



ANGELICA VASCONCELOS PEDROSA

**"ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS
GENES *Vangl1* E *Vangl2* DURANTE A ONTOGÊNESE
DE GALINHA (*Gallus gallus*)"**

**"COMPARATIVE ANALYSIS OF *Vangl1* AND *Vangl2*
GENE EXPRESSION DURING CHICKEN
ONTOGENESIS (*Gallus gallus*)"**

Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANGELICA VASCONCELOS PEDROSA

"ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS
GENES *Vangl1* E *Vangl2* DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DE GALINHA (*Gallus gallus*)"

"COMPARATIVE ANALYSIS OF *Vangl1* AND *Vangl2*
GENE EXPRESSION DURING CHICKEN
ONTOGENESIS (*Gallus gallus*)"

Este exemplar corresponde à redação
final da Tese defendida pela aluna

Angelica Vasconcelos Pedrosa
aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Dissertation presented to the Institute of
Biology in the State University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master in
cell and structural biology in the area of
cell biology.

Orientadora: Dra. Lúcia Elvira Alvares

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P343a Pedrosa, Angelica Vasconcelos, 1986-
Análise comparativa da expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2* durante a ontogênese da galinha (*Gallus gallus*) / Angelica Vasconcelos Pedrosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Lúcia Elvira Alvares.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Via de sinalização Wnt. 2. Embriologia. 3. Proteínas de membrana. 4. Hibridação *in situ*. 5. Vertebrado. I. Alvares, Lúcia Elvira, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative analysis of *Vangl1* and *Vangl2* gene expression during chicken ontogenesis (*Gallus gallus*)

Palavras-chave em inglês:

Wnt signaling pathway

Embryology

Membrane proteins

In situ hybridization

Vertebrate

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Lúcia Elvira Alvares [Orientador]

Carmem Silva Fontanetti Christofolletti

Paulo Pinto Joazeiro

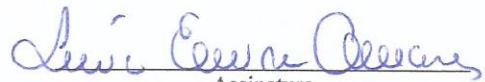
Data de defesa: 16-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 16 de dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

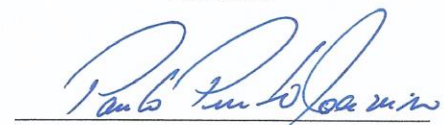
Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues De Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Carla Cristina Judice Maria

Assinatura

Resumo

A correta padronização do corpo do embrião requer a atividade de diferentes vias de sinalização. Dentre elas, uma que se destaca é via de sinalização Wnt de polaridade celular planar (Wnt/PCP), que é responsável pelo controle da polaridade celular e pela organização celular de diversos tecidos nos animais. Uma vez interrompida, a via Wnt/PCP pode causar falhas no fechamento do tubo neural, provocando defeitos congênitos. Em seres humanos, mutações em componentes-chave da via Wnt/PCP como as proteínas codificadas pelos genes *Vangl1* e *Vangl2* têm sido associadas à graves malformações geradas por falhas no fechamento do tubo neural. Estruturalmente, ambos os genes *Vangl1* e *Vangl2* codificam proteínas de superfície transmembranares, essenciais para o desenvolvimento apropriado do embrião. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do padrão de expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2* durante a embriogênese de *Gallus gallus*. Ensaios de hibridação *in situ* em embrião inteiro (*whole mount*) e cortes em vibratômo foram realizados com a finalidade de estabelecer temporal e espacialmente o padrão de expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2*. Como resultado, observou-se que estes genes são expressos durante as etapas de gastrulação, neurulação e no início da organogênese do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*. No início da gastrulação, os genes *Vangl1* e *Vangl2* possuem domínios de expressão comuns nos embriões de galinha, uma vez que ambos são expressos na linha primitiva, nódulo de Hensen e crescente cardiogênico. Contudo, nossos dados revelaram particularidades na expressão destes genes, uma vez que há uma predominância dos transcritos de *Vangl1* na região posterior da linha primitiva, enquanto *Vangl2* apresenta uma expressão uniforme ao longo desta estrutura. Em adição, enquanto *Vangl1* é expresso na notocorda e em toda a extensão do nódulo de Hensen, *Vangl2* é expresso no entorno desta estrutura. Ao longo da neurulação e na organogênese inicial, ambos os genes *Vangl* são expressos de maneira similar, em domínios que abrangem a placa, as pregas e o tubo neural. Outros importantes domínios de expressão dos *Vangl* correspondem às vesículas ópticas e óticas, às vesículas encefálicas particularmente na região das flexuras encefálicas, aos diferentes tipos de mesoderma (paraxial, intermediário e lateral) e ao assoalho da faringe. Ao comparar os resultados obtidos por hibridação *in situ* em galinha ao um

levantamento bibliográfico sobre outros vertebrados, observou-se uma sobreposição dos domínios-chave de expressão nos diferentes organismos, demonstrando a conservação filogenética da atividade destes genes e sugerindo uma possível conservação funcional. Desta forma, nossos dados sugerem que os genes *Vangl* desempenham um importante papel no desenvolvimento embrionário de aves, possivelmente coordenando os movimentos morfogênicos durante a gastrulação, bem como a formação da placa neural e posterior dobramento e fechamento do tubo neural, além de outros processos da embriogênese de aves.

Abstract

The correct patterning of the embryo's body requires the activity of different signaling pathways. Among them, one that stands out is the Wnt Planar Cell Polarity Signaling Pathway (Wnt/PCP), which is responsible for controlling the cell polarity and cellular organization of many tissues in animals. Failures in the Wnt/PCP signaling can cause neural tube birth defects. In humans, mutations in key components of the Wnt/PCP as the *Vangl1* and *Vangl2* molecules were identified in patients with neural tube defects. Structurally, both *Vangl1* and *Vangl2* genes encode transmembrane surface proteins similar, which are essential to proper development. The present study aimed to characterize the expression pattern of *Vangl1* and *Vangl2* genes during embryogenesis in *Gallus gallus*. Whole-mount *in situ* hybridization assays and vibratome sectioning of embryos were conducted in order to establish the spatial and temporal expression pattern of *Vangl1* and *Vangl2* genes. Our results showed that these genes are expressed during gastrulation, neurulation and early organogenesis in *Gallus gallus*. At the onset of Gastrulation, *Vangl1* and *Vangl2* genes have common areas of expression in chicken embryos, since both are expressed in the primitive streak, Hensen's node and cardiogenic crescent. However, our data showed particularities in the expression of these genes, since there is a predominance of *Vangl1* transcripts in the posterior region of the primitive streak while *Vangl2* has a uniform expression throughout that structure. In addition, while *Vangl1* is expressed in the notochord and in the full length of the Hensen's node, *Vangl2* is expressed only around this structure. Throughout neurulation and early organogenesis, both *Vangl* genes are expressed in a similar manner on the neural plate, neural groove, neural folds and in the neural tube. Other important areas of *Vangl* expression correspond to optical and otic vesicles, the brain vesicles, the different types of mesoderm (paraxial, intermediate and lateral) and the floor of the pharynx. By comparing the chicken expression of *Vangl* genes with other vertebrates, we notice that there are overlapping expression patterns among key areas among different organisms, showing a phylogenetic conservation of expression domains and suggesting a possible functional conservation. Overall, our data suggests that *Vangl* genes play an important role in embryonic development of bird, possibly by coordinating

the morphogenetic movements during gastrulation, as well as the formation of neural tube, among other processes during the birds embriogenesis.

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Dedicatória.....	xiii
Agradecimentos.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Abreviaturas.....	xxi
1. Introdução.....	25
2. Revisão Bibliográfica.....	29
2.1 Via de sinalização Wnt/PCP.....	30
2.2 As Proteínas Transmembranares Vangl.....	34
3. Objetivos.....	38
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. Material e Métodos.....	40
4.1 Obtenção de embriões.....	41
4.2 Coleta dos embriões de galinha.....	41
4.3 Estadiamento dos embriões de galinha.....	42
4.4 Extração de RNA total de embriões de galinha.....	43
4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	44
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	44
4.7 Síntese de ribossonda.....	45

4.8 Processamento dos embriões para hibridação <i>in situ</i>	46
4.9 Ensaios de hibridação <i>in situ</i> (<i>Whole mount</i>) de embriões de galinha.....	47
4.10 Análise dos embriões inteiros (<i>Whole mount</i>).....	49
4.11 Cortes dos embriões de galinha em vibrátomo.....	49
4.12 Análise dos cortes de embrião.....	49
5. Resultados.....	50
5.1 Dinâmica da expressão de <i>Vangl1</i> nas etapas iniciais da embriogênese de Galinha.....	51
5.2 Dinâmica da expressão de <i>Vangl2</i> nas etapas iniciais da embriogênese de Galinha.....	54
6. Discussão.....	58
6.1 O padrão de expressão dos genes da família <i>Vangl</i> é conservado em Vertebrados.....	59
6.2 A família <i>Vangl</i> e os defeitos de desenvolvimento em vertebrados.....	63
7. Conclusão.....	69
8. Referências Bibliográficas.....	71
9. Anexos.....	78

*D*edico este trabalho a minha amada família que me apoiou
incondicionalmente em todos os momentos durante
esta jornada possibilitando meu sonho
tornar - se realidade

Agradecimentos

Inicialmente agradeço à Deus por ter me abençoado com minha família que me proporciona um lar tão acolhedor, calmo, cativante e amoroso. Ao meu pai, meu herói que tenho como exemplo na vida profissional e na pessoal, pois superou muitos obstáculos tendo seu trabalho reconhecido em sua comunidade. À minha mãe, minha heroína, uma mulher forte, trabalhadora e muito boa e que pacientemente escutou meus desabafos e me aconselhou sabiamente durante esta jornada. Ambos são exemplos a serem seguidos e me motivam dia a dia a lutar por meus sonhos.

Aos meus irmãos que são fundamentais na minha vida, pois além de me apoiarem estão sempre dispostos a me ajudar independente do que isso acarrete a eles. Independente da diferença de idade ou da distância são meus parceiros de todos os momentos e sou eternamente grata por tê-los como irmãos e amigos.

A minha amada sobrinha Giovanna que veio iluminar a minha vida, que me fez acreditar que definitivamente deve existir um lugar superior, pois você é um anjo. Presenciar você crescendo e descobrindo o mundo, me dá forças e motivos para encarar mais um dia por mais difícil que estejam às coisas. Em seu olhar encontro a paz, a alegria, o amor e a esperança que me faz querer ser uma pessoa melhor e lutar por um mundo melhor. E espero conseguir te ensinar que a família sempre deve ser a prioridade na vida, independente do que esteja acontecendo ou de onde você estiver, pois a família que vai nos acolher e nos fortalecer Sempre.

As pessoas especiais que encontrei nesta jornada, ao começar pela Débora que me ensinou muito e se tornou uma boa amiga, a Lucimara que é uma pessoa muito especial que não só me acolheu como também me ensinou a ter mais autonomia, Karina por toda sua compreensão, apoio e amizade e Natalia que é uma pessoa única na minha vida, estando presente e me apoiando em todas as horas, quer fossem boas ou fossem ruins.

Tenho muito agradecer a Débora, Lucimara, Luana e Natália pela indispensável ajuda no laboratório!

A toda equipe do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Instituto de Biologia da Unicamp.

A minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Elvira Álvares que me ofereceu a oportunidade de estagiar em seu laboratório e que gentilmente me aceitou como aluna de mestrado.

Ao Dr. Gonçalo A. Guimarães, Dra. Maria Alice da Cruz Höfling, Dr. José Xavier-Neto pelo empréstimo de equipamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade.

A CAPES/PROAP pelo apoio financeiro.

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos de feedback de componentes da via Wnt/PCP na asa de drosófila.....	31
Figura 2. Via sinalização de Wnt/PCP.....	33
Figura 3. Esquema estrutural de Vangl1 e Vangl2.....	34
Figura 4. Expressão de <i>Vangl1</i> fases de gastrulação, neurulação e início da organogênese.....	53
Figura 5. Expressão de <i>Vangl2</i> fases de gastrulação, neurulação e início da organogênese.....	56
Figura 6. Sítios de origem de defeitos no tubo neural de embrião humano resultado da perturbação no fechamento do tubo neural.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estádios e principais características morfológicas dos embriões de galinha.....	42
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para confecção de sondas com o promotor da enzima RNA polimerase T7.....	46
Tabela 3. Sumário de dados dos principais domínios de expressão de <i>Vangl1</i> e <i>Vangl2</i> em galinha em comparação com os domínios de expressão publicados em camundongos, em <i>Xenopus laevis</i> e em <i>Zebrafish</i>	60

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abm	Arco branquial mandibular
Af	Assoalho da faringe
Aor	Aorta
Co	Coração
C	Região carboxi-terminal
Cc	Crescente cardiogênico
cDNA	Molécula de DNA complementar, do inglês <i>Complementary DNA</i>
Celsr1	Receptor G do tipo 1 de caderinas, do inglês <i>Cadherin EGF Lag seven-pass G-Type Receptor 1</i>
Celsr2	Receptor G do tipo 2 de caderinas, do inglês <i>Cadherin EGF Lag seven-pass G-Type Receptor 2</i>
Celsr3	Receptor G do tipo 3 de caderinas, do inglês <i>Cadherin EGF Lag seven-pass G-Type Receptor 3</i>
DAAM1	Ativador da morfogênese associado a Dishevelled, do inglês, <i>Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
Die	Diencéfalo
Dgo	Moléculas citoplasmáticas, Diego
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
Dsh	Molécula citoplasmática, Dishevelled
Dvl	Molécula citoplasmática, Dishevelled
Dvl1	Dishevelled-1
Dvl2	Dishevelled-2

Dvl3	Dishevelled-3
DTN	Defeitos do tubo neural
FZ	Receptor de membrana, Frizzled
FZ3	Frizzled-3
FZ6	Frizzled-6
FMI	Receptores de membrana, Flamingo e também conhecido por Stan.
GTPase	Proteína que degrada moléculas de GTP
HH	Estádios de embriões de galinha, do inglês <i>Hamburger–Hamilton Stages</i>
HIS	Hibridação <i>in situ</i>
JNK	Quinase Jun N-terminal, do inglês <i>Jun N-terminal kinase</i>
Ita	Intestino anterior
Lp	Linha primitiva
Looptail	Camundongo mutante Lp (<i>Vangl2</i>)
Me	Mesencéfalo
Met	Metaencéfalo
Mie	Mielencéfalo
Mio	Miótomo
mL	Mililitro
N	Região amino-terminal
Nep	Neuroepitélio
No	Nódulo primitivo ou de Hensen
Not	Notocorda
Np	Neuróporo posterior
Pb	Pares de base

