

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
LABORATÓRIO DE DIFERENCIAÇÃO MUSCULAR E CITOESQUELETO

**PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E DE ADESÃO NA  
MIOGÊNESE DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas  
do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ

**Aluna:** Roberta da Costa Escaleira  
**Orientadores:** Manoel Luís Costa e  
Cláudia dos Santos Mermelstein

Rio de Janeiro  
2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Proteínas do citoesqueleto e de adesão na  
miogênese do peixe-zebra (*Danio rerio*)**

**ROBERTA DA COSTA ESCALEIRA**

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Apresentada em 13 de dezembro de 2006 à Banca Examinadora composta por:

Dr. **Radovan Borojevic** – Departamento de Histologia e Embriologia – ICB - UFRJ

Dra. **Helene Santos Barbosa** - FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Dr. **Marcos André Vannier dos Santos** – FIOCRUZ – Salvador, Bahia

Dra. **Helena Marcolla Araújo** - Departamento de Histologia e Embriologia – ICB – UFRJ  
– Revisora e suplente

## Ficha Catalográfica

ESCALEIRA, Roberta da Costa

Proteínas do Citoesqueleto e de Adesão na Miogênese do Peixe-Zebra (*Danio rerio*)/Roberta da Costa Escaleira. Rio de Janeiro, UFRJ, Pós Graduação em Ciências Morfológicas, 2006.

87 pp, xi

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, PCM, 2006.

1. Adesões Celulares. 2. Citoesqueleto. 3. Peixe-Zebra. 4. Miogênese. 5. Imunofluorescência – Tese. I. Tese (Doutorado) – Pós Graduação em Ciências Morfológicas. II. Título

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, sob orientação do Prof. Dr. Manoel Luís Pereira da Silva Costa e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia dos Santos Mermelstein e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programas de Núcleo de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB).

**Somos aprendizes de uma arte na qual ninguém se torna mestre.  
(Ernest Heminwhay)**

**Dedico este trabalho à minha mãe, Julemes,  
pelo apoio incondicional.**

## ABREVIACOES

**ADP** – Adenosina difosfato  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**BMP-4** – Proteína Morfogenética Óssea 4  
**CAMs** – Moléculas de Adesão Celular  
**CCD** – “Charged coupled device” – câmara digital  
**DAPI** – 4, 6-diamidino-2-fenilindole  
**DGC** – Complexo Distroglicano  
**DIC** – contraste diferencial interferencial  
**DNA** – Ácido desoxirribonucléico  
**FAK** – Cinase de Adesão Focal  
**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína  
**hpf** – Horas Pós-Fertilização  
**MAPs** – Proteínas Associadas à Microtúbulos  
**MRF** – Fator Regulatório Miogênico  
**NIH** – Instituto de Saúde Nacional Americano  
**nSMF** – Miofibrilas não-Estriadas  
**PARVA** – Parvina  $\alpha$   
**PARVB** – Parvina  $\beta$   
**PARVG** – Parvina  $\gamma$   
**PBS** – Tampão fosfato salino  
**PFA** – Paraformaldeido  
**RNA** – Ácido Ribonucléico  
**RNA-m** - Ácido Ribonucléico Mensageiro  
**SFLS** – Estruturas Semelhantes à Fibras de Estresse  
**SHh** – Sonic Hedgehog  
**TGF- $\beta$** - Fator de Crescimento Tumoral  $\beta$   
**TRIS** – Tris-hidroximetil-aminometano  
**TRITC** - Isotiocianato de tetraetilrodamina  
**TRITON X-100** – t-octilfenoxipolietoxietanol

**Estudo de proteínas do citoesqueleto e de adesão na miogênese do peixe-zebra (*Danio rerio*)**

**SUMÁRIO**

<b>I) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1) CITOESQUELETO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1) Microfilamentos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2) Filamentos Intermediários.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3) Microtúbulos.....</b>	<b>5</b>
<b>2) MIOGÊNESE E MIOFIBRILOGÊNESE.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1) SARCÔMERO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2) ASPECTOS DA EVOLUÇÃO DE MÚSCULO EM INVERTEBRADOS E VERTEBRADOS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3) ADESÃO CELULAR.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3a) Adesão Célula-Célula.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3b) Adesão Célula-Matriz Extracelular (Contatos Focais).....</b>	<b>16</b>
<b>3) MATRIZ EXTRACELULAR.....</b>	<b>21</b>
<b>4) COMPLEXO DE ADESÃO ASSOCIADO À DISTROFINA.....</b>	<b>22</b>
<b>5) PEIXE-ZEBRA COMO MODELO.....</b>	<b>25</b>
<b>6) MIOFIBRILOGÊNESE NO PEIXE-ZEBRA.....</b>	<b>27</b>
<b>II) OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>III) MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>1) Manutenção do Estoque de Peixes.....</b>	<b>32</b>
<b>2) Marcação Imunológica de Embriões.....</b>	<b>33</b>
<b>3) Microscopia Óptica e Aquisição de Imagens.....</b>	<b>34</b>
<b>IV) RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>V) DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>VI) CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>VIII) ANEXOS (ARTIGOS PUBLICADOS).....</b>	<b>87</b>

## **LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS**

### **5) INTRODUÇÃO**

Tabela 1- Classificação e Distribuição dos Filamentos Intermediários.....	5
Esquema 1 – Miogênese: Modelo Clássico em Células de Galinha.....	7
Esquema 2 – Estrutura do Sarcômero.....	8
Esquema 3 – Proteínas associadas à actina: tropomiosina e troponina.....	9
Esquema 4 – Molécula de Caderina.....	14
Esquema 5 – Molécula de Integrina.....	16
Esquema 6 – Estrutura do Contato Focal.....	18
Esquema 7 – Principais Estruturas de Adesão Focal e Célula-Célula.....	20
Esquema 8 – Principais Componentes da Matriz Extracelular.....	21
Esquema 9 – Complexo de Proteínas Associadas à Distrofina.....	23
Figura 1 - Peixe-Zebra Adulto.....	26
Figura 2 – Embriões de Peixe-Zebra.....	27

### **1) MATERIAIS E MÉTODOS**

Tabela 2 – Anticorpos Primários.....	35
Tabela 3 – Anticorpos Secundários.....	36
Tabela 4 – Sondas.....	36

### **RESULTADOS**

Figura 3 - Contraste interferencial (DIC) mostrando os primeiros somitos no embrião de peixe-zebra com 24 hpf nos somitos de 24-30.....	41
Figura 4 - Imunofluorescência com anticorpo anti-desmina nos somitos 26 a 28 em embriões de 24 hpf.....	42
Figura 5 -Imunofluorescência com anticorpo anti-vimentina em embriões de peixe-zebra com 48 hpf.....	43
Figura 6 - Imunofluorescência com decodificação de cor para $\alpha$ -actinina nos somitos 24 e 25 em embriões de 24 hpf.....	44

Figura 7 -Imunofluorescência com anticorpo anti- $\alpha$ -actina sarcomérica em embriões de 48 hpf.....	45
Figura 8 -Imunofluorescência com anticorpo anti-troponina T no somito 20 em embriões de 48 hpf.....	46
Figura 9 - Imunofluorescência com anticorpo anti-titina no somito 20, de um embrião jovem (24 hpf) e no somito 20 em embriões mais maduros (48hpf).....	47
Figura 10 - Imunofluorescência com anticorpo anti-vinculina e com a sonda faloidina nos somitos 24 a 27 de embriões de 24 hpf.....	48
Figura 11 - Imunofluorescência com anticorpo anti-vinculina e com a sonda faloidina nos somitos 23 a 26 em embriões de 48 hpf.....	49
Figura 12 - Imunofluorescência com anticorpo anti-distrofina nos somitos 23 a 25 em embriões de peixe-zebra com 48 hpf.....	50
Figura 13 - Imunofluorescência com anticorpo anti-paxilina em embriões de 48 hpf de peixe-zebra.....	51
Figura 14 -Imunofluorescência com anticorpo e anti-caderina em embriões de 48 hpf de peixe-zebra .....	52
Figura 15 - Caderina subcortical em embriões de peixe-zebra com 24hpf.....	53
Figura 16 - Imunofluorescência com anticorpo anti- $\beta$ -catenina em embriões de 48 hpf de peixe-zebra.....	54
Figura 17 - Imunofluorescência com anticorpo anti-integrina $\beta$ 1 em embriões de 48 hpf de peixe-zebra.....	55
Figura 18 - Imunofluorescência com anticorpo anti-fibronectina em embriões de 48 hpf de peixe-zebra.....	56
Figura 19 - Miogênese: modelo clássico <i>in vitro</i> .....	57
Figura 20 - Miogênese no peixe-zebra <i>in situ</i> .....	58

## RESUMO

O modelo de miogênese atual tem como base estudos *in vitro* em cultura de células e em menor proporção estudos em embriões de aves e mamíferos. Enquanto as condições isoladas e artificiais criadas em cultura de células permitem análises estruturais minuciosas, as estruturas celulares *in situ* são mais difíceis de secção e manipulação. Para sobrepor estas dificuldades, nós utilizamos embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) que são opticamente transparentes e fáceis de manipular. Monitoramos a expressão de proteínas citoesqueléticas e de adesão (desmina,  $\alpha$ -actinina, troponina, titina, vimentina, paxilina, vinculina, integrina e distrofina), proteínas de adesão célula-célula (caderina e  $\beta$ -catenina) e proteínas de matriz extracelular (laminina, e fibronectina) utilizando microscopia de imunofluorescência, subtração de fundo e contraste diferencial interferencial de embriões de peixe-zebra de 24-48 hpf (horas pós-fertilização). Em miótomos maduros, mioblastos mononucleados exibem estriação periódica para todas as proteínas sarcoméricas testadas. As mudanças na distribuição de desmina de agregados a perinuclear e estriada, embora siga a mesma sequência, ocorre muito mais rápido que em outros modelos estudados. Todas as células positivas para desmina apresentaram as demais proteínas miofibrilares presentes e estriadas, ao contrário do que ocorre em células em cultura. Vimentina apresenta-se estriada em células maduras, enquanto esta é “down-regulated” em estudos em cultura. O septo de tecido conjuntivo entre os somitos foi positivo para proteínas de adesão como vinculina, integrina e paxilina, ao invés da disposição em placas isoladas observadas em cultura. Caderina se distribui em agregados em células musculares e se apresenta mediando adesão intercelular em células epiteliais. As diferenças da miogênese *in situ* no peixe-zebra e cultura de células *in vitro* sugerem que algumas estruturas previamente observadas e distribuição de proteínas em cultura possam ser artefatos metodológicos. Considerando os estudos em miogênese em cultura, propomos, comparativamente um modelo de miogênese em embriões de peixe-zebra.

## **ABSTRACT**

The current myogenesis model has been based mostly on *in vitro* cell culture studies, and, to a lesser extent, on *in situ* studies in avian and mammalian embryos. While the more isolated artificial conditions of cells in culture permitted careful structural analysis, the actual *in situ* cellular structures have not been described in detail because the embryos are more difficult to section and manipulate. To overcome these difficulties, we used the optically clear and easy to handle embryos of zebrafish *Danio rerio*. We monitored the expression of cytoskeletal and cell-adhesion proteins (desmin,  $\alpha$ -actinin, troponin, titin, vimentin, paxillin, vinculin, integrin and dystrophin), cell-cell adhesion proteins (cadherin and  $\beta$ -catenin) and extracellular matrix proteins (laminin and fibronectin) using immunofluorescence microscopy and video-enhanced, background-subtracted, differential interference contrast of 24 to 48 hpf (hours post-fertilization) zebrafish embryos. In the mature myotome, the mononucleated myoblasts displayed periodic striations for all sarcomeric proteins tested. The changes in desmin distribution from aggregates to perinuclear and striated forms, although following the same sequence, occurred much faster than in others models. All desmin-positive cells were also positive for myofibrillar proteins and striated, in contrast to that which occurs in cultures. Vimentin appeared to be striated in mature cells, while it is developmentally down-regulated *in vitro*. The whole connective tissue septum between the somites was positive for adhesion such as vinculin, integrin and paxillin, instead of the isolated plaques observed in cell cultures. Cadherin was distributed in aggregates in muscle cells and in epithelial cells appears mediating intercellular adhesion. The differences in the myogenesis of zebrafish *in situ* and in cell culture *in vitro* suggest that some of the previously observed structures and protein distributions in cultures could be methodological artifacts. Considering the myogenesis studies in cell culture, we propose, comparatively, a model for myogenesis in zebrafish embryos

# **I) INTRODUÇÃO**

## **1) Citoesqueleto**

O citoplasma das células eucarióticas é espacialmente organizado por uma complexa rede de filamentos protéicos chamada de citoesqueleto. Esta estrutura é altamente dinâmica e se reorganiza continuamente à medida que a célula muda de forma divide-se e responde ao seu microambiente. É responsável pela distribuição das células pelo substrato, pela organização que possibilita a contração muscular e pelas inúmeras mudanças de forma que ocorrem em um embrião de vertebrado em desenvolvimento. O citoesqueleto fornece a maquinaria necessária aos movimentos intracelulares, como o transporte de vesículas e organelas e para a segregação dos cromossomos na mitose, mantendo a compartimentalização de funções celulares de forma altamente organizada. Também participa das vias de comunicação entre as células e destas com o meio extracelular.

O citoesqueleto nas células musculares se dispõe de forma particular de maneira a permitir a organização de uma miofibrila funcional. Os principais componentes dos sarcômeros no músculo estriado são os microfilamentos de actina, que determinam a Banda I e os filamentos espessos de miosina que formam a Banda A. Recentemente, se identificou um sistema composto por moléculas de titina, maior proteína já identificada em vertebrados e um quarto sistema formado por moléculas da proteína nebulina que se associa ao longo dos filamentos de actina (Clark et al., 2002). A função destes dois últimos sistemas seria a de servir como “molde molecular” para o assentamento de outras proteínas típicas de células

musculares durante a embriogênese e também fornecer apoio e resistência, ajudando a manter a integridade estrutural do músculo durante a contração (Gregorio et al., 1999).

### **1.1) Microfilamentos**

A actina é uma proteína ubiquitária componente dos microfilamentos e possui diversas funções na célula como: motilidade, citocinese e contração. Os filamentos de actina são formados por  $\alpha$ -hélices que se associam com proteínas regulatórias como troponina e tropomiosina. Existem duas isoformas para actina nos músculos estriados, a esquelética e a cardíaca, que são diferentes de isoformas de células de músculo liso e não musculares, sendo cada uma destas variantes de actina codificada por um gene diferente (Schiaffino e Reggiani, 1996). As isoformas de actina são freqüentemente classificadas em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e estudos recentes indicam que o controle fino da expressão destas isoformas de actina é crítica para a manutenção da estrutura e função do músculo (Clark et al., 2002).

A actina existe como monômero globular chamado actina-G e na sua forma polimérica filamentosa chamada actina-F, a qual é constituída por uma cadeia linear de subunidades de actina-G. Cada molécula de actina contém um íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) complexado a cada ATP ou ADP, sendo que os estados predominantes de apresentação da actina na célula são a de ATP-actina-G e ADP-actina-F. A interconversão de ATP e ADP de actina são importantes para o arranjo do citoesqueleto.

## 1.2) Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários formam uma trama que se irradia do núcleo e se estende até a periferia das células. São estruturas estáveis formadas por proteínas específicas que variam de acordo com o tipo celular (**Tabela 1**). A desmina (52 kDa) é o filamento intermediário predominante em músculo estriado, compondo a região de linha Z do sarcômero, costâmeros (estruturas subsarcolemais que conferem sustentação e permitem a manutenção da integridade quando da contração muscular, resistindo ao estiramento), junção miotendinosa e discos intercalares. No músculo maduro os filamentos de desmina, interligam linhas Z, possivelmente através da interação com nebulina, integram miofibrilas, núcleo, mitocôndria e provavelmente microtúbulos (Costa et al., 2004). Estudos recentes mostram que a desmina liga o sarcolema ao envelope nuclear através de ligação à anquirina, outros componentes do costâmeros e lamina B (Capetanaki et al., 1997). Durante o desenvolvimento, a expressão de desmina antecede a de todos os genes estruturais específicos de músculo e fatores de transcrição como MyoD, miogenina e MRF4, com exceção de Myf-5, indicando que a desmina desempenha papel importante no recrutamento e diferenciação muscular (Capetanaki et al., 1997). Porém, este filamento intermediário não parece ser essencial para o desempenho da função muscular, mas contribui na manutenção da integridade e alinhamento de miofibrilas em desenvolvimento ou regeneração (Clark et al., 2002). Outros filamentos intermediários característicos de músculo estriado são: vimentina (55 kDa), nestina (240 kDa), sinemina (230 kDa) e paranemina (178 kDa).

A vimentina é o filamento intermediário predominante durante o desenvolvimento de músculo estriado, sendo sua expressão significativa em mioblastos replicantes (Schultheiss

et al., 1991). Apresenta uma distribuição semelhante à desmina que é perdida após a maturação do músculo. A nestina é expressa nas junções miotendinosa e neuromuscular, durante o desenvolvimento e regeneração muscular, colocalizando com a vimentina e estando ausente ou pouco expressa no músculo adulto. Sinemina e paranemina, são filamentos intermediários associados à desmina e vimentina e ainda não são funcionalmente bem definidos.

Recentemente, identificou-se dois novos filamentos intermediários: desmuslina e sincoilina que se associam à  $\alpha$ -distrobrevina, componente do complexo de adesão associado à distrofina, e que colocalizam com desmina nas linhas Z. Já as citoqueratinas, são expressas em células epiteliais, mas também são expressas no músculo em regiões do costâmero próximas ao sarcolema, parecendo cooperar com a desmina e suas moléculas associadas, na organização e estabilização do mioplasma e do sarcolema. Dentre os filamentos intermediários, os únicos expressos de forma ubíqua são as laminas (60-75 kDa) que estabilizam o envelope nuclear e funcionam como sítios de ancoragem para as proteínas intracelulares e cromossomas. As isoformas deste filamento expressas em músculo podem ser do tipo A (laminas A e C) e do tipo B (laminas B1 e B2). As laminas do tipo A, se ligam à proteína emerina (34 kDa), estando a ausência desta proteína associada à uma distrofia ligada ao cromossoma X que determina fraqueza, defeitos da condução no músculo cardíaco e repentina falência cardíaca (Clark et al., 2002).

