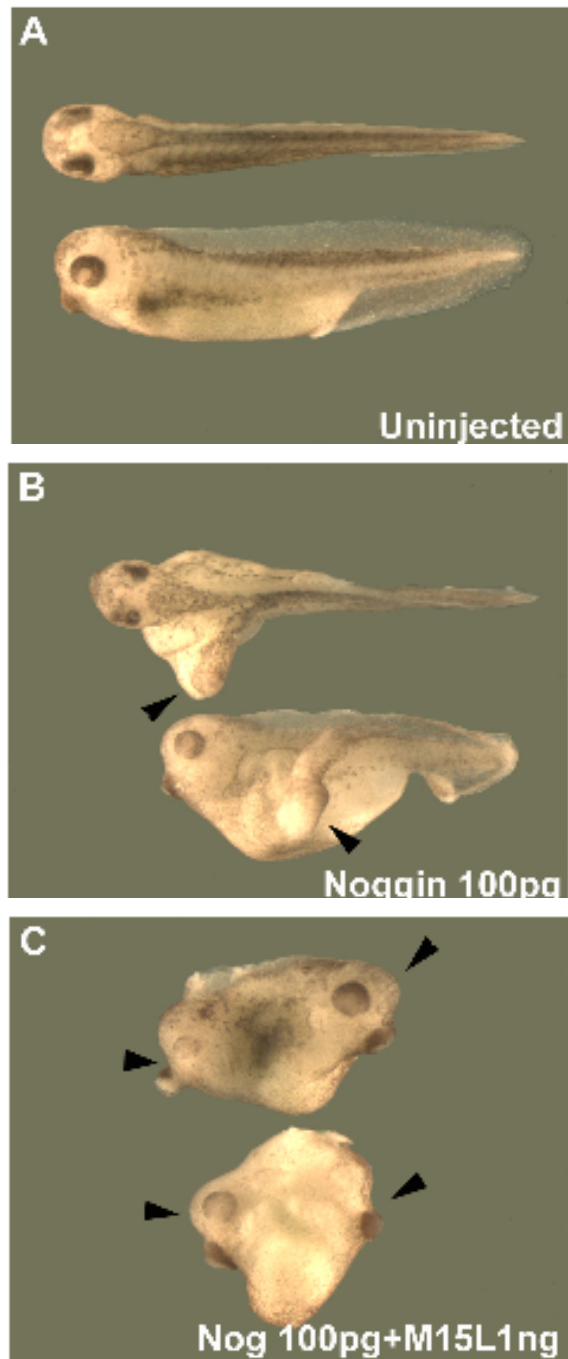


Fig.20 - M15L associado à inibição de BMP também leva ao desenvolvimento da cabeça.

A: embrião não injetado, estágio 37.

B: embrião no estágio de 8 células injetado com 100pg de Noggin nos blastômeros ventrais desenvolve-se com eixo secundário, sem cabeça (cabeças de seta).

C: A co-injeção ventral de Noggin com 1ng de M15L leva ao desenvolvimento de embriões com 2 cabeças (cabeça de seta).

de expressão de *Xag-1* foi aumentado e pôde-se observar o aparecimento de pontos de expressão ectópica (Fig.21 A, B, D, E, G, H).

O marcador prosencefálico *Otx-2* também foi analisado (Fig.21 C, F I), mas apenas uma discreta expansão pode ser detectada (Fig.21 F). A expressão de *Krox-20*, o mais posterior dentre os marcadores aqui mencionados, também foi analisada. Observou-se que a sua expressão foi deslocada ou reduzida por ocasião da micro-injeção de M15L (Fig.21 C, F, I). Assim, pode-se dizer que a super-expressão de M15L afeta a expressão de alguns marcadores anteriores, especialmente *Xag-1* e *Otx-2*, e desloca ou reduz levemente a expressão de *Krox-20*.

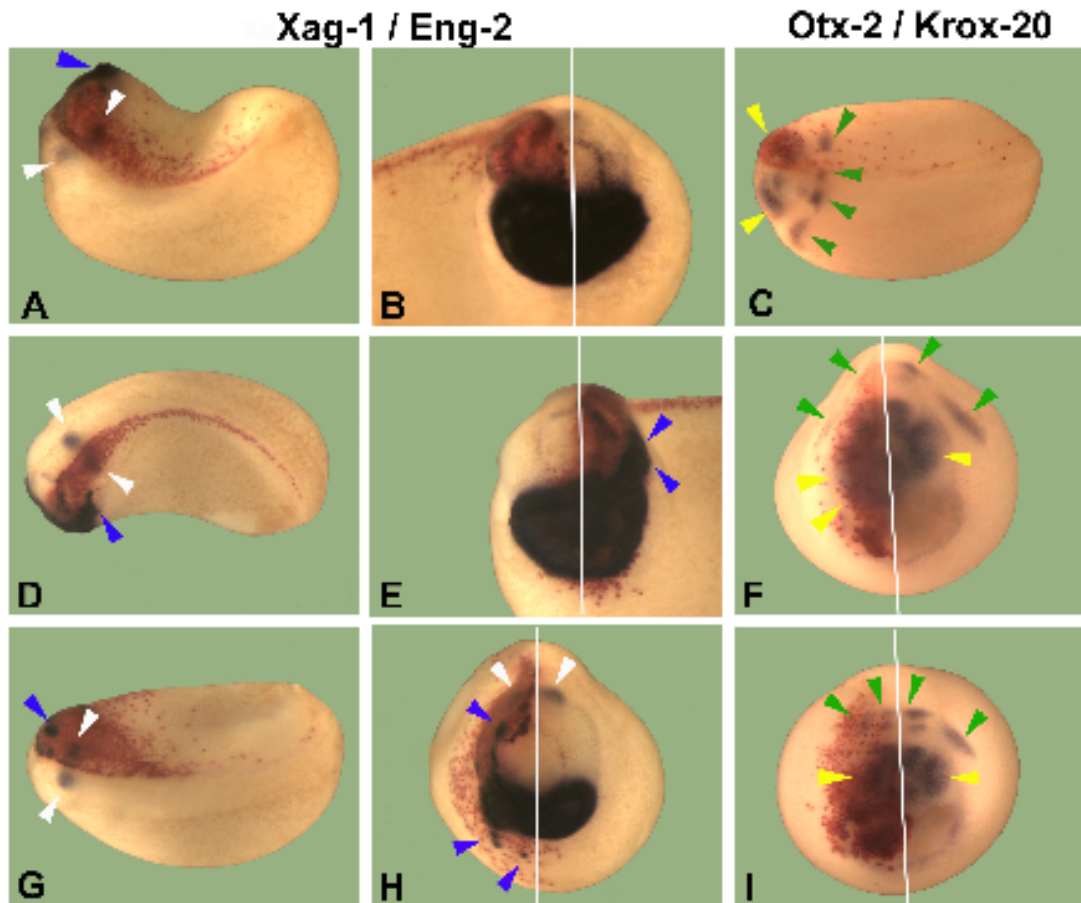


Fig.21- M15L aumenta a expressão de marcadores da região anterior

A, D, G: vista dorsal de embriões injetados com M15L no lado marcado em vermelho e processados para *in situ* dos marcadores *Xag-1* e *En-2*. A expressão de *En-2* não parece afetada (cabeça de seta branca) no lado injetado, mas a expressão de *Xag-1* foi aumentada e induzida ectopicamente (cabeça de seta azul, ver também em B, E e H, visão frontal). C: vista dorsal de embrião injetado e processado para *in situ* dos marcadores *Otx-2* e *Krox-20*: observe redução na expressão de *Krox-20* (setas verdes) na região do arco branquial. F e I: Visão frontal: observa-se aumento da expressão de *Otx-2* em F, setas amarelas. Em I, observa-se novamente redução na expressão de *Krox-20* na região do arco branquial.

5- OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA E O COMPROMETIMENTO DA REGIÃO ANTERIOR

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma série de interações celulares e moleculares, que ocorrem de forma ordenada e extremamente organizada. Nesse contexto, as membranas celulares e as proteínas associadas às membranas desempenham papel fundamental na captura e transdução de diferentes sinais. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado os microdomínios de membrana ricos em colesterol como plataformas preferenciais de diversos eventos de sinalização. Resultados obtidos durante meu mestrado demonstraram que a depleção de colesterol produzida por M β CD afeta a formação das estruturas anteriores de embriões de *Xenopus*. Dando prosseguimento a esses achados, descobrimos que M β CD reduz os níveis de colesterol desses microdomínios e altera o padrão de expressão de marcadores dessas regiões. Demonstramos ainda que o fenótipo de microcefalia produzido pela depleção de colesterol é na verdade decorrente da inibição da via de Sonic Hedgehog (Shh), cujo complexo receptor reside em microdomínios de membrana. Esses dados em conjunto geraram o artigo descrito abaixo, que foi submetido ao *Developmental Biology* em 29/06/2008.

Artigo 2: A novel role for Cholesterol-Rich Microdomains during embryonic patterning in *Xenopus* ¹Karla L. Almeida, ¹Alice H. Reis, ¹Debora M. Cerqueira, ¹Diego P. Aguiar, ¹Mariana P. Louza, ¹Fabio A. Mendes, ¹Leonardo R. Andrade, ²Marcelo Einicker-Lamas, ³Georgia C. Atella and ¹José G. Abreu.

O protocolo de utilização de embriões de Xenopus laevis aprovado pelo Comitê de Ética da UFRJ é o DAHEICB 014

6- DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho dedicou-se ao entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que norteiam o processo de estabelecimento do eixo antero-posterior (AP), enfatizando a formação da cabeça. Dada a importância da via de sinalização de Wnt nesse contexto, preocupamo-nos primeiramente em investigar de que forma componentes dessa via interagem entre si para ativá-la. Demonstramos que o complexo Axina-GSK3, previamente conhecido por sua atuação inibitória da via de Wnt, desempenha também um papel na ativação, através da fosforilação dos domínios intracelulares de LRP6.

No intuito de se buscar outros componentes atuantes nesse mecanismo, realizamos um *screening* funcional, que resultou na identificação de um novo gene, chamado *a priori* de M15. Esse gene é expresso no Centro Organizador de Spemann e codifica uma proteína transmembrana com ação inibitória sobre a via de Wnt.

Por fim, demos continuidade à investigação de dados gerados durante o mestrado, que apontam papel relevante para os microdomínios de membrana durante o desenvolvimento embrionário. Estes resultados mostraram que desorganização dos microdomínios de membrana através da depleção de colesterol da membrana plasmática leva ao desenvolvimento de embriões microcefálicos ou mesmo com ausência de cabeça. Descobrimos agora que a desorganização desses microdomínios afeta negativamente a via de Sonic Hedgehog.

Dessa maneira, discutiremos aqui pontos específicos desses achados, que como um todo contribui para o melhor entendimento dos diferentes mecanismos que norteiam a formação da cabeça em vertebrados.

6.1- A via de sinalização de Wnt e seus mecanismos de ativação

Há muito que se busca compreender os mecanismos que disparam a ativação da via de Wnt/ β -catenina. O esforço de vários grupos de pesquisa tem contribuído para o encaixe de algumas peças nesse quebra-cabeça, mas ainda não existe um modelo estabelecido que explique as etapas precedentes à estabilização de β -catenina no citoplasma. É consenso, todavia, que na ausência de Wnt os níveis de β -catenina são mantidos baixos graças à sua fosforilação promovida pelas quinases GSK3 e CK1 (Huang & He, 2008). Essas quinases, juntamente com Axina e APC, compõem um complexo citoplasmático que leva à degradação de β -catenina (Logan & Nusse, 2004). Quando Wnt se liga a seus receptores Frizzled e LRP6, Axina é recrutada para a membrana, desorganizando o complexo de degradação e assim ativando a via (Clevers, 2006).

Um dos grandes avanços recentes foi a identificação dos domínios PPPSPxS na porção intracelular de LRP6 e a constatação de que esses precisam ser fosforilados para ativar a via (Tamai et al, 2004). Outro grande achado demonstrou que GSK3 e CK1, as mesmas quinases que fosforilam e degradam β -catenina, são também as quinases responsáveis pela fosforilação de LRP6 (Zeng et al, 2005). A idéia de que elementos até então tidos como inibitórios na cascata de sinalização de Wnt, pudessem também desempenhar um papel na ativação da via, já vem sendo especulada há alguns anos. Também se tem atribuído à APC um papel na ativação da via, dado por sua capacidade de degradar Axina, restaurando os níveis de β -catenina (Lee et al, 2003; Takacs et al, 2008).

Dessa forma, os achados aqui apresentados seguem essa tendência. Demonstramos que o recrutamento de Axina para a membrana não somente tem a função de desestabilizar o complexo de degradação de β -catenina. Mostramos que Axina é necessária para que ocorra a fosforilação de LRP6, uma vez que é capaz de se ligar e recrutar GSK3 para a membrana.

Demonstramos ainda que independente de Wnt, a formação do complexo Fzl-LRP6 promovida artificialmente é capaz de levar por si só à fosforilação de LRP6 (Fig.2 do artigo 1). Entretanto, essa fosforilação depende da presença de porções intracelulares da molécula de Fzl capazes de se ligar à porção PDZ de Dvl (Fig.1 do artigo 1). Dessa forma, Fzl recruta Dvl, através do domínio PDZ e Dvl se liga à Axina, através do domínio DIX (Fig.3 do artigo 1).

Dvl recruta o complexo Axina-GSK3 para a membrana, levando à fosforilação de LRP6 por GSK3 (Fig.4 e 5 do artigo 1). Essa fosforilação inicial gera pontos de ligação para Axina na molécula de LRP6, conforme já havia sido sugerido em outros estudos (Tamai et al., 2004; Zeng et al., 2005). Assim, Axina se liga a LRP6, trazendo consigo mais moléculas de Gsk3, que por sua vez continuam fosforilando LRP6 e amplificando a fosforilação inicial (Fig.6 do artigo 1).

O modelo de interação entre Axina e LRP6, sustentando e ampliando a fosforilação inicial, poderia permitir que a maior parte dos domínios PPPSPxS de LRP6 sejam fosforilados. Além disso, ele ajuda a explicar o fato de que, uma vez que LRP6 é fosforilado e β -catenina estabilizada, a ativação da via é mantida, pelo menos enquanto houver estimulação de Wnt (Khan et al., 2007)

Dessa forma, o complexo Axina-GSK3 parece exercer um duplo papel durante a via de Wnt, seja participando da ativação (através da fosforilação de LRP6) ou

inibição (através da fosforilação de β -catenina) da via. A escolha entre esses dois caminhos parece ser mediada pela ação de Fzl e Dvl, dependente da presença ou ausência de Wnt.