Pc	Prega cefálica
PCP	Via de polaridade celular planar, do inglês <i>Planar Cell Polarity Pathway</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
PDZ	Domínio central da proteína Dishevelled, do inglês <i>Post synaptic density-95/Discs</i>
Pc	Prega cefálica
Pgn	Prega neural
Pms	Placa mesodérmica segmental
Pn	Placa neural
Pr	Prosencéfalo
PK	Molécula citoplasmática Prickle
PK1	Prickle1
PK2	Prickle2
Ptk7	Proteína receptora, do inglês <i>Tyrosine-protein kinase-like 7</i>
RAC1	Proteína relacionada à RAS, do inglês <i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
Rb	Rombencéfalo
Rho	Família gênica homóloga à Ras, do inglês <i>Ras Homolog Gene Family</i>
RhoA	Família gênica homóloga à RAS, do inglês <i>Ras Homolog Gene Family, Member A</i>
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROCK	Rho-quinase, do inglês <i>Rho-Associated Protein Kinase</i>

Ror1/2	Receptor de Tirosina quinase do tipo I/II, do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
Scrb1	Proteína Scribbled 1
Som	Somito
STBM	Receptor de membrana Strabismus, também conhecido por Van Gogh ou Vang
Tbm	Túbulos mesonéfricos
Tec	Túbulos endocárdicos
Tn	Tubo neural
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
Vangl1	Van Gogh like 1
Vangl2	Van Gogh like 2
Vo	Vesícula óptica
Vot	Vesícula ótica
WISH	Hibridação <i>in situ</i> de embriões inteiros, do inglês <i>Whole Mount In Situ Hybridization</i>
Wnt	Via de sinalização, combinação dos nomes em inglês <i>Wg</i> e <i>Int</i> , do inglês <i>Wingless Related</i>
Wnt/β-cat	Via de sinalização Wnt beta-catenina (via canônica), do inglês <i>Wnt β-catenin Signaling Pathway</i>
Wnt/Ca²⁺	Via de sinalização Wnt dependente de íon cálcio, do inglês <i>Wnt/Ca²⁺ Signaling Pathway</i>
Wnt/PCP	Via de sinalização Wnt polaridade celular planar, do inglês <i>Wnt Planar Cell Polarity Signaling Pathway</i>

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Nos organismos multicelulares, o desenvolvimento do embrião se inicia a partir de uma única célula denominada célula-ovo ou zigoto, que se divide através de mitoses gerando um conjunto de células que progressivamente formarão todo o corpo de um novo ser. Além das mitoses, a formação de um novo indivíduo requer a modificação gradual das células do embrião, a fim de formar diversos tecidos diferenciados, que se organizam em uma arquitetura extremamente precisa (GILBERT, 2013; GRAY, 2000). Para que as células sofram modificações na sua natureza ao longo da ontogênese, é necessária a atuação de várias vias de sinalização, uma vez que essas fornecem a comunicação célula-célula necessária para coordenar diversas atividades celulares. Mecanismos de comunicação celular semelhantes são utilizados na idade adulta para garantir a homeostase e regeneração de tecidos. A regulação dessas vias de sinalização é crucial, pois o excesso ou atividade reduzida de uma determinada via pode causar resultados devastadores, como malformações congênitas ou doenças graves tais como, o câncer (GORDON; NUSSE, 2006).

A fim de garantir a padronização adequada do embrião, as vias de sinalização estão envolvidas na liberação de moléculas sinalizadoras, cujo papel é transmitir informações sobre o contexto celular e ambiental para as redes de regulação da atividade gênica, de forma a possibilitar a construção de estruturas anatomicamente diferentes (CARROL, S. B., GRENIER, J. K., WEATHERBEE, 2005; MIKELS; NUSSE, 2006). Uma via de sinalização que se destaca, é a da família Wnt, envolvida em processos do desenvolvimento, em nível celular, como na diferenciação, na migração, na polaridade e na proliferação celular (PANDUR; MAURUS; KÜHL, 2002). Os ligantes Wnt podem ativar diferentes versões dessa via de sinalização, via canônica e vias não-canônicas, resultando em repostas singulares em cada uma delas. A via de sinalização canônica é conhecida por via Wnt/ β -catenina, que regula o destino das células durante o desenvolvimento e atua protagonizando diferentes processos pós-natais (MOON *et al.*, 2004). As vias de sinalização não-canônicas são conhecidas por via Wnt/ Ca^{2+} , que participa do desenvolvimento embrionário e pode ter um papel importante durante a supressão de tumores durante o período pós-natal (KÜHL, 2004) e a via Wnt de polaridade celular

planar (PCP) que é muito importante no desenvolvimento embrionário, pois direciona as células em uma adequada orientação no eixo corporal do embrião (ADLER; LEE, 2001).

As proteínas Vangl1 e Vangl2 fazem parte de um conjunto de proteínas que coordenam a polaridade celular planar, processo no qual grupos de células são orientadas dentro do plano do tecido. Esta orientação polarizada resulta em movimentos celulares sincrônicos e direcionados, que possibilitam a organização de várias estruturas do embrião e a remodelação de tecidos durante o reparo de lesões e doenças (SIMONS; MLODZIK, 2008; SUGIMURA; LI, 2010).

Os genes *Vangl1* e *Vangl2* são homólogos ao gene *Van Gogh* (*Vang*) de drosófila, também conhecido como *Strabismus*. Esses genes possuem grande importância no desenvolvimento embrionário de diferentes seres vivos, sendo conservado desde drosófila até os vertebrados. Na drosófila, o gene *Vang* é essencial para o estabelecimento da polaridade nos olhos e nas cerdas e, nos vertebrados, os *Vangls* são expressos durante toda a embriogênese, tendo uma forte expressão durante os processos de gastrulação e neurulação (PARK; MOON, 2002). Durante os movimentos morfogenéticos há um processo conhecido por extensão convergente, que tem como um dos seus principais papéis o estreitamento e alongamento da placa neural e o fechamento do tubo neural (WALLINGFORD; FRASER; HARLAND, 2002). Os genes da família *Vangl* atuam de maneira marcante neste processo e podem estar implicados em um grupo heterogêneo de malformações congênitas que afetam o cérebro e a medula espinhal, conhecido por defeitos do tubo neural (DTN). Estas malformações surgem quando o tubo neural, precursor embrionário do cérebro e da medula espinhal, não se fecha durante a fase de neurulação, afetando o desenvolvimento adequado do cérebro e da medula espinhal (COPP; GREENE; MURDOCH, 2003; KIBAR *et al.*, 2007). Atualmente, em humanos são conhecidas DTN causadas por treze mutações heterozigóticas raras em *Vangl1* e nove mutações adicionais em *Vangl2*; coletivamente, estima-se que as mutações nos genes *Vangl* são responsáveis por 0,4 a 2,5% de DTN em humanos (KIBAR *et al.*, 2007, 2009, 2011; LEI *et al.*, 2010).

Devido ao fato dos genes *Vangl1* e *Vangl2* desempenharem papéis críticos no controle da polarização celular planar e nos movimentos de extensão convergente durante o desenvolvimento morfogenético (KIBAR; CAPRA; GROS, 2007; TORBAN; KOR;

GROS, 2004), este trabalho teve como objetivo caracterizar o padrão de expressão desses genes durante a ontogênese de galinha, a fim de detalhar os sítios específicos de expressão dos *Vangl* em diferentes estádios do desenvolvimento embrionário deste importante modelo vertebrado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Via de sinalização Wnt/PCP

A polarização celular planar (PCP) e os fenômenos relacionados são de grande importância para a geração de diversos tipos de células, o que é crucial para o desenvolvimento de um organismo multicelular complexo. Diversos estudos demonstraram que a via de sinalização Wnt/PCP é responsável pelo controle da polaridade celular (ADLER; TAYLOR, 2001; TADA; KAI, 2009) atuando na organização celular de diversos tecidos de invertebrados e vertebrados (ADLER; LEE, 2001; JENNY *et al.*, 2005; SIMONS; MLODZIK, 2008). Em *Drosophila melanogaster*, a via PCP manifesta-se em tecidos adultos, incluindo a disposição omatidial no olho multifacetado e na orientação dos pêlos em células da asa (ADLER; LEE, 2001; JENNY *et al.*, 2005; SIMONS; MLODZIK, 2008). Nos mamíferos, a sinalização PCP regula o movimento de extensão convergente durante a gastrulação, o fechamento do tubo neural na neurulação e a organização de uma ampla variedade de estruturas durante a organogênese, incluindo a orientação dos pêlos do corpo e das células ciliadas sensoriais do ouvido interno (SIMONS; MLODZIK, 2008; WANG; NATHANS, 2007).

O fenômeno de polarização celular planar em drosófila é estabelecido pelas interações entre os componentes moleculares da via Wnt/PCP, os receptores de membrana Frizzled (FZ), Flamingo (FMI, também conhecido como Stan), Van Gogh (conhecido como Vang ou Strabismus), Dsh e as moléculas citoplasmáticas Diego (Dgo) e Prickle (PK), que se associam a membrana durante sinalização PCP (SEIFERT; MLODZIK, 2007; WANG; NATHANS, 2007). Os principais eventos na via Wnt/PCP serão descritos a seguir.

O receptor FZ recruta Dsh à membrana celular e a molécula Dgo liga-se fisicamente a Dsh, formando o complexo FZ-Dsh-Dgo, localizado no lado apical-distal da célula (JENNY *et al.*, 2005). Outro momento importante é quando Strabismus (STBM) recruta PK para a membrana formando assim o complexo STBM-PK na posição apical-proximal da célula (JENNY *et al.*, 2003). O complexo FZ-Dsh-Dgo age positivamente, promovendo a ativação de Dsh enquanto que o complexo STBM-PK tem como função limitar a ativação Dsh (Fig. 1) (SEIFERT; MLODZIK, 2007; STRUTT, 2001).

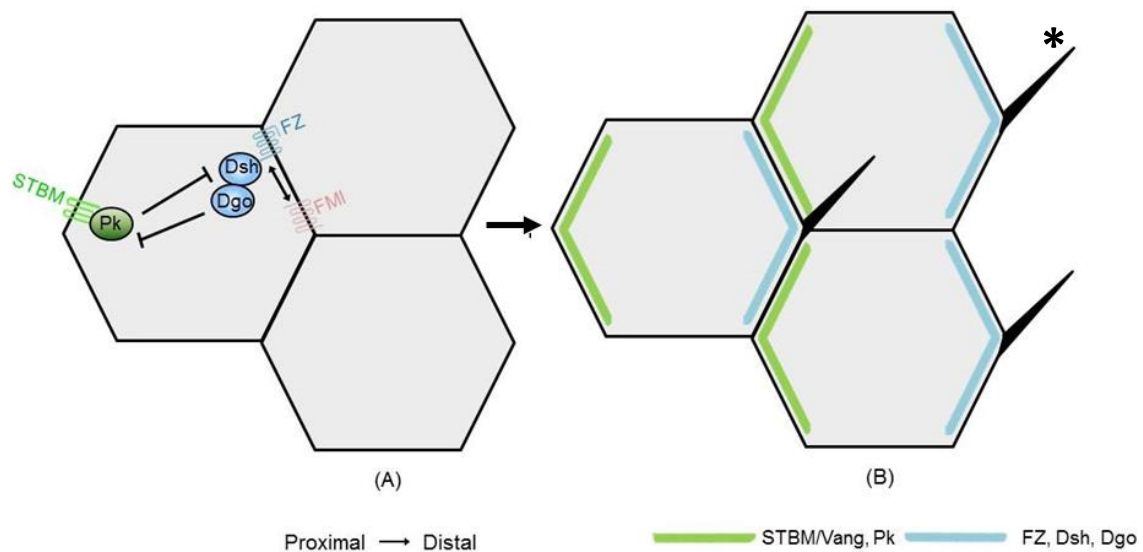


Figura 1. Mecanismos de *feedback* de componentes da via Wnt/PCP na asa de drosófila. (A) *Feedback* entre proteínas envolvidas na PCP depende de convocação de Dsh por FZ. STBM (Vang) recruta PK nas membranas adjacentes e o complexo STBM/Pk impede atividade de FZ por recrutamento de Dsh. (B) Devido à sobreposição direcional das vias de sinalização, o mecanismo de *feedback* regulatório entre os componentes do via PCP tende acumular FZ/Dsh/Dgo (azul) no vértice distal das células da asa enquanto STBM/Pk (verde) se acumula na parte proximal. O pêlo da asa (*) desenvolve no vértice distal e nos pontos distais. Abreviaturas: Dsh: Dishevelled; Dgo: Diego; FZ: Frizzled; Pk: Prickle; STBM: Strabismus. Adaptado de BARROW (2006) e SEIFERT & MLODZIK (2007).

Nos vertebrados, não se sabe exatamente como a via de sinalização de Wnt/PCP regula seus alvos, no entanto, sabe-se que muitos dos componentes presentes em drosófila são conservados em vertebrados e desempenham papéis importantes na polaridade celular e em vários processos morfogênicos (KATOH, 2005; SEIFERT; MLODZIK, 2007). A via Wnt/PCP nos vertebrados possuem receptores representativos que são os *Frizzled-3* (FZ3) e *Frizzled-6* (FZ6) e co-receptores que são *Ror1* e *Ror 2* e *Ptk7*. As moléculas *Vang-like1* (Vangl1) e *Vang-like2* (Vangl2); *Celsr1*, *Celsr2* e *Celsr3*; *Dishevelled-1* (Dvl1), *Dishevelled-2* (Dvl2) e *Dishevelled-3* (Dvl3); *Prickle1* (PK1) e *Prickle2* (PK2); e *Diversina* que são respectivamente homólogas as moléculas em drosófila *Strabismus/Vang*, *Stan/Flamingo*, *Dishevelled*, *Prickle* e *Diego* (KATOH, 2005;

MOELLER *et al.*, 2006; SCHWARZ-ROMOND *et al.*, 2002; TADA; KAI, 2009; WANG; NATHANS, 2007). Diferente desses, os genes *Scribbled* (*Scrb1*) e *Ptk7* fazem parte dessa via, porém somente em vertebrados, uma vez que ainda não há evidência da atuação desses genes em drosófila na via Wnt/PCP. (LU *et al.*, 2004; MURDOCH *et al.*, 2003).