Outros exemplos de filamentos intermediários são: G.F.A.P. (proteína acídica fibrilar glial) em células gliais; neurofilamentos em células neuronais e periferinas em células do sistema nervoso periférico. Dentre estes últimos, a periferina, por exemplo, é um filamento intermediário do tipo III, expresso em neurônios motores, sensoriais e do sistema nervoso

simpático, exclusivamente. É expressa durante o crescimento axonal e sua síntese parece ser necessária para a regeneração axonal em adultos (Portier et al., 1993).

### Classificação e Distribuição dos Filamentos Intermediários

<b>Tipo I</b>	queratinas ácidas	células epiteliais
<b>Tipo II</b>	queratinas básicas e neutras	células epiteliais
<b>Tipo III</b>	desmina, vimentina, G.F.A.P., periferina	células musculares  células mesenquimais, cancerosas e em cultura,  células gliais
<b>Tipo IV</b>	neurofilamentos e internexina	neurônios
<b>Tipo V</b>	laminas A, B e C	ubiquitárias
<b>Tipo VI</b>	nestina e sinemina (proteínas de alto peso molecular)	células musculares  neurônios
<b>Tipo VII</b>	paranemina, filensina e faquinina	retina

**Tabela 1**

### 1.3) Microtúbulos

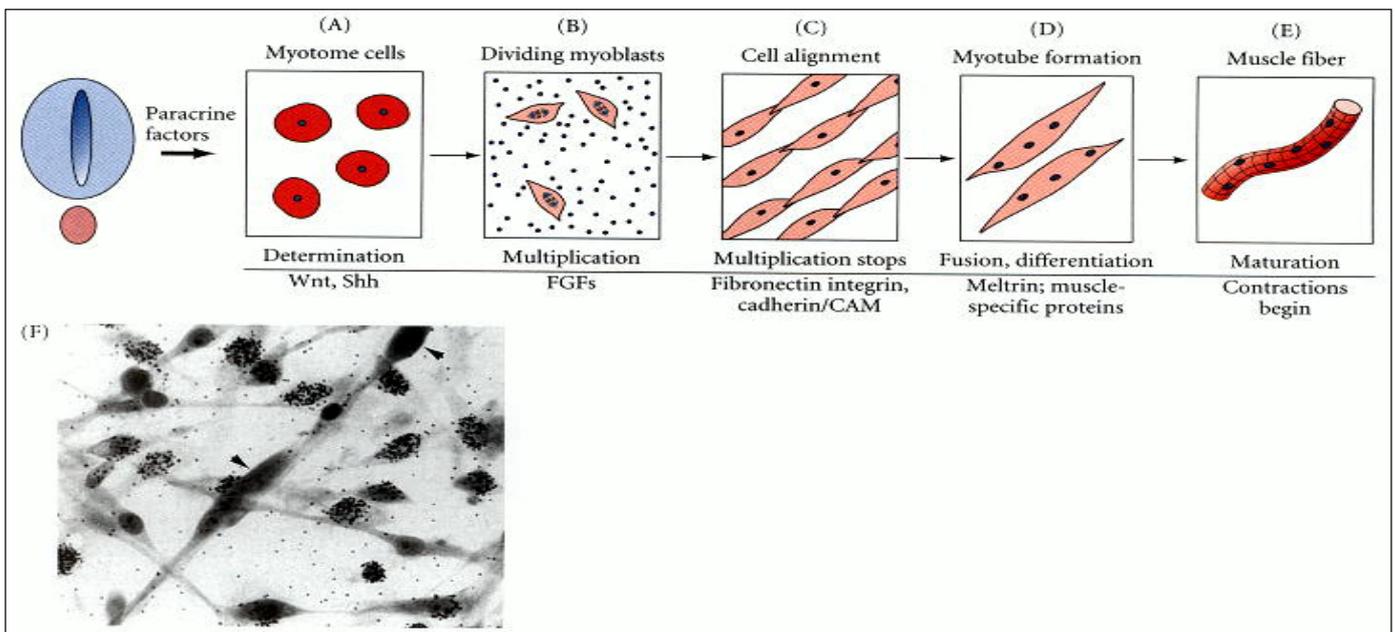
Os microtúbulos estão envolvidos em diferentes processos celulares como transporte intracelular, distribuição de organelas, motilidade celular e mitose. Pouco se sabe sobre o papel de microtúbulos no músculo estriado, mas parecem estar envolvidos na diferenciação,

morfologia e atividade contrátil destas células (McElhinny et al., 2004). Estruturalmente são polímeros de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas (55 kDa cada) que são compostos por diferentes isoformas dependendo do tipo celular. Existem proteínas associadas a microtúbulos (MAPs) sendo que a MAP-4 é específica de músculo, assim como a proteína MURF-3 (“muscle ring finger protein”) que se localiza com microtúbulos e linhas Z dos sarcômeros, sendo fundamentais para formação de miotubos e, possivelmente, atuando na estabilização e sinalização de microtúbulos (Gregorio et al., 2005).

## 2) Miogênese e Miofibrilogênese

Durante a somitogênese, separam-se células precursoras do tecido muscular de origem mesodérmica, os pré-mioblastos. Mas estas células somente irão se diferenciar quando atuarem fatores de regulação como *myf5*, *myoD*, *Miogenina (mgn)* e *MRF4*, porém os dois primeiros são expressos em mioblastos em proliferação, enquanto os dois últimos fatores são ativados durante a diferenciação de mioblastos (Pownall et al., 2002). A primeira proteína estrutural e exclusiva de músculo a ser observada é o filamento intermediário desmina sendo inicialmente expressa ao redor dos núcleos e depois ocupa toda a extensão da célula. Os mioblastos são células replicantes que proliferam um determinado número de vezes, depois se alongam, se alinham ao mesmo tempo que começam a expressar outras proteínas musculares como  $\alpha$ -actinina e titina e passam a se chamar miócitos. A marcação de  $\alpha$ -actinina permite a caracterização de estruturas semelhantes a fibras de estresse (SFLS) e de miofibrilas não-estriadas (nSMF), que precedem a formação das miofibrilas propriamente ditas. Segue-se então a fusão dos miócitos que são não-replicantes a outros

miócitos ou a miotubos. Estes últimos são multinucleados e possuem as primeiras proteínas contráteis expressas e estriadas, apresentando um padrão estrutural particular que define a unidade contrátil do músculo, o sarcômero (**Esquema 1**). Os estudos acima mencionados foram realizados em modelos *in vitro*.



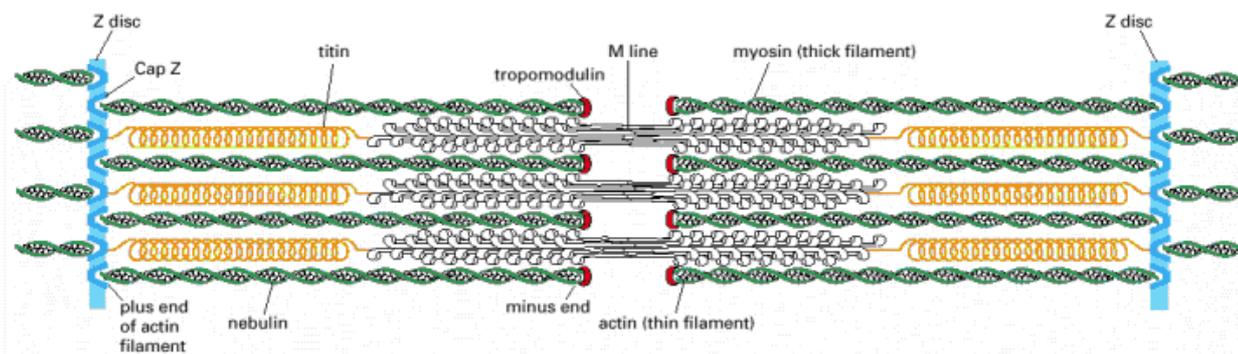
**Esquema 1: Miogênese - modelo clássico em células de galinha (a partir de Gilbert, 2000).**

## 2.1) O Sarcômero

Em células musculares adultas, o sarcômero é a unidade de contração. Este é composto por filamentos finos de actina entrelaçados com filamentos grossos de miosina (**Esquema 2**). O modelo clássico foi proposto por Huxley, em 1954, a partir de imagens de microscopia de luz polarizada (Huxley e Niedergerke, 1954). Um sarcômero, com aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$ , espaço este delimitado por duas linhas Z, compostas por  $\alpha$ -

actinina e talvez actina, e linhas M, compostas por miomesina e proteína C, e cuja função é interligar lateralmente filamentos finos e grossos, respectivamente.

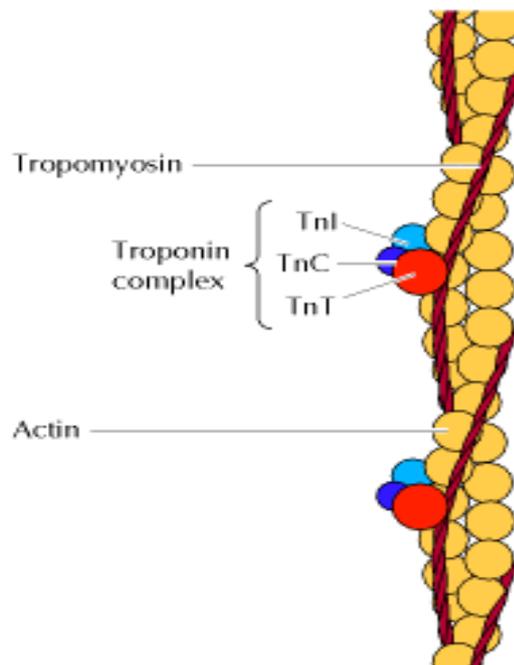
A região dos filamentos de actina, com 1µm, aproximadamente (separada por α-actinina) é chamada de banda I (isotrópica ou clara) e a região dos filamentos de miosina de banda A (anisotrópica ou escura). Estabelecendo o papel de ligação da linha Z à linha M do sarcômero, estão proteínas de alto peso molecular como titina (3000 kDa) e nebulina (900 kDa) conferindo resistência durante as contrações celulares evitando o estiramento muscular (Gregorio et al., 1999). Diferentes proteínas se associam à actina e participam da estabilidade da miofibrila como troponina, nebulina e tropomiosina.



**Esquema 2: Estrutura do Sarcômero (Alberts et al., 2004).**

A tropomiosina (36 kDa) compõe um grupo de proteínas diméricas ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  ou  $\alpha\beta$ ) que confere resistência estrutural ao filamento de actina (**Esquema 3**). O deslocamento da tropomiosina em relação à actina aumenta a probabilidade de ocorrer a ligação da actina com a miosina, ou seja, possuindo papel fundamental na contração e no relaxamento muscular (Gordon et al., 2000). A troponina é também uma proteína associada à actina, podendo ser encontrada em três subunidades: troponina T (39kD), que liga a troponina à tropomiosina, Troponina C (17 kDa) que liga íons  $Ca^{2+}$  e a Troponina I (31 kDa), que se

caracteriza pela propriedade inibitória sobre a actomiosina ATPase e possui capacidade de ligação à actina (Schiaffino e Reggiani, 1996). Por combinação alternativa podem-se desenvolver modificações nas regiões N e C-terminal da tropomiosina e troponina T e promovendo diferentes respostas cálcio-dependentes ao longo do desenvolvimento de células musculares (Schiaffino e Reggiani, 1996).



**Esquema 3 : Proteínas associadas à actina: tropomiosina e o complexo de troponinas T, I e C (Cooper, 2000).**

Outras proteínas sarcoméricas serão discutidas posteriormente, porém outra proteína de especial interesse estando também associada à actina é a nebulina (900 kDa). A porção N-terminal da proteína, nas linhas Z interage com  $\alpha$ -actinina. Duas moléculas de nebulina se associam a um único filamento de actina, atuando como “régua molecular” na determinação do tamanho do filamento (Schiaffino e Reggiani, 1996).

## 2.2) Aspectos da Evolução de Músculo em Invertebrados e Vertebrados

O processo de formação das unidades contráteis musculares desperta interesse em diferentes áreas de pesquisa, que utilizam, por vezes, modelos de estudo dos mais diversos. Além disto, interesse particular há na evolução deste processo, isto porque ao longo do desenvolvimento, determinados reguladores de transcrição assim como algumas proteínas ubíquas musculares como actina e miosina e proteínas associadas a estas apresentam profunda homologia.

Os músculos esqueléticos derivam dos somitos os quais se originam do mesoderma paraxial. A especificação de células progenitoras de músculo depende da indução de sinais advindos de tecidos adjacentes como o tubo neural, a notocorda e dos ectodermas dorsal e lateral. Em resposta a estas induções, os precursores de células musculares, os mioblastos, começam a expressar diferentes ativadores transcricionais que controlam a expressão de genes musculares estruturais. Uma família de 4 genes identificada em mamíferos e em pássaros inclui *MyoD*, *miogenina*, *myf5* e *MRF4*. Em invertebrados, foram mais estudados os homólogos de *MyoD* em *Drosophila* e em *Caenorhabditis elegans*, que foram denominados, respectivamente, Nautilus e CeMyoD, sendo que a função destes homólogos ainda não está muito clara, isto porque o bloqueio da expressão destes se reflete em que apenas algumas células musculares que não se diferenciam, ou ainda está relacionada a defeitos na miogênese apenas, embora os músculos estriados se formem da mesma maneira.

Comentando mais especificamente a expressão de Fatores Regulatórios Miogênicos (MRF), estudos em vertebrados mostram que *Myf5* se expressa primeiramente na região dorso-medial do somito em resposta a sinais vindos do tubo neural e da notocorda (axiais)

via hedgehog e proteína Wnt1. Já o MyoD se apresenta primeiramente em células da região lateral dos somitos pela sinalização vinda do ectoderma dorsal via Wnt7. Em invertebrados como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, assim como em vertebrados inferiores como no sapo *Xenopus laevis*, no peixe-zebra, *Danio rerio* e na truta *Oncorhynchus mykiss*, identificou-se homólogos do MyoD que podem possuir até duas cópias, sendo como em *Xenopus*, onde um dos genes MyoD transcrito atua no momento de desenvolvimento mais primordial por parte do embrião, enquanto um segundo transcrito de MyoD vai se acumulando depois da ativação da somitogênese e do programa de formação de músculo, ou seja, cada gene está sendo expresso no momento do desenvolvimento mais conveniente. Além destas sinalizações, interações locais do tipo célula-célula também são fundamentais para a miogênese, isto porque as células embrionárias para se diferenciar em músculo precisam estar agrupadas e o tamanho destas estruturas formadas depende, dentre outros fatores do chamado “Community Effect”, onde atuam proteínas como as Moléculas de Adesão Celular (CAMs) e N-caderina, sendo que esta última pode suprimir a expressão do MyoD em alguns estágios mais anteriores de desenvolvimento (George-Weinstein et al., 1997).

Ainda em *Xenopus laevis* ao contrário do peixe e em vertebrados superiores, não se identificou um transcrito para miogenina durante a miogênese primária, o que pode estar relacionado à fase inicial de miogênese em sapos que não apresenta fusão de mioblastos, o que se confirma em estudos *in vitro* mostrando que mioblastos negativos para miogenina não se fundem. Por outro lado, durante o desenvolvimento de fibras musculares secundárias em *Xenopus laevis*, observa-se acumulação do transcrito para miogenina que se correlaciona

com aparecimento de cadeias pesadas de miosina indicando a organização em músculo adulto.

Em *Caenorhabditis elegans* a organização em músculo estriado é bem simples: formações musculares (“body-wall muscle”) que se expandem longitudinalmente abaixo da cutícula do corpo do animal promovendo ondas de contração que determinam a locomoção deste invertebrado. As células musculares em *Caenorhabditis elegans* não se fundem como em mamíferos e não se conhece ainda equivalentes de células precursoras musculares (satélites) nestes organismos. Porém com relação às proteínas que constituem o sarcômero, observou-se, recentemente, extenso grau de homologia entre as proteínas do complexo glicoproteico associado à distrofina (DGC) como sintrofina, distrobrevina, distroglicanos e distrofina. Também a actina que é proteína ubiquitária em células eucarióticas e desempenha importante papel estrutural, de geração de força contrátil e motilidade em células musculares e não-musculares, possui pelo menos duas isoformas em ascídias e um vasto número de homólogos em músculos de invertebrados.

Os pontos abordados acima indicam que ao longo da evolução, determinados fatores como a manutenção de proteínas musculares estruturais, como actina, têm se conservado em razão do papel único desempenhado por esta proteína em células musculares, para juntamente com a miosina e proteínas associadas promover contração. Além disto, apesar das diferenças no desenvolvimento muscular de mamíferos e peixes, a ação de indução contrária de hedgehog e proteína BMP-4, que sendo produzida no mesoderma lateral impede a expressão do MyoD e diferenciação precoce no domínio lateral dos somitos, se mantém conservada ao longo da escala evolutiva. Aliado a estes fatores evolutivos, estão os fatores ambientais como temperatura, por exemplo, que pode determinar a ativação de genes

do tipo MRF em algumas espécies de peixe e que poderia explicar um processo de miogênese mais rápido em embriões de peixes e anfíbios, já que se desenvolvem em condições ambientais adversas, sem constantes, diferentemente do que ocorre em mamíferos. Ou seja, a evolução é fundamental para o melhor entendimento dos programas de diferenciação que os diferentes animais desenvolvem assim como no estudo de patologias e escolha, por exemplo, de um modelo de estudo para determinado evento celular que se busque maiores conhecimentos.