Esses achados contribuíram ainda para esclarecer uma questão que há muito se discutia: de que maneira Fzl e Dvl efetivamente contribuíam para a ativação da via. Sabia-se que a presença desses componentes era de alguma forma importante, mas não se chegava a um consenso acerca da maneira pela qual essas proteínas interagem no contexto da fosforilação de LRP6 (Huang & He, 2008). Assim, os achados mostrados nesse trabalho contribuem para redesenhar os mecanismos envolvidos no processo de ativação da via de Wnt, relacionando conceitos até então desconexos. Contudo, muitas questões permanecem em aberto e possivelmente outros fatores além destes aqui descritos desempenham papel importante na via. Assim, a identificação de novos componentes contribuirá para a compreensão global do problema, respondendo as dúvidas ainda não esclarecidas.

6.2- A identificação de M15 como um novo inibidor da via de Wnt

Nos primeiros eventos do desenvolvimento embrionário, a via de Wnt desempenha um papel crucial para o estabelecimento do eixo dorso-ventral e formação do futuro Centro Organizador. Quando a transcrição gênica zigótica tem início, contudo, Wnt8 encontra-se expresso no lado ventral e, juntamente com BMPs, passa a ser fonte de sinais ventralizantes e posteriorizantes. Assim, nas células que darão origem à cabeça, essas vias precisam ser inibidas (Glinka et al, 1997)

Vários antagonistas de Wnt, secretados pelo Centro Organizador, têm sido descobertos nos últimos anos e esses achados têm contribuído para clarificar os mecanismos que levam à formação da região anterior. A realização de *screening* funcional em embriões de *Xenopus laevis* como método de identificação de novos genes tem se mostrado uma ferramenta poderosa e já permitiu a descoberta de muitos genes críticos para o desenvolvimento embrionário, como Dkk1 (Glinka et al. 1998) e Noggin (Smith & Harland, 1992), entre outros.

Nosso trabalho aponta para a mesma direção, pois através dessa ferramenta de investigação conseguimos identificar mais um gene, chamado provisoriamente de M15. Vários dados apontam esse gene como um potente inibidor da via de Wnt. Micro-injeções de M15 geram embriões de *Xenopus* com fenótipo anteriorizado. O tronco é encurtado, a cabeça é aumentada e observa-se um aumento na glândula de cemento (Fig.12). Esse fenótipo corresponde àquele decorrente da inibição de Wnt e já observado frente à super-expressão de outros antagonistas, como Dkk-1 (Glinka et al, 1998).

Outro dado que reforça o papel de M15 como antagonista de Wnt é o próprio local onde é expresso. Demonstramos que o RNA desse gene é expresso após o período MBT, no Centro Organizador, mais precisamente na região do endomesoderma dorsal, que corresponde à futura placa pré-cordal (Fig.13). (Sive et al. 1998). Assim, M15 é expresso no momento certo, em regiões do Centro Organizador que são comprometidas com a formação da cabeça e onde vários antagonistas de Wnt também são expressos, como Fzb, Cerberus e Dkk-1.

Outros indícios importantes foram obtidos através de ensaios de indução de duplo-eixo e dissecação de explantes ectodérmicos. M15 bloqueia a formação de

duplo-eixo induzida por microinjeções ventrais de Wnt8, mesmo quando estas utilizaram doses consideradas altas (10pg) (Fig.14). Por outro lado, doses de M15 consideradas baixas para uma proteína transmembrana (0.25pg) são capazes de bloquear completamente a expressão de *Xnr-3* induzida por Wnt em explantes ectodérmicos (Fig.18). Por fim, micro-injeções ventrais de M15 são capazes de induzir a formação de eixo secundário completo, com cabeça, quando realizadas juntamente com antagonistas de BMP (*Noggin*) (Fig.15). Isso faz com que M15 se enquadre como inibidor de Wnt, segundo o modelo proposto por Glinka e colaboradores, em 1997.

Descobrimos também que M15 apresenta um homólogo, que foi chamado de M15L. Nossos experimentos demonstram que M15L também age como antagonista da via de Wnt. Micro-injeções do RNA mensageiro de M15L também causam um fenótipo anteriorizado, semelhante ao obtido com injeções de M15 (Fig.16). Análises por hibridização *in situ* de fato revelam que a super-expressão de M15L altera a expressão de certos marcadores da região anterior. Se o marcador prosencefálico *Otx-2* aparece levemente aumentado, *Xag-1*, por sua vez, tem sua expressão bastante aumentada, podendo-se observar inclusive alguns pontos de expressão ectópica (Fig.21). A expressão de *En-2* não parece ter sofrido qualquer alteração, enquanto *Krox-20* teve seu domínio de expressão levemente reduzido ou deslocado. Como *Krox-20* é considerado o marcador mais posterior dentre os citados acima, é possível que essas alterações tenham ocorrido em função dos efeitos de anteriorização e redução do tronco sofridos por esses embriões.

O padrão de expressão de M15L revelou algumas surpresas. Os dados obtidos através de RT-PCR demonstram que M15L, assim como M15, é um

transcrito zigótico e expresso no lado dorsal de um embrião no estágio de gástrula (Fig.17). Entretanto, os dados de hibridização *in situ* são um pouco divergentes, mostrando nenhuma expressão até o estágio 27. Mesmo estágios mais tardios exibem uma característica não encontrada em M15: a expressão na região ventral anterior, correspondente ao campo do mesoderma pré-cardíaco (Fig.17).

Essas divergências podem ser explicadas pelo fato de que tanto M15 quanto M15L são genes de baixa expressão, por isso difíceis de serem detectados na técnica de hibridização *in situ*, que é menos sensível que o RT-PCR. Várias modificações no protocolo original da técnica de hibridização tiveram que ser realizadas, com o intuito de otimizar o sinal obtido. Mas isso ainda não explica o porquê de M15 ter sido detectado em estágios mais iniciais e M15L não.

Outro aspecto a ser levado em consideração é que a sonda utilizada na *in situ* de M15 foi confeccionada a partir da seqüência inteira de M15. No caso de M15L não tínhamos a seqüência completa em *Xenopus*, que deve ter cerca de 2kb, por isso utilizamos uma parcial, com cerca de 1.3 Kb. Sabe-se que normalmente seqüências menores que essas são suficientes para se fazer uma sonda para hibridização, mas talvez nesse caso em que o gene naturalmente já tenha uma expressão baixa, isso não tenha sido suficiente. Contudo, ainda temos o fato de que em estágios mais tardios M15L parece divergir um pouco do padrão de M15. Isso poderia ser fruto de alguma diferença funcional que esses genes possam exibir em estágios mais adiantados do desenvolvimento. Todavia, essa questão só poderá ser esclarecida quando pudermos realizar nova reação com a seqüência completa de M15L e também quando pudermos investigar o papel biológico destes dois genes, em experimentos de perda de função.

Independente disso, a atividade de M15L em estágios mais iniciais parece ser a mesma exibida por M15. M15L possui a mesma habilidade de inibir a formação de duplo-eixo induzida por Wnt8, bem como bloquear a expressão de *Xnr-3* induzida por Wnt8 em explantes ectodérmicos (Fig.18). Além disso, a atividade inibitória de Wnt8 é extremamente forte, dada sua capacidade de antagonizar a via de Wnt mesmo a doses consideradas baixas (0.1ng) (Fig.19). Por fim, da mesma maneira que M15, M15L coopera com *Noggin* para induzir a formação da cabeça (Fig.20).