Embora sejam conhecidas as moléculas envolvidas na via Wnt/PCP (WANG; NATHANS, 2007), ainda não é possível definir quais são os exatos mecanismos por trás dessa via. Mas, é possível ter um panorama geral (Fig. 2), as proteínas Wnt ativam a via PCP, através do recrutamento de Dsh e Dgo ao domínio citoplasmático dos receptores FZ. Logo, Dgo inibe a interação do complexo Pk-Vang com Dsh, isso permite a ativação de moléculas GTPases RhoA e RAC1, Rho-quinase (ROCK) e JNK (Jun N-terminal Kinase) via Dsh. A molécula Daam1, ativadora da morfogênese associada a Dsh, é responsável pela conexão de Dsh com RhoA e ROCK (Rho-quinase Associated) e o componente Rac1 é ativado diretamente por Dsh e isso resulta na ativação de JNK (CLARK; NOURSE; COOPER, 2012; HABAS; DAWID; HE, 2003; KATOH, 2005).

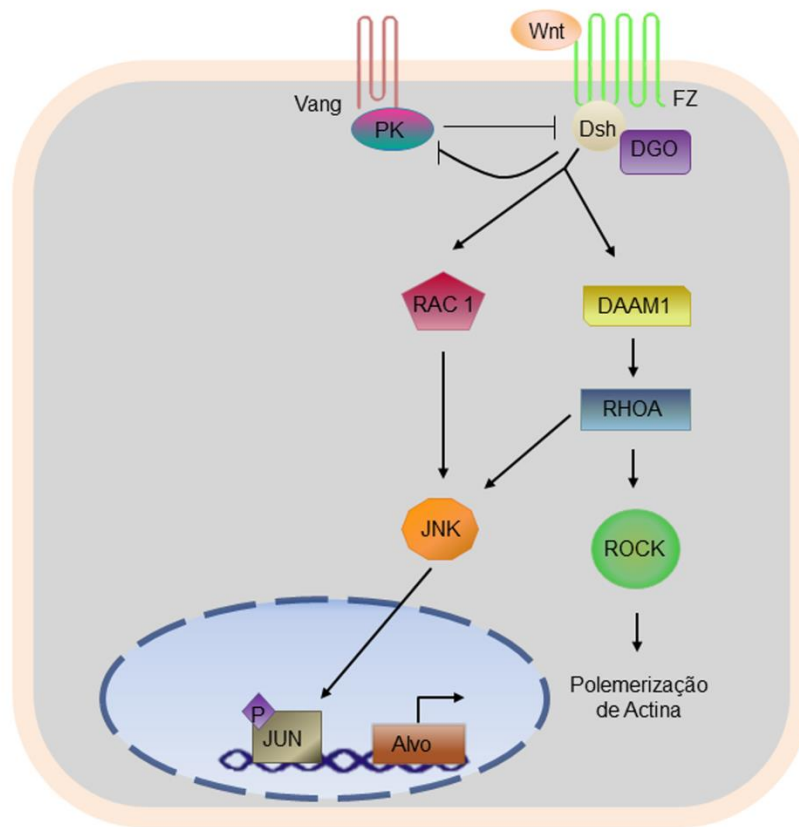


Figura 2. Via sinalização de Wnt/PCP. Sinais Wnt ativam a via PCP, recrutam Dsh e Dgo ao receptor FZ e Dgo inibe a interação do complexo Pk-Vang com Dsh ativando as moléculas GTPases RhoA e RAC1, Rho-quinase (ROCK) e JNK (Jun N-terminal Kinase). A molécula Daam1 é responsável pela conexão de Dsh com RhoA e ROCK (Rho-quinase Associated) e o componente Rac1 é ativado diretamente por Dsh e isso resulta na ativação de JNK.. DAAM1 (Ativador da morfogênese associado a Dsh); Dgo (Diego); Dsh (Dishevelled); FZ (Frizzled); Jun (gene alvo da JNK); P (grupo fosfato); PK (Prickle). Adaptado de BARROW (2006), CLARK; NOURSE; COOPER (2012), MOON *et al.*, (2004).

Uma vez interrompida, a via Wnt/PCP pode causar falhas no fechamento do tubo neural provocando defeitos congênitos, como por exemplo, espinha bífida. Em mamíferos, mutantes de *Celsr1* (CURTIN *et al.*, 2003), *FZ3/FZ6* (WANG; GUO; NATHANS, 2006), *Dvl1/Dvl2* (HAMBLET, 2002) apresentam craniorraquisque, uma condição em que a parte posterior do cérebro e do tubo neural permanecem abertos (SELLER, 1987). Em seres humanos, mutações em componentes exclusivos da via PCP como nas moléculas *Vangl1* (KIBAR *et al.*, 2007), foram identificadas em pacientes com

espinha bífida e mutações em *Vangl2* foram encontradas em fetos natimortos com vários defeitos do tubo neural (LEI *et al.*, 2010).

2. 2 As Proteínas Transmembranares Vangl

Tanto o gene *Van Gogh* (*vang/strabismus*), originalmente identificado em drosófila, como o seu ortólogo *Vangl2* em mamífero estão envolvidos nos defeitos de polaridade celular planar (ADLER, 2002; MLODZIK, 2002; TAYLOR *et al.*, 1998; WOLFF; RUBIN, 1998). Nos vertebrados, além do *Vangl2*, há a presença de mais um parálogo, conhecido por *Vangl1* e ambos apresentam cerca de 70% de similaridade de sequência, e apresentam idênticas estruturas secundárias preditas (TORBAN *et al.*, 2004). Tal semelhança, apresentada pelas estruturas secundárias, reforça a conservação de funções dessas moléculas, uma vez que a expressão ectópica do *Vangl1* no *Zebrafish* suprimiu parcialmente o defeito de gastrulação em mutantes de *Vangl2* (JESSEN; SOLNICA-KREZEL, 2004). Estruturalmente, os genes *Vangl1* e *Vangl2* codificam proteínas semelhantes de superfície transmembranares multipasso, possuindo regiões intracelulares amino e carboxi-terminal composta por dois *loops* limitados e descontínuos com motivo de ligação PDZ na sua porção carboxi-terminal (Fig. 3) (COPP; GREENE; MURDOCH, 2003; KIBAR *et al.*, 2001b; TORBAN *et al.*, 2004).

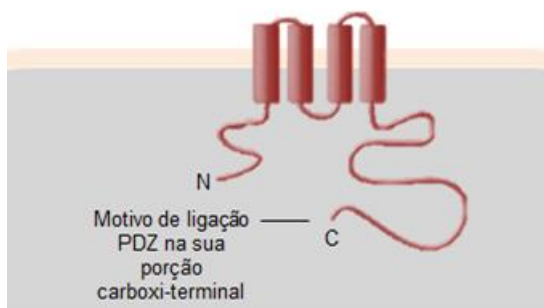


Figura 3. Esquema estrutural de *Vangl1* e *Vangl2*. N: Região Amino-terminal; C: Região carboxi-terminal.

Adaptado de KIBAR *et al.*, (2007).

O papel potencial da via PCP nas DTN veio à tona após clonagem posicional de *Vangl2* nos mutantes de camundongo conhecidos como *loop-tail* (*mouse loop-tail*) que apresentam craniorraquisise, uma DTN bastante grave (KIBAR *et al.*, 2001b; MURDOCH *et al.*, 2001). *Loop-tail* (LtapLp, também chamado de Lp ou Lpp1) é uma mutação semi-dominante que afeta a neurulação em camundongos, que possuem cauda enrolada (*loop-tail*) e apresentam movimentos trêmulos da cabeça. Embriões homozigotos exibem defeito no fechamento do tubo neural, que se estende a partir do mesencéfalo caudal à ponta da cauda (KIBAR *et al.*, 2001a).

Torban e colaboradores (2008) criaram um camundongo mutante para o gene *Vangl1* (*Vangl1/gt*) para compreender o papel dessa molécula durante o desenvolvimento embrionário e comparar esses indivíduos a camundongos mutantes para o gene *Vangl2*. Após a comparação dos dois tipos de mutante, demonstraram que tanto os heterozigotos *Vangl1 gt/+* e *Vangl2 lp/+* como os homozigotos *Vangl1 gt/gt* estavam saudáveis, porém notaram uma desorganização pequena, mas reprodutível dos feixes de estereocílios nas células ciliadas da cóclea em homozigotos de *Vangl1 gt/gt*. Já os homozigotos *Vangl2 lp/lp* exibiram defeitos semelhantes aos encontrados nos heterozigotos duplos *Vangl1 gt/+*; *Vangl2 lp/+*, que exibiram um conjunto de anomalias, tais como craniorraquisise, desorientação grave dos feixes de estereocílios cocleares (semelhante aos mutantes), e defeito cardíaco, sob a forma de artéria subclávia direita aberrante (TORBAN *et al.*, 2008).

Além disso, Song e colaboradores (2010) descobriram que as proteínas *Vangl1* e *Vangl2* são amplamente expressas durante a padronização direita-esquerda e ambas estão localizadas assimetricamente nas células formadoras do nódulo primitivo (células posteriores à notocorda) ao longo do eixo do ântero-posterior. Estes autores descreveram que na ausência dessas proteínas a assimetria direita-esquerda era interrompida. Diante disso, pode-se concluir que as células formadoras do nódulo são de fato polarizadas e que a via PCP tem um provável papel regulatório nessa etapa do desenvolvimento embrionário (SONG *et al.*, 2010).

A análise detalhada do padrão de expressão de *Vangl1* e *Vangl2* em cérebro de camundongos demonstrou que esses genes apresentam expressão distinta, embora também sejam co-expressos em diversas estruturas (TISSIR; GOFFINET, 2006; TORBAN *et al.*, 2008). Por exemplo, Torban e colaboradores (TORBAN *et al.*, 2004, 2008) mostraram

que a expressão de *Vangl1* é restrita às células da placa de assoalho do tubo neural e na notocorda, enquanto *Vangl2* está mais amplamente distribuído ao longo de todo o neuroepitélio e ausente na notocorda (MURDOCH *et al.*, 2001; TISSIR; GOFFINET, 2006; TORBAN *et al.*, 2008). Posteriormente, e em áreas medianas do cérebro, na retina e no telencéfalo ocorre uma abundante expressão de *Vangl2* em relação a *Vangl1* (TISSIR; GOFFINET, 2006). Além do mais, *Vangl1* e *Vangl2* são co-localizados no epitélio sensorial da cóclea de camundongo demonstrando padrões semelhantes de localização assimétrica em células ciliadas e células de suporte (SONG *et al.*, 2010) e além disso, foram co-expressos no coração, pele e rins.

Estes dados mostram que, em alguns sistemas, ou em algumas etapas de desenvolvimento, *Vangl1* e *Vangl2* poderiam interagir em algum tipo de complexo proteico específico (BELOTTI *et al.*, 2012). Vários estudos sugerem que *Vangl2* esteja associado a diferentes moléculas, podendo desencadear diversas formas de DTN. Por exemplo, indivíduos duplo mutantes para os genes *Dvl* e *Vangl2* (*Dvl3^{+/}*; *Ltap^{Lp}/+*) apresentam craniorraquisquise e/ou exencefalia (ETHERIDGE *et al.*, 2008) e a interação genética com *Wnt5a* poderia aumentar a penetração de fechamento do tubo neural, causando craniorraquisquise nos camundongos (QIAN *et al.*, 2007). Até o momento não foram identificadas mutações no gene *Vangl2* em humanos que apresentam craniorraquisquise (DOUDNEY *et al.*, 2005), no entanto mutações em *Vangl2* foram identificadas em fetos natimortos ou abortados que exibiam defeitos no tubo neural (LEI *et al.*, 2010). Contudo, mutações no gene *Vangl1* foram encontradas em humanos com DTN familiares e esporádicas, que exibiram defeitos na parte posterior do tubo neural.

Além disso, os resultados revelaram que as mutações *Vangl1* interromperam a interação física com *Dvl* podendo comprometer o recrutamento de *Dvl* para a membrana e, portanto, perturbar a sinalização molecular durante a gastrulação e fechamento do tubo neural (KIBAR *et al.*, 2007). Estes dados indicam que mutações no gene *Vangl1* são um fator de risco para defeitos do tubo neural em humanos. Posteriormente, mutações em *Vangl1* foram detectadas em disrafismo espinhal, dando maiores evidências que apoiam o papel de *Vangl1* como fator de risco para o desenvolvimento espinhal (KIBAR *et al.*, 2009).

Apesar da descoberta que mutações genéticas em PCP causam DTN tanto em camundongos como em humanos, os fenótipos nem sempre são de fato correspondentes. Por exemplo, os camundongos mutantes de *Vangl2* apresentam craniorraquisquise em homozigotos e espinha bífida aberta em heterozigotos (GREENE; STANIER; COPP, 2009) e ao contrário disso, mutações em *Vangl2* não foram identificadas em humanos com craniorraquisquise (DOUDNEY *et al.*, 2005). As DTNs humanas associadas à heterozigose para variantes de *Vangl2* incluem anencefalia, holoprosencefalia (não é um defeito de fechamento do tubo neural), e espinha bífida fechada. Além disso, em humanos foram encontradas mutações em *Vangl1* apesar de não haver fenótipo DTN em mutantes de camundongo homozigotos para este gene (KIBAR *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2010). Essa variação de fenótipo demonstra como o mesmo gene pode atuar em diferentes maneiras no desenvolvimento embrionário animal, ampliando de modo considerável os papéis que os genes podem executar em diferentes animais.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do padrão de expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2* durante a embriogênese de *Gallus gallus*

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Desenhar *primers* específicos para os genes *Vangl1*, *Vangl2*, sintetizar sondas de RNAm que são empregadas em hibridação *in situ whole mount* a fim de caracterizar o padrão de expressão desses genes em embriões de galinha em diferentes fases do desenvolvimento.
- 2) Realizar cortes seriados em vibrátomo dos embriões que foram submetidos à hibridação *in situ whole mount*, para melhor detalhamento do padrão de expressão dos genes *Vangl*.
- 3) Registrar o padrão de expressão dos genes *Vangl* em fotomicrografias dos embriões inteiros e dos cortes seriados utilizando microscópio estereoscópico e microscópio, respectivamente.
- 4) Comparar a expressão dos sítios de expressão dos genes *Vangl* obtidos através dos ensaios hibridação *in situ whole mount* com levantamento bibliográfico sobre outros grupos de animais vertebrados e correlacioná-los com as possíveis mutações descritas na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção de embriões

Embriões de galinha foram obtidos a partir de ovos fertilizados provenientes da granja Yamaguishi (www.yamaguishi.com.br). Os embriões foram incubados, em atmosfera úmida a 38,5°C em uma incubadora apropriada, até que atingissem os estádios de interesse para a realização dos experimentos, podendo ser enfim coletados (Projeto número 13621-A, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/Unicamp).