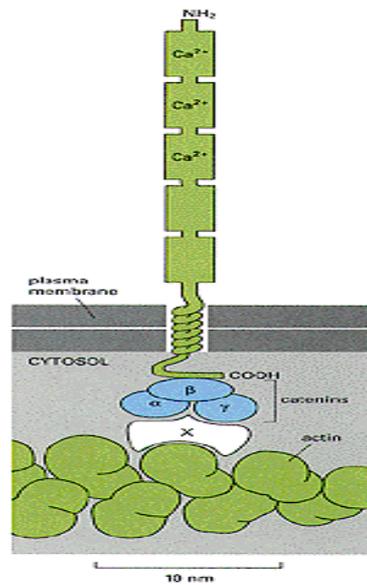
### **2.3) Adesão Celular**

As interações adesivas compreendem regiões de contato entre uma célula e sua matriz extracelular ou entre células adjacentes que regulam a sua morfologia, propriedades de migração, crescimento, diferenciação e apoptose. Um dos modelos para estudo de adesão à matriz extracelular é a adesão focal (Burrige et al., 1996, Zamir et al., 1999).

As principais famílias de proteínas que medeiam as adesões célula-célula e célula-matriz são, respectivamente, a das caderinas e a das integrinas.

#### **2.3a) Adesão Célula-Célula**

Em vertebrados, duas classes distintas de moléculas de adesão célula-célula atuam em vias dependentes ou independentes de  $Ca^{2+}$ . As caderinas (**Esquema 4**) constituem o grupo de proteínas de adesão celular que medeiam adesão célula-célula dependente de  $Ca^{2+}$  e esta atividade é regulada por interações citoplasmáticas entre caderinas, cateninas e o citoesqueleto de actina (Hazan et al., 1997).



**Esquema 4: Molécula de caderina (Alberts et al., 2004).**

As caderinas possuem domínios extracelulares com resíduos iguais, sendo os membros da superfamília de caderinas divididos em tipo clássico e tipo protocaderina (Suzuki et al., 1996). Estudos recentes têm mostrado importante papel das caderinas clássicas na adesão celular, morfogênese e outros processos biológicos que ocorrem durante a vida embrionária de vertebrados. A injeção de RNA-m no estágio de duas a quatro células suprime a expressão de MyoD (George-Weinstein et al., 1997). A expressão de MyoD é restaurada com a coinjeção de um m-RNA para caderina N ou E, ou seja há um papel para as caderinas na expressão do MyoD (George-Weinstein et al., 1997). Interessantemente, caderinas do tipo clássico têm sido encontradas apenas em vertebrados, enquanto caderinas do tipo protocaderina tem sido identificadas em diversos organismos multicelulares em número superior à do tipo clássico. As moléculas envolvidas na adesão célula-célula em um mecanismo independente de  $\text{Ca}^{2+}$  são as CAMs (“cell adhesion molecule”).

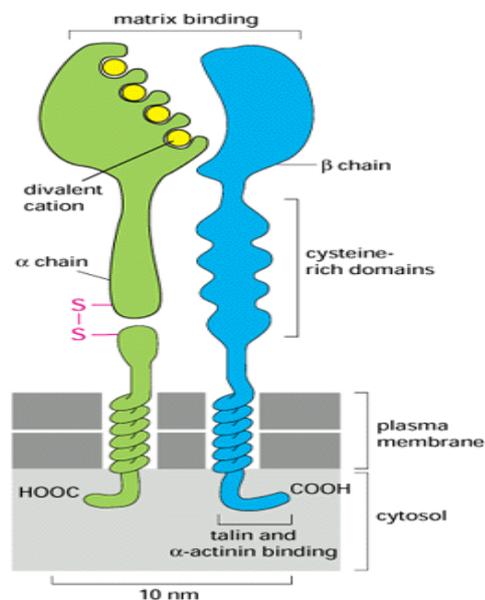
Uma variedade de tipos celulares que expressa caderinas tem demonstrado capacidade de promoção de adesão célula-célula de forma específica. A caderina E é o

principal subtipo expresso em células epiteliais polarizadas, enquanto os subtipos E e P de caderina são expressos por células epiteliais escamosas. N-caderina é expressa por cardiomiócitos em desenvolvimento e maduros e parece desempenhar papel importante na interação entre os miócitos e na miofibrilogênese. A N-caderina funciona no nervo como uma molécula de adesão célula-célula, assim como no músculo esquelético em desenvolvimento. N-caderina é expressa por fibroblastos de galinha de cultura primária de células, enquanto a P-caderina foi identificada em linhagem de fibroblastos de ratos, na epiderme e em células placentárias (Knudsen et al., 1995).

A  $\alpha$ -catenina (105 kDa), é fundamental para a ancoragem transmembrana de caderinas e mutações desta proteína impedem a adequada adesão, porém alguns animais mutados exibem adesão e se especula que caderinas estejam mediando estas interações citoplasmáticas com o citoesqueleto envolvendo vinculina. A  $\alpha$ -catenina acopla-se com o citoesqueleto de actina, pois se liga à  $\beta$ -catenina (94 kDa), e à actina. Também se liga à  $\alpha$ -actinina e à espectrina, mas o papel destas interações ainda é desconhecido (Hazan et al., 1997). As caderinas também participam de eventos de sinalização da célula que afetam a diferenciação celular, proliferação, migração, organização do citoesqueleto e controle do crescimento celular (Angst et al., 2001; Steinberg et al., 1999). A interação do complexo caderina/catenina com a actina não está bem elucidada, já que alguns trabalhos mostram que esta interação se dá via  $\alpha$ -actinina (Knudsen et al., 1995) enquanto outros indicam que a ligação com o citoesqueleto de actina ocorre via vinculina (Hazan et al., 1997).

### 2.3b) Adesão Célula-Matriz Extracelular (Contatos Focais)

Este modelo de interação é mediado via receptores transmembrana chamados integrinas, que estabelecem ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina, se apresentando como “clusters” que determinam as adesões e os complexos focais, onde se inserem proteínas associadas e outras moléculas de sinalização (Schoenwaelder et al., 1999). As integrinas são heterodímeros  $\alpha\beta$ , sendo que as subunidades  $\alpha$  possuem peso entre 120 e 180 kDa e se associam não-covalentemente às subunidades  $\beta$  que compreendem peso entre 90 e 110 kDa (Hynes, 1992). As integrinas (**Esquema 5**) funcionam como sensores do microambiente da matriz extracelular, sendo essenciais para a migração, crescimento e invasão celular. Possuem papel central na organização do citoesqueleto de actina em sítios de adesão à matriz extracelular.



**Esquema 5: Molécula de integrina (Alberts et al., 2004).**

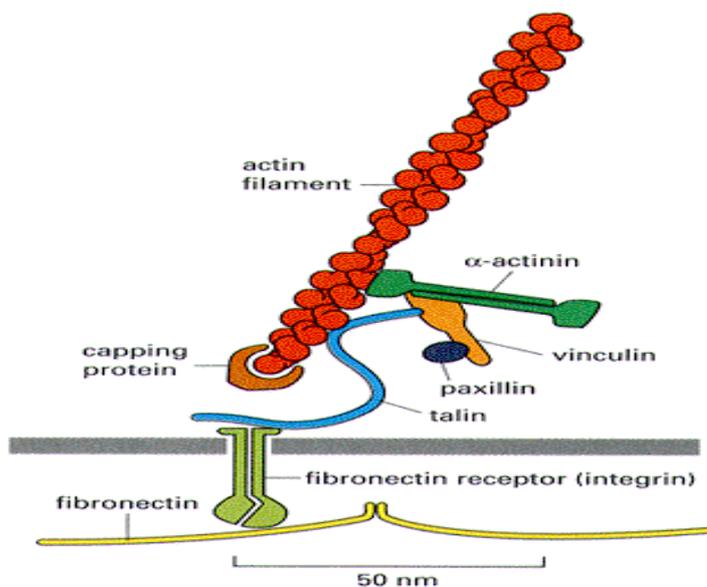
As integrinas também regulam vias de sinalização entre componentes da família das RhoGTPases como Cdc42, Rac e Rho, que podem influenciar e coordenar a dinâmica e estrutura de processos formados por actina como filopódios, lamelipódios e formação de fibras de stress (Martin et al., 2002).  $\alpha$ -Actinina, vinculina e talina são componentes estruturais importantes envolvidos na estabilidade e formação de adesões focais.

A  $\alpha$ -actinina é uma proteína expressa de forma ubíqua, que pertence à família das proteínas associadas à actina e possui homologia estrutural com distrofina, espectrina e fimbrina. (Izaguirre et al., 2001). Desempenha importante papel na regulação de fibras de stress, sendo que juntamente com vinculina e talina está estruturalmente relacionada à formação e estabilidade de adesões focais, parecendo ligar diretamente filamentos de actina aos receptores do tipo integrina. (Greenwood et al., 2000). Recentemente demonstrou-se que a  $\alpha$ -actinina expressa em plaquetas ativadas é tirosina fosforilada, sendo esta idêntica à isoforma citoesquelética não-muscular. (Izaguirre et al., 2001). Estudos indicam que esta isoforma de  $\alpha$ -actinina é substrato para cinase de adesão focal (FAK), podendo mediar sinais dependentes desta enzima, o que se reflete em impactos na organização do citoesqueleto (Izaguirre et al., 2001). Estudos recentes mostram que  $\alpha$ -actinina, vinculina e talina são as primeiras três proteínas que seguem o recrutamento de FAK e sua localização com agregados de integrina (Izaguirre et al., 2001). Recentemente, demonstrou-se que a  $\alpha$ -actinina e não a vinculina se colocaliza em fibroblastos, ao complexo caderina-catenina, sendo proposto que este complexo se liga ao citoesqueleto de actina via uma interação direta entre  $\alpha$ -catenina e  $\alpha$ -actinina. (Knudsen et al., 1995). A organização destes complexos de adesão depende não somente destas proteínas citoesqueléticas estruturais, mas também de

diferentes proteínas do tipo tirosina-quinase, como membros da família Src e FAK (Parsons et al., 2000).

A vinculina (116 kDa) está presente em contatos célula-célula e célula-substrato e possui a capacidade de se ligar diretamente à actina e está associada também à talina e  $\alpha$ -actinina *in vitro* (Burrige e Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Interage também com a integrina a proteína paxilina (68 kDa), envolvida em contatos focais (**Esquema 6**) como vinculina e talina, sendo encontrada de outras formas associada ao citoesqueleto de actina, como nas placas densas de músculo liso e junção miotendinosa em músculos estriado esquelético (Turner et al., 1991). A talina (270 kDa) liga diretamente o receptor integrina ao citoesqueleto de actina e possui sítio de interação com a vinculina. Estudos recentes mostram que a talina está associada à miosina de classe VII, participando no processo de adesão célula-célula e célula-substrato com o citoesqueleto de actina sendo esta interação profundamente conservada (Titus, 2005).



**Esquema 6: Estrutura do contato focal (Alberts et al., 2004).**

Recentemente se identificou a proteína lailina (55 kDa) que representa um sítio de ligação para talina em “ruffles” ou protusões móveis e transitórias de membrana que as células exibem, quando em cultura, porém não é expressa em adesão focal. O papel da lailina em “ruffles” de membrana ainda não é conhecido, mas sabe-se que de alguma forma faz-se necessária na presença destas “especializações” de membrana e não no caso de adesão focal mediada por integrinas (Bono et al., 2001).

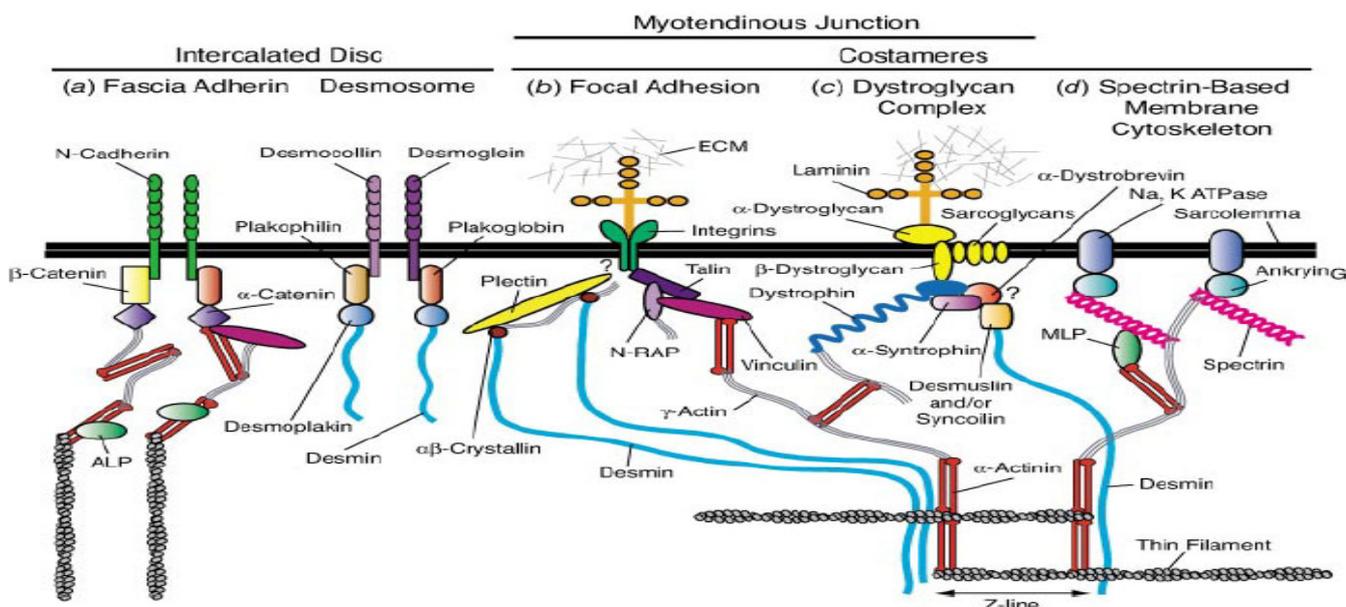
Outro grupo de proteínas importante nas junções adesivas é a das plectinas (500 kDa) que pertencem à família das plaquinas cujos membros são desmoplaquinas, plectinas, envoplaquina, periplaquina e epiplaquina, dentre outros, num total de sete proteínas. Muitas plaquinas são expressas em tecidos submetidos, freqüentemente, a estresse como epitélio e músculo, interligando filamentos do citoesqueleto e os ancorando a complexos de adesão na membrana, mantendo a integridade do tecido. A desmoplaquina, por exemplo, é encontrada em junções adesivas do tipo desmossoma ancorando filamentos intermediários à membrana plasmática, ou seja, desempenhando função fundamental na manutenção da integridade tecidual (Leung et al., 2002). A plectina é uma proteína citoesquelética que interage com actina e filamentos intermediários sendo encontrada em diferentes tecidos exceto na maioria dos neurônios (Stenbock et al., 1999). Desempenha papel de interligação de filamentos intermediários a microtúbulos, se associa a hemidesmossomos e desmossomos em células epiteliais. A plectina apresenta-se expressa consideravelmente em adesões focais e em fibras de stress. Na célula muscular esta plaquina é encontrada principalmente nas linhas Z em músculo estriado, placas densas em músculo liso e discos intercalares em músculo cardíaco (Leung et al., 2002).

Outra família de proteínas envolvidas na ligação de integrinas e proteínas associadas com mecanismos intracelulares de sinalização é a das parvinas. As isoformas  $\alpha$  (PARVA) e

$\beta$  (PARVB) estão localizadas nas adesões focais e possuem importante função na adesão, espreadimento e motilidade celular (Sepulveda e Wu, 2006).

As parvinas participam de interações como quinase associada à integrina, paxilina,  $\alpha$ -actinina e proteínas de matriz extracelular, são expressas em células de músculo cardíaco e esquelético de mamíferos, no baço e em plaquetas. Já a isoforma  $\gamma$  (PARVG) possui uma distribuição mais restrita a tecidos linfóides e hematopoiéticos. A PARVA se associa à actina filamentosa (actina-F) com afinidade comparável a outras proteínas classicamente conhecidas como de associação à actina. Trabalhos mostram em alguns tipos de células epiteliais a presença de PARVA em adesões célula-célula ricas em caderina e catenina, enquanto que em células musculares as proteínas parvinas desempenham funções de manutenção da integridade física e de mecanismos de sinalização (Sepulveda e Wu, 2006).

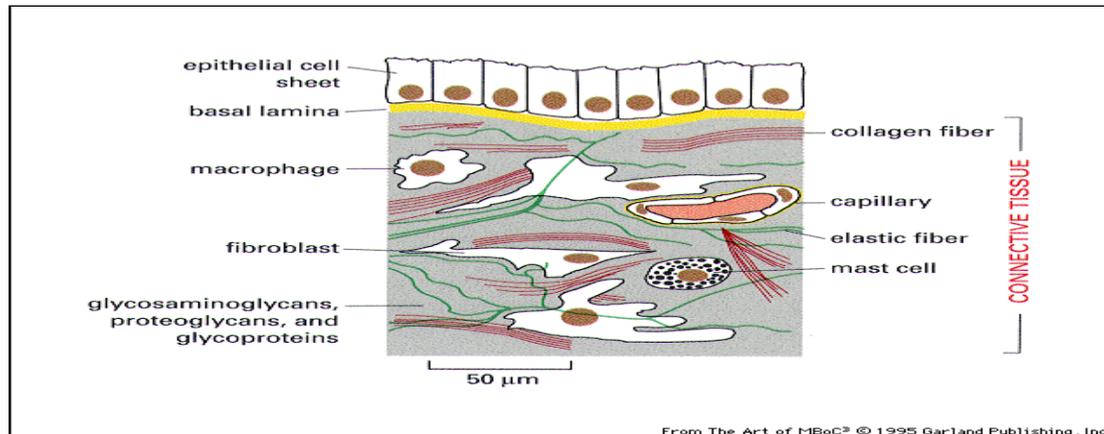
No **Esquema 7** são mostradas as principais proteínas que integram e se associam para formar os diferentes complexos estruturais de adesão atualmente identificados.



**Esquema 7: Principais estruturas de adesão focal e célula-célula (adaptado de Clark et al., 2002).**

### 3) Matriz Extracelular

A matriz extracelular é constituída por uma mescla de polímeros formada por proteínas multiméricas, sendo o seu arranjo resultado da interação com seus próprios componentes e com outras proteínas de matriz (**Esquema 8**).