Apesar de todos esses dados, nada se sabe ainda acerca do mecanismo de ação de M15 e M15L. Experimentos preliminares mostram que mutantes de M15 que não apresentam o domínio transmembranar não conseguem inibir a via de Wnt. Também em M15L a ausência desse domínio parece ser essencial para a sua ação, já que essa construção parcial não promove anteriorização, não bloqueia a formação de duplo-eixo ou a expressão de *Xnr-3* induzidas por Wnt. Esses achados, ainda que preliminares, sugerem que a ação de M15 se dá ao nível de suas interações na membrana plasmática.

O que torna M15 uma molécula interessante é o fato de que parece agir de forma diferente de outros inibidores da via de Wnt. Como mencionado anteriormente, Fzb-1 é uma proteína secretada, que se liga a Wnt no espaço extracelular, impedindo sua ação. Dkk-1, SOST e Wise também são proteínas secretadas, porém o bloqueio de Wnt se dá através da ligação ao seu receptor, LRP6. Shisa, por outro lado, age mantendo Frizzeld no retículo endoplasmático, impedindo a sua maturação e inibindo assim a via de Wnt (Yamamoto et al, 2005). Kremen, que poderia ser estruturalmente comparado à M15, por ser também uma proteína transmembrana,

não age por si só como antagonista da via de Wnt, como o faz M15, mas sim colabora com Dkk-1 no bloqueio da via.

Ainda são necessários vários experimentos no intuito de se descobrir os mecanismos através dos quais M15 age para realizar o bloqueio da via de Wnt. Além disso, experimentos de perda de função também devem ser realizados, para que se possa esclarecer detalhadamente o papel biológico de M15 durante o desenvolvimento. Esses achados contribuirão não somente para um melhor entendimento da via, como também possibilitarão a inserção de M15 entre as moléculas necessárias para que se dê a padronização do eixo AP e cuja ação é essencial para permitir a formação da cabeça.

6.3- O papel dos microdomínios de membrana na formação da cabeça: o envolvimento de Sonic Hedgehog

Há muito se discute o envolvimento de microdomínios de membrana com eventos de sinalização celular. Essas estruturas, ricas em colesterol e esfingolípídios, entre outros, chamaram a atenção da comunidade científica quando se constatou que podem atuar como plataformas para a compartimentalização de elementos de vias de sinalização (Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 2000; Edidin, 2003). Neste trabalho fomos um pouco mais além e demonstramos que os microdomínios de membrana têm uma correlação direta com o desenvolvimento embrionário de *Xenopus*, e que a sua desorganização através da depleção de colesterol afeta a via de Sonic Hedgehog (Shh), gerando um fenótipo de microcefalia.

Primeiramente devemos comentar sobre a depleção de colesterol utilizada em nossos experimentos. Muito embora M β CD já tenha sido bastante utilizada como ferramenta para a depleção de colesterol em vários trabalhos (Ohtani *et al.*, 1989; Kilsdonk *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995; Neufeld *et al.*, 1996), ainda existem questionamentos quanto a possíveis efeitos tóxicos ou inespecíficos desse fármaco sobre as estruturas celulares. Nossos resultados mostram que, primeiramente, a depleção de colesterol produzida por M β CD deu-se primordialmente sobre os microdomínios de membrana, visto que os níveis de colesterol pareceram reduzidos apenas nas frações membranares correspondentes a essas estruturas (Fig.4 do artigo 2). Segundo, análises por microscopia eletrônica demonstraram claramente que tanto as membranas celulares quanto as organelas intracelulares parecem preservadas (Fig.5 do artigo 2), confirmando achados anteriores que descrevem a especificidade de M β CD na remoção de colesterol sem a adição de danos à estrutura celular (Ohtani *et al.* 1989).

Outro aspecto importante foi a constatação de que a depleção de colesterol desses microdomínios leva à desorganização dessas estruturas. A expressão do gangliosídeo GM1, um gangliosídeo abundante nessas estruturas, foi completamente alterada ao longo da membrana celular (Fig.4 do artigo 2). Além disso, o isolamento de frações membranares por gradiente de sacarose permitiu-nos observar que a proteína Caveolina, normalmente presente em frações leves correspondentes a microdomínios do tipo caveolares, foi deslocada dessas frações (Fig.4 do artigo 2). Isso mostra que a depleção de colesterol afeta o posicionamento e composição de elementos presentes em microdomínios de membrana

A via de sinalização de Shh é extremamente importante durante o desenvolvimento embrionário, atuando, entre outras ações, na formação dos membros, padronização dorso-ventral do tubo neural, indução de estruturas ventrais do prosencéfalo e migração e sobrevivência de células da crista neural cranial (Fan e Tessier-Lavigne, 1994; Ito et al., 2001; Jeong et al., 2004, Brito et al., 2006). Tal complexidade de ações explica os variados efeitos advindos do desequilíbrio da via de Shh.

No que tange à formação das estruturas anteriores, já se demonstrou que camundongos knockout para *Shh* apresentam grave comprometimento da região anterior, caracterizado principalmente por defeitos na face e quase que completo desaparecimento do prosencéfalo, reduzido apenas a uma probóscide (Chiang et al., 1996). Mutações envolvendo *Shh* resultam em doenças como holoprosencefalia, caracterizada por separação incompleta das duas metades do prosencéfalo, microcefalia e ciclopia (Ingham and McMahon, 2001). A privação de Shh em células da crista neural cranial, que dão origem à maioria do esqueleto e tecido conjuntivo da cabeça, também gera embriões com sérias deformidades crânio-faciais (Jeong et al., 2004).

De uma forma geral, desordens na disponibilidade de colesterol relacionam-se à via de Shh. Isso pode ser explicado pelo fato de que a proteína Sonic Hedgehog depende de colesterol para sua biossíntese e modificações lipídicas em sua estrutura aumentam sua lipossolubilidade, direcionando Shh para microdomínios de membrana (Jeong & McMahon, 2002; Linder & Deschenes, 2003). Além disso, já se demonstrou que Patched, o receptor de Shh, associa-se a colesterol e Caveolina em

microdomínios de membrana, e a depleção de colesterol por M β CD remove essas duas proteínas dessas regiões (Karpen et al., 2001)

Nossos resultados mostram que os níveis de colesterol presentes em microdomínios de membrana são reduzidos drasticamente pelo tratamento com M β CD e o fenótipo resultante dessa depleção mostra um grande comprometimento da região crânio-facial (Fig.1 do artigo 2). Observa-se a diminuição ou mesmo perda completa de marcadores da região anterior, principalmente *Otx-2*, *Six-3* e *Xag-1* (Fig.2 e 3 do artigo 2). Esses achados quando associados à literatura por si só já sugerem um envolvimento da via de Shh. Todavia, decidimos ainda investigar outras vias de sinalização, já que um fenótipo de microcefalia poderia também estar relacionado a um aumento da via de BMPs e da via zigótica de Wnt. Utilizando o plasmídeo repórter da via de BMP, *Msx-1lux*, observamos que injeções de M β CD não interferem nessa via. Já a utilização do repórter da via de Wnt, Top-Flash, trouxe resultados mais curiosos. Observamos que há uma redução aparente na ativação da via de Wnt em decorrência da injeção com M β CD. Esses resultados, analisados friamente, estariam em consonância com trabalhos recentes utilizando experimentos *in vitro* que demonstraram que Caveolina é importante pra ativação da via de Wnt e que a desorganização das cavéolas reduziria os níveis de ativação da via (Yamamoto et al., 2006; Yamamoto et al., 2008). Todavia, no modelo experimental aqui utilizado esses resultados tornam-se difíceis de serem explicados em função do momento em que injetamos a droga. M β CD é injetado no estágio 9 da blástula, ou seja, num momento em que a via de Wnt inibe a formação da cabeça. Dessa forma, o fenótipo decorrente da injeção com M β CD é incompatível com redução da via de Wnt. Se esta estivesse envolvida no fenótipo aqui descrito, esperaríamos uma

ativação e não redução da via. Não descartamos aqui a possibilidade da via de Wnt também estar sendo afetada pela depleção de colesterol, afinal, demonstrou-se que o receptor da via de Wnt, LPR6, encontra-se em cavéolas (Yamamoto et al., 2006). Todavia, um envolvimento da via de Wnt não parece ser a causa isolada do fenômeno aqui descrito.