4.2 Coleta dos embriões de galinha

Em vias de realizar a coleta, os ovos foram retirados da incubadora e reservados em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Após esse período, a coleta iniciou-se ao quebrar o ovo e colocar o conteúdo em uma placa de petri, mantendo o embrião voltado para a superfície. O albúmen, que recobre o embrião, foi removido com lenço de papel e sobre o embrião, agora exposto, foi posicionada uma moldura de papel filtro que adere às membranas embrionárias e ao recortar ao redor da moldura as membranas são desprendidas de forma que possibilitam a retirada do embrião do interior do ovo. Com o auxílio de uma pinça, os embriões foram transferidos para uma placa contendo tampão fosfato salino 0,1M pH 7,4 com 0,15M (PBS 1X) e as suas membranas extra-embrionárias foram removidas com uso de microtesouras. Após a dissecação, os embriões foram fixados em 4% paraformaldeído (PFA) e mantidos a temperatura a 4°C. Esta etapa de fixação é fundamental, pois consiste em manter a integridade dos tecidos após a morte para que não ocorram alterações das estruturas.

4.3 Estadiamento dos embriões de galinha

O estadiamento dos embriões de galinha foi feito segundo os critérios descritos por Hamburger & Hamilton (1951) (Tabela 1).

Tabela 1. Estádios e principais características morfológicas dos embriões de galinha.

Estádios	Tempo de incubação	Morfologia e número de somitos
HH4	17 horas	Linha primitiva definitiva
HH5	18-19 horas	Formação do processo cefálico
HH6	19-21 horas	Dobra de cabeça
HH7	21-22 horas	Um par de somitos
HH8	22-24 horas	Quatro pares de somitos
HH9	29 horas	Sete pares de somitos; vesícula óptica
HH10	33 horas	10 pares de somitos; vesículas cefálicas
HH12	48 horas	16 pares de somitos; telencéfalo
HH13	50 horas	19 pares de somitos; canal atrioventricular
HH14	52 horas	22 pares de somitos; flexura do tronco
HH15	53 horas	22 a 24 pares de somitos
HH16	55 horas	Entre asas e patas 17 a 20 pares de somitos; broto dos membros
HH17	60 horas	29 a 32 pares de somitos; epífises
HH18	65 horas	30 a 36 pares de somitos
HH19	68 horas	37 a 40 pares de somitos estendidos até a cauda

HH20	3.0-3.5 dias	40-43 pares de somitos; pigmentação nos olhos
HH21	3.5 dias	43-44 pares de somitos
HH22	3.5-4.0 dias	Presença de somitos até a ponta da cauda
HH23	4 dias	O contorno dorsal do rombencéfalo até a cauda é uma linha curva
HH24	4.5 dias	Placa dos dígitos
HH25	4.5-5.0 dias	Articulação do tornozelo e ombro
HH26	5 dias	Dígitos 1 e 3
HH27	5.0-5.5 dias	Bico
HH28	5.5-6.0 dias	3 dígitos anteriores; 4 dígitos posteriores
HH29	6.0-6.5 dias	Rudimento do quinto dígito do pé
HH30	6.5-7.0 dias	Folículos das penas
HH31	7.0-7.5 dias	Presença da membrana interdigital
HH35	8 dias	Falanges nos membros posteriores

4.4 Extração de RNA total de embriões de galinha

Amostras de RNA total foram obtidas a partir dos embriões de galinha (HH10). Para tanto, embriões inteiros foram transferidos para tubos falcons de 15mL livres de RNase contendo 2 mL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) e o conteúdo foi homogeneizado com o auxílio de agulha e seringa até que todo o tecido fosse macerado. Em seguida, as amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 min. em temperatura ambiente. Para cada 300µL do homogenado, adicionou-se 200µL de clorofórmio seguido de homogeneização em vórtex durante 30 segundos. Após 5 min. em temperatura ambiente o homogenado foi submetido à centrifugação por 15 min. a 12000 x g a 4°C. A fase aquosa

foi transferida para um novo tubo de 1,5mL e a ela foi acrescentada 500µL de álcool isopropílico, e após homogeneização suave, as amostras foram mantidas por 10 min. à temperatura ambiente para maximizar o processo de precipitação do RNA. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 min. a 4°C e após completa remoção do sobrenadante, adicionou-se 1mL de etanol 70% gelado para nova centrifugação por 10 min. a 7500 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* acrescentado 1mL de etanol absoluto gelado. Logo, as amostras foram centrifugadas a 7500 x g a 4°C por 10 min. e o sobrenadante foi removido e por fim, após secagem à temperatura ambiente, o *pellet* foi solubilizado em 40µL de água tratada com DEPC e armazenado a - 80°C.

4.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A partir do RNA obtido em 4.4, quantificou-se a amostra no nanodrop (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 260/290 nanômetros e então realizou-se a síntese do cDNA para posterior Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o Kit *SuperScript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para isso, ao RNA total foi acrescentado H₂O tratada com DEPC a fim de se obter volume final igual 10µL. Em seguida, esses reagentes foram incubados a 65°C por 5 min. e então foram incubados em 4°C visando promover a desnaturação do RNA. Posteriormente acrescentou-se 4 µL tampão 10X (Tris-HCl 200mM pH 8,4 e KCl 25 mM), MgCl₂ (3mM), 2 µL dNTPs (0,5mM de cada nucleotídeo), 1 µL RNA *Inhibitor* e 1 µL da enzima transcriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação foi incubada por duas horas a 42°C a fim de gerar cópias de cDNA a partir do RNA total empregado como molde. Por fim a reação foi incubada a 95°C por 5 min. para que ocorresse a inativação da enzima transcriptase reversa. Os cDNAs obtidos nesta etapa foram empregados posteriormente em reações de PCR.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para os ensaios de RT-PCR foram usados *primers* apropriados para cada amostra de cDNA de interesse. Cada reação de PCR foi feita em volume final igual a 25µL que incluíam 1µL de cDNA, 10pmol de *primer* direto e reverso (Tabela 2), 0,5mL de dNTP

(0,2mM de cada nucleotídeo), 1,5 mM de $MgCl_2$, 4,5 μ L de tampão de PCR 10X, 2,5% de DMSO e 1U de Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia, Brasil). As condições de todas as reações de PCR foram: denaturação a 95°C por 30s; anelamento dos *primers* a 60°C por 30s; extensão a 72°C por dois minutos. Foram feitos 35 ciclos e a extensão final a 72°C por 10 min.

4.7 Síntese de ribossonda

As sondas foram sintetizadas em duas etapas, inicialmente o cDNAs de interesse foi submetido à uma primeira reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos sem o promotor da enzima RNA polimerase T7 (Tabela 2). O produto obtido do primeiro PCR foi diluído 10x em 1 μ L, e submetido a uma segunda reação de PCR, utilizando *primers* específicos contendo a região promotora da enzima RNA polimerase T7 acoplada a extremidade 5' (Tabela 2). Essa técnica permite a obtenção de sequências-moldes para a síntese da ribossonda, uma vez que o fragmento amplificado apresenta o sítio promotor para a RNA polimerase.

Os produtos obtidos da segunda PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick – PCR Purification Kit (Qiagen) e, em seguida, o DNA purificado pode ser utilizado para transcrição das sondas. Para síntese da sonda, adicionamos, a 1 μ g de DNA purificado, 2 μ L de tampão de transcrição 10X (10X *transcription buffer*-Ambion), 2 μ L de 0,1M de DTT, 2 μ L de uma mistura contendo ribonucleotídeos e UTP conjugado a digoxigenina (DIG), 0,5 μ L de inibidor de RNase, 1 μ L da T3 RNA polimerase e água livre de ribonucleases para completar o volume final de 20 μ L e incubamos a 37°C por duas horas. Após a incubação, adicionou-se ao tubo 2 μ L de DNase I (2U) (Fermentas) para remover o produto de PCR utilizado como molde. Esta mistura foi incubada durante 30 min. a 37°C e depois colocada em 4°C. O RNA transcrito foi purificado em coluna (Sigma S5059) e ressuspendido em 30 μ L em água livre de ribonucleases e armazenados a -20°C.

A fim de conferir a qualidade da ribossonda sintetizada, foi realizada uma eletroforese de 1 μ L da solução final ressuspendida utilizando gel de agarose 1,5% e a qualidade da ribossonda sintetizada foi avaliada através da intensidade e definição das bandas obtidas após a eletroforese. A partir de uma avaliação positiva, é necessário

quantificar a ribossonda através de leitura em nanodrop (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 260/290 nanômetros podendo então realizar a diluição em tampão de pré-hibridação na concentração de 1 µg de sonda/mL. As ribossondas diluídas em tampão de pré-hibridação foram armazenadas a -20°C.

Tabela 2. *Primers* utilizados para confecção de sondas com o promotor da enzima RNA polimerase T7. Em negrito sublinhado, destaque para a região promotora da enzima.

Gene		Sequência	Fragmento
<i>Vangl1</i> Gg	1 ^a	Direto 5' ACCGTTGCTCGGGAATGACGC 3'	384 pb
	PCR	Reverso 5' ATGTCTGCCTTGGGCTGGCG 3'	
	2 ^a	Direto 5' ACCGTTGCTCGGGAATGACGC 3'	
	PCR	Reverso 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> ATGTCTGCCTTGGGCTGGCG 3'	
<i>Vangl2</i> Gg	1 ^a	Direto: 5' CAAACTCCTCATCCTCCTGC 3'	602 pb
	PCR	Reverso 5' GTGAAAGCCTCTTCCACTGC 3'	
	2 ^a	Direto: 5' CAAACTCCTCATCCTCCTGC 3'	
	PCR	Reverso 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> GTGAAAGCCTCTTCCACTGC 3'	

4.8 Processamento dos embriões para hibridação *in situ*

Após a fixação, os embriões passaram para a etapa de pré-tratamento, onde foram lavados em PBT (PBS 1X + 0,1 % Tween-20) durante 5 min. de modo a possibilitar a completa remoção do fixador. Os embriões foram então desidratados em uma sequência de soluções de metanol a 25%, 50%, 75% em PBT durante 5 min. em cada solução. Em seguida, ocorreu a fase de clareamento, em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 6%

em PBT, à temperatura ambiente, por uma hora. Nesta fase, diminuiu-se a intensidade de pigmentos presentes no sangue e nos olhos, por exemplo, e ao mesmo tempo há inativação das fosfatases endógenas que podem gerar reação de fundo (KADOTA *et al.*, 1987). Enfim, os embriões foram armazenados em Metanol 100% a -20°C, por no máximo, dois meses para serem utilizados nos ensaios HIS.

4.9 Ensaios de hibridação *in situ* de embriões de galinha.

Ensaios de WISH tem como finalidade demonstrar um panorama geral das estruturas onde um determinado gene é expresso durante os estádios do desenvolvimento.

Após os embriões terem passado pela etapa de fixação, continuou-se então a etapa denominada de pré-tratamento onde os embriões armazenados em metanol 100% foram reidratados através de banhos seriados decrescentes de metanol em PBT (75%, 50% e 25%) por 5 min. em cada solução e duas lavagens em PBT por 5 min. à temperatura ambiente. Após a reidratação, os embriões foram lavados em PBT e tratados com detergente mix (Igepal 1%, SDS 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 1mM pH8,0 e NaCl 150mM). Este tratamento consiste em três banhos com a solução de detergente mix por 20 min. cada, à temperatura ambiente a fim de promover o acesso da ribossonda ao RNAm no interior de cada célula no momento da hibridação, sem comprometer a integridade do embrião. A ação do detergente mix é interrompida lavando-se os embriões duas vezes em PBT durante 5 min. à temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões foram refixados em PFA 4% contendo glutaraldeído a 0,25% em PBS por 20 min. e lavados três vezes em PBT por 5 min. à temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram lavados em tampão de pré-hibridação (50 % de formamida, 5x de SSC 20x pH 4,5, 2% de SDS 20%, 250 µg/ml de RNAt 20 µg/µl, 100 µg/ml de heparina 50 µg/µl e 2% de BBR) 50% em PBT, à temperatura ambiente. Logo, os embriões foram incubados em tampão pré-hibridação a 70°C por, pelo menos, 2 horas a 70°C. Após esse período, o tampão de pré-hibridação foi substituído pelo tampão de hibridação (correspondente à tampão de pré-hibridação contendo 1µg/mL da ribossonda) por pelo menos 12 horas a 70°C. Em seguida, os embriões foram lavados a 70°C em solução X (formamida 50%, SSC 2X pH 4,5 e SDS 1%) pré-aquecida quatro vezes durante 30 minutos. Após o tratamento

com Solução X, os embriões foram lavados por 10 min. a 70°C em solução X 50% pré-aquecida e MABT 50%. A partir daí, os embriões serão preparados para a etapa de incubação de anticorpo, começando por três lavagens rápidas em solução tampão MABT (ácido maléico 100mM, NaCl 150mM, levamisole 2mM e Tween-20 0,1%, em pH 7,5) à temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram lavados duas vezes por 30 min. em solução tampão MABT, à temperatura ambiente. A partir desse momento, os embriões foram pré-bloqueados em reagente de bloqueio Boehringer Mannheim (BMB) a 2% em tampão MAB durante uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões continuaram a ser pré-bloqueados em uma solução de alta concentração protéica (BMB 2%, soro de ovelha inativado 10% em tampão MABT, por uma a duas horas. Esta fase é importante para bloquear sítios aos quais o anticorpo pode eventualmente se ligar inespecificamente. Após o pré-bloqueio, os embriões foram incubados em solução contendo reagente de bloqueio a 2% em tampão MABT, 1% de soro de ovelha inativado e anticorpos anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina na titulação de 1:2000 durante pelo menos 12 horas a 4°C. Em seguida, os embriões foram lavados em tampão MABT à temperatura ambiente (oito banhos de uma hora cada), e pelo menos por mais 12 horas a 4°C. Após as lavagens em tampão MABT, os embriões foram lavados em NTMT pH 9,5 (NaCl 100mM, Tris 100mM pH 9,5, MgCl₂ 50mM, Tween-20 0,1%, Levamisole 2mM) à temperatura ambiente. Posteriormente, iniciou-se a etapa de detecção da sonda, onde os embriões foram tratados com tampão NTMT juntamente ao substrato para fosfatase alcalina, BCIP/NBT (117 µg/mL de BCIP, 225 µg/mL de NBT em NTMT), protegidos da luz, a fim de detectar a ação da fosfatase alcalina até a reação atingir intensidade desejada. Devido a especificidade de cada ribossonda, o tempo de revelação pode variar bastante, o gene *Vangl1* teve seu sinal revelado dentro de 4 a 5 dias e o gene *Vangl2* entre 2 a 3 dias. Para cessar a reação de revelação, os embriões foram lavados em PBT 1X, fixados em PFA 4% a 4°C por pelo menos 12 horas. Após a fixação os embriões foram lavados em PBS 1X e passaram por uma série crescente de glicerol em PBS (25%, 50% e 80%) por 5 min. em cada solução à temperatura ambiente e armazenados em glicerol 80%.