**Esquema 8: Principais componentes da matriz extracelular (Alberts et al., 2004).**

Por exemplo, interações com a proteína transmembrana integrina são necessárias para a disposição correta de fibronectina e laminina, sendo que para esta última proteína, além das integrinas interage com o distroglicano via isoforma- $\alpha 2$  (Schwarzbauer, 1999). Não se sabe ainda a relação entre estes sistemas de adesão mediados por integrina e distrofina, mas alguns trabalhos mencionam que a disposição de laminina em oligômeros possa ser iniciada por distroglicanos, e então as integrinas poderiam mediar um rearranjo destes oligômeros de maneira a originar o padrão de entremeado, de rede poligonal (Schwarzbauer, 1999). Proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno formam arranjos protéicos diferenciados de acordo com condições específicas da composição e arquitetura do tecido.

Fibronectina (130 kDa) é uma proteína multifuncional de matriz extracelular com uma variedade de sítios de ligação para outras moléculas extracelulares. Indicou-se

recentemente que a fibronectina pode estar envolvida em processos de morfogênese, assim como poderia regular a diferenciação celular e migração (Schwarzbauer et al., 1999; Miyamoto et al., 1995). A laminina (900 kDa) representa uma família de proteínas, sendo todas estas glicoproteínas extracelulares heterotriméricas que contém cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A laminina  $\alpha$ -2 faz a ligação do citoesqueleto à matriz extracelular em células musculares. Não se conhece ainda a importância desta proteína no sistema nervoso e na regeneração de neuronal periférica (McGowan et al., 2000). O colágeno é o principal componente, quantitativamente da matriz extracelular de músculo (Capetanaki et al., 1997).

#### **4) Complexo de adesão associado à distrofina**

A proteína distrofina (427 kDa) predominantemente expressa em músculo estriado, possui quatro domínios protéicos, sendo que os três primeiros exibem seqüência homóloga a proteínas citoesqueléticas como  $\alpha$ -actinina e espectrina; um domínio amino-terminal de ligação à actina, um domínio em bastão com estrutura em tripla hélice; um domínio rico em cisteína e um domínio carboxi-terminal (Rybakova et al., 1996). A deficiência de distrofina resulta em perda da integridade do complexo glicoprotéico associado e da membrana do sarcômero, desorganização da transmissão de força via costâmeros e distrofia muscular severa, ou seja, a distrofina desempenha um papel fundamental na manutenção da ligação do citoesqueleto de actina à matriz extracelular para manutenção da integridade muscular.

Estudos recentes mostraram que, possivelmente, a distrofina esteja fazendo a interação através de filamentos de  $\gamma$ -actina com o citoesqueleto cortical ficando de forma adjacente à membrana sarcolemal num arranjo denominado costâmeros. Estas estruturas transmitem força durante a contração lateralmente através da membrana sarcolemal para a



Os distroglicanos podem ser do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ , derivados de um único ARN-m que sofreu uma modificação pós-traducional dando origem a dois tipos de distroglicanos. O  $\alpha$ -distroglicano é uma proteína de interação extracelular e se associa à laminina  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2 na lâmina basal e à agrina. Quanto ao  $\beta$ -distroglicano, é uma proteína transmembrana que se associa à distrofina e através desta ao citoesqueleto de actina e tem sido mostrado também que interage com utrofina, uma proteína homóloga autossômica da distrofina (Durbeej et al., 1998). Distroglicanos também são expressos em diferentes tipos celulares, dentre estes, células não-musculares, indicando sua importância não só para o músculo. Por exemplo,  $\alpha$ -distroglicano é expresso na membrana das células de Schwann juntamente com Dp116 e utrofina onde estaria se associando a componentes de matriz extracelular como laminina  $\alpha$ -2 e agrina também expressas nestas células (Durbeej et al., 1998). No sistema nervoso central os distroglicanos são expressos em diferentes tipos celulares como células de Purkinje no cerebelo e na interface glia-sistema vascular, onde se associa à laminina  $\alpha$ -2, sugerindo que possui um papel na manutenção da barreira hematoencefálica (Tian et al., 1996), também na retina, em células epiteliais e em tecidos embrionários, onde aparece numa distribuição perinuclear na maioria das células, tendo importância fundamental na formação da membrana de Reichert e na membrana que separa endoderma e ectoderma visceral (Williamson et al., 1999). A deleção total do distroglicano, em camundongos é letal já durante o desenvolvimento embrionário, evidenciando o quanto importante é a função desta molécula (Ehmsen et al., 2002).

Integrando também o complexo associado à distrofina estão os sarcoglicanos que compreendem cinco proteínas do tipo transmembrana, todas expressas em músculo

esquelético como os sarcoglicanos  $\alpha$  (50 kDa), também chamada adalina,  $\beta$  (43 kDa),  $\delta$  (35kDa),  $\gamma$  (35 kDa) e  $\epsilon$  (50 kDa). Sendo que o sarcoglicano  $\gamma$  se associa diretamente à distrofina (Chan et al., 1998). O sarcospan (25 kDa) é uma proteína de membrana com quatro domínios transmembrana sendo expresso predominantemente em células de músculo estriado e cardíaco, enquanto as sintrofinas (58 kDa) são expressas em três isoformas na junção neuromuscular, sendo apenas as isoformas  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  presentes no sarcolema (Ehmsen et al., 2002). Recentemente, se identificou caveolina-3, pela primeira vez em células musculares.

As caveolinas são proteínas características de regiões especializadas da membrana plasmática, denominadas cavéolas, sendo encontradas em diferentes tipos celulares. Recentemente, identificou-se caveolina-3, pela primeira vez, em células musculares associada ao complexo de adesão via  $\beta$ -dístroglicano (Sotgia et al., 2000). Também foi descrita ligação de  $\beta$ -dístroglicano à caveolina-1 e à filamina, proteína associada à actina e responsável pela organização da actina cortical, nas quais as integrinas e os complexos de adesão focal estão ancorados (Halayko e Stelmack, 2005).

## **6) O Peixe-Zebra como modelo**

O peixe-zebra (Fig 1) é um vertebrado cujos embriões se desenvolvem externa e rapidamente e são opticamente transparentes (Fig 2). Vantagens como estas permitem observação do processo de divisões celulares por microscopia em “time-lapse”, utilização de microinjeção de corantes, e expressão alterada de genes por microinjeção de RNA-m e

DNA (Stickney et al., 2000), além de uso da microscopia óptica com campo claro, contraste diferencial interferencial (DIC) e imunofluorescência. O peixe tem sido um sistema interessante para estudo do arranjo de miofibrilas através da indução de mutações, constituindo importante modelo genético por seu tamanho relativamente pequeno, cerca de 5-6 cm, o que permite trabalhos com uma amostragem considerável, tempo de geração curto (2-4 meses) e produção de mais de 200 embriões por fêmea em uma semana (Barut et al., 2000).

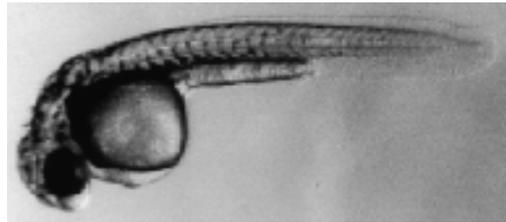


**Figura 1: Peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto.**

Além disto, o desenvolvimento da musculatura é rápido e já temporalmente conhecido: todos os miótomos estão formados nas 30 hpf (horas pós-fertilização), células do músculo esquelético axial estão estriadas até 36 h (Stickney et al., 2000). O peixe-zebra inicia seus movimentos com 18 hpf, e estão nadando perfeitamente após 4 dias, iniciando neste momento o aporte de alimentação exógeno (Felsenfeld et al., 1990). Através de métodos de microscopia simples como o contraste diferencial interferencial (DIC), pode-se observar a definição dos septos entre os somitos e estriação ao longo do embrião de peixe-zebra (Fig 3, resultados).

Trabalhos recentes têm identificado alguma homologia, em peixe-zebra, para proteínas de matriz extracelular, como fibronectina (Zhao et al., 2001), de adesão como caderina (Bitzur et al., 1994), intracelulares e associadas à actina como distrofina (Chambers et al., 2001) e a cinase de adesão focal (FAK) (Henry et al., 2001), envolvida em contatos

focais. Assim como estudos com peixes mutantes para proteínas como laminina tem possibilitado associação com alterações na formação do notocorda e a ausente expressão de distroglicanos associada com distrofia muscular severa (Parsons et al., 2002). Além disso, o peixe-zebra vem sendo utilizado para estudo de doenças humanas (Dooley et al., 2000).



**Figura 2: Embrião de peixe-zebra com 33 horas de desenvolvimento. Os somitos podem ser observados na parte superior do embrião (a partir de [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/figs/fig29.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/figs/fig29.html)).**

Apesar da utilização do peixe-zebra em estudos de desenvolvimento, diferenciação e genética, pouco se conhece do seu desenvolvimento muscular assim como de sua miofibrilogênese. Por isto se torna um modelo interessante para estudo de diferenciação e citoesqueleto em células musculares.

## **6) MIOFIBRILOGÊNESE NO PEIXE-ZEBRA**

O músculo de peixe é segregado em regiões homogêneas em fibras do tipo rápido e lento estando as fibras de característica lenta localizadas em região lateral do miótomo de peixe-zebra adulto. Já as fibras rápidas estão localizadas em porções mais profundas do miótomo. As fibras lentas são menores, escuras e mais amplamente vascularizadas que as fibras rápidas (Stickney et al., 2000). A região adjacente à notocorda sinaliza para indução

de músculo lento sendo esta hipótese confirmada com a caracterização por estudos em mutantes de peixe-zebra *floating head (flh)*, *no tail (ntl)* e *bozozok (boz)* onde defeitos no desenvolvimento da notocorda ocasionam deficiente expressão de *myoD* nas células adaxiais, nos precursores musculares e no miosepto. Porém se observa recuperação de precursores musculares quando são transplantadas notocordas do tipo selvagem para estes mutantes (Halpern et al., 1993), estudos sugerem que a indução via notocorda pela secreção de Sonic hedgehog resulte no desenvolvimento de precursores musculares e expansão de fibras do tipo lento (Stickney et al., 2000). Pouco se conhece sobre os precursores e fatores de indução de músculo rápido no peixe-zebra, porém Shh (Sonic-Hedgehog) e o Fator de Crescimento Tumoral (TGF- $\beta$ ) parecem sinalizar para a especificar este tipo muscular, além disto Meng et al. (1999), identificou uma nova proteína “zinc-finger” de peixe-zebra, *terra*, que está expressa no mesoderma lateral pré-somítico e nos últimos 2 ou 3 somitos formados, mas não é encontrada em células adaxiais. Estes dados sugerem importante papel de *terra* no desenvolvimento de células musculares rápidas em peixe-zebra porque a superexpressão de Shh ocasiona em redução ou ausência de fibras musculares rápidas e também da expressão de *terra*.

Cogita-se que na fase 24-36 hpf, esteja na cauda cerca de 70% do volume muscular do peixe (Felsenfeld et al., 1990). A somitogênese inicia-se precocemente, isto porque os primeiros somitos se desenvolvem com 10,5 hpf, outros somitos surgem em intervalos de 30min em um arranjo bilateral, simétrico, no sentido antero-posterior até um total de 30 pares de somitos (Stickney et al., 2000).

Um dos poucos estudos que existem sobre a miogênese no peixe-zebra comparou o processo normal com o de mutantes com distúrbios de motilidade *fub-1*, e relatou que o

processo era basicamente o mesmo do descrito em outros animais (Felsenfeld et al., 1991). Caracterizaram-se também duas populações de fibras musculares onde as miofibrilas contêm misturas de cadeias brancas; intermediárias e pesadas de miosina, Bryson-Richardson e colaboradores realizaram estudos em peixe-zebra e identificaram a presença de cadeias pesadas de miosina do tipo rápido e lento em músculo lento de peixe-zebra. A isoforma lenta de cadeia pesada de miosina é expressa em células adaxiais até a etapa de 18-somitos, quando a expressão se expande às células de músculo rápido. No estágio de 26-somitos quando a migração adaxial se completa, não se observa expressão de miosina de cadeia pesada do tipo lento em músculo superficial lento ou células musculares precursoras, mas se mantém em células musculares rápidas.

Estudos recentes (Kudo et al., 2004) caracterizaram a proteína periostina no peixe-zebra, evidenciando que possui papel fundamental na formação do miosepto do embrião. A periostina é uma proteína secretada de 86 kDa que se acumula no substrato e pode se ligar à integrina  $\alpha\beta5, \alpha\beta3$  em células de carcinoma ovariano (Gillan et al., 2002) determinando motilidade celular. E alguns estudos sugerem que a periostina ligue à integrina  $\alpha7\beta1$  (Mayer et al., 1997) sugerindo que esta possa atuar na formação dos sarcômeros, considerando função na miogênese das integrinas  $\beta1$  (Schwander et al., 2003). Além disto, outra proteína de transdução de sinais de integrina, a FAK (quinase de adesão focal), foi descrita em peixe-zebra concentrada nas regiões intersomíticas (Henry et al., 2001) corroborando a importância das integrinas e de moléculas associadas a esta na miogênese do peixe. Tratamento de células miogênicas com morfólino antisense para periostina, provocou desorganização da estrutura da sarcolema, dos miofilamentos e a motilidade do embrião também foi afetada (Kudo et al., 2004), porém proteínas de matriz extracelular, como

laminina e tenascina que integram o miosepto no sentido transversal, compensaram algumas alterações advindas da supressão de periostina.

Considerando os aspectos acima abordados para as diferentes proteínas citoesqueléticas e de adesão nos propusemos a estudar características particulares da miogênese e miofibrilogênese no embrião do peixe-zebra. Considerando a riqueza de informações que este modelo pode oferecer e a falta de detalhe estrutural na literatura sobre miogênese e adesão realizada *in situ*, podemos com nosso propósito, ao realizar esta pesquisa, prestar uma contribuição à este campo do conhecimento.

## **II) OBJETIVOS**

- \* Estudar as particularidades da miogênese do peixe-zebra (*Danio rerio*) *in situ*;
- \* Comparar aspectos da miogênese *in vitro* e *in situ* considerando o modelo do peixe-zebra;
- \* Caracterizar a distribuição e organização de proteínas do citoesqueleto que integram o sistema de adesão durante a miogênese do peixe-zebra seja na adesão célula-célula ou na adesão célula- substrato;
- \* Avaliar como ocorre a determinação dos processos de fusão e estriação no peixe-zebra através marcações para proteínas que são expressas, precocemente, no desenvolvimento muscular;
- \* Elaborar esquematicamente um padrão de miogênese no peixe-zebra comparativo com o padrão de miogênese descritos na literatura para embrião de galinha;
- \* Estudar e representar esquematicamente o padrão de expressão e de distribuição de desmina, principal filamento intermediário de células musculares, e sua proteínas associadas nos diferentes tipos musculares.

### **III) MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1) Manutenção do estoque de peixes**

Para que fosse possível obter embriões para realização dos experimentos, construímos um biotério onde existe regulação do ciclo de luz de 14 horas, disposição dos peixes machos e fêmeas em tanques de 12 litros mantidos a 28°C com água destilada acrescida de sais essenciais (“Egg Water”). Os peixes eram alimentados 3 vezes ao dia, em razão dos possíveis resíduos de comida, existia também um sistema de lâmpada UV que permitiria após exposição diária de 1 hora em cada tanque, diminuição considerável do número de microorganismos presentes na água, assim também como pelo tratamento desta com uma solução fungicida de 0,01% de azul de metileno. Existia também um sistema de filtros mecânicos (com lã de vidro, cascalho e carvão ativado) em número de dois por tanque e também um filtro externo para manutenção da qualidade da água e aeração adequada.

A limpeza e troca de água para retirada dos detritos eram realizadas sempre que necessário, muitas vezes diariamente. Antes de restabelecer o nível de água após a limpeza, ajustava-se o pH para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio 1M, porém também se realizava, através de pHmetro, a aferição diária dos valores de pH de cada um dos tanques, visando evitar variações extremas ou bruscas que poderiam estressar os peixes e alterar o seu metabolismo. Caso necessário ajustava-se o pH diretamente nos tanques para 6,8-7,0.

Os embriões eram obtidos dispondo-se a proporção de 3 fêmeas para 2 machos em tanque de fertilização que permitia a separação dos ovos no dia seguinte assim que o ciclo de luz se iniciava. Após coletados, os ovos eram tratados com solução de hipoclorito 5% por

um período de 1 minuto sob agitação, seguido de duas passadas para água limpa, para impedir o crescimento de fungos. Os embriões eram mantidos em tanques com aeração até que completassem 24 ou 48 h pós-fertilização quando eram fixados e decorionados por dissecação em lupa, para realização de experimentos de marcação imunológica.

## **2) Marcação Imunológica de Embriões**

Os embriões de peixe-zebra decorionados com idade de 24 ou 48h foram fixados em paraformaldeído 4% (PFA) por 10 minutos. Foram então permeabilizados com 0,5% de Triton em PBS 1X concentrado através de 5 lavagens de 3 minutos cada, à temperatura ambiente e leve agitação. Eram então incubados por 1 hora a 37°C com anticorpo primário (**Tabela 2**) na diluição adequada, sendo após este processo repetidas as lavagens em PBS/Triton X-100 0,5% até incubação nas mesmas condições com o anticorpo secundário ligado a fluorocromo (**Tabela 3**). Para marcação de núcleo, incubava-se com a sonda DAPI (4,6-diamino-2-fenilidole dihidroclorato) por 1 minuto em NaCl 0,9%, à temperatura ambiente e sob agitação. Os embriões também podiam ser lavados em PBS 1X e corados com faloidina conjugada à rodamina para revelar actina filamentosa. Ao final das marcações, os embriões eram montados usando espaçadores em lâminas de microscópio.

Foram feitas marcações em embriões de peixe-zebra utilizando somente o(s) anticorpo(s) secundário(s), omitindo-se o(s) anticorpo(s) primário(s) para fins de controle de marcações inespecíficas dos anticorpos. Não foram observadas marcações positivas nestes experimentos.