Outros trabalhos também demonstraram que a depleção de colesterol em embriões de galinha, através do uso de M β CD, também leva ao desenvolvimento de embriões com fenótipo de microcefalia e sugeriu-se que isso era devido à diminuição da via de Shh (Cooper et al., 2003). Nossa análise por hibridização *in situ* mostra a redução na expressão do mRNA de *Shh*, principalmente na região da placa pré-cordal e região dos arcos branquiais (Fig.6 do artigo 2).

Experimentos com plasmídeo repórter para via de Shh em células 293 mostraram que M β CD é capaz de reduzir a ativação da via. Além disso, essa inibição deve ocorrer ao nível da membrana, pois a transfecção dessas células com Gli-1, um efetor imediato depois de Smo, é capaz de resgatar a ativação da via, mesmo na presença de concentrações elevadas de M β CD (Fig.7 do artigo 2).

Nossos achados foram reforçados pelo fato de que verificamos um grande aumento na expressão do RNA de *Patched-2*, principalmente na região anterior (Fig.6 do artigo 2) A transcrição de *Patched* é resultado da ativação de Shh, mas ele é considerado um inibidor da via, pois num mecanismo de *feedback negativo*, se liga a Smo, impedindo-o de transduzir a via de Shh (Lum & Beachy, 2004). A ligação de Shh a Patched é capaz de liberar essa associação, deixando Smo livre para ativar a via de Shh. Nossa primeira pergunta frente a esses dados foi em função do aumento de *Patched*. Isso porque, se por um lado o aumento da sua expressão indica um

efeito inibitório na via, por outro lado sugere que Shh de alguma forma levou a essa super-expressão.

Dessa forma, baseando-se nos nossos dados e na literatura, podemos propor um modelo que tenta explicar esse mecanismo. Patched está ligado a Smo e ancorado em microdomínios de membrana, através da associação com colesterol e Caveolina. Na ausência de Shh, Caveolina mantém a associação Patched-Smo, prevenindo a ativação da via. Na presença de Shh, essa associação se desfaz e Smo fica livre da ação inibitória de Patched, permitindo a ativação da via.

A injeção de M β CD remove colesterol desses microdomínios, desorganizando a sua estrutura, e deslocando componentes integrantes dessas regiões, tais como GM1, Caveolina e Patched. O deslocamento de Caveolina e Patched, por sua vez, deixa Smo livre para ativar a via, independente da ligação de Shh. Dessa forma, num primeiro momento teríamos uma ativação transitória da via, que resulta na expressão aumentada de *Patched-2*.

Num segundo momento, níveis elevados de Patched agem num mecanismo de *feedback* negativo, inibindo a via. Associado a isso, os próprios níveis da proteína Shh podem estar baixos, uma vez que a depleção de colesterol pode ter afetado seu autoprocessamento e habilidade de se dirigir para microdomínios de membrana. Dessa forma, altos níveis de Patched, associados a baixos níveis de Shh, contribuiriam para regular negativamente a via de Sonic Hedgehog.

Ainda são necessários experimentos futuros para a confirmação desse modelo, tais como analisar a presença das proteínas Patched e Sonic nesses microdomínios e demonstrar seu desaparecimento dessas regiões frente ao tratamento com M β CD. Outro aspecto importante seria a realização de hibridização

in situ de *Shh* e *Patched* logo após o momento da injeção de M β CD, passando pela formação da placa neural até estágios mais tardios do desenvolvimento. Isso serviria para caracterizar de forma mais clara essa regulação temporal que parece depender dos níveis de *Patched* na membrana. Além disso, outros genes da via de *Shh*, tais como *Gli-1* e *Gli-3*, também poderiam ser analisados após injeções de M β CD, seja via RT-PCR ou hibridização *in situ*.

Esse trabalho utilizou estratégias variadas na caracterização pioneira dos efeitos da depleção de colesterol em embriões de *Xenopus*. Demonstramos que a via de *Shh* depende da organização de microdomínios de membrana para a ativação da via e isso é essencial para o correto desenvolvimento da região anterior. Esses achados reafirmam a importância de *Shh* durante o desenvolvimento embrionário e, principalmente, contribuem para a inserção dos microdomínios de membrana como um novo paradigma durante a formação da cabeça em vertebrados.

7- CONCLUSÕES DA TESE

Parte I

1- A ativação da via de Wnt requer a fosforilação de LRP6 e esse evento depende do recrutamento de Dvl por Fzl, através do domínio PDZ de Dvl.

2- Dvl, através do domínio DIX, recruta o complexo Axina-Gsk3 para a membrana, onde Gsk3 dá início à fosforilação do domínio PPPSPxS de LRP6.

3- O complexo Axina-Gsk3 exerce duplo efeito durante a via de Wnt, participando tanto dos processos de ativação quanto de inibição.

4- A fosforilação inicial abre novos sítios de ligação para Axina na molécula de LRP6, permitindo que os domínios PPPSPxS continuem a ser fosforilados, num modelo de amplificação.

Parte II

5- M15 é um novo transcrito zigótico, expresso no Centro Organizador e sua super-expressão gera embriões de *Xenopus* com fenótipo anteriorizado.

6- M15 bloqueia a formação de duplo eixo e expressão de Xnr-3 induzidas por Wnt8 e é capaz de gerar a formação de cabeça quando co-expresso com inibidores da via de BMP, demonstrando seu papel na inibição da via de Wnt.

7- M15L é um homólogo de M15 que também gera um fenótipo anteriorizado e antagoniza a via de Wnt, de todas as formas mencionadas acima, contribuindo para a formação da cabeça.

8- A super-expressão de M15L altera a expressão de marcadores anteriores: aumenta *Xag-1* e *Otx-2* (esse com menor intensidade) e desloca e/ou reduz *Krox-20*.

Parte III

9- Micro-injeções de M β CD reduzem os níveis de colesterol de microdomínios de membrana e afetam a distribuição de componentes dessas regiões, como Caveolina e GM1.

10- A ação de M β CD parece ser específica e não compromete a integridade de membranas ou organelas celulares.