4.10 Análise dos embriões inteiros (*Whole mount*)

Após ensaios de WISH, os embriões de galinha foram analisados ao microscópio estereoscópico (Olympus, SzX7 e Leica MZ16 F) visando à identificação das estruturas/tecidos que apresentem transcritos para os genes estudados. Os resultados obtidos foram examinados e registrados em fotomicrografias organizadas em pranchas a fim de expor o padrão de expressão dos genes estudados. Os embriões foram fotografados pela câmera *Cool SNAP-Pro-color – Media Cybernetics* e as fotos capturadas pelo programa *Image-Pro Plus* versão 4.1.0.0 para Windows 95/NT/98 – Media Cybernetics.

4.11 Cortes dos embriões de galinha em vibrátomo

Para maior detalhamento do padrão de expressão, os embriões foram incluídos em gelatina 20%, fixadas em PFA 4% *overnight* e cortadas em vibrátomo (OTS-3000; Electron Microscopy Sciences) com aproximadamente 50µm de espessura. As lâminas foram montadas com lamínulas em meio de montagem com glicerol 80%.

4.12 Análise dos cortes de embrião

Os cortes dos embriões de galinha foram analisados no fotomicroscópio Olympus (BX51) para delinear a expressão dos genes estudados nas estruturas do embrião. Os resultados obtidos foram examinados e registrados em fotomicrografias organizadas em pranchas a fim de expor um maior detalhamento do padrão de expressão dos genes estudados. Os embriões foram fotografados pela câmera Q-Color 3 Olympus e as fotos capturadas pelo programa *Programa Image-Pro Plus* versão 6.0 para Windows 95/NT/98 .

5. RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Dinâmica da expressão de *Vangl1* nas etapas iniciais da embriogênese de galinha

A sonda específica para o gene *Vangl1* detectou forte expressão nas fases de gastrulação, neurulação e no início da organogênese. Durante a etapa de gastrulação (estádio HH5), houve uma evidente expressão de *Vangl1* na linha primitiva, que mostrou ser mais intensa na região posterior desta estrutura, bem como no nódulo primitivo, placa neural e na notocorda (Fig. 4 A, Ai, Aii). Além disto, uma expressão fraca mas identificável de *Vangl1* foi detectada no crescente cardiogênico (Fig. 4 A), um campo contendo células mesodérmicas que formarão o coração em etapas subsequentes da embriogênese de aves.

No estágio HH6 a expressão na linha primitiva, nódulo de Hensen e notocorda foram mantidos (Fig. 4 B). Durante esta etapa, os movimentos celulares são importantes para promover o encurtamento da linha primitiva e a dispersão das células do nódulo (WAKELY; ENGLAND, 1979), sendo que as células emergentes do nódulo continuam a expressar *Vangl1* em HH6 e irão contribuir para a formação da notocorda (Fig. 4 A, Ai, B, Bi, Bii). Neste mesmo estágio, observa-se que o embrião inicia a fase de neurulação, momento em que surgem novos domínios de expressão de *Vangl1*, situados na pregacefálica e na placa neural e nas pregas neurais (Fig. 4 B, Bi-Biii). Estas estruturas se formam por meio de importantes eventos morfogenéticos, que irão modificar o formato tridimensional do embrião conforme o desenvolvimento avança, compondo um domínio cefálico definido e gerando o tubo neural que irá compor o sistema nervoso central e periférico do embrião.

No estágio HH8, transcritos de *Vangl1* continuam a ser expressos na linha primitiva posterior (Fig. 4 C) e uma expressão ampla é notada ao longo de toda placa neural, conforme observado nos cortes ao longo do eixo ântero-posterior do embrião (Fig. 4 C-Civ). Ainda neste estágio, nota-se uma expressão específica no assoalho da faringe (Fig. 4 C, Ci).

No estágio HH11, transcritos de *Vangl1* são expressos ao longo de todo o tubo neural, incluindo a região que irá formar o encéfalo onde a expressão deste gene é

particularmente intensa. Interessantemente, a expressão de *Vangl1* no tubo neural apresenta diferenças regionais. Na porção mais anterior do tubo neural, a expressão de *Vangl1* concentra-se na camada ventricular do neuroepitélio, região localizada próxima à superfície interna do tubo neural e que fica em contato com o lúmen desta estrutura, onde se localizam células em intensa atividade proliferativa (Fig. 4 Dii). Contudo, nas regiões mais caudais do tubo neural, a atividade de *Vangl1* distribui-se uniformemente no neuroepitélio e há uma fraca expressão na notocorda (Fig. 4 Dii-iv). Outro importante sítio de expressão de *Vangl1* corresponde às vesículas ópticas (Fig. 4 D, Di).

Durante o estágio HH15, a distribuição dos transcritos de *Vangl1* predomina no sistema nervoso em desenvolvimento, de maneira semelhante ao observado no estágio HH11, havendo expressão nos três compartimentos encefálicos (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), bem como ao longo do tubo neural posterior que irá gerar a medula espinhal (Fig. 4 D, Di, E, Ei). Além disto, neste estágio foi possível observar a atividade de *Vangl1* na vesícula óptica, em um padrão de expressão que se iniciou no estágio HH11 (Fig. D, Di) e se fortalece no estágio HH15 (Fig. 4 E, Ei).

Ainda no estágio HH15 (Fig. 4 E, Eii-Eiv), a expressão de *Vangl1* na notocorda aumenta quando comparada ao estágio HH11 (Fig. 4 Dii). Surgem também outros domínios de expressão, tendo sido observada expressão de *Vangl1* nos miótomos dos somitos compartimentalizados (Fig. 4 Eii) e nos túbulos mesonéfricos (Fig. 4 Eiii). Por fim, no estágio HH15 os transcritos *Vangl1* são fortemente expressos no endoderma do tubo digestivo e no arco branquial mandibular (Fig. 4 E).

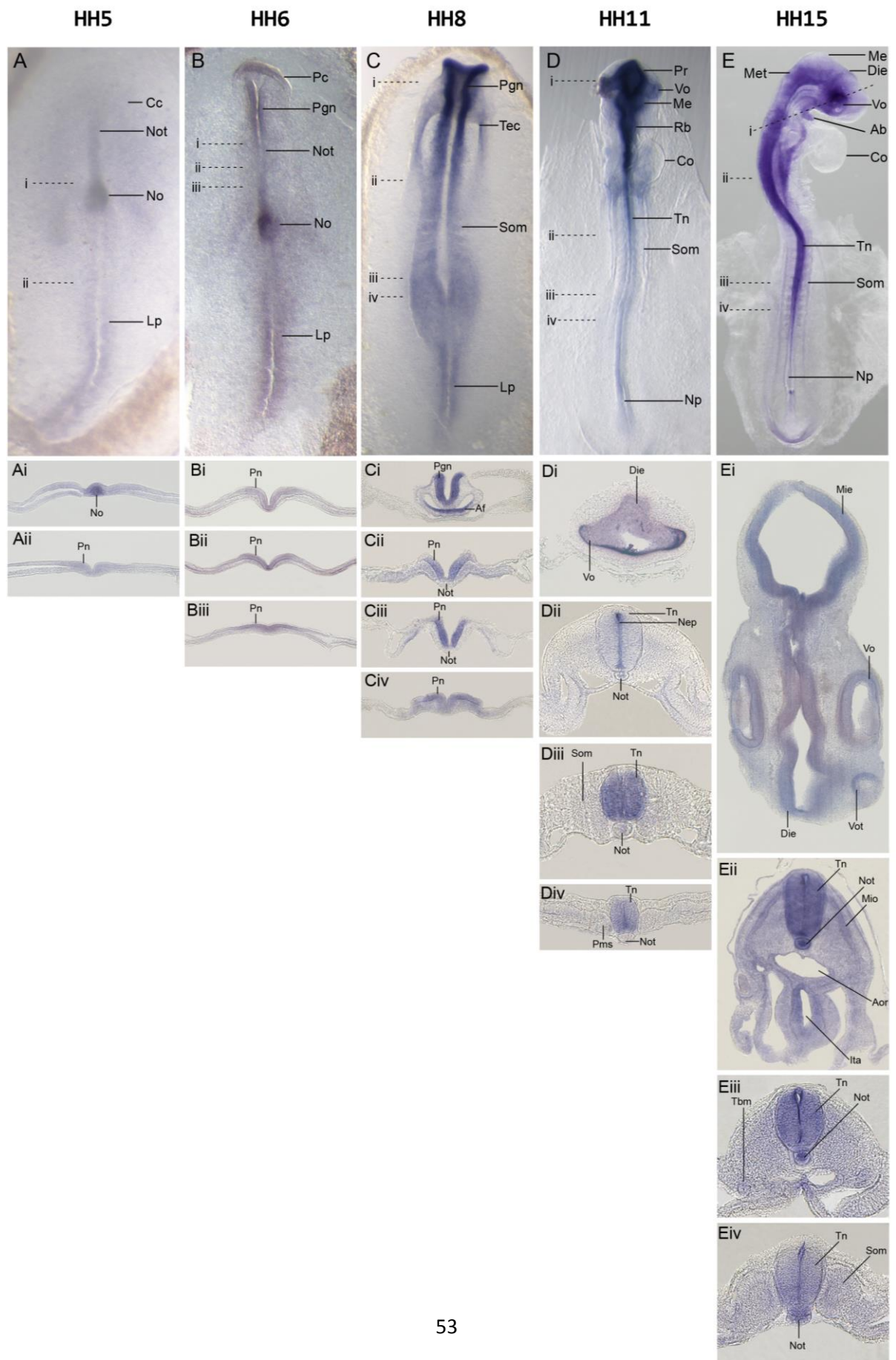


Figura 4. Expressão de *Vangl1* nas fases de gastrulação, neurulação e início da organogênese. Os estágios de desenvolvimento analisados são indicados na parte superior do painel. Vista dorsal de embriões inteiros nos estádios HH5 (A), HH6 (B), HH8 (C), HH11 (D) e HH15 (E). Os níveis axiais dos cortes transversais apresentados nas fileiras inferiores do painel foram indicados do lado esquerdo dos embriões inteiros e seguem a mesma indicação de estágio, a saber HH5 (Ai-ii), HH6 (Bi-iii), HH8 (Ci-iv), HH11 (Di-iv) e HH15 (Ei-iv). Abreviaturas: Abm: arco branquial mandibular; Af: assoalho da faringe; Aor: aorta dorsal; Cc: crescente cardiogênico; Co: coração; Die: diencéfalo; Lp: linha primitiva; Me: mesencéfalo; Met: Metencéfalo; Mie: mielencéfalo; Mio: miótomo; Nep: neuroepitélio; Np: Neuróporo posterior; No: nódulo de Hensen; Not: notocorda; Ita: intestino anterior; Pc: prega cefálica; Pgn: Prega neral; Pms: placa mesodérmica segmentar; Pn: placa neural; Pr: prosencéfalo; Rb: rombencéfalo; Som: somito; Tbm: túbulos mesonéfricos; Tec: túbulos endocárdicos; Tn: tubo neural; Vo: vesícula óptica; Vot: vesícula ótica.

5.2 Dinâmica da expressão de *Vangl2* nas etapas iniciais da embriogênese de galinha

Assim como o observado para o gene *Vangl1*, a sonda específica para *Vangl2* identificou transcritos nas fases de gastrulação, neurulação e no início da organogênese dos embriões de galinha. No estágio HH5, transcritos de *Vangl2* foram expressos ao longo de toda a linha primitiva, no entorno do nódulo primitivo (Fig. 5 A) e na placa neural e mRNAs para *Vangl2* foram detectados no crescente cardiogênico (Fig. 5 A, Ai).

No estágio HH6, a região prega cefálica constitui um novo sítio de expressão de *Vangl2*, em adição ao nódulo primitivo e à linha primitiva (Fig. 5 B). Neste estágio a expressão de *Vangl2* permanece associada às pregas neurais e ao neuróporo anterior, bem como na placa neural em toda a sua extensão (Fig. 5 Bi-Biii).

No estágio HH8, os transcritos de *Vangl2* são localizados nas estruturas descritas para o estágio anterior, incluindo neuróporo anterior, placa, e pregas neurais, nódulo de Hensen e linha primitiva (Fig. 5 C, Ci-iv). Contudo, neste estágio há uma expressão definida do gene nos túbulos endocárdicos e uma expressão ampla no endoderma do tubo digestivo (Fig. 5 C, Ci).