### **3) Microscopia Óptica e Aquisição de Imagens**

As lâminas montadas foram observadas em microscópio invertido do tipo Axiovert 100 (Zeiss, Alemanha) utilizando os filtros de fluorescência apropriados, polarização, DIC (contraste diferencial interferencial) e/ou contraste de fase. As imagens podiam ser adquiridas por fotografia usando um filme Tmax ASA 400 ou por uma câmera de vídeo CCD modelo C2400 (Hamamatsu, Japão) controlada por um processador de imagem Argus-20 (Zeiss, Alemanha). A unidade Argus possuía uma interface SCSI com um computador modelo Optiplex (Dell Computers, EUA), que utilizava o software de processamento e análise de imagens ImagePro-plus (Media Cybernetics, EUA), e um programa de aquisição de imagens especialmente feito para isto (incluindo um procedimento de reconstrução tri-dimensional a partir de seções ópticas de contraste interferencial ou de fluorescência). As imagens podiam também ser enviadas para um computador Macintosh Quadra 840AV e utilizadas com o software de imagens NIH Image (desenvolvido no National Institutes of Health, EUA).

## ANTICORPOS E/OU DILUIÇÕES UTILIZADOS

### I) ANTICORPOS PRIMÁRIOS:

**Tabela 2**

<b>ANTICORPOS PRIMÁRIOS</b>	<b>TIPO</b>	<b>FEITO EM</b>	<b>DILUIÇÃO UTILIZADA</b>	<b>ORIGEM DO ANTÍGENO</b>	<b>FIRMA</b>	<b>Nº CATÁLOGO</b>
anti- $\alpha$ -actinina sarcomérica EA53	monoclonal	Camundongo	1:100	Coelho	Sigma	A-7811
anti-titina T11	monoclonal	Camundongo	1:100	Galinha	Sigma	T-9030
anti- $\alpha$ -actinina de plaqueta	policlonal	Coelho	1:50	Humana	Doação Yanick Gache	-
anti-troponina TJLT-12	monoclonal	Camundongo	1:100	Coelho	Sigma	T-6277
anti-desmina	policlonal	Coelho	1:50	Galinha	Sigma	D-8281
anti-Pan caderina	policlonal	Coelho	1:50	Galinha	Sigma	C3678
anti- $\beta$ -catenina	policlonal	Coelho	1:50	Humana Camundongo	Sigma	C2206
anti- $\beta$ 1-integrina	monoclonal	Camundongo	1:100	-	Sigma	I8638
anti-vinculina VIN-11-5	monoclonal	Camundongo	1:100	Galinha	Sigma	V4505
anti-paxilina	monoclonal	Camundongo	1:100	-	Transduction Lab	-
anti-distrofina	monoclonal	Camundongo	1:100	Humana	Sigma	D8168
anti-fibronectina	policlonal	Coelho	1:100	Humana	Sigma	F3648

**Tabela 3**

<b>ANTICORPOS SECUNDÁRIOS</b>	<b>FEITO EM</b>	<b>DILUIÇÃO UTILIZADA</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>Nº CATÁLOGO</b>
anti-IgG de camundongo- FITC	Cabra	1:100/1:50	Sigma	F-5262
anti-IgG de camundongo-TRITC	Cabra	1:100/1:50	Sigma	T-7657
anti-IgG de coelho-FITC	Cabra	1:50/1:100/1:200	Sigma	F-0511
anti-IgG de coelho-TRITC	Cabra	1:50	Sigma	T-6778

**Tabela 4****SONDAS**

<b>SONDA</b>	<b>MARCAÇÃO</b>	<b>DILUIÇÃO UTILIZADA</b>	<b>FLUOROCROMO CONJUGADO</b>
FALOIDINA (Conjugada à Rodamina)	F-actina	1:50	Rodamina
DAPI	Núcleo	1:1500	-

## **IV) RESULTADOS**

Por serem translúcidos, os embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) permitem um estudo estrutural detalhado de características celulares que não são tão facilmente observáveis em outros modelos biológicos. Através de métodos de microscopia simples como o contraste diferencial interfencial (DIC), pode-se observar bem os limites entre septos e somitos, além das primeiras estriações miofibrilares visualizadas ao longo do embrião de peixe-zebra (Fig 3).

Em peixe-zebra, a desmina aparece como pequenos aglomerados em células mais jovens. Em células mais velhas, a desmina aparece perfeitamente estriada, além de distribuída em volta do núcleo (Fig 4, Costa et al., 2002). O padrão periódico de marcação de desmina encontrado no peixe geralmente só é observado em músculo cardíaco, em miotubos de músculo esquelético ou em células mononucleadas induzidas pelo gene myoD. Filamentos Intermediários como vimentina apresentam-se estriados em embriões maduros (Costa et al., 2003, Fig 5). Alfa-actinina aparece perfeitamente estriada, permitindo a contagem de algo em torno de  $30 \pm 5$  sarcômeros em cada mioblasto, delimitado pelos septos entre os miótomos e cuja marcação é mostrada em diferentes profundidades decodificadas por cor (Fig 6). Proteínas miofibrilares e citoesqueléticas como  $\alpha$ -actina sarcomérica (Fig 7), troponina T (Fig 8) e titina (Fig 9, Costa et al., 2002), se apresentaram estriadas desde os somitos mais jovens, sendo que não foi possível determinar a interface de tempo em que estas proteínas estão acumulando suas isoformas e estejam ainda não estriadas. Possivelmente a interface seja temporalmente mais rápida ou inexista no peixe-zebra.

A Figura **10** mostra a marcação para vinculina (verde) em embriões de 24 horas pós-fertilização (hpf). Vemos que a marcação de vinculina se dispõe ao longo do septo de tecido conjuntivo entre os somitos, sendo que a distribuição de actina filamentosa, evidenciada pela sonda faloidina, parece estar ancorada na junção intersomitos, terminando sua marcação onde começa a de vinculina, estando esta funcionando como sítio de ancoragem. Em alguns somitos jovens (mais caudais) podemos observar início da expressão de vinculina, da mesma forma que a marcação para a proteína existe também onde se está ainda iniciando a septogênese (seta).

Na Figura **11** se observa a mesma dupla-marcação em somitos maduros em embriões de peixe-zebra com 48 hpf. A distribuição de vinculina se apresenta de forma mais clara na região intersomitos, de forma contínua ao longo de todo o septo, enquanto a actina se apresenta perfeitamente estriada. Observa-se na marcação em embriões de 48 horas menos regiões de colocalização entre vinculina e actina (amarelo) em comparação aos embriões mais jovens.

Na Figura **12** se evidencia a marcação para distrofina que se mostra ao longo do septo entre os somitos. Possui uma distribuição similar à de vinculina, apesar de estudos anteriores relacionarem co-distribuição destas duas proteínas somente em costâmeros.

Na Figura **13** a marcação de paxilina em embriões jovens de peixe-zebra marca região entre os miótomos, sendo a marcação para a proteína restrita à região de septo de tecido conjuntivo entre os somitos, também relacionada à adesão célula-substrato.

Na marcação de caderina na Figura **14B**, observamos aglomerados pontuais. Esta distribuição apesar de inesperada foi obtida em repetidos experimentos. O padrão de pontos de aglomerados em camadas mais profundas do embrião e em nível do tecido muscular,

como ocorre por Contraste Diferencial Interferencial (DIC), na figura **14A**, podemos observar as estriações características do tipo celular. Além disto, na Figura **15**, podemos observar o padrão de marcação em células epiteliais, utilizado como controle, como característico e descrito na literatura para caderina em adesão célula-célula.

Na figura **16** marcação para  $\beta$ -catenina, evidencia um padrão de distribuição de contato célula-célula, nas junções entre os somitos, considerando esta proteína como associada à caderina em contato célula-célula, a distribuição esperada foi observada em embriões jovens de peixe-zebra.

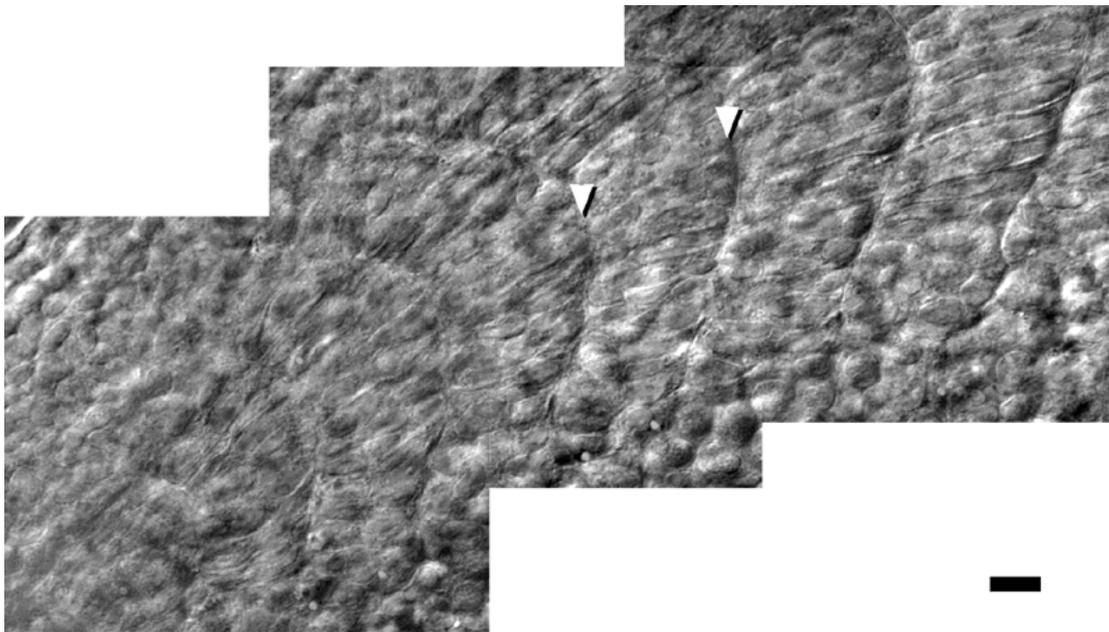
Na figura **17**, a marcação de integrina  $\beta 1$  (vermelho), na região de junção entre os somitos (célula-substrato) mostra-se bem definida, pois em verde podemos evidenciar por marcação para actina pela sonda faloidina (verde) que as miofibrilas estão perfeitamente estriadas e se ancoram nas regiões intersomitos através da ligação via integrina. A marcação com DAPI mostra a marcação dos núcleos.

Na Figura **18**, marcação de fibronectina (verde), uma proteína de matriz extracelular, cuja observação mais criteriosa, permite considerar regiões mais caudais (onde estão as células mais jovens) do embrião onde a marcação para a proteína ainda não está bem definida, estando inicialmente preenchida por actina (vermelho). Em regiões mais anteriores do embrião, a disposição de fibronectina já aparece se restringindo às regiões intersomito (adesão célula-substrato) e se colocaliza em menos locais com a marcação de actina, estando as miofibrilas terminando por se ancorar ao septo intersomito ao qual a fibronectina integra.

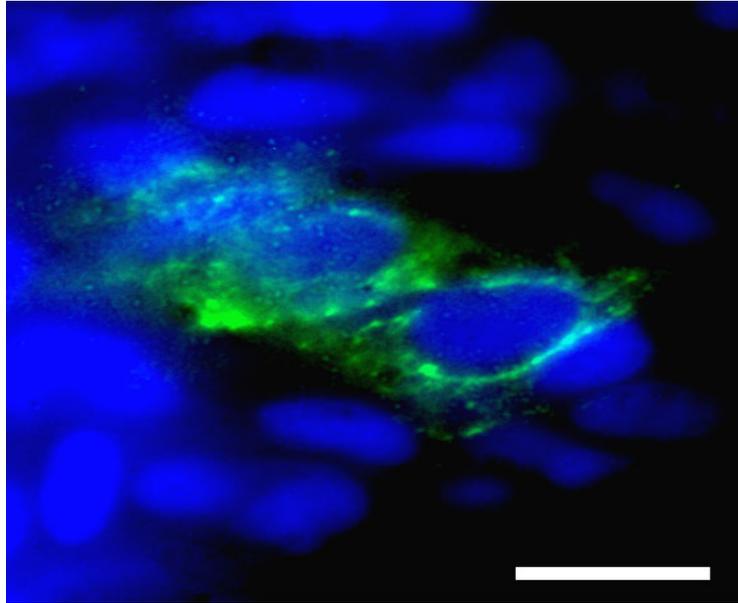
Na figura **19**, esquematicamente dispõe-se o modelo clássico de miogênese *in vitro* em etapas: pré-mioblastos comprometidos com o padrão muscular, replicante e não expressa

nenhuma proteína citoesquelética, numa segunda fase este pré-mioblasto começa a expressar desmina e conforme adquire a forma fusiforme, não mais se divide e inicia a fusão com outros mioblastos para iniciar estriação, culminando com a formação de miofibrilas.

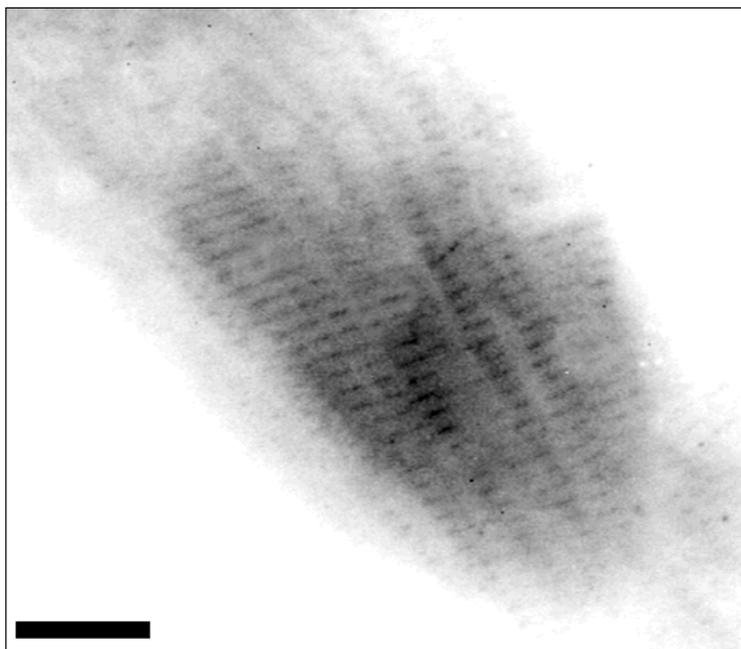
Na figura 20, o esquema de miogênese *in situ* no peixe-zebra representa algumas das particularidades que abordamos para o processo de formação muscular, considerando os resultados que viemos obtendo. Considera-se que a etapa do modelo de miogênese clássica em embrião de galinha em que os mioblastos já fusiformes e não mais replicantes, se fusionam a outros mioblastos para determinar o início da estriação e expressão de proteínas contráteis e citoesqueléticas primordiais, não ocorre. Observamos células mononucleadas e perfeitamente estriadas e positivas para filamentos característicos de músculo.



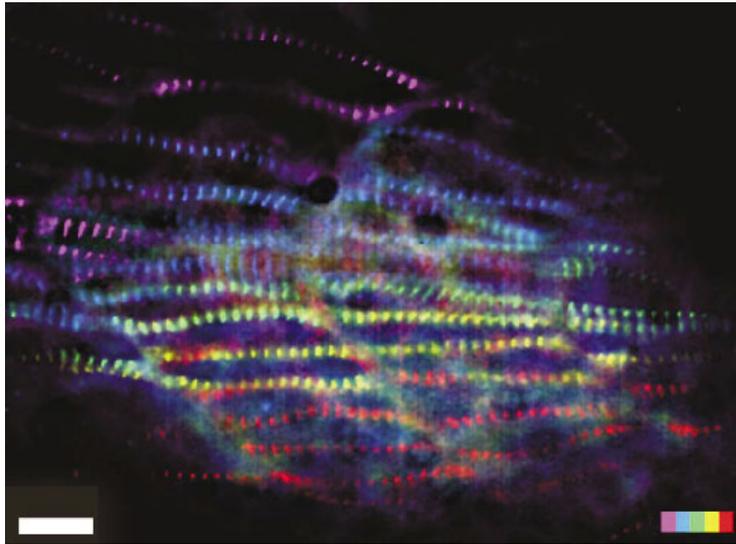
**Fig. 3: Contraste diferencial interferencial (DIC), mostrando a somitogênese nos primeiros somitos do embrião de peixe-zebra (*Danio rerio*) com 24 hpf nos somitos de 24-30. A região anterior (cabeça) do embrião está voltada para a esquerda e a posterior (cauda) está a direita. Barra: 10  $\mu$ m.**



**Fig. 4: Imunofluorescência com anticorpo anti-desmina (verde) nos somitos 26 a 28 em embriões de 24 hpf. Pode-se verificar a marcação perinuclear em células mononucleadas e positivas para desmina. Barra: 10  $\mu$ m.**



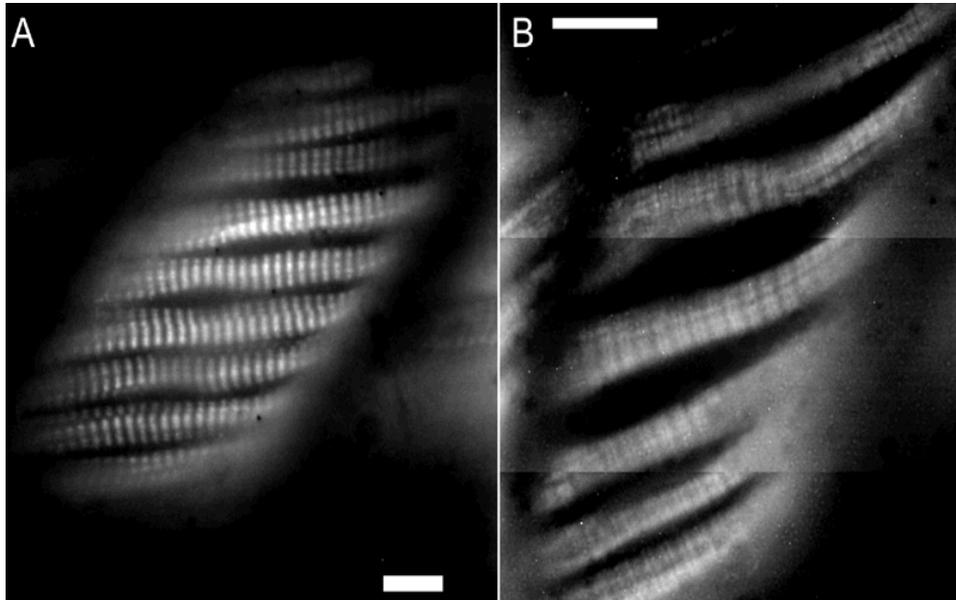
**Fig. 5: Imunofluorescência com anticorpo anti-vimentina em embriões de peixe-zebra com 48 hpf. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .**



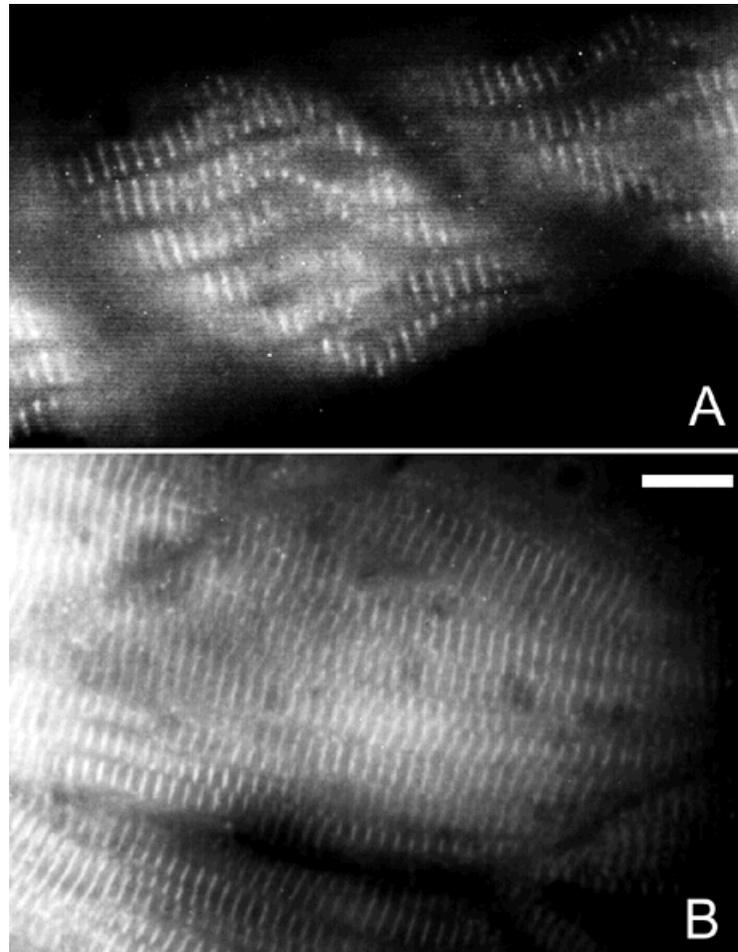
**Fig. 6: Imunofluorescência com decodificação de cor para  $\alpha$ -actinina nos somitos 24 e 25 em embriões de 24 hpf. Projeção codificada por cor de cinco planos focais, separados por 2  $\mu\text{m}$ , obtidos por processamento em computador, de dois miotómos jovens adjacentes. A barra de cor à direita representa cada plano no eixo Z; vermelho é a porção mais superficial e violeta corresponde as fatias mais profundas. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .**



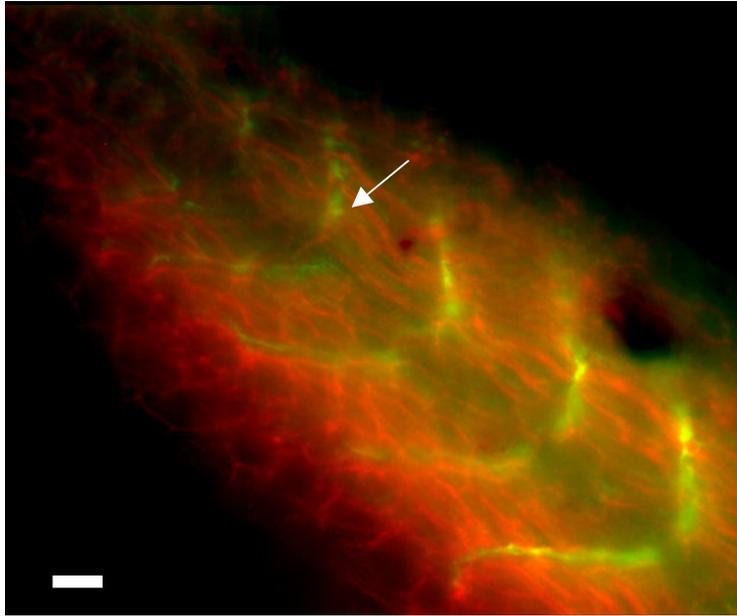
**Fig. 7: Imunofluorescência com anticorpo anti  $\alpha$ -actina sarcomérica nos somitos 24 a 25 em embriões de peixe-zebra de 24 hpf. A seta indica as estriações marcadas. Barra: 10  $\mu$ m.**



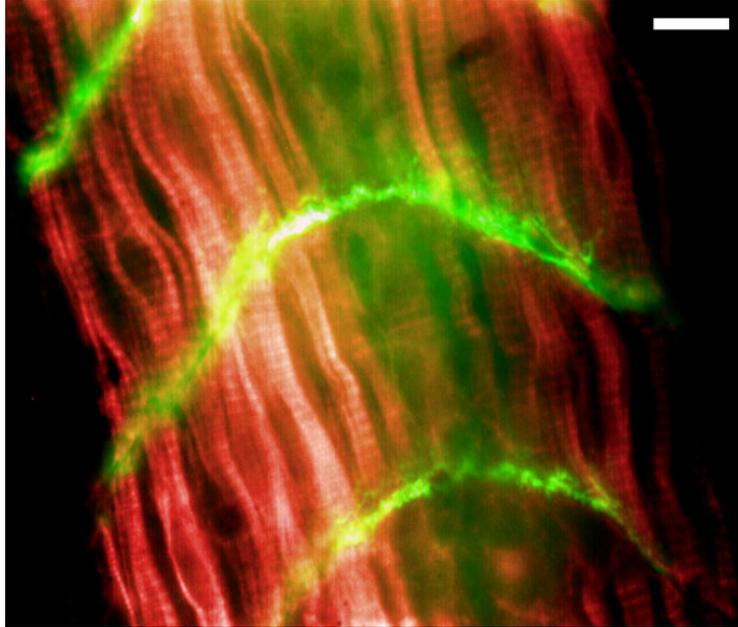
**Fig. 8: Imunofluorescência com anticorpo anti-troponina T no somito 20 em embriões de 48 hpf (A). (B) é um aumento maior onde pode-se observar em maior detalhe a marcação de troponina T nas bandas I. Barra: 10 µm.**



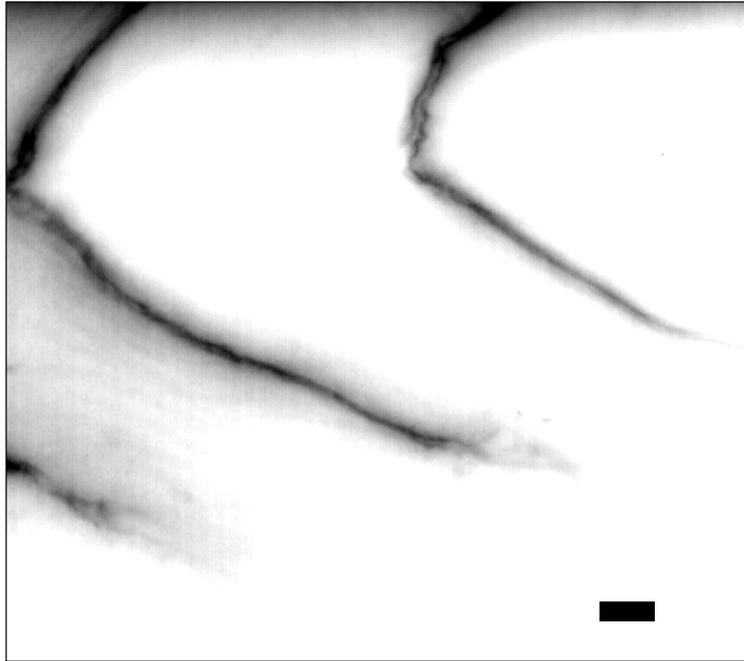
**Fig. 9: Imunofluorescência com anticorpo anti-titina no somito 20, de um embrião jovem (24 hpf) e no somito 20 em embriões mais maduros (48 hpf). Este anticorpo anti-titina marca a junção entre as bandas A e I dos sarcômeros. Barra: 10  $\mu$ m.**



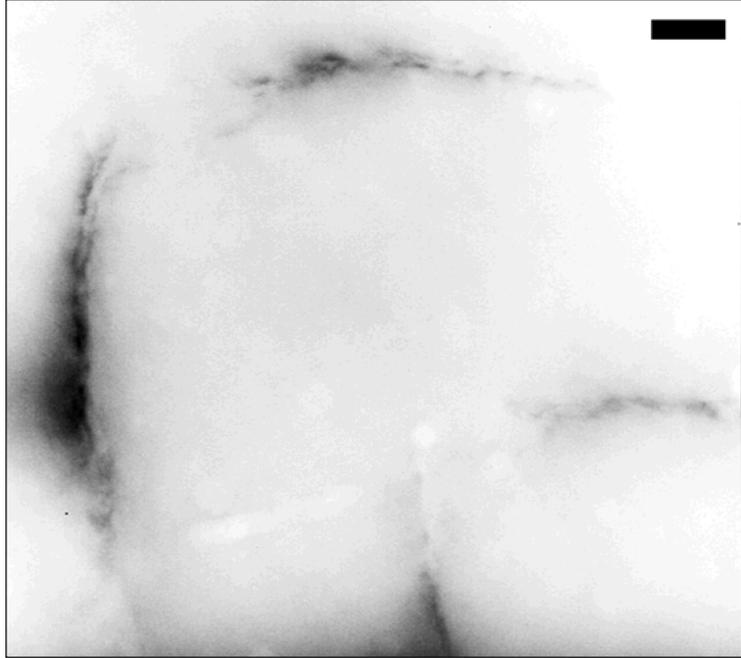
**Fig. 10: Imunofluorescência com anticorpo anti-vinculina (verde) e com a sonda faloidina (vermelho) nos somitos 24 a 27 de embriões de 24 hpf. A seta indica a presença de vinculina no início da septogênese. A cabeça do embrião se encontra orientada para baixo, enquanto que na posição oposta estão os somitos caudais (mais jovens). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .**



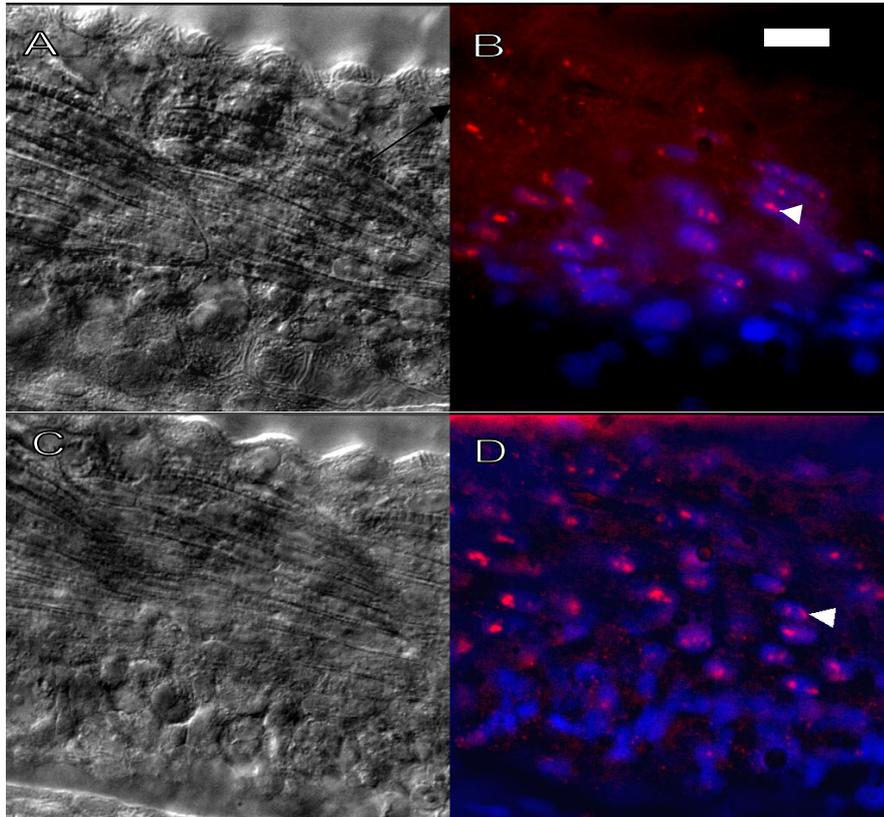
**Fig. 11: Imunofluorescência com anticorpo anti-vinculina (verde) e com a sonda faloidina (vermelho) nos somitos 23 a 26 em embriões de 48 hpf. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .**



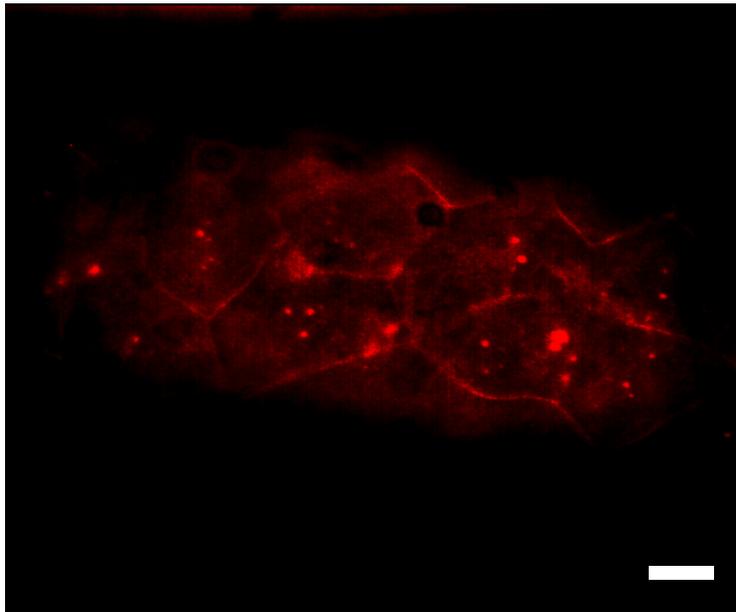
**Fig. 12: Imunofluorescência com anticorpo anti-distrofina nos somitos 23 a 25 em embriões de peixe-zebra com 48 hpf. Barra: 10  $\mu$ m.**



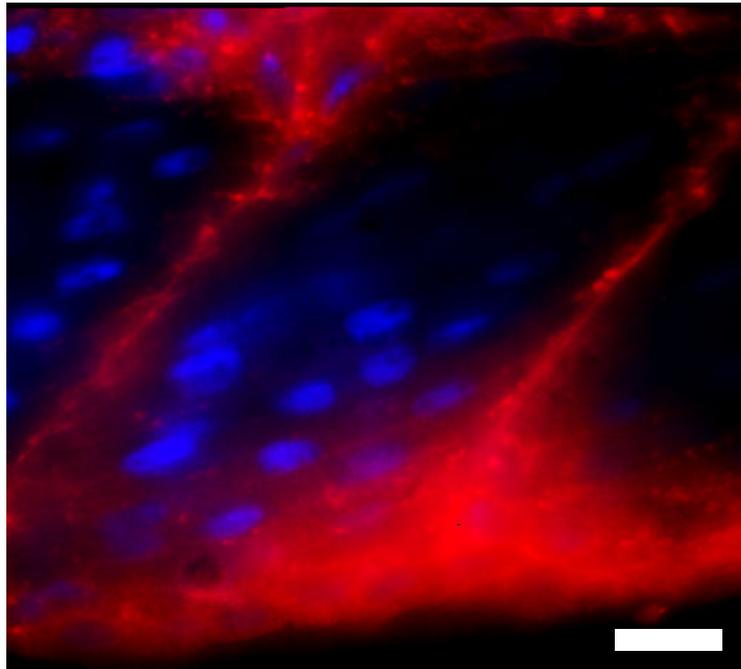
**Fig. 13: Imunofluorescência com anticorpo anti-paxilina em embriões de 48 hpf de peixe-zebra. Barra: 10  $\mu$ m.**



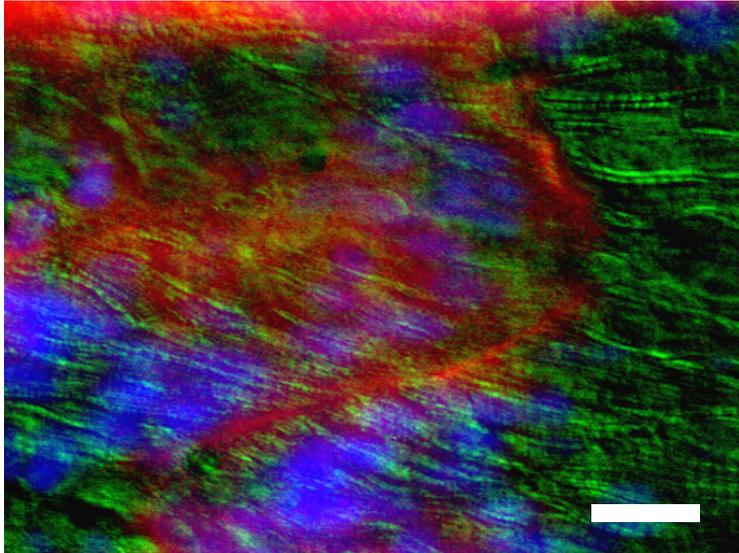
**Fig. 14: Imunofluorescência com anticorpo anti-caderina (vermelho-cabeça de seta, B e D), DAPI em azul e DIC (cinza) em embriões de 48 hpf de peixe-zebra. Barra: 10  $\mu$ m.**