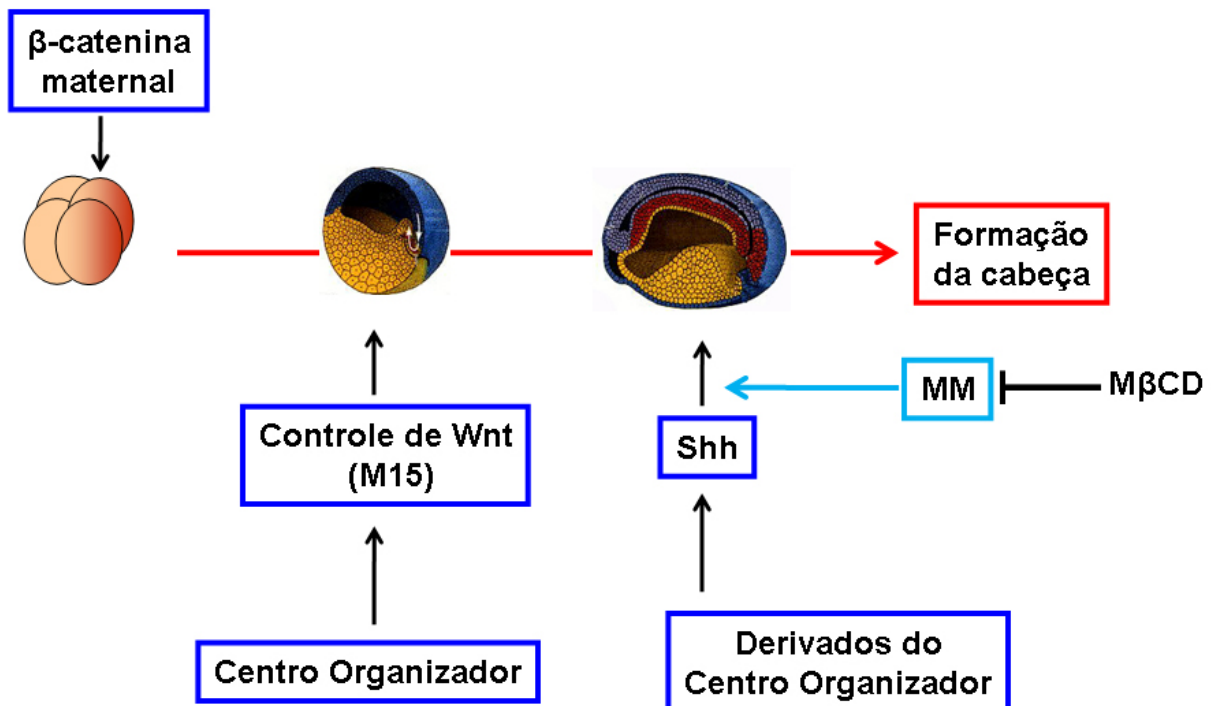
11- A depleção de colesterol por M β CD regula negativamente a via de Shh e isso se demonstra pela diminuição da expressão de *Shh*, aumento da transcrição de *Patched-2* e diminuição da atividade de luciferase.

12- A organização de microdomínios de membrana é importante para a via de Shh e esses dois fatores juntos colaboram para a boa formação da região anterior de vertebrados.

CONCLUSÃO GERAL

Os eventos embrionários que levam à formação da cabeça em *Xenopus* podem ser divididos em dois momentos distintos e envolvem principalmente a participação de duas vias de sinalização: a via de Wnt/ β -catenina e a via de Sonic Hedgehog. A indução primária ocorre em função da via de Wnt/ β -catenina, antes do período MBT e resulta na formação do Centro Organizador de Spemann. Após o

período MBT, a via de Wnt exerce um efeito contrário e sua ativação promove a ventralização e posteriorização das estruturas embrionárias. Dessa forma, fatores antagonistas secretados pelo Centro Organizador, como o próprio M15 aqui estudado, garantem a formação da cabeça através da inibição da via de Wnt. Uma vez que os domínios de formação da região anterior são estabelecidos, faz-se necessário padronizá-los e a via de Sonic Hedgehog tem um papel essencial nesse processo. Estruturas derivadas do próprio Organizador, como a notocorda, secretam Sonic Hedgehog, cujo estímulo permitirá a migração de células da crista neural, formação dos arcos branquiais e conseqüente morfogênese de todo o esqueleto crânio-facial. A desorganização de microdomínios de membrana pela remoção de colesterol afeta a via de Sonic e leva ao desenvolvimento de embriões com microcefalia.



8- GLOSSÁRIO

ADMP – Proteína morfogenética anti-dorsalizante, uma BMP expressa no Centro Organizador

ALK-2 – Receptor de ADMP

BCNE – Centro de expressão de *Chordin* e *Noggin* na blástula, um pré-Organizador

Centro Organizador de Spemann – Centro indutor que se forma na região dorsal de embriões de anfíbios, a partir dos estágios de blástula tardia e gástrula. Secrete vários fatores que antagonizam moléculas de efeito ventralizante e posteriorizante.

Dkk-1 – Dickkopf -1, proteína secretada, antagonista da via de Wnt

En-2 – *Engrailed-2*, gene expresso no limite entre mesencéfalo e rombencéfalo, serve como marcador molecular para essa região

Krox-20 – gene expresso nos rombômeros 3 e 5 e no primeiro arco branquial, serve como marcador molecular para essas regiões

MBT – *Mid Blastula Transition*, é o período que marca o meio do estágio de blástula, onde tem início a transcrição gênica zigótica.

Myo-D – Marcador molecular de mesoderma paraxial

Otx-2 – Gene homeobox expresso no prosencéfalo e mesencéfalo, é utilizado como marcador dessas regiões

sFRP – Proteínas secretadas semelhantes a Frizzled, são inibidores solúveis de Wnt

Six-3 – Gene expresso na região dos olhos e faixa de diencéfalo entre eles. É utilizado como marcador molecular dessas regiões.

tBR – Forma dominante-negativa do receptor de BMP

Tsg – *Twisted gastrulation*: proteína capaz de se ligar a Chordin e a BMP

VegT - fator de transcrição expresso no pólo vegetal

Vg1 - proteína pertencente à família TGF- β

Wnt – fusão do nome Wingless (em drosófila) com INTegrated (vertebrados)

WTX - *Wilms Tumor gene on the X chromosome*, é um fator supressor tumoral, inibe a via de Wnt

Xag-1 – Marcador molecular da glândula de cimento

Xlr – Xolloid: metaloproteinase presente em *Xenopus*, semelhante a Tolloid (em drosófila), que cliva Chordin.

Xvent-1 –gene alvo da via de BMP, expresso na zona marginal ventral de *Xenopus*

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J.G., Coffinier, C., Larrain, J., Oelgeschlager, M. and De Robertis, EM Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene* 287, 39-47 (2002).

AGIUS, E.; Oelgeschlager, M.; Wessely, O.; Kemp, C. & De Robertis, E.M. Endodermal Nodal-related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development*, 127:1173-1183 (2000).

ALBERTS, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Publishing (2002). New York.

ALMEIDA, K.L. A depleção de colesterol interfere na formação da cabeça em embriões de *Xenopus laevis*. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BOUWMEESTER, T.; Kim, S.; Sasai, Y.; Lu, B.; De Robertis, E.M. Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 282, 595-601 (1996).

BHANOT P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.*, 382, 225-30 (1996).

BRACHET J. An old enigma: the gray crescent of amphibian eggs. *Curr Top Dev Biol.* 11, 133-86 (1977).

BRADLEY LC, Snape A, Bhatt S, Wilkinson DG. The structure and expression of the *Xenopus* Krox-20 gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mech Dev* 40, 73-84(1993).

BRITO, J.M., Teillet, M.A. and Le Dourin, N.M., 2006. An early role for Sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: Ensuring neural crest cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103,11607-12.

BROWN DA, ROSE JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-44 (1992).

BROWN DA, LONDON E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 9;275(23):17221-4. (2000)

BROWN JD AND MOON RT. Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol*, 10(2):182-7 (1998).

CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.*, 15;11(24):3286-305 (1997).

CHANG, W.J., Rothberg, K.G., Kamen, B.A., Anderson, R.G. Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J Cell Biol.*, 118, :63-9 (1992).

CHIANG C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 383, 407-13 (1996)

CHO, K.W.; Blumberg, B.; Steinbeisser, H.; De Robertis, E.M. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell*, 67, 1111-20 (1991).

CHRISTIAN JL AND MOON RT. Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev.*, 7, 13-28 (1993).

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480 (2006).

COOPER MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, Porter FD, Beachy PA. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet*. 33(4):508-13 (2003).

CORLEY MASTICK C, Sanguinetti AR, Knesek JH, Mastick GS, Newcomb LF. Caveolin-1 and a 29-kDa caveolin-associated protein are phosphorylated on tyrosine

in cells expressing a temperature-sensitive v-Abl kinase. *Exp Cell Res.* 266,142-54 (2001).

DALE L, Evans, W., Goodman, SA. Xolloid-related: a novel BMP1/Tolloid-related metalloprotease is expressed during early *Xenopus* development. *Mech. Dev.* 119:177–90 (2002).

DAVIDSON, L.A. and KELLER, R.E. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* 126,, 4547-4556 (1999).

DE ROBERTIS, E.M.; Larrain, J.; Oelgeschlager, M. & Wessely, O. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Reviews*, 1:171-181 (2000).

DE ROBERTIS, E.M. AND KURODA, H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20:285-308 (2004).

DU, S.J., S.M. Purcell, J.L. Christian, L.L. McGrew, and R.T. Moon. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2625–2634 (1995).

EDIDIN, M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32, 257-83 (2003)

ELINSON RP, Rowing B. A transient array of parallel microtubules in frog eggs: potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. *Dev Biol.* 128, 185-97 (1988).

FAN CM, TESSIER-LAVIGNE M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell.* 79, 1175-86 (1994).

FIELDING CJ AND FIELDING PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta*, 1529, 210-22 (2000).

GALBIATI, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106 (4), 403-411 (2001).

GAMMILL LS & SIVE HL. Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development* 124, 471-481 (1997).

GAWANTKA V., Delius H., Hirschfeld K., Blumenstock C., Niehrs C. Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene Xvent-1. *EMBO J.* 14, 6268-79 (1995).

GILBERT SF. *Developmental Biology*, 7^a edição, Sinauer Associates, Inc. pag 303-338, 2003 Sunderland, Massachusetts.

GLINKA A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. & Niehrs, C. Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517–519 (1997).

GLINKA A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362 (1998).

GRAFF, J.M., Thies, R.S., Song, J.J., Celeste, A.J., Melton, D.A. Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo. *Cell* 79, 169-79 (1994).

GROPPE J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420, 636–42 (2002).

GÜNTHER T, Struwe M, Aguzzi A, Schughart K. Open brain, a new mouse mutant with severe neural tube defects, shows altered gene expression patterns in the developing spinal cord. *Development*. 120, 3119-30 (1994).

GURDON JB, Byrne JA and Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation. *PNAS*, 100, 11819–11822 (2003).

HANSEN, C. S., Marion, C. D., Steele, K., George, S. & Smith, W. C. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development* 124, 483–492 (1997).

HARAMOTO Y, Tanegashima K, Onuma Y, Takahashi S, Sekizaki H, et al. *Xenopus tropicalis* nodal-related gene 3 regulates BMP signaling: an essential role for the proregion. *Dev. Biol.* 265, 155–68 (2004).

HARDER T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141, 929 –942 (1998).

HARLAND, R. & GERHART, J. Formation and function of Spemann's Organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 611–667 (1997).

HATA, A., Lagna, G., Massagué, J. and Hemmati-Brivanlou, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 12, 186-197 (1998).

HAWLEY SH, Wunnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent MN, Watabe T, Blumberg BW, Cho KW.. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev.* 9, 2923-35 (1995).

HUANG, H. AND HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 119-25 (2008).

IEMURA, S., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino H, Ueno N. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc. Natl Acad. Sci.* 95, 9337–9342 (1998).

INGHAM, P.W., MCMAHON, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-87.

ITASAKI N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, Krumlauf R. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development.* 130, 4295-305 (2003).

ITO, Y., Kuhara, S. and Tashiro, K.,. In synergy with Noggin and Follistatin, *Xenopus* Nodal-related gene induces Sonic Hedgehog on notochord and floor plate. *Biochemical and Biophysical research communications* 281, 714-19 (2001)

JACOBSON, K., Sheets, E.D., Simson, R. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*. 268, 1441-2 (1995).

JEONG, J. AND MCMAHON, AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J. Clin. Invest.* 110, 591-596 (2002)

JEONG, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A.H., McMahon, A.P. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev.* 18, 937-51 (2004).

KARPEN HE, Bukowski JT, Hughes T, Gratton JP, Sessa WC, Gailani MR. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem.* 276, 19503-11 (2001).

KAWANO Y AND KYPTA R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 116, 2627-34 (2003).

KAZANSKAYA O, Glinka A, Niehrs C. The role of *Xenopus* dickkopf1 in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127, 4981-92 (2000).

KELLER, R.E. The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol.* 60, 201-34 (1980).

KELLER, R.E. An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis*. *J Exp Zool.* 216, 81-101 (1981).

KELLER, R., SHIH., J. AND SATER, A. The Cellular Basis of the Convergence and Extension of the *Xenopus* Neural Plate. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 193:199-217 (1992)

KHAN, Z., Vijayakumar, S., de la Torre, T., Rotolo, S. and Bafico, A. Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7291-7301 (2007).

KILSDONK EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem.* 270, 17250-6 (1995).

KLEIN, U., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*. 34, 13784-93 (1995).

KLEIN, P. S. & MELTON, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl Acad. Sci.* 93, 8455–8459 (1996).

KUHL M. Non-canonical Wnt signaling in *Xenopus*: regulation of axis formation and gastrulation. *Semin Cell Dev Biol.* 13(3):243-9 (2002).

KURODA H, Wessely O, De Robertis EM. Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol.* (5):E92. (2004).

LANGE Y. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res* 32, 329-39 (1991).

LARRAÍN J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, De Robertis EM. BMP-binding modules in Chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* 127, 821–830 (2000).

LARRAÍN J, Oelgeschlager M, Ketpura NI, Reversade B, Zakin L, et al. Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* 128, 4439–47 (2001).

LEE, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R., Kirschner, M.W.: The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* 1, 116-132 (2003).

LEYNS, L., Bouwmeester, T., Kim, S.-H., Piccolo, S. & De Robertis, E. M. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann Organizer. *Cell* 88, 747–756 (1997).

LI X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 280,19883-7 (2005).

LINDER, ME., AND DESCHENES, RJ. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry*. 42, 4311–4320 (2003).

LOGAN, C.Y. AND NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810 (2004).

LUM, L., BEACHY, P.A. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304, 1755-9. (2004).

MAJOR, M.B., Camp, N.D., Berndt, J.D., Yi, X., Goldenberg, S.J., Hubbert, C., Biechele, T.L., Gingras, A.C., Zheng, N., Maccoss, M.J. et al.: Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/betacatenin signaling. *Science* 316, 1043-1046 (2007).

MANN, R.K., BEACHY, P.A. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem*. 73, 891-923 (2004)

MAO B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417:664–67 (2002).

MAYOR S. AND RAO M. Rafts: Scale-Dependent, Active Lipid Organization at the Cell Surface. *Traffic* 5, 231–240 (2004).

MCGREW LL, Takemaru K, Bates R, Moon RT. Direct regulation of the *Xenopus* engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mechanisms of Development* 87, 21-32 (1999).

MILLER, J.R.; Rowing, B.A.; Larabell, C.A.; Yang-Snyder, J.A.; Bates, R.L. & Moon, R.T. Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryo coincides with the dorsal enrichment of disheveled that is dependent on cortical rotation. *J. Cell. Biology*, 146, 427-437 (1999)

MIURA GI, TREISMAN JE. Lipid Modification Of Secreted Signaling Proteins. *Cell Cycle*. 5,1184-8 (2006).

MOON, RT, Brown JD, Torres M. Wnts modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet.* 13, 157-62 (1997).

MOON RT, 2005. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE.*, (271), cm1 (2005).

MURATA, M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 10339-43. (1995).

NEUFELD EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem.* 271, 21604-13 (1996).

NIEHRS, C. Head in the Wnt: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* 15, 314-9 (1999).

NIETO MA, Bradley LC, Wilkinson DG. Conserved segmental expression of Krox-20 in the vertebrate hindbrain and its relationship to lineage restriction. *Development* 2, 59-62 (1991).

OELGESCHLÄGER, M., Larraín, J., Geissert, D. & De Robertis, E. M. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757–763 (2000).

OHTANI Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 186, 17-22 (1989).

OKAMOTO T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273, 5419-22 (1998).

PANNESE M, Pólo C, Andreatzoli M, Vignali R, Kablar B, Barsacchi G and Boncinelli E. The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* 121, 707-720 (1995)

PEIFER M, POLAKIS P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus. *Science.* 287, 1606-9 (2000).

PICCOLO, S.; Sasai, Y.; Lu, B. & De Robertis, E.M. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell*, 86, 589-598 (1996).

PICCOLO, S.; Agius, E.; Lu, B.; Goodman, S.; Dale, L. & De Robertis, E.M. Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*, 91, 407-416 (1997).

PICCOLO S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature*, 397, 707-10 (1999).

PIKE, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47, 1597-8 (2006).

PITHA J, Irie T, Sklar PB, Nye JS. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43, 493-502 (1988).

REVERSADE B, De Robertis EM. Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. *Cell* 123, 1147-60 (2005).

REVERSADE B, Kuroda H, Lee H, Mays A, De Robertis EM. Depletion of Bmp2, Bmp4, Bmp7 and Spemann organizer signals induces massive brain formation in *Xenopus* embryos. *Development* 132, 3381-92 (2005).

RIOBO, N.A., Manning, D.R. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J.* 403, 369-79 (2007).

RODAL SK, Skretting G, Garred Ø, Vilhardt F, Deurs B and Sandvig K. Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles *Molecular Biology of the Cell* 10, 961–974 (1999).

ROTHBERG, K. G., Y.S. Ying, J. F. Koihouse, B. A. Kamen, and R. G. W. Anderson. The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 110:637-649 (1990).

ROTHBERG KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 68, 673-82. (1992).

SASAI, Y.; Lu, B.; Steinbeisser, H.; Geissert, D.; Gont, L.K.; De Robertis, E.M. *Xenopus* Chordin: a novel dorsalizing factor activity by organizer-specific homeobox genes. *Cell*, 79, 779-790 (1994).

SASAI, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and de Robertis, E. M. Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 376, 333-336 (1995).

SCHNEIDER, S., Steinbeisser, H., Warga, R. M. & Hausen, P. β -Catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech. Dev.* 57, 191–198 (1996).

SCHNITZER JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127, 1217-32 (1994).

SCHOHL A, Fagotto F. Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* 129: 37–52 (2002).

SEMĚNOV M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*. 280, 26770-5. (2005).

SHI, Y. AND MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700 (2003).

SHINITZKY M & INBAR M. Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *J Mol Biol*. 85, 603-15 (1974).

SIMONS, K. AND IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569 – 572 (1997).

SPEMANN, H. AND MANGOLD, H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Arch. EntwMech. Org.* 100, 599-638 (1924).

STAUFFER TP AND MEYER T. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J Cell Biol* 139, 1447–1454 (1997).

SIVE HL, Grainger RM and Harland RM. Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Inc. pag 13-38, 1998, Cold Spring Harbor, New York.

SOKOL S, Christian JL, Moon RT, Melton DA. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell.* 67, 741-52 (1991).

TADA, M., Concha, M.L., Heisenberg, C.P. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 251–260 (2002).

TAKACS, C.M., Baird, J.R., Hughes, E.G., Kent, S.S., Benchabane, H., Paik, R., Ahmed, Y.: Dual positive and negative regulation of wingless signaling by adenomatous polyposis coli. *Science* 319, 333-336 (2008).

TAKAHASHI S, Yokota C, Takano K, Tanegashima K, Onuma Y, Goto J, Asashima M. Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development.* 127(24):5319-29 (2000).

TAMAI K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 28;407(6803):530-5 (2000).

TAMAI, K.; Zeng, X.; Liu, C.; Zhang, X.; Harada, Y.; Chang, Z. & He, X. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell*, 13:149-156 (2004).

VINCENT JP, Oster GF, Gerhart JC. Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs: the displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. *Dev Biol.* 113, 484-500 (1986).

VIOLA A, Schroeder S, Sakakibara Y, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283, 680–682 (1999).

VON BUBNOFF AND CHO KH. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol.* 239, 1-14 (2001).

WALLINGFORD, J. B. AND HABAS, R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421-4436 (2005).

WANG, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F. P. & Moos, M. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann Organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757-766 (1997).

WARDLE FC, Wainstock DH and Sive HL Cement gland-specific activation of the Xag1 promoter is regulated by co-operation of putative Ets and ATF/CREB transcription factors.. *Development* 129, 4387-4397 (2002)

WEAVER C, Farr GH 3rd, Pan W, Rowning BA, Wang J, Mao J, Wu D, Li L, Larabell CA, Kimelman D. GBP binds kinesin light chain and translocates during cortical rotation in *Xenopus* eggs. *Development* 148:691-702 (2003).

WEINSTEIN DC AND HEMMATI-BRIVANLOU A. Neural induction in *Xenopus laevis*: evidence for the default model. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 7-12 (1997).

WESSELY O, Agius E, Oelgeschl"ager M, Pêra EM, De Robertis EM. Neural induction in the absence of mesoderm: beta-catenin dependent expression of secreted BMP antagonists at the blastula stage in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 234, 161-73 (2001).

WESSELY O, Kim JI, Geissert D, Tran U, De Robertis, EM. Analysis of Spemann organizer formation in *Xenopus* embryos by cDNA macroarrays. *Dev. Biol.* 269, 552-66 (2004).

WILSON, P. A., Lagna, G., Suzuki, A. and Hemmati-Brivanlou, A. Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* 124, 3177-3184 (1997).

WINKLBAUER, R. AND SCHÜRFFELD, M. Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development* 126, 3703-3713 (1999).

WODARZ, A. & NUSSE, R. Mechanism of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59–88 (1998).

XU, R. H., Kim, J., Taira, M., Zhan, S., Sredni, D. and Kung, H. F. A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 212-219 (1995).

YAMAMOTO, A., Nagano, T., Takehara, S., Hibi, M. and Aizawa, S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell* 120, 223-235 (2005).

YAMAMOTO, H, Komekado H, Kikuchi A. Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* 11, 213-226, 2006.

YAMAMOTO H, Sakane H, Yamamoto H, Michiue T, Kikuchi A. Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Dev Cell* 15, 37-48, 2008

YEAGLE, PL. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 73, 1303-10 (1991).

ZENG X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature.* 438, 873-7 (2005)

ZHOU X, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. Cloning and expression of X*Six3*, the *Xenopus* homologue of murine *Six3*. *Mechanisms of Development* 91, 327-330 (2000).

ZIMMERMAN, L. B., De Jesús-Escobar, J. M. & Harland, R. M. The Spemann organizer signal Noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599–606 (1996).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)