Outro sítio de expressão corresponde ao mesoderma intra-embrionário, onde os transcritos de *Vangl2* concentram-se nas regiões onde está havendo segmentação, dobramento ou compartimentalização nos diferentes tipos de mesoderma (Fig. 5 Dii, Diii). Esta expressão mesodérmica concentra-se na porção basal das células em todos os

diferentes tipos de mesoderma: paraxial, intermediário e mesoderma lateral somático e visceral (Fig. 5 Dii, Diii). Há uma expressão branda de *Vangl2* na placa mesodérmica segmentar e nos somitos em processo de compartimentalização (Fig. 5 D, Dii-Div).

No estágio HH11 foi detectada uma forte expressão de *Vangl2* no neuroepitélio do tubo neural (Fig. 5 D, Di-Div), que se alonga por todos os três compartimentos encefálicos, bem como por toda a região precursora da medula espinhal (Fig. 5 D, Di-Div). Ainda em HH11, foi observada a expressão de *Vangl2* nas vesículas ópticas (Fig. 5 D, Di). No desenvolvimento do encéfalo, observou-se uma expressão intensa de *Vangl2* na porção ventral das vesículas encefálicas, com níveis de expressão mais elevados ao nível das flexuras cefálicas (diencefalo/mesencefalo e mesencefalo/rombencefalo) (Fig. 5 E, Ei).

No estágio HH15, a expressão de *Vangl2* foi mantida no neuroepitélio do tubo neural (Fig. 5 D, Dii-Div, E, Eii-iv), bem como no neuróporo posterior (Fig. 5 D, E). Ainda no estágio HH15, há uma expressão intensa de *Vangl2* no tubo digestivo anterior, que neste estágio assume a forma de um saco fechado e também há expressão no arco branquial mandibular (Fig. 5 E) e uma fraca expressão nos túbulos mesonéfricos (Fig. 5 Eiii). Finalmente, é possível observar uma forte expressão de *Vangl2* na região dos miótomos dos somitos compartimentalizados (Fig. 5 Eii, Eiii) e uma expressão menos intensa nos somitos jovens (Fig. 5 Eii, Eiii).

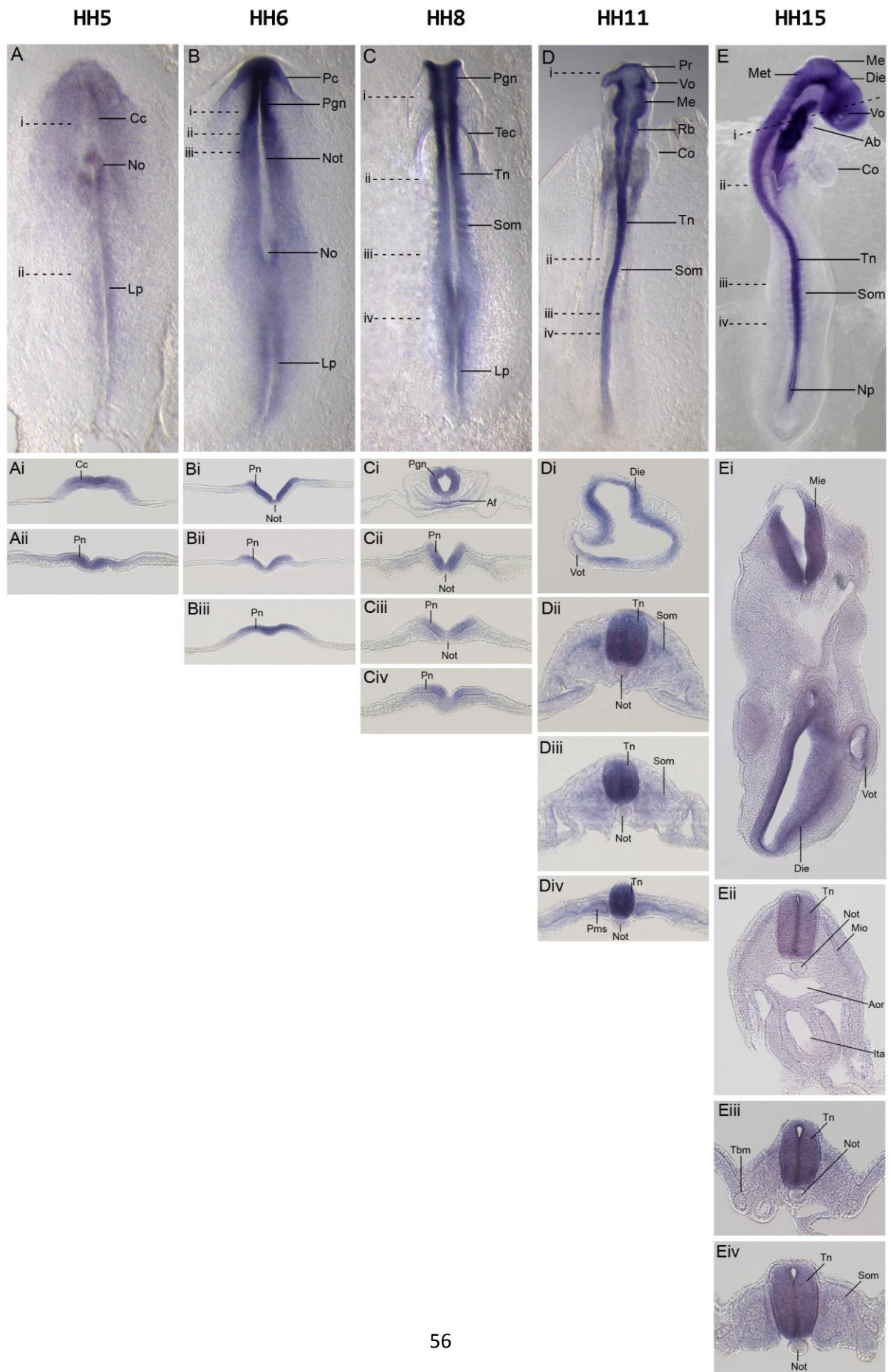


Figura 5. Expressão de *Vangl2* nas fases de gastrulação, neurulação e início da organogênese. Os estágios de desenvolvimento analisados são indicados na parte superior do painel: Vista dorsal de embriões inteiros nos estádios HH5 (A), HH6 (B), HH8 (C), HH11 (D) e HH15 (E). Os níveis axiais dos cortes transversais apresentados nas fileiras inferiores do painel foram indicados do lado esquerdo dos embriões inteiros e seguem a mesma indicação de estágio, a saber HH5 (Ai-ii), HH6 (Bi-iii), HH8 (Ci-iv), HH11 (Di-iv) e HH15 (Ei-iv). Abreviaturas: Abm: Arco branquial mandibular; Af: assoalho da faringe; Aor: aorta dorsal; Cc: crescente cardiogênico; Co: coração; Die: diencéfalo; Lp: linha primitiva; Me: mesencéfalo; Met: Metencéfalo; Mie: mielencéfalo; Mio: miótomo; Nep: neuroepitélio; Np: Neuróporo posterior; No: nódulo de Hensen; Not: notocorda; Ita: intestino anterior; Pc: prega cefálica; Pgn: Prega neral; Pms: placa mesodérmica segmentar; Pn: placa neural; Pr: prosencéfalo; Rb: rombencéfalo; Som: somito; Tbm: túbulos mesonéfricos; Tec: túbulos endocárdicos; Tn: tubo neural; Vo: vesícula óptica; Vot: vesícula ótica.

6. DISCUSSÃO

Devido à importância da família gênica *Vangl* no desenvolvimento embrionário dos vertebrados foi realizada uma caracterização espacial e temporal desses genes na embriogênese de aves. As fases do desenvolvimento embrionário que foram abordadas nos ensaios de WISH partiram da etapa da gastrulação, etapa da embriogênese caracterizada pelo surgimento da linha primitiva e da notocorda, além de corresponder ao período no qual são estabelecidos os planos corporais do embrião. Em seguida, a análise focalizou em embriões na neurulação, momento em que surge a placa neural e durante a qual deve haver o dobramento e fechamento do tubo neural.

Finalmente, nossas análises de WISH analisaram embriões na fase de organogênese inicial, quando estão se estabelecendo os primórdios de diferentes tecidos e órgãos, que continuam a se diferenciar e posteriormente originam tecidos e órgãos especializados (GILBERT, 2003). Os ensaios de WISH demonstraram que os genes *Vangl* estão presentes nessas três etapas do desenvolvimento embrionário, sendo expressos principalmente na formação do sistema nervoso central.

6.1 O padrão de expressão dos genes da família *Vangl* é conservado em Vertebrados

Ao comparar os padrões de expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2* em galinha com os dados disponíveis na literatura sobre a expressão destes genes em camundongos, *Zebrafish* (“peixe - paulistinha”) e *Xenopus* (anfíbio), três outros importantes organismos-modelo da embriologia, tornam-se evidentes as semelhanças e diferenças que irão ser abordadas neste tópico e que foram sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Sumário dos dados de expressão de *Vangl1* e *Vangl2* em galinha em comparação com os domínios de expressão conhecidos em camundongos *MmVangl1-2* (BELOTTI *et al.*, 2012; DOUDNEY *et al.*, 2005; KIBAR *et al.*, 2001b; PHILLIPS *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2010; TISSIR; GOFFINET, 2006), em *Xenopus laevis* *XlVangl1-2* (GOTO; KELLER, 2002; PARK; MOON, 2002) e em Zebrafish *ZfVangl1-2* (JESSEN *et al.*, 2002; PARK; MOON, 2002). Os campos não preenchidos indicam que não há dados de expressão disponíveis na literatura.

TABELA 3. SUMÁRIO DE DADOS								
								
DOMÍNIOS	<i>Mm</i> <i>Vangl1</i>	<i>Gg</i> <i>Vangl1</i>	<i>Xl</i> <i>Vangl1</i>	<i>Zf</i> <i>Vangl1</i>	<i>Mm</i> <i>Vangl2</i>	<i>Gg</i> <i>Vangl2</i>	<i>Xl</i> <i>Vangl2</i> (<i>xstbm</i>)	<i>Zf Vangl2</i> (<i>stbm</i>)
Linha Primitiva		✓			✓	✓		
Nódulo primitivo		✓			✓	✓		
Placa neural	✓	✓			✓	✓	✓	
Tubo neural	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Placa do assoalho do tubo neural	✓	×			✓ /×	×	✓	
Placa do teto do tubo neural	✓	×			✓	×	✓	
Notocorda	✓	✓			✓ /×	✓ /×	✓ /×	×
Prosencéfalo	✓ /×	✓ /×		✓	✓	✓		
Mesencéfalo	×	×			✓	✓		
Rombencéfalo	✓	✓		✓	×	✓		✓
Vesícula Óptica	×	✓		✓	✓	✓		

Em galinha e camundongo (SONG *et al.*, 2010), a expressão de *Vangl1* no nódulo de Hensen ou primitivo apresenta um padrão de expressão similar, pois em ambos a expressão está presente e os transcritos de *Vangl2* distribuem-se no entorno desta estrutura (SONG *et al.*, 2010). No desenvolvimento de galinha, a expressão de *Vangl1* na linha primitiva é mais forte na região posterior, enquanto que a expressão de *Vangl2* está amplamente distribuída em toda esta estrutura. Logo, pode-se sugerir que os genes *Vangl* desempenham um mesmo papel molecular em diferentes vertebrados durante esta fase do desenvolvimento embrionário.

Na notocorda foi identificada uma grande concentração de transcritos de *Vangl1* em camundongo (SONG *et al.*, 2010; TORBAN *et al.*, 2008) e em galinha. Por outro lado, *Vangl2* está envolvido em contradições, já que de acordo com Torban *et al.*, (2008) e Park & Moon (2002), o gene não é expresso na notocorda de camundongo e de *Xenopus*, entretanto, de acordo com Song *et al.*, (2010) e Goto & Keller (2002), há uma expressão fraca de *Vangl2* nesses animais e no *Zebrafish* não foi identificada a expressão desse gene (PARK; MOON, 2002). Os resultados evidenciam uma expressão dinâmica de *Vangl2* na notocorda, que talvez explique os resultados contraditórios de outros autores. Em galinha, entre os estádios HH5-HH8 não foram detectados transcritos de *Vangl2* na notocorda, embora nos estádios mais avançados (HH11-HH15), há uma clara expressão deste gene, mostrando a necessidade de detalhar o padrão de expressão do gene em vários estádios do desenvolvimento embrionário para que a análise seja conclusiva.

A placa, as pregas e o tubo neural são áreas de intensa expressão da família *Vangl*, estando presentes em camundongo (TORBAN *et al.*, 2008), galinha, *Xenopus* (GOTO; KELLER, 2002; PARK; MOON, 2002) e *Zebrafish* (JESSEN *et al.*, 2002; PARK; MOON, 2002), de forma que o padrão de expressão destes genes varia pouco entre esses vertebrados. Em concordância com esta observação, tanto em camundongo (TORBAN *et al.*, 2008) como em galinha, transcritos de *Vangl1* estão presentes no neuroepitélio do tubo neural, onde sua expressão abranda próximo à cauda. Diferentemente, em *Zebrafish*, só foi encontrado uma fraca expressão do gene confinada à região caudal (JESSEN *et al.*, 2002; PARK; MOON, 2002). Por sua vez, o gene *Vangl2* é expresso uniformemente no neuroepitélio do tubo neural ao longo de toda a extensão do mesmo, e tal padrão de expressão é mantido em camundongo (TORBAN *et al.*, 2008), galinha, *Xenopus* (GOTO;

KELLER, 2002; PARK; MOON, 2002) e *Zebrafish* (JESSEN *et al.*, 2002; PARK; MOON, 2002). Ainda que ocorram leves variações no padrão de expressão da família *Vangl*, há uma conservação da expressão dos domínios de expressão em todos os vertebrados estudados até o momento, indicando a conservação da regulação transcricional deste gene e reforçando sua importância para o desenvolvimento dos vertebrados.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso em vertebrados, a placa de assoalho e do teto são essenciais, uma vez que a primeira é fundamental na diferenciação de células neurais (LEE; DIETRICH; JESSELL, 2000) e a segunda tem um importante papel na padronização dorso-neural (JESSELL *et al.*, 1989). A placa de assoalho exibe intensa expressão de *Vangl1* em camundongos (TORBAN *et al.*, 2008), mas não em galinhas, indicando uma diferença no padrão de expressão entre estas duas espécies de vertebrados. A expressão de *Vangl2* na placa de assoalho em camundongos é contraditória, uma vez que Murdoch *et al.*, (2001) afirmaram que o gene *Vangl2* não está presente nesta estrutura, enquanto Torban *et al.*, (2007) descreveram a expressão de *Vangl2* na placa de assoalho. Os resultados não mostram expressão do gene *Vangl2* na placa de assoalho em galinha, ao contrário do que foi observado em *Xenopus* (GOTO; KELLER, 2002). Em conjunto, estes resultados sugerem que há uma variação nos domínios de expressão de *Vangl2* entre diferentes vertebrados ou que a expressão deste gene é de tal forma dinâmica que exige uma análise de estágios de desenvolvimento relativamente próximos para que seja possível a sua detecção. Na placa de teto, *Vangl1* apresenta uma fraca expressão em camundongo (TORBAN *et al.*, 2008), enquanto em galinha esta expressão não existe. De maneira semelhante, a marcação de *Vangl2* na placa de teto foi branda em camundongo (TORBAN *et al.*, 2008) e em *Xenopus* (GOTO; KELLER, 2002), no entanto em galinha não foi identificada a expressão deste gene. Apesar de algumas contradições entre as publicações, é notória a presença da família *Vangl* nessas estruturas, reforçando o envolvimento desses genes na formação do sistema nervoso dos vertebrados.