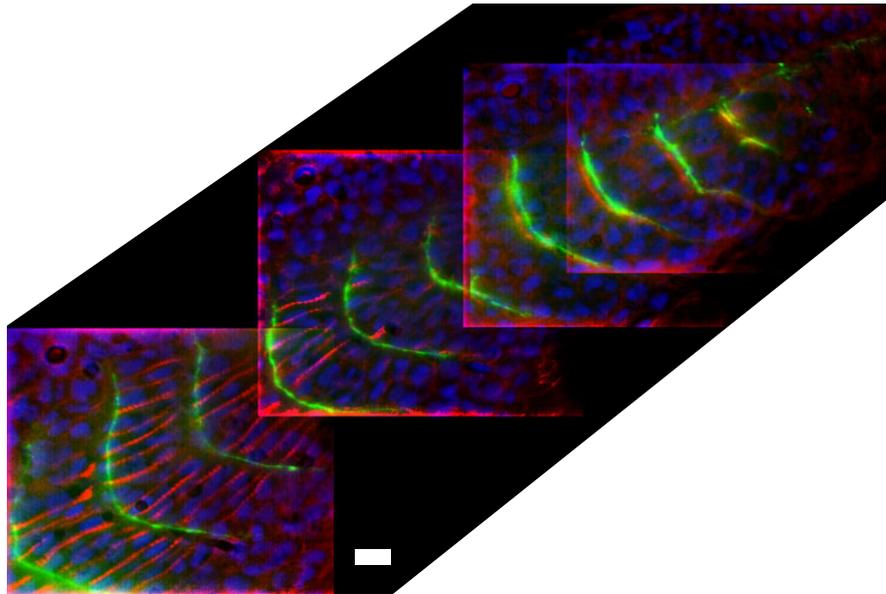
**Fig 15: Caderina (vermelho) subcortical em células epiteliais de embriões de peixe-zebra com 24hpf. Barra: 10  $\mu$ m.**



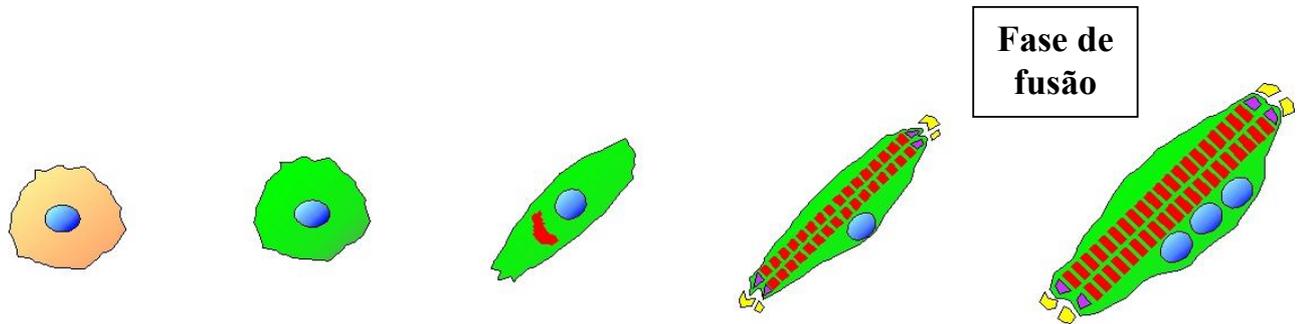
**Fig. 16: Imunofluorescência com anticorpo anti- $\beta$ -catenina (vermelho) em embriões de 48 hpf de peixe-zebra. Núcleos em azul (DAPI). Barra: 10  $\mu$ m.**



**Fig. 17: Imunofluorescência com anticorpo anti-integrina  $\beta 1$  (vermelho) em embriões de 48 hpf de peixe-zebra. Marcação de DAPI (azul) e faloidina (verde). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .**

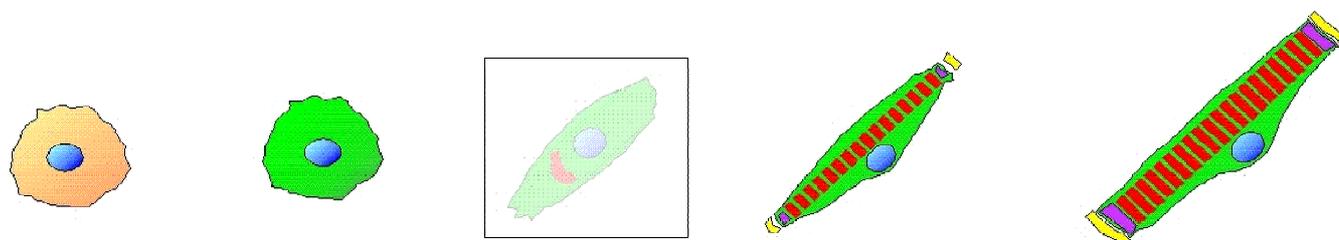


**Fig. 18: Imunofluorescência com anticorpo anti-fibronectina (verde) em embriões de 48 hpf de peixe-zebra. A cabeça do embrião se encontra orientada para baixo à esquerda, enquanto que acima e à direita estão os somitos caudais (mais jovens). Marcação de DAPI (azul) e faloidina (vermelho). Barra: 10  $\mu$ m.**



<b>Pré-mioblasto</b>	<b>Mioblasto</b>	<b>Miócito</b>	<b>Miotubo</b>	<b>Miotubo</b>
replicante	não-replicante	não-replicante	não-replicante	não-replicante
desmina(-)	desmina(+)	desmina (+)	desmina(+)	desmina (+)
ptns miofibrilas(-)	ptns miofibrilas (-)	ptns miofibrilas(+)	ptns miofibrilares(+)	ptns miofibrilares (+)
mononucleada	mononucleada	mononucleada	mononucleada	multinucleada
não-estriada	não-estriada	não-estriada	estriado	estriado e alongado

**Fig. 19: Miogênese: modelo clássico *in vitro* à partir de experimentos realizados em embriões de galinha.**



<b>Pré-mioblasto</b>	<b>Mioblasto</b>	<b>Fusão</b>	<b>Miócito</b>	<b>Miotubo</b>
replicante	não-replicante	(etapa omitida)	não-replicante	não-replicante
desmina(-)	desmina(+)		desmina(+)	desmina (+)
ptns miofibrilas(-)	ptns miofibrilas (-)		ptns miofibrilares(+)	ptns miofibrilares (+)
mnonucleada	mononucleada		mononucleada	mononucleada
não-estriada	não-estriada		estriado	estriado e alongado

**Figura 20: Miogênese de fase embrionária (até 48 hpf) do peixe-zebra *in situ* à partir dos resultados obtidos nesta tese.**

## V) DISCUSSÃO

Neste trabalho, podemos observar algumas peculiaridades na miogênese do peixe-zebra (Costa et al., 2002; Costa et al., 2003). Os padrões de fusão de células e sua relação com a estriação em estudos anteriores, por exemplo, são diferentes dos descritos para músculo peitoral de galinha e das linhagens musculares de mamíferos, aonde a miogênese tem sido mais estudada *in vitro*. No músculo peitoral de galinha os mioblastos começam a se alongar e a sintetizar desmina, mas não apresentam estriação até se juntar a outros mioblastos formando miotubos multinucleados, e alguns consideram que esta fusão dos mioblastos seria uma condição para a formação dos sarcômeros (Holtzer et al., 1990).

Porém estes estudos foram realizados *in vitro*, sendo que, para o peixe-zebra, observamos, *in situ*, que em quase todas as células, as diferentes proteínas sarcoméricas testadas apareceram estriadas em embriões jovens (24 hpf a 48 hpf). A visualização no mesmo campo dos núcleos com DAPI e de toda a célula com contraste diferencial interferencial (DIC) permite confirmar que estas células são mononucleadas e perfeitamente estriadas (Costa et al., 2002). O número de sarcômeros por célula é menor do que descrito para aves, sendo que as miofibrilas são bem mais curtas e espessas que nos miótomos de galinha.

O resultado mais surpreendente foi o de constatar que os mioblastos dos músculos jovens do peixe-zebra apresentam estriação mesmo antes de se fundir com outros mioblastos e antes de formar os miotubos, ao contrário do proposto em estudos *in vitro*. Ainda não sabemos se existem fibras musculares mononucleadas, estriadas na cauda do

peixe-zebra adulto, nem se este tipo de estrutura acaba se fundindo no miótomo do embrião do peixe-zebra ou no peixe adulto para formar as fibras musculares plurinucleadas características do músculo de galinha. Porém, estudos recentes têm demonstrado que fibras de músculo lento do peixe-zebra são mononucleadas, enquanto as de músculo rápido são multinucleadas, porém se desenvolvem mais tardiamente já que aparentemente as fibras rápidas aparecem por indução, em ondas, conforme o músculo lento se desenvolve (Henry et al., 2004).

Outro resultado interessante se deve à distribuição de caderina no embrião de peixe-zebra. Diferentes caderinas são encontradas nas células musculares precursoras, por exemplo, a M-caderina está envolvida na formação de miotubos e na adesão de células satélites ao músculo maduro, também a N-caderina está relacionada à interação entre mioblastos e formação de miotubos, sendo que além destas proteínas, a caderina-11, R-caderina e T-caderina têm sido encontradas em células musculares jovens.

Porém ainda não está bem descrito o papel de caderinas nos primeiros estágios da miogênese. Estudos em cultura de células 3D mostraram que a adesão mediada por N-caderina pode promover miogênese através do aumento da miosina sarcomérica, sendo que tal efeito não é específico para esta caderina. Em ratos negativos para N-caderina, a diferenciação muscular ocorre normalmente (George-Weinstein et al., 1997), evidenciando que não se faz essencial ao processo tal proteína, pois pelas diferentes caderinas expressas em músculo, outra caderina pode estar atuando como substituto funcional da N-caderina.

Células miogênicas crescidas em suspensão como células isoladas, crescem, mas não se diferenciam sem um substrato para adesão (Milansicic et al., 1996). É possível que a adesão mediada por caderina altere a produção de matriz ou a interação de células com a

matriz extracelular, de forma que favoreça a diferenciação. N-caderina medeia uma adesão que pode perpassar os sinais necessários à promoção de miogênese via integrina (Redfield et al., 1997). A necessidade do “Community Effect” para diferenciação celular tem sido demonstrada em diferentes sistemas de estudos de desenvolvimento. A formação de agregados por células primárias da tireóide altera os contatos célula a célula e promove diferenciação (Yap e Manley, 1993). Durante a somitogênese, a condensação celular envolve mudanças na forma e na adesão celular, o que pode modificar aspectos do comportamento celular como proliferação, expressão de fatores de transcrição que contribuem para o controle de processo de diferenciação tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Nossos resultados de marcações para caderina em somitos jovens (24 hpf) mostraram a localização em “pontos duplos” ou aglomerados em região próxima ao núcleo, sendo esta marcação inesperada e mostrou um padrão de distribuição singular no peixe-zebra. Em células epiteliais do mesmo embrião foi encontrado o padrão de marcação esperado conforme literatura. Ainda não compreendemos se mudanças no padrão convencional de adesão celular possam estar ocorrendo para justificar a marcação encontrada.

A marcação de  $\beta$ -catenina mostrou a marcação de regiões intersomitos, como esperado, pois esta proteína integra, juntamente com a caderina, os sistemas de adesão célula-célula.

Com relação ao padrão de distribuição encontrado para proteínas dos complexos das junções focais, formações ou organização protéica dependente de integrina, apesar de seu papel na adesão celular, migração, sinalização e interação com o citoesqueleto seu estudo adveio, em sua maioria, de trabalhos em substratos em cultura de células (2D).

Porém o papel de ambientes 3D possui reconhecida relevância em processos de diferenciação e polaridade celular (Roskelley e Bissel, 1995), assim sendo, observa-se em trabalhos recentes que a composição protéica, adesividade ao substrato e taxa de migração variam de acordo com o microambiente e com as interações que o sistema de adesão focal realiza com a matriz celular. Da mesma forma, as necessidades de desenvolvimento do animal determinam o rearranjo protéico servindo às situações ou etapa do desenvolvimento, sendo este um sistema extremamente dinâmico envolvendo diferentes arranjos protéicos mediados por integrina ou distrofina.

Nossos resultados no peixe-zebra mostraram que existe um padrão de marcação para integrina e distrofina com disposição ao longo do septo de tecido conjuntivo entre os somitos e colocalizando com diferentes proteínas como paxilina, vinculina e fibronectina que se apresentam positivas em embriões jovens (24 hpf). Estudos realizados através de análises em cultura de células tendem a distinguir dois tipos de complexos de adesão: o mediado por integrina e o mediado por distrofina, distintos inclusive nas proteínas associadas e na predominância, dependendo do tipo celular. As marcações de paxilina e vinculina são semelhantes ao longo do septo, mas não são coincidentes de forma que determinam um encaixe protéico de forma que as ancora às miofibrilas através da extremidade de actina. Tal distribuição é evidenciada na marcação com a sonda faloidina, que marca actina filamentosa. Pode-se observar que em embriões mais jovens, a marcação de vinculina colocaliza em diversos locais ao longo do septo intersomitos, com a marcação de actina filamentosa determinando a coloração amarelada nestes locais, ou seja, enquanto o padrão final de distribuição de vinculina ainda não está formado, ocorre preenchimento pela actina, possivelmente associado a proteínas como  $\alpha$ -actinina, duas das primeiras proteínas a

ser expressas no peixe, para sustentar e servir de base para que estas outras proteínas possam chegar a ocupar corretamente o local que integram. Quando isto acontece a marcação de actina não é mais observada em regiões intersomito, indicando a capacidade que uma outra proteína teve de assumir seu papel e se restringe às miofibrilas.

Ao longo do desenvolvimento, podemos observar que a disposição protéica muda para a vinculina, isto porque se observa uma organização mais restrita ao septo entre os miótomos. Ou seja, neste momento, diferentes proteínas estão se associando para determinar a estrutura de adesão no peixe-zebra.

O complexo de adesão glicoprotéico que compreende distrofina e proteínas associadas foi descrito inicialmente em costâmeros, estruturas subsarcolemas presentes em células musculares estriadas. Este complexo, segundo estudos anteriores, possui proteínas associadas como sarcoglicanos, sarcospan, actina e beta-distroglicano e não partilha de proteínas presentes na estrutura descrita para adesão mediada por integrina sugerindo sistemas independentes de adesão, geralmente quando se fala em adesão, os estudos tendem a separar o envolvimento de integrina e  $\alpha$ -distroglicano, como se estivessem relacionados a dois complexos de adesão distintos inclusive quanto a proteínas associadas: o complexo de adesão focal via integrina e o complexo de adesão via distrofina ( $\beta$ -distroglicano). Porém nosso trabalho evidencia que não existem sistemas isolados de adesão. Ao contrário, propõe-se que estes sistemas possam interagir entre si para atender a necessidades fisiológicas e do desenvolvimento do embrião.

Além disto, estudos *in vitro* em cultura de células (Hotzer et al., 1990) sugerem um padrão de marcação pontual, daí o nome adesão focal, para vinculina que está relacionada,

classicamente, a adesões deste tipo. Porém, observamos, em embriões de peixe-zebra, um padrão de marcação contínuo, inclusive para vinculina.

Trabalhos recentes (Cukierman et al., 2001, 2002) em cultura mostram estruturas de adesão focal diferenciadas quanto à participação de proteínas como paxilina, vinculina, alfa-5-integrina quando do estudo *in vitro* (adesão do tipo focal) e quando do estudo da participação protéica na adesão quando esta se faz em culturas 3D sob matrizes de fibronectina (adesão fibrilar), ou seja, ocorre interação com o microambiente, onde as células estão.

Com base nos conceitos advindos do nosso trabalho, elaborou-se um modelo de miogênese *in situ* (Fig 21), comparativamente a um modelo *in vitro* (Fig 20). Observou-se particularidades quanto à temporalidade das proteínas expressas e características funcionais, por exemplo, na miogênese *in vitro*, os pré-mioblastos não diferenciados, mas comprometidos com o padrão muscular, evoluem a mioblastos que após divisões determinadas, se tornam não replicantes e iniciam a expressão das primeiras proteínas musculares como  $\alpha$ -actinina, titina e desmina. Nesta fase, morfologicamente fusiformes, se alinham e se fusionam para dar origem a miotubos plurinucleados e às miofibrilas. Já no modelo de miogênese *in situ*, no peixe-zebra, a etapa de fusão, que determinaria a estriação das células parece ser perpassada, pois observamos células mononucleadas, estriadas e positivas para diferentes proteínas, como desmina.

Entendemos que a ausência ou modificações nas proporções de citocinas, fatores de crescimento e outros mensageiros que não podem ser mimetizados em cultura determinam constituições protéicas diferentes quando do estudo *in situ*. Assim como parece ser fundamental a preservação da tridimensionalidade do sistema, fatores inerentes ao

desenvolvimento e fisiológicos também determinam aspectos que evolutivamente podem ter sido adquiridos para garantir a viabilidade do embrião do peixe que já apresenta movimentos quando da estimulação mecânica com 18 hpf. Tais necessidades contribuem na determinação da composição protéica constituinte de sistemas de adesão e citoesqueléticos determinando as particularidades encontradas em embriões de peixe-zebra nos experimentos realizados, *in situ*, neste estudo.

## VI) CONCLUSÕES

- 2) Desmina foi observada primeiramente em pequenos agregados celulares, depois perinuclear até que começasse a ser expressa integrando as miofibrilas;
- 3) Vimentina ainda se manteve expressa em embriões de 48 hpf com distribuição estriada, ao contrário da diminuição na sua expressão, característica de estágios mais desenvolvidos, conforme descrito em outros modelos;
- 4)  $\alpha$ -Actinina,  $\alpha$ -actina sarcomérica, troponina T e titina apresentaram-se estriadas mesmo em embriões jovens de 24 hpf, em contraste com a sua organização mais tardia em miofibrilas observada *in vitro*;
- 5) Vinculina apresentou-se expressa em regiões de junção entre os somitos sendo observada em embriões de 24hpf, regiões mais jovens onde a actina está presente até que a vinculina passe a ser expressa no local, o que pode ser observado em somitos mais maduros;
- 6) Caderina exhibe um padrão de marcação diferente dos já descritos em outros modelos biológicos, pois se apresenta em agregados pontuais que parecem colocalizar com o núcleo em embriões com 48hpf. Por outro lado, o padrão de marcação de membrana é característico em células epiteliais. A  $\beta$ -catenina, proteína que se liga à caderina, apresenta-se expressa em regiões de septo de tecido conjuntivo entre os somitos evidenciando a sua participação em complexos de adesão célula-célula;
- 7) As proteínas paxilina e fibronectina, que estão envolvidas em contato célula-substrato se apresentam expressas em regiões de junções intersomitos;

- 8) A expressão temporal e sequencial de desmina e de outras proteínas miofibrilares e a estriação sem fusão mostra que no peixe-zebra ou as etapas de miogênese são extremamente rápidas ou são perpassadas quando comparadas aos modelos clássicos de estudo *in vitro* em aves e mamíferos;
- 9) A observação do padrão de marcação contínuo ao longo do septo de tecido conjuntivo intersomitos para as proteínas de adesão estudadas, indica que ao contrário de estruturas restritas ou pontuais como em contatos focais ou fibrilares existem no peixe-zebra, complexos de adesão singulares;
- 10) O modelo clássico de miofibrilogênese em que ocorre agregação e disposição lateral de filamentos de actina para definir os pontos de nucleação para adesão não se aplica ao peixe-zebra, assim como o papel desempenhado por proteínas fundamentais em processos iniciais de migração e de desenvolvimento, como caderina, é diferenciado.

## **VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2004. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 4<sup>th</sup> edition.

Angst, B. D., Marcozzi, C., Magee, A. I. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114: 629-641.

Balaban, N. Q, Schwarz, U. S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., Geiger, B. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biol.* 3: 466-472.

Barut, B. A., Zon, L. I. 2000. Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease. *Physiol. Genomics* 2: 49-51.

Bass, M. D., Patel, B., Barsukov, I. G., Fillingham, I. J., Mason, R., Smith, B. J., Bagshaw, C. R., Critchley, D. R. 2002. Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem. J.* 362: 761-768.

Belkin, A . M., Burridge, K. 1995. Localization of utrophin and aciculin at sites of cell-matrix and cell-cell adhesion in culture cells. *Exp. Cell Res.* 221: 132-140.

Belkin, A. M, Stepp, M. A. 2000. Integrins as receptors for laminins. *Micros. Res. Tech.* 51: 280-301.

Bitzur, S., Kam, Z., Geiger, B. 1994. Structure and distribution of N-cadherin in developing zebrafish embryos: morphogenetic effects of ectopic over-expression. *Dev. Dyn.* 2201: 121-136.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S. E., Davies, K. E. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82: 291-329.

Bono, P., Rubin, K., Higgins, J. M. G., Hynes, R. O. 2001. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol. Biol. Cell* 12: 891-900.

Borowsky, M. L., Hynes, R. O . 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J. Cell Biol.* 143: 429-442.

Burkin, D. J, Kaufman, S. J. 1999. The  $\alpha 7$  integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* 296: 183-190.

Burridge, K, Chrzanowska-Wodnicka, M.1996. Focal Adhesions, Contractility, and Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 463-519.

Burridge, K., Molony, L., Kelly, T. 1987. Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* 8: 211-229.

Capetanaki, Y, Milner, D. J, Weitzer, G. 1997. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct. Funct.* 22: 103-116.

Chan, Y. M., Bonnemann, C. G., Lidov, H. G., Kunkel, L. M. 1998. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell Biol.* 143: 2033-2044.

Chambers, S. P., Dodd, A., Overall, R., Sirey, T., Lam, L., Morris, G. E., Love, D. R. 2001. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 286: 478-483.

Cifuentes-Diaz, C., Nicolet, M., Goudou, D., Rieger, F., Mege, R. M. 1994. N-cadherin expression in developing, adult and denervated chicken neuromuscular system: accumulations at both the neuromuscular junction and the node the Ranvier. *Development* 120: 1-11.

Clark, K.A, McElhinny, A. S, Beckerle, M. C, Gregorio, C. C. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 637-706.

Colognato, H., Yurchenco, P. D. 2000. Form and Function: The laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218: 213-234.

Cooper, G. M. 2000. *The Cell – A Molecular Approach*. 2<sup>nd</sup> ed.

Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A , Oliveira, F., Mermelstein, C. 2004. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 1819-1830.

Costa, M. L., Escaleira, R. C., Manasfi, M., Souza, L. F., Mermelstein, C. S. 2003. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1117-1120.

Costa, M. L., Escaleira, R. C., Rodrigues, V. R., Manasfi, M., Mermelstein, C. S. 2002. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin,  $\alpha$ -actinin, troponin and titin. *Mech. Dev.* 116: 95-104.

Critchley, D. R. 2000. Focal Adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 133-139.

Cukiermam, E., Pankov, R., Stevens, D. R., Yamada, K. M. 2001. Taking cell-matrix adhesions to third dimension. *Science* 294: 1708-1712.

Cukiermam, E., Pankov, R., Yamada, K. M. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 633-639.

Dabiri, G. A., Turnacioglu, K. K., Sanger, J.M., Sanger, J. W. 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9493-9498.

Dooley, K., Zon, L. I. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 252-256.

Duband, J., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M., Thiery, J. 1987. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *J. Cell Biol.* 104: 1361-1374.

Durbeej, M., Henry, M. D., Campbell, K. P. 1998. Dystroglycan in development and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 594-601.

Ehmsen, J., Poon, E., Davies, K. 2002. The dystrophin-associated protein complex. *J. Cell Sci.* 115: 2801-2803.

Enomoto, M. T., Boettiger, D., Menko, S. 1993.  $\alpha 5$  Integrin is a critical component of adhesion plaques in myogenesis. *Dev. Biol.* 155: 180-197.

Ervasti, J. M., Campbell, K. P. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122: 809-823.

Felsenfeld, A. L., Walker, C., Westerfield, M., Kimmel, C., Streisinger, G. 1990. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development* 108: 443-459.

Felsenfeld, A. L., Curry, M., Kimmel, C. B. 1991. The fub-1 mutation blocks initial myofibril formation in zebrafish muscle pioneer cells. *Dev. Biol.* 148: 23-30.

Finley, K. R., Davidson, A. E., Ekker, S. C. 2001. Three-color imaging using fluorescent proteins in living zebrafish embryos. *Biotechniques* 31: 66-70.

Flück, M., Ziemiecki, A., Billeter, R., Müntener, M. 2002. Fibre-type specific concentration of focal adhesion kinase at the sarcolemma: influence of fibre innervation and regeneration. *J. Exp. Biol.* 205: 2337-2348.

George-Weinstein, G., Gerhart, J., Blitz, J., Simak, E., Knudsen, K. A. 1997. N-Cadherin promotes the commitment and differentiation of skeletal muscle precursor cells. *Dev. Biol.* 185: 14-24.

Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. 6<sup>th</sup> edition. Sinauer Associated Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Gerbin, C. S., Karlan, B. Y., Chang, D. D. 2002. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 62: 5358– 5364.

Gordon, A. M., Homsher, E., Regnier, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 80: 853-924.

Greenwood, J. A., Theibert, A. B., Prestwich, G. D., Murphy-Ullrich, J. E. 2000. Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase: regulation by PtdIns (3,4,5)-P3 binding to  $\alpha$ -actinin. *J. Cell Biol.* 150: 627-641.

Gregorio, C. C., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. 1999. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 18-25.

Gregorio, C. C., Perry, C. N., McElhinny, A. S. 2005. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26: 389-400.

Halyko, A., Stelmack, G. 2005. The associated of caveolae, actin and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function? *Can. J. Pharmacol.* 83: 877-91.

Hazan, R. B., Kang, L., Roe, S., Borgen, P. I., Rimm, D. L. 1997. Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 272: 32448-32453.

Hemler, M. E. 1998. Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 578-585.

Hemler, M. E. 1999. Dystroglycan versatility. *Cell* 97: 543-546.

Henry, M. D, Campbell, K. P. 1996. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 625-631.

Henry, M. D, Campbell, K. P. 1999. Dystroglycan inside and out. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 602-607.

Henry, C. A., Crawford, B. D., Yan, Y. L., Postlethwait, J., Cooper, M. S., Hille, M. B., 2001. Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev. Biol.* 240: 474– 487.

Henry, C. A., Amarcher, S. L. 2004. Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev. Cell* 7: 917-923.

Holtzer, H., Schultheiss, T., Dillulo, D., Choi, J., Costa, M., Lu, M., Holtzer, S. 1990. Autonomous expression of the differentiation programs of cells in the cardiac and skeletal myogenic lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 599: 158-169.

Huxley, A. F., Niedergerke, R. 1954. Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibers. *Nature* 173: 971-973.

Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Campbell, K. P. 1997. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet.* 6: 831-841.

Imanaka-Yoshida, K., Knudsen, K. A., Linask, K. K. 1998. N-cadherin is required for the differentiation and initial myofibrillogenesis of chick cardiomyocytes. *Cell Motil. Cytoskel.* 39: 52-62.

Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y., Lee, H., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J., Haimovich, B. 2001. The cytoskeletal/Non-muscle isoform of  $\alpha$ -actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 28676-85.

Jockusch, B. M., Isenberg, G. 1981. Interaction of  $\alpha$ -actinin and vinculin with actin: Opposite effects on filament network formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 3005-3009.

Jockusch, B. M., Isenberg, G. 1982. Vinculin and  $\alpha$ -actinin: interaction with actin and effect on microfilament network formation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 46: 613-623.

Katz, B., Zamir, E., Bershadsky, A., Kam, Z., Yamada, K. M., Geiger, B. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. Mol. Biol. Cell 11: 1047-1060.

Knight, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N. A., Edlund, M., Horwitz, A. R. 2000. Visualizing muscle cell migration *in situ*. Curr. Biol. 10: 576-585.

Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. P., Wheelock, M. J. 1995. Interaction of  $\alpha$ -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via  $\alpha$ -catenin. J. Cell Biol. 130: 67-77.

Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K., Kudo, A. 2004. Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev. Biol.* 267: 473-487.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Laukaitis, C. M., Webb, D. J., Donais, K., Horwitz, A . F. 2001. Differential dynamics of  $\alpha 5$  integrin, paxillin and  $\alpha$ -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J. Cell Biol.* 153: 1427-1440.

Leung, C. L, Green, K. J, Liem, R. K. H. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* 12: 37-45.

Linask, K. K., Ludwig, C., Han, M., Liu, X., Radice, G. L., Knudsen, K. A. 1998. N cadherin/catenin-mediated morphoregulation of somite formation. *Dev. Biol.* 202: 85-102.

Ludin, B., Matus, A. 1998. GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 8: 72-77.

Martin, K. H., Slack, J. K., Boerner, S. A., Martin, C. C., Parsons, T. 2002. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* 296: 1652-1653.

Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., Von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E., von der Mark, K. 1997. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 17: 318–323.

McElhinny, A. S., Perry, C. N., Witt, C. C., Labeit, S., Gregorio, C. C. 2004. Muscle specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J. Cell Sci.* 117: 3175-88.

McGowan, K. A., Marinkovich, P. 2000. Laminins and Human Disease. *Micr. Res. Tech.* 51: 262-279.

Meier, T., Ruegg, M. 2000. The role of dystroglycan and its ligands in physiology and disease. *News Physiol. Sci.* 15: 255-259.

Meng, A., Moore, B., Tang, H., Yuan, B., Lin, S. 1999. A Drosophila doublesex-related gene, terra, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development* 126: 1259-1268.

Milansicic, D. J., Dhawan, J., Farmer, S. R. 1996. Anchorage-dependent control of muscle-specific gene expression in C2C12 mouse myoblasts. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 32: 90-99.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., Yamada, K. M. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal ad signalling molecules. *J. Cell Biol.* 131: 791-805.

Mizuno, Y., Thompson, T. G., Guyon, J. R., Lidov, H. G. W., Brosius, M., Imamura, M., Ozawa, E., Watkins, S. C., Kunkel, L. M. 2001. Desmuslin an intermediate filament protein that interacts with  $\alpha$ -dystrobrevin and desmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6156-6161.

Ojima, K., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q., Hijikata, T., Holtzer, S., Labeit, S., Sweeney, H. L., Holtzer, H. 1999. Initiation and maturation of I-Z-I bodies in the growth tips of transfected myotubes. *J. Cell Sci.* 112: 4101-4112.

Pardo, J. V., Siliciano, J. D., Craig, S. W. 1983. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolema attachment regions in cardiac muscle fibers. *J. Cell Biol.* 97: 1081-1088.

Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M., Weed, S. A. 2000. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19: 5606-5613.

Parsons, M. J., Campos, I., Hirst, E., Stemple, D. L. 2002. Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 129: 3505-3512.

Paul, A. C, Sheard, P. W., Kaufman, S. J, Duxson, M. J. 2002. Localization of  $\alpha 7$  integrins and dystrophin suggests potential for both lateral and longitudinal transmission of tension in large mammalian muscles. *Cell Tissue Res.* 308: 255-265.

Petruzzelli, L., Takami, M., Humes, D. 1999. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am. J. Med.* 106: 467-476.

Poon, E., Howman, E. V., Newey, S. E., Davies, K. E. 2002. Association of syncoilin and desmin. *J. Biol. Chem.* 277: 3433-3439.

Portier, M. M., Escurat, M., Landon, F., Djabali, K., Bousquet, O. 1993. Peripherin and neurofilaments: expression and role during neural development. *C. R. Acad. Sci. III.* 316: 1124-40.

Pownall, M., Gustafsson, Emerson, M. K. Jr., Emerson, C. P. 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 747-783.

Redfield, A., Nieman, M. T., Knudsen, K. A. 1997. Cadherins promote skeletal muscle differentiation in three-dimensional cultures. *J. Cell Biol.* 138: 1323-1331.

Roskelley C. D., Bissel, M. J. 1995. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol.* 73: 391-397.

Rybakova, I. N., Amann, K. J. Ervasti, J. M. 1996. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.* 135: 661-672.

Rybakova, I. N., Jitandrakumar, R., Ervasti, J. M. 2000. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* 150: 1209-1214.

Schiaffino, S., Reggiani, C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Phys. Rev.* 76: 371-423.

Schneider, S., Herrenknecht, K., Butz, S., Kamler, R., Hausen, P. 1993. Catenins in *Xenopus* embryogenesis and their relation to the cadherin-mediated cell-cell adhesion system. *Development* 118: 629-640.

Schoenwaelder, S. M, Burridge, K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 274-286.

Schultheiss, T., Choi, J., Lin, Z.-X., Dilullo, C., Cohen-Gold, L., Fischman, D., Holtzer, H. 1992. A sarcomeric alpha-actinin truncated at the carboxil end induces the breakdown

of stress fibers in PTK2 cells and the formation of nemaline-like bodies and breakdown of myofibrils in myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9282-9286.

Schultheiss, T., Lin, Z., Ishikawa, H., Zamir, I., Stockert, C. J., Holtzer, H. 1991. Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J. Cell Biol.* 114: 953-966.

Schwarzbauer, J. 1999. Basement membrane: putting up the barriers. *Curr. Biol.* 9: R242-R244.

Schwarzbauer, J. E., Sechler, J. L. 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 622-627.

Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O. M., Ruegg, U. T., Schittny, J., Muller, U., 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* 4: 673– 685.

Sepulveda, J., Wu, C. 2006. The parvins. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 25-35.

Sonnenberg, A. 1993. Integrins and their ligands. *Curr. Top. Microb. Immunol.* 184: 7-35.

Sotgia, F., Lee, J. F., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F. D., Minetti, C., Sudol, M., Lisanti, M. P. 2000. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of  $\beta$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.* 275: 38048-38058.

Spence, H. J, Chen, Y, Winder, S. J. 2002. Muscular dystrophies, the cytoskeleton and cell adhesion. *Bioessays* 24: 542-552.

Steinberg, M. S, McNutt, P. M. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 554-560.

Steinböck, F. A, Wiche, G. 1999. Plectin: a cytolinker by design. *Biol. Chem.* 380: 151-158.

Stickney, H. L., Barresi, M. J., Devoto, S. H. 2000. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 219: 287-303.

Suzuki, S. T. 1996. Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* 109: 2609-2611.

Thomas, J. W., Cooley, M. A., Broome, J. M., Salgia, R., Griffin, J. D., Lombardo, C. R., Schaller, M. D. 1999. The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J. Biol. Chem.* 274: 36684-36692.

Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S., Jucker, M. 1996. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha-2- chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2739-2747.

Titus, M. A . 2005. A conserved role for myosin VII in adhesion. *Novartis Found Symp.* 269: 16-24.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4.

Troyanovsky, S. M. 1999. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 561-566.

Turner, C. E., Kramarcy, N., Sealock, R., Burrige, K. 1991. Localization of paxillin, a focal adhesion protein, to smooth muscle dense plaques, and the myotendinous and neuromuscular junctions of skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 192: 651-655.

Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Zamir, E., Katz, B., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B., Kam, Z. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Biol.* 112: 1655-1669.

Yap, A. S., Manley, S. W. 1993. Contact inhibition of cell spreading: a mechanism for the maintenance of thyroid cell aggregation in vitro. *Exp. Cell Res.* 208: 121-127.

Zamir, E., Katz, B., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B., Kam, Z. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112: 1655-1669.

Zamir, E., Geiger, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114: 3583-3590.

Zhao, Q., Liu, X., Collodi, P. 2001. Identification and characterization of a novel fibronectin in zebrafish. *Exp. Cell Res.* 268: 211-219.

## **VIII) ANEXOS**

**(ARTIGOS PUBLICADOS)**

# 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](#)