Na fase da neurulação, a porção mais anterior do tubo neural sofre mudanças drásticas se expandindo em três vesículas primárias: prosencéfalo (originará o telencéfalo e o diencéfalo), mesencéfalo e rombencéfalo (originará o mielencéfalo e o metencéfalo) (GILBERT, 2003) e, ao que tudo indica, os genes *Vangl* podem desempenhar um papel

fundamental nesta etapa, haja visto que há uma expressão acentuada destes genes, em particular nos sítios dos dobramentos cefálicos.

A vesícula óptica não exhibe a expressão de *Vangl1* em camundongo, mas transcritos desse gene foram identificados na galinha e na retina de *Zebrafish* (JESSEN *et al.*, 2002). O padrão expresso por *Vangl2* em camundongo (BELOTTI *et al.*, 2012; TISSIR; GOFFINET, 2006) e galinha são semelhantes, porém no primeiro, os transcritos do gene estão mais restritos à retina.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que ocorre sobreposição dos domínios-chave de expressão dos genes *Vangl* nos diferentes organismos, demonstrando a conservação filogenética da atividade destes genes sugerindo uma possível conservação funcional.

6.2 A família *Vangl* e os defeitos de desenvolvimento em vertebrados

Os membros da família *Vangl* estão envolvidos na gastrulação de vertebrados. O papel de *Vangl2* nesta etapa da embriogênese foi testado em *Xenopus*, sendo que a inativação deste gene resultou em embriões com eixo corporal encurtado, apresentando uma placa neural curta e larga e um tubo neural que não se fecha (PARK; MOON, 2002). Um fenótipo semelhante a este foi observado em *Zebrafish* após mutação de *Vangl2*, mas o fenótipo pode ser parcialmente recuperado em embriões que foram tratados com altas doses de *mRNA Vangl1* sintético (JESSEN *et al.*, 2002; REYNOLDS *et al.*, 2010). Tal fato pode indicar que ambos os genes *Vangl* podem agir de forma similar dentro de um contexto específico. De fato, especula-se que os *Vangl* atuem por uma via dependente da dosagem de gene, como observada na via Wnt-PCP, mas nesse caso com um limiar mínimo de atividade de *Vangl* durante as etapas de gastrulação e neurulação (TORBAN *et al.*, 2008).

O padrão de expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2* em embriões de galinha no processo de gastrulação coincide com os sítios afetados pelas malformações em *Zebrafish* e *Xenopus*. Tomando esses dados em conjunto, podemos hipotetizar que ambos os genes podem, em diferentes contextos, ter funções similares (REYNOLDS *et al.*, 2010; TORBAN *et al.*, 2008) e que essa família de genes é requisitada para atuar como possíveis

moduladores de movimentos convergentes (JESSEN *et al.*, 2002; PARK; MOON, 2002; REYNOLDS *et al.*, 2010; UENO; GREENE, 2003).

Os genes *Vangl* exibiram um padrão de expressão significativo nas estruturas do sistema nervoso central. No camundongo mutante *loop-tail* (*Vangl2*) a DTN mais grave, craniorraquisquise, resulta na falha do fechamento do tubo neural (COPP; CHECIU; HENSON, 1994; COPP; GREENE; MURDOCH, 2003). No entanto, a maioria dos embriões que desenvolvem DTN completam o fechamento, mas falham posteriormente durante a Neurulação, apresentando DTN com lesões no tubo neural (exencefalia, progredindo para anencefalia) e no tubo neural espinhal (espinha bífida aberta ou fechada) (COPP; STANIER; GREENE, 2013). A presença de transcritos de *Vangl2* durante a formação do sistema nervoso nas vesículas cefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) está de acordo com os resultados obtidos por Torban *et al.*, (2008), pois uma vez que sucede mutações homozigóticas em *Vangl2*, resulta-se em severa craniorraquisquise, onde o cérebro e a medula espinhal permanecem abertos, sendo incompatível com a vida. Quando ocorre uma mutação heterozigótica em *Vangl2*, o embrião pode ser viável, quando apresentar defeitos na cauda e desenvolver espinha bífida, e inviável, quando desenvolver craniorraquisquise (COPP; CHECIU; HENSON, 1994; GREENE; STANIER; COPP, 2009). Ambas as malformações resultantes de mutações no gene *Vangl2*, em camundongos, estão localizadas em regiões onde há uma evidente expressão desse gene nos ensaios de WISH com galinha, de forma que estes dados juntos, corroboraram uma conservação funcional de *Vangl2* na neurulação dos vertebrados.

Curiosamente, em seres humanos que apresentam o fenótipo de craniorraquisquise não há mutações nos genes *Vangl* (COPP; STANIER; GREENE, 2013), mas há malformações (Fig. 6) relacionadas a mutantes heterozigotos dessa família, onde *Vangl1* e *Vangl2* estão presentes em espinha bífida fechada (disrafismo espinhal) e espinha bífida aberta (mielomeningocele) e apenas *Vangl2* está presente em anencefalia e holoprosencefalia (COPP; STANIER; GREENE, 2013; KIBAR *et al.*, 2007, 2009, 2011; LEI *et al.*, 2010).

Mutações em *Vangl1* e *Vangl2* estão relacionadas com desenvolvimento da espinha bífida fechada e aberta, sendo a primeira resultado de defeitos da neurulação, no qual a medula espinhal não se separa dos tecidos adjacentes ocasionando lesão envolvendo

duas ou mais vértebras (torácicas ou lombares) cobertas por pele e a segunda causada por defeitos na neurulação, como por exemplo, falha no fechamento do neuróporo caudal podendo exibir duas apresentações clínicas: medula espinhal coberta por meninges (espinha bifida cística), medula espinhal sem cobertura (espinha bifida aberta) (COPP; GREENE; MURDOCH, 2003; GREENE; STANIER; COPP, 2009; KIBAR *et al.*, 2007, 2009). As mutações em *Vangl2* ainda podem estar relacionadas com outras malformações congênitas como anencefalia que é caracterizada pela completa ausência da calota craniana e dos hemisférios cerebrais sendo invariavelmente letal (BASSUK; KIBAR, 2009; KIBAR *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2010) e holoprosencefalia, que é uma malformação cerebral que não está envolvida na falha do fechamento do tubo neural como as demais citadas acima, mas resulta da falha do crescimento ou da segmentação do tubo neural anterior causando um defeito da linha média do prosencéfalo (HAHN; PINTER, 2002; LEI *et al.*, 2010).

Como já foram observadas, em humanos as mutações heterozigóticas são as que estão relacionadas a malformações congênitas e isso destaca a importância das mutações serem homozigóticas ou heterozigóticas podem causar resultados adversos. Logo, destaca-se um fato interessante dos estudos de Torban *et al.*, (2008), pois os camundongos mutantes homozigoto *Vangl1 gt/gt* e heterozigóticos *Vangl2 Lp/+* não apresentam defeitos graves, lembrando que a ausência de um forte fenótipo em camundongos homozigotos *Vangl1 gt/gt* destaca a predominância de *Vangl2* na família *Vangl* (BELOTTI *et al.*, 2012). Por outro lado, o homozigoto *Vangl2 Lp/Lp* e duplo heterozigotos *Vangl1 gt/+;Vangl2 Lp/+* e o *Vangl1gt/gt;Vangl2 Lp/+* causam defeitos graves no desenvolvimento. Os duplos heterozigotos *Vangl1 gt/+; Vangl2 Lp/+* exibiram além de craniorraquisque grave, desorientação grave coclear e desorientação de feixes de estereocílios (semelhante à *Vangl2 lp/lp*) e um defeito cardíaco, sob a forma de subclávia direita aberrante (TORBAN *et al.*, 2008). As WISH em galinha mostraram uma específica expressão de *Vangl2* nos túbulos endocárdicos corroborando com o local afetado pelas mutações em camundongos duplos heterozigotos (TORBAN *et al.*, 2008), de forma a reforçar uma expressão desse gene no início do desenvolvimento cardíaco.

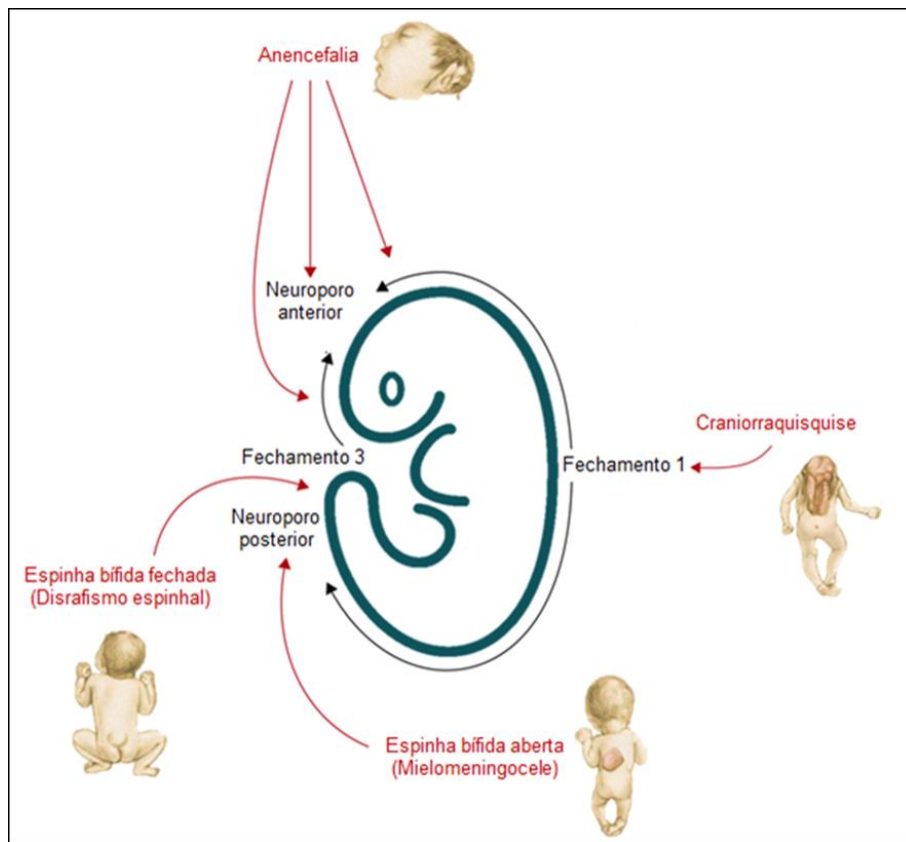


Figura 6. Sítios de origem de defeitos no tubo neural de embrião humano resultado da perturbação no fechamento do tubo neural. Anencefalia é a consequência de fechamentos cranianos defeituosos. Craniorraquisquis ocorre quando acontece uma falha no fechamento 1. Espinha bífida fechada (disrafismo espinhal) e aberta (mielomeningocele) surgem devido aos defeitos no processo de neurulação. Adaptado de BOTTO *et al.*, (1999), COPP; GREENE; MURDOCH, (2003), COPP; STANIER; GREENE, (2013), GREENE; COPP, (2009).

Dentro do contexto de DTN em humanos, é possível fazer uma correlação da expressão gênica encontrada em embriões de galinha com os efeitos das mutações nos genes *Vangl* em seres humanos. Uma vez que *Vangl1* e *Vangl2* são expressos ao longo de todo o tubo neural, e esse irá após diferenciação celular, gerar a medula espinhal que é evidentemente afetada por mutações em *Vangl1* e *Vangl2* como observado na espinha bífida fechada e aberta. Além disso, o padrão de expressão de *Vangl2* na galinha pode ser relacionado com a anencefalia e holoprosencefalia em humanos, pois o local que ocorre tais malformações coincide com o sítio de expressão de *Vangl2* na ave.

No sistema nervoso central, a análise detalhada do padrão de expressão de *Vangl1* e *Vangl2* mostra tanto as diferenças como possíveis sobreposições (TISSIR; GOFFINET, 2006; TORBAN *et al.*, 2008). Por exemplo, nos resultados a expressão *Vangl1* é encontrada mais significativamente na notocorda, enquanto *Vangl2* está mais amplamente distribuído ao longo de todo o neuroepitélio e ausente ou muito fraco na notocorda. Posteriormente, os resultados mostraram que em áreas do mesencéfalo e telencéfalo, *Vangl2*, mas não *Vangl1*, é abundantemente expresso (TISSIR; GOFFINET, 2006). Em contraste, *Vangl1* e *Vangl2* são co-localizados nas pregas neurais, no neuróporo anterior, na vesícula óptica. Em conjunto, estes resultados sugerem que, em alguns sistemas, ou em algumas etapas de desenvolvimento, *Vangl1* e *Vangl2* poderiam interagir em algum complexo proteico específico.

Tem sido proposto que as proteínas Vangl atuam como um complexo único, mas não foi fornecida nenhuma prova experimental para validar essa hipótese em nível endógeno (BELOTTI *et al.*, 2012). Torban *et al.*, (2008) hipotetizam que os *Vangl* podem ter funções redundantes, visto como suas expressões podem se sobrepor, pois em células que expressam níveis abundantes de *Vangl2* comparado com *Vangl1*, o *Vangl2* pode desempenhar um papel aparentemente "dominante". Neste cenário, a perda de 50% do *Vangl2* coloca a via num modo "sensibilizado" permitindo a indução de um fenótipo de uma perda parcial de *Vangl1*, contudo em células com níveis elevados de *Vangl2*, a perda de *Vangl1* pode ser completamente mascarada ou pode ter um efeito sutil (por exemplo, desorientação dos feixes de estereocílios cocleares). Este modelo é compatível com as observações de que a via de sinalização PCP dependente da dosagem de genes, com mutações por perda de função e superexpressão de membros individuais da PCP, resultam no mesmo fenótipo deletério (TORBAN *et al.*, 2008).

Em contrapartida, há uma possibilidade, que já foi apoiada por trabalhos recentemente publicados (SONG *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2012), onde indica que *Vangl2* Lp atua como uma proteína negativa dominante. Pois, interage com proteínas do tipo selvagem nos camundongos duplo heterozigotos *Vangl1^{gt/+}; Vangl2^{Lp/+}* de forma a atrapalhar a migração da proteína *Vangl2* para a membrana plasmática. A imuno-histoquímica do tubo neural corrobora com tal teoria, uma vez que em embriões mutantes Lp houve uma severa redução da expressão da proteína *Vangl2* da membrana plasmática (TORBAN *et al.*, 2007)

e dados *in vivo* mostraram também uma redistribuição de *Vangl1* no mutante Lp (YIN *et al.*, 2012).

Em resumo, a mutação *Vangl2* é capaz de provocar uma série de defeitos que afetam diretamente (estabilidade, tráfico) ou indiretamente (formação de heterodímeros sinalizadores incompetentes) tanto as funções *Vangl1* como também as de *Vangl2* (BELOTTI *et al.*, 2012).

Este trabalho determinou a expressão temporal e espacial dos genes da família *Vangl* durante a embriogênese de galinha. Em todos os estádios analisados, os dados evidenciam que os genes *Vangl* contribuam para o desenvolvimento do sistema nervoso central em embriões de galinha, porém, estudos futuros serão necessários para identificar especificamente os tipos celulares em que há expressão dos genes *Vangl1* e *Vangl2*, bem como para determinar sua função em diferentes etapas da embriogênese de aves.

7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

- I. Os genes *Vangl* são expressos durante as etapas de gastrulação, neurulação e no início da organogênese do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*.
- I. Na gastrulação, os genes *Vangl1* e *Vangl2* possuem domínios de expressão em comum: linha primitiva, nódulo de Hensen e crescente cardiogênico. Possivelmente, os genes *Vangl* coordenam os movimentos morfogenéticos nesta etapa de desenvolvimento embrionário. Contudo, há particularidades no padrão de expressão de cada um destes genes. Por exemplo, há predominância de *Vangl1* na região posterior da linha primitiva, enquanto *Vangl2* exibe uma expressão uniforme ao longo desta estrutura. Em adição, *Vangl1* é expresso na notocorda e em toda a extensão do nódulo de Hensen, porém *Vangl2* está presente apenas ao entorno desta estrutura.
- II. Na neurulação e na organogênese inicial, ambos os genes *Vangl* são expressos de maneira similar em alguns domínios como na placa, nas pregas, no tubo neural, nas vesículas ópticas e óticas, nas vesículas encefálicas e no assoalho da faringe. Tais dados destacam a importância desses genes no desenvolvimento do sistema nervoso central dos vertebrados.
- III. Quando se compara a expressão dos genes *Vangl* em galinha com outros vertebrados, nota-se uma sobreposição dos domínios-chave de expressão nos diferentes organismos, demonstrando a conservação filogenética da atividade destes genes, sugerindo uma possível conservação funcional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, P. N. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. **Developmental cell**, v. 2, n. 5, p. 525-35, maio 2002.

ADLER, P. N.; LEE, H. Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 5, p. 635-40, out. 2001.

ADLER, P. N.; TAYLOR, J. Asymmetric cell division: plane but not simple. **Current biology : CB**, v. 11, n. 6, p. R233-6, 20 mar. 2001.

BARROW, J. R. Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 17, n. 2, p. 185-93, abr. 2006.

BASSUK, A. G.; KIBAR, Z. Genetic basis of neural tube defects. **Seminars in pediatric neurology**, v. 16, n. 3, p. 101-10, set. 2009.

BELOTTI, E. et al. Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e46213, jan. 2012.

BOTTO, L. D. et al. Neural-tube defects. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 20, p. 1509-19, 11 nov. 1999.

CARROL, S. B., GRENIER, J. K., WEATHERBEE, S. D. **From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design**. 2th. ed. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd, 2005.

CLARK, C. E. J.; NOURSE, C. C.; COOPER, H. M. The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. **Neuro-Signals**, v. 20, n. 3, p. 202-20, jan. 2012.

COPP, A. J.; CHECIU, I.; HENSON, J. N. Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. **Developmental biology**, v. 165, n. 1, p. 20-9, set. 1994.

COPP, A. J.; GREENE, N. D. E.; MURDOCH, J. N. The genetic basis of mammalian neurulation. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 10, p. 784-93, out. 2003.

COPP, A. J.; STANIER, P.; GREENE, N. D. E. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. **Lancet neurology**, v. 12, n. 8, p. 799-810, ago. 2013.

CURTIN, J. A *et al.* Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. **Current biology : CB**, v. 13, n. 13, p. 1129-33, 1 jul. 2003.

DOUDNEY, K. *et al.* Analysis of the planar cell polarity gene Vangl2 and its co-expressed paralogue Vangl1 in neural tube defect patients. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 136, n. 1, p. 90-2, 1 jul. 2005.

ETHERIDGE, S. L. *et al.* Murine dishevelled 3 functions in redundant pathways with dishevelled 1 and 2 in normal cardiac outflow tract, cochlea, and neural tube development. **PLoS genetics**, v. 4, n. 11, p. e1000259, nov. 2008.

GILBERT, S. F. *Developmental Biology*, 7th edition. p. 5-9, 2003.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology Edition : Tenth**. Tenth ed. [s.l.] Sinauer Associates, Inc., 2013. p. 719

GORDON, M. D.; NUSSE, R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22429-33, 11 ago. 2006.

GOTO, T.; KELLER, R. The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in Xenopus. **Developmental biology**, v. 247, n. 1, p. 165-81, 1 jul. 2002.

GRAY, H. **Anatomy of the Human Body -**. TWENTIETH ed. Philadelphia: Philadelphia: Lea & Febiger, 2000. p. 1396

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Development of the vertebrate central nervous system : formation of the neural tube. n. November 2008, p. 303-311, 2009.

GREENE, N. D. E.; STANIER, P.; COPP, A. J. Genetics of human neural tube defects. **Human molecular genetics**, v. 18, n. R2, p. R113-29, 15 out. 2009.

HABAS, R.; DAWID, I. B.; HE, X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt / Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. p. 295-309, 2003.

HAHN, J. S.; PINTER, J. D. Holoprosencephaly: genetic, neuroradiological, and clinical advances. **Seminars in pediatric neurology**, v. 9, n. 4, p. 309-19, dez. 2002.

HAMBLET, N. S. Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. **Development**, v. 129, n. 24, p. 5827-5838, 15 dez. 2002.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 195, n. 4, p. 231-72, dez. 1951.

JENNY, A. *et al.* Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. **The EMBO journal**, v. 22, n. 17, p. 4409-20, 1 set. 2003.

JENNY, A. *et al.* Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. **Nature cell biology**, v. 7, n. 7, p. 691-7, jul. 2005.

JESSELL, T. M. *et al.* Polarity and patterning in the neural tube: the origin and function of the floor plate. **Ciba Foundation symposium**, v. 144, p. 255-76; discussion 276-80, 290-5, jan. 1989.

JESSEN, J. R. *et al.* Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. **Nature cell biology**, v. 4, n. 8, p. 610-5, ago. 2002.

JESSEN, J. R.; SOLNICA-KREZEL, L. Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue. **Gene expression patterns : GEP**, v. 4, n. 3, p. 339-44, maio 2004.

KADOTA, S. *et al.* Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 147, n. 1, p. 259-66, 31 ago. 1987.

KATOH, M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). **Oncology reports**, v. 14, n. 6, p. 1583-8, dez. 2005.

KIBAR, Z. *et al.* Identification of a new chemically induced allele (Lp(m1Jus)) at the loop-tail locus: morphology, histology, and genetic mapping. **Genomics**, v. 72, n. 3, p. 331-7, 15 mar. 2001.

KIBAR, Z. *et al.* Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. **Nature genetics**, v. 28, n. 3, p. 251-5, jul. 2001.

KIBAR, Z. *et al.* Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 14, p. 1432-7, 5 abr. 2007.

KIBAR, Z. *et al.* Novel mutations in VANGL1 in neural tube defects. **Human mutation**, v. 30, n. 7, p. E706-15, jul. 2009.

KIBAR, Z. *et al.* Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. **Clinical genetics**, v. 80, n. 1, p. 76-82, jul. 2011.

KIBAR, Z.; CAPRA, V.; GROS, P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. **Clinical genetics**, v. 71, n. 4, p. 295-310, abr. 2007.

KÜHL, M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, n. 2 mM, p. 967-74, 1 jan. 2004.

LEE, K. J.; DIETRICH, P.; JESSELL, T. M. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 734-40, 17 fev. 2000.

LEI, Y.-P. *et al.* VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 23, p. 2232-5, 10 jun. 2010.

LU, X. *et al.* PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 93-8, 1 jul. 2004.

MIKELS, A J.; NUSSE, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene**, v. 25, n. 57, p. 7461-8, 4 dez. 2006.

MLODZIK, M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? **Trends in genetics : TIG**, v. 18, n. 11, p. 564-71, nov. 2002.

MOELLER, H. *et al.* Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 43, p. 15900-5, 24 out. 2006.

MOON, R. T. *et al.* WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 9, p. 691-701, set. 2004.

MURDOCH, J. N. *et al.* Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of Lpp1, a novel gene involved in floor plate specification. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 22, p. 2593-601, 15 out. 2001.

MURDOCH, J. N. *et al.* Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 2, p. 87-98, 15 jan. 2003.

PANDUR, P.; MAURUS, D.; KÜHL, M. Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 24, n. 10, p. 881-4, out. 2002.

PARK, M.; MOON, R. T. The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. **Nature cell biology**, v. 4, n. 1, p. 20-5, jan. 2002.

PARK, M.; MOON, R. T. The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. **Nature cell biology**, v. 4, n. 1, p. 20-5, jan. 2002.

- PHILLIPS, H. M. *et al.* Vangl2 acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract. **Circulation research**, v. 96, n. 3, p. 292-9, 18 fev. 2005.
- QIAN, D. *et al.* Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. **Developmental biology**, v. 306, n. 1, p. 121-33, 1 jun. 2007.
- REYNOLDS, A. *et al.* Europe PMC Funders Group VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. v. 127, p. 385-392, 2010.
- SCHWARZ-ROMOND, T. *et al.* The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. **Genes & development**, v. 16, n. 16, p. 2073-84, 15 ago. 2002.
- SEIFERT, J. R. K.; MLODZIK, M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 2, p. 126-38, fev. 2007.
- SELLER, M. J. Neural tube defects and sex ratios. **American journal of medical genetics**, v. 26, n. 3, p. 699-707, mar. 1987.
- SIMONS, M.; MLODZIK, M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. **Annual review of genetics**, v. 42, n. Table 1, p. 517-40, jan. 2008.
- SONG, H. *et al.* Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. **Nature**, v. 466, n. 7304, p. 378-82, 15 jul. 2010.
- STRUTT, D. Planar polarity: getting ready to ROCK. **Current biology : CB**, v. 11, n. 13, p. R506-9, 10 jul. 2001.
- SUGIMURA, R.; LI, L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 90, n. 4, p. 243-56, dez. 2010.
- TADA, M.; KAI, M. Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation. **Zebrafish**, v. 6, n. 1, p. 29-40, mar. 2009.
- TAYLOR, J. *et al.* Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. **Genetics**, v. 150, n. 1, p. 199-210, set. 1998.
- TISSIR, F.; GOFFINET, A. M. Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. **The European journal of neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 597-607, fev. 2006.

TORBAN, E. *et al.* Independent mutations in mouse Vangl2 that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52703-13, 10 dez. 2004.

TORBAN, E. *et al.* Tissue, cellular and sub-cellular localization of the Vangl2 protein during embryonic development: effect of the Lp mutation. **Gene expression patterns : GEP**, v. 7, n. 3, p. 346-54, jan. 2007.

TORBAN, E. *et al.* Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 9, p. 3449-54, 4 mar. 2008.

TORBAN, E.; KOR, C.; GROS, P. Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. **Trends in genetics : TIG**, v. 20, n. 11, p. 570-7, nov. 2004.

UENO, N.; GREENE, N. D. E. Planar cell polarity genes and neural tube closure. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 69, n. 4, p. 318-24, nov. 2003.

WAKELY, J.; ENGLAND, M. A. The chick embryo late primitive streak and head process studied by scanning electron microscopy. **Journal of anatomy**, v. 129, n. Pt 3, p. 615-22, out. 1979.

WALLINGFORD, J. B.; FRASER, S. E.; HARLAND, R. M. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. **Developmental cell**, v. 2, n. 6, p. 695-706, jun. 2002.

WANG, Y.; GUO, N.; NATHANS, J. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 8, p. 2147-56, 22 fev. 2006.

WANG, Y.; NATHANS, J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 4, p. 647-58, fev. 2007.

WOLFF, T.; RUBIN, G. M. Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. **Development (Cambridge, England)**, v. 125, n. 6, p. 1149-59, mar. 1998.

YIN, H. *et al.* Comparison of phenotypes between different vangl2 mutants demonstrates dominant effects of the Looptail mutation during hair cell development. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31988, jan. 2012.

9. ANEXOS

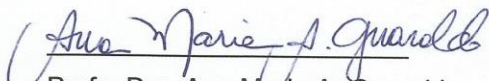
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Caracterização do padrão espacial e temporal de expressão dos genes Vangl1 e Vangl2" (protocolo nº 1362-1(A)), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares / Angélica Vasconcelos Pedrosa, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de novembro de 2013.

Campinas, 04 de novembro de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva