



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Lucimara Aparecida Sensiate

“Análise comparativa da expressão dos genes *Dapper* (*Dpr*)

durante a ontogênese dos membros de camundongo

(*Mus musculus* C57BL/6) e galinha (*Gallus gallus*)”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Lucimara Aparecida Sensiate e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Se59a

Sensiate, Lucimara Aparecida

Análise comparativa da expressão dos genes *Dapper* (Dpr) durante a ortogênese dos membros de camundongo (*Mus musculus* C57BL/6) e galinha (*Gallus gallus*) / Lucimara Aparecida Sensiate. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. *Dapper*. 2. Desenvolvimento embrionário. 3. Extremidades – Crescimento e desenvolvimento. 4. Camundongo. 5. Galinha. I. Alvares, Lucia Elvira, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Comparative analysis of *Dapper* (Dpr) gene expression during limbs ontogeny of mouse (*Mus musculus* C57BL/6) and chicken (*Gallus gallus*).

Palavras-chave em inglês: *Dapper*; Embryonic development; Extremities – Growth and development; Mouse; Chicken.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Lucia Elvira Alvares, Chao Yun Irene Yan, Henrique de Marques-Souza.

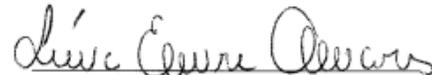
Data da defesa: 25/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti


Assinatura

Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa De Souza


Assinatura

Prof. Dr. José Xavier Neto

Assinatura

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, com Auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), bolsa de mestrado.

A todos os animais submetidos
à experimentação em ciência.

Agradecimentos

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

A CAPES/PROEX pelo apoio financeiro.

A minha orientadora, Dra. Lúcia Elvira Alvares por ter me recebido tão bem no laboratório e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento: Angélica, Carla, Carol, Débora, Denner, Letícia, Thaís e Ricardo pela amizade e contribuição em todas as etapas deste trabalho.

A todos os amigos do DHE pelas conversas, momentos de confraternização e por fazerem parte dessa caminhada. Agradeço principalmente a Camila pela companhia, desabafos e risadas de todos os dias.

Ao Dr. Gonçalo A. Guimarães, Dr. Marcelo Menossi e Dra. Vera Nisaka Solferini pelo empréstimo de equipamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos professores que compõem a banca examinadora pelo aceite do convite.

A meu namorado Leonardo por toda amizade, companhia e amor.

À minha família, por tudo!

Por fim, e mais importante, aos meus pais, sem o apoio e o exemplo vindo de vocês eu nunca conseguiria.

 triunfo pertence a quem se atreve, e a
vida é muito bela para ser insignificante.

Charles Chaplin

Resumo

Dentre as moléculas envolvidas na sinalização molecular durante o desenvolvimento, têm papel de destaque aquelas envolvidas nas vias de sinalização Wnt e TGF- β . Trabalhos demonstram que as proteínas Dapper (Dpr) são capazes de modular tais vias de sinalização. A família de genes *Dpr* é constituída por três componentes: *Dpr1*, *Dpr2* e *Dpr3* em peixe-zebra, camundongo e humanos e *Dpr1* e *Dpr2* em aves. Os genes *Dpr* têm sido associados a movimentos morfogênicos durante a gastrulação, especificação do mesoderma, morfogênese do encéfalo, coração e olhos. Apesar da grande relevância desta família gênica para o desenvolvimento, pouco se sabe sobre o padrão de expressão de tais genes em mamíferos e aves. Este projeto de pesquisa teve como objetivo principal a caracterização do padrão de expressão dos genes *Dpr* ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongo e com maiores detalhes, a caracterização do padrão de expressão dos genes *Dpr* durante a ontogênese dos membros em embriões de camundongo e galinha. O padrão de expressão foi determinado através de ensaios de hibridação *in situ whole mount* e em cortes de parafina. Para permitir comparações, hibridações *in situ* foram realizadas com marcadores para o desenvolvimento de cartilagem, tendão e músculo. Como resultado, observamos que os genes *Dpr* são expressos em seis domínios chave (tubérculo genital, membros, focinho, somitos, hérnia umbilical fisiológica e encéfalo) durante o desenvolvimento de camundongo. A análise do padrão de expressão sugere fortemente o envolvimento dos genes *Dpr* na ontogênese dos membros em embriões de galinha e camundongo. Contudo, a expressão destes genes é bastante diferente entre estes dois organismos. O gene *Dpr1* parece estar envolvido com a formação de elementos da articulação e do pericôndrio durante o desenvolvimento dos membros em embriões de camundongo e galinha. O gene *Dpr2* possui expressão bastante difusa durante o desenvolvimento dos membros em embriões de camundongo. Em contrapartida, na galinha, *Dpr2* possui expressão localizada no blastema dos dígitos e articulações do autópode. O gene *Dpr3* possui expressão difusa durante o desenvolvimento dos membros. Apesar disto, os domínios de expressão identificados sugerem que *Dpr3* esteja relacionado com o desenvolvimento dos dígitos e articulações.

Abstract

Among the molecules involved in molecular signaling during development, those involved in the Wnt and TGF- β pathways are particularly important. Studies have shown that the Dapper protein family (Dpr) can modulate Wnt and TGF- β signaling. The *Dpr* gene family consists of three members: *Dpr1*, *Dpr2* and *Dpr3* in zebrafish, mice and humans, and only two: *Dpr1* and *Dpr2*, in birds. *Dpr* genes have been associated with morphogenetic movements during gastrulation, mesoderm specification, morphogenesis of the brain, heart and eyes. Despite the great relevance of this gene family during development, little is known about the expression pattern of the *Dpr* genes in mammals and birds. This research project had as main aims to characterize the expression pattern of the *Dpr* genes during mouse embryonic development and, in more detail, their expression during limb ontogenesis in mouse and chicken embryos. The expression pattern was determined by *in situ* hybridization in *whole mount* and in paraffin sections. To allow comparisons, were performed *in situ* hybridization with markers for the development of cartilage, tendon and muscle. Our results indicate that *Dpr* genes are expressed in six key areas (genital tubercle, limbs, nose, somites, brain and physiological umbilical hernia) during development of mouse. The expression pattern in the limbs strongly suggests that the *Dpr* genes work in limbs development in chicken and mouse embryos. However, the expression pattern of these genes is different in these two organisms. *Dpr1* seems to be involved in joint and perichondrium formation during limb development in mouse and chicken embryos. For *Dpr2*, the expression was diffuse during limb development in mouse embryos. In contrast, chicken *Dpr2* has localized expression in the digits and joints. *Dpr3* gene has diffuse expression during limb development. However, its expression domains suggest that *Dpr3* is related to digits and joints development.

Lista de Abreviaturas

Ad	Arco digital
AER	Crista Ectodérmica Apical, do inglês <i>Ectodermal Apical Ridge</i>
AI	Articulação Interfalangeana
AP	Ântero-posterior
β-cat	Beta-catenina
Cc	Condensações cartilagosas
cDNA	Molécula de DNA complementar, do inglês <i>Complementary DNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
Dpc	Dia pós-coito
Dpr	Proteína antagonista de Dishevelled, do inglês <i>Dapper</i>
Dsh	Dishevelled
DV	Dorso-ventral
EST	Sequência expressa marcada, do inglês <i>Expressed Sequence Tag</i>
F	Fêmur
Fb	Fíbula
Frizzled	Receptor de membrana que participa em várias vias de sinalização
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos, do inglês <i>Fibroblasts growth factors</i>
Gdf5	Fator de crescimento e diferenciação 5 (Marcador molecular para articulações)
HIS	Hibridação <i>in situ</i>
MA	Membro anterior
Mcf	Articulação metacarpofalangeana
MP	Membro posterior
Mtf	Articulação metatarsofalangeana
Myog	Miogenina (marcador molecular para diferenciação muscular esquelética)
Nodal	Proteína membro da família TGF- β
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Próximo-distal
PZ	Zona de Progresso

R	Rádio
RNase	Ribonuclease
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
Sex	Escleraxis (marcador molecular para tendão)
Sox9	SRY-RELATED HMG-BOX GENE 9 (marcador molecular para células condroprogenitoras)
SRC	Síndrome de Regressão Caudal
SHH	Sonic hedgehog
T	Tíbia
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
TS	Estádio do desenvolvimento de acordo com Theiler
UI	Ulna
Um	Úmero
UTR	Região não transcrita, do inglês <i>Untranslated Region</i>
Vangl2	Proteína Transmembrana com papel na via de sinalização PCP
WISH	Hibridação in situ de embriões inteiros, do inglês <i>whole mount in situ hybridization</i>
Wnt	Importante via de sinalização, da combinação em inglês dos nomes dos genes Wg (<i>wingless</i>) e Int
Wnt14	Marcador molecular para articulação
ZPA	Zona de Atividade Polarizadora, do inglês <i>Zone of Polarizing Activity</i>
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

Lista de Figuras

Figura 1. Estádios de desenvolvimento embrionário de camundongo <i>Mus musculus</i> de acordo com Theiler (1989).....	8
Figura 2. Estádios de desenvolvimento embrionário de galinha <i>Gallus gallus</i> de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).....	12
Figura 3. Estrutura básica do botão do membro em vertebrados.....	13
Figura 4. Os três domínios esqueléticos do membro representados no braço humano.....	14
Figura 5. Sinalização Wnt/ β catenina em metazoários.....	16
Figura 6. Esquema representativo da via de sinalização canônica Wnt.....	18
Figura 7. Esquema representativo da cascata de sinalização não canônica dos sinais Wnt.....	19
Figura 8. Esquema representativo da cascata de sinalização não canônica dos sinais Wnt/ Ca^{2+}	20
Figura 9. A sinalização Nodal.....	22
Figura 10. Expressão de genes <i>Dpr</i> durante o desenvolvimento embrionário de camundongo nos estádios TS19 a TS22.....	46
Figura 11. Padrões de expressão dos genes <i>Dpr</i> em MA e MP de camundongo nos estádios TS18 a TS23.....	49
Figura 12. Padrão de expressão dos genes <i>Dpr</i> em MP de camundongo no estágio TS23.....	50

Figura 13. Comparação do padrão de expressão de <i>Dpr1</i> com <i>Gdf5</i> , <i>Sox9</i> e <i>Myog</i> em MP de embrião de camundongo no estágio TS 23.....	51
Figura 14. Padrão de expressão dos genes <i>Dpr</i> em MA e MP de galinha nos estádios HH24 a HH34.....	54
Figura 15. Comparação do padrão de expressão de <i>Dpr1</i> com <i>Sox9</i> em MP de embrião de galinha no estágio HH30.....	56

Tabela

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para confecção de sondas com o promotor da enzima RNA polimerase T7.....	34
---	----

Sumário

Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	viii
<i>Abstract</i>	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Tabela.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Desenvolvimento Embrionário de <i>Mus musculus</i> – O camundongo como organismo modelo.....	5
2.2 Desenvolvimento Embrionário de <i>Gallus gallus</i> – O embrião de galinha como organismo modelo.....	8
2.3 Desenvolvimento dos membros em vertebrados.....	10
2.4 Vias de Sinalização.....	13
2.4.1 Sinalização Wnt.....	14
2.4.1.1 Sinalização Wnt Canônica.....	14
2.4.1.2 Sinalização Wnt não Canônica.....	16
2.4.2 Sinalização Nodal.....	20
2.5 Os Genes <i>Dapper</i>	20
2.5.1 <i>Dapper1</i>	21
2.5.2 <i>Dapper2</i>	23
2.5.3 <i>Dapper3</i>	24
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	32
4.1 Obtenção de embriões.....	30
4.1.1 Camundongo.....	30

4.1.2 Galinha.....	30
4.2 Processamento de embriões para HIS.....	30
4.3 Hibridação <i>in situ</i>	31
4.3.1 Transcrição das sondas.....	31
4.3.1.1 Síntese de sonda plasmidial para <i>Dpr1</i> (Mm), <i>Dpr2</i> (Mm), <i>Dpr3</i> (Mm), <i>Dpr1</i> (Gg), <i>Dpr2</i> (Gg) e <i>Gdf5</i> (Mm).....	31
4.3.1.2 Sondas sintetizadas a partir de primers contendo o promotor da enzima RNA polimerase T7.....	32
4.3.2 Procedimentos para embriões inteiros.....	36
4.3.3 Cortes dos embriões em vibrátomo.....	37
4.3.4 Procedimentos para cortes histológicos.....	37
4.3.5 Análise dos embriões – identificação do padrão de expressão.....	38
5. Resultados	43
5.1 Análise do padrão de expressão dos genes <i>Dpr</i> durante a ontogênese de embriões de camundongo.....	41
5.2 Análise do padrão de expressão dos genes <i>Dpr</i> durante a ontogênese dos membros.....	43
5.2.1 Embriões de camundongo.....	43
5.2.2 Embriões de galinha.....	48
6. Discussão.....	57
7. Conclusão.....	64
8. Referências Bibliográficas.....	66

Introdução



1. Introdução

O desenvolvimento ontogenético de um organismo humano adulto a partir de um zigoto unicelular envolve a construção de uma estrutura com aproximadamente 100 trilhões de células as quais formarão uma arquitetura extremamente precisa com tecidos muito diferenciados (Gray, 1918). Para a formação de estruturas tão distintas e elaboradas que constituem o corpo dos vertebrados são necessários sinais moleculares finamente modulados, os quais transmitem às células informações necessárias, para que cada elemento constituinte de um órgão tenha a forma, o tamanho e a proporção exatos para a sua plena funcionalidade (Mattick, 2007).

Embora os detalhes moleculares estejam longe de serem completamente elucidados, dois grandes grupos de proteínas coordenam a maioria dos processos do desenvolvimento, garantindo a correta especificação e diferenciação de tecidos e órgãos. O primeiro grupo inclui moléculas sinalizadoras, cujo papel é transmitir informações sobre o contexto celular e ambiental para as redes de regulação da atividade gênica, possibilitando a construção de estruturas anatomicamente diferentes. Neste grupo estão proteínas secretadas e seus respectivos receptores de membrana, como aqueles representados pelos sistemas Wnt-Frizzled e patched-hedgehog. No segundo grupo estão as proteínas regulatórias capazes de modificar a expressão gênica em vários níveis, tais como as proteínas modificadoras da cromatina, fatores transcricionais e fatores de *splicing* (Carroll *et al.*, 2005).

As vias de sinalização Wnt e Nodal desempenham grande papel durante a embriogênese, atuando na formação do mesoderma, no desenvolvimento da crista neural e de importantes órgãos como o coração (Logan e Nusse, 2004). Devido a esta importância, vários trabalhos têm sido realizados buscando identificar moléculas capazes de modular os sinais de tais vias. Em 2002, a molécula Dapper (Dpr) foi caracterizada como um potente modulador da via de sinalização Wnt (Gloy *et al.*, 2002; Cheyette *et al.*, 2002). Quatro anos depois, estudos revelaram que as proteínas Dpr podiam modular também sinais da via Nodal (Zhang *et al.*, 2006). Na via Wnt, as proteínas Dpr agem por meio da interação com a proteína Dishevelled (Dsh), molécula-chave para a transdução de sinais (Gloy *et al.*, 2002; Cheyette *et al.*, 2002 e Zhang *et al.*, 2006). Já na via de sinalização Nodal, a

molécula Dpr atua acelerando a degradação dos receptores de membrana Alk4 e Alk5 via lisossomos (Zhang *et al.*, 2004).

Estudos funcionais realizados em peixes e anfíbios mostraram que os genes *Dpr* atuam na indução mesodérmica, na morfogênese cefálica e do olho, na coordenação de movimentos morfogenéticos e na cardiogênese (Gloy *et al.*, 2002; Cheyette *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Waxman *et al.*, 2004; Yau *et al.*, 2005). Esta multiplicidade de funções é conferida graças à habilidade das moléculas Dpr de interagir com diferentes parceiros moleculares. Estas interações são mediadas por diferentes domínios estruturais, que têm sido conservados filogeneticamente e estão presentes nos membros desta família gênica (Waxman *et al.*, 2004 e Zhang *et al.*, 2004).

O fato de existirem poucos trabalhos relatando o padrão de expressão dos genes da família *Dpr* em camundongo fez com que a proposta inicial deste trabalho de pesquisa fosse estudar a expressão destes genes ao longo da embriogênese de camundongo. As análises iniciais mostraram que os membros constituíam um importante local de expressão dos genes *Dpr*, de maneira semelhante ao observado em galinha. Considerando o fato de não haver até o momento descrição da expressão dos genes *Dpr* durante a formação e o desenvolvimento dos membros de vertebrados, nós optamos por estudar, com maior nível de detalhes, esse padrão durante a ontogênese dos membros de camundongo. Além disto, completamos a análise do padrão de expressão dos genes *Dpr* em galinha, que havia sido iniciada por outro aluno em nosso laboratório, com o intuito de fazer uma análise comparativa entre estes dois organismos-modelo. Em paralelo, analisamos o padrão de expressão de vários marcadores moleculares para diferentes tecidos/estruturas dos membros, tais como *Miogenina* (*Myog*), marcador para músculo; *Escleraxis* (*Scx*), marcador para tendão; *Gdf5*, marcador para articulação e *Sox9*, marcador para células condroprogenitoras. Desta maneira, contribuímos para ampliar o conhecimento sobre o papel de tais genes durante a formação dos membros em organismos amniotos.

Revisão Bibliográfica



2. Revisão Bibliográfica

2.1 Desenvolvimento Embrionário de *Mus musculus* - O camundongo como organismo modelo

A experimentação animal se reveste de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Mesmo com o progresso de métodos alternativos (estudos *in vitro*, cultura de células, etc.), os modelos animais ainda apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo (Heywood, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995; Snitkoff, 2004). Animais de várias espécies têm sido utilizados ao longo desses últimos dois séculos de desenvolvimento científico, mas dentre todos eles o camundongo é, inquestionavelmente, o mamífero mais utilizado em experimentação animal.

A introdução do camundongo como animal de laboratório deve-se principalmente às várias vantagens que o mesmo oferece: o fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção (Santos, 2002). A linhagem C57BL/6, utilizada neste estudo, possui 93,5% do genoma oriundo da espécie *Mus musculus* e o restante de *Mus spretus* (Franco, 2006).

De acordo com Theiler (1989) o desenvolvimento embrionário de camundongo é dividido em 28 estádios, sendo o último, representante do desenvolvimento pós-natal (Figura 1). Embriões com a mesma idade gestacional podem diferir em seus estádios do desenvolvimento. O primeiro estágio tem início com a fecundação que dará origem a uma única célula, a qual contém material genético paterno e materno. Esta fase tem duração de aproximadamente vinte horas e ocorre na tuba uterina. O início da segmentação marca o segundo estágio do desenvolvimento, dentro de quatro horas a primeira clivagem estará completa.

Dois dias após a fecundação, o embrião atinge o terceiro estágio e se encontra na forma de mórula, sendo composto por aproximadamente 16 células. No quarto estágio, que corresponde ao terceiro dia após a fecundação, o embrião adquire a forma de blastocisto e já está localizado no útero. No estágio seguinte, a massa celular interna se torna aparente, o embrião é formado por aproximadamente 27 células embrioblásticas e 98 células

trofoblásticas. No sexto estágio, ocorre a implantação, na qual o blastocisto invade o epitélio uterino ainda intacto. Durante o sétimo estágio ocorre um rápido aumento da massa celular interna, levando à formação do epiblasto, o qual contribuirá para a forma cilíndrica do disco embrionário. A invasão do tecido materno pelo trofoblasto, diferenciação do disco embrionário em regiões embrionárias e extra-embrionárias e formação da cavidade pró-amniótica são características do oitavo estágio. No estágio seguinte, tem início a gastrulação, a qual produzirá as primeiras células mesodérmicas. Nesta fase, também principia a formação dos eixos corporais do embrião.

No décimo estágio a gastrulação continua e o exoceloma começa a se formar. No estágio subsequente, quando se passaram sete dias e meio após a fecundação, a cavidade amniótica está formada, e a formação da placa neural principia. Existem agora três cavidades distintas: a cavidade amniótica, o celoma extra-embrionário e a fenda ectoplacentária. No oitavo dia, ou seja, no décimo segundo estágio, surgem os primeiros pares de somitos. Também ocorre a formação do sistema circulatório, com o surgimento das ilhotas sanguíneas e desenvolvimento dos rudimentos do coração. É neste estágio que o cérebro se desenvolve rapidamente e determina a forma do embrião. No camundongo, a formação de um par de somitos requer de uma a duas horas.

Oito dias e meio após a fecundação o embrião sofre uma rotação que resulta em uma mudança nítida em sua forma externa, este fato marca o décimo terceiro estágio do desenvolvimento. No décimo quarto estágio, ocorre a formação e o fechamento do neuróporo anterior. O coração nesta fase é capaz de manter parte da circulação sanguínea do embrião. Com nove dias e meio é formado o neuróporo posterior e a vesícula prosencefálica se divide em telencéfalo e diencéfalo; são formados também os brotos de membro anterior (MA). Neste estágio, o embrião possui de 21 a 29 somitos e mede de 1,8 a 3,3 mm. No 16º estágio pode-se observar o fechamento do neuróporo posterior, o surgimento dos brotos da cauda e dos membros posteriores (MP), e os processos nasais começam a se formar. Nesta fase, o embrião possui de 30 a 34 somitos e mede cerca de 3,9 mm. Durante o 17º estágio, o primeiro arco branquial é dividido em componente maxilar e mandibular, a cauda se alonga e o cérebro sofre intenso desenvolvimento. Durante o 18º estágio, as fossas nasais começam a se formar e o cérebro cresce surpreendentemente, os

somitó da região cervical não podem mais ser vistos, e a cauda, bastante longa, passa lateralmente ao coração e sobre a fossa nasal. No 19º estágio, as margens periféricas do olho tornam-se bastante definidas e uma constrição surge nos MA dividindo-o em duas regiões, o que, neste estágio, ainda não aconteceu para o MP. No 20º estágio, que corresponde a 12 dias após a fecundação, surgem os primeiros sinais de dedos, é possível observar a pigmentação da retina através da transparência da córnea, e o embrião mede de 7 a 9 mm. No 13º dia, o qual corresponde ao 21º estágio do desenvolvimento, as orelhas e as cinco fileiras de vibriças se tornam evidentes e a constrição no MP começa a se formar. Os somitos passam a ser visíveis apenas na parte distal da cauda e, a cavidade oral ainda está em completa comunicação com a cavidade nasal.

No 22º estágio, os dígitos dos membros anteriores estão completamente separados, porém os dígitos dos membros posteriores ainda não se separaram, a hérnia umbilical fisiológica é bastante nítida e torna-se possível a diferenciação sexual. Os ossos longos dos membros estão presentes e há folículos pilosos espalhados pelo corpo com exceção da região da cabeça. Durante o 23º estágio, as pálpebras ainda estão abertas e os dedos dos membros inferiores se separaram. Primórdios de unhas são visíveis sobre os dedos no 24º estágio. Os olhos se fecham e a hérnia umbilical fisiológica é totalmente reposta durante o 25º estágio. O nascimento ocorre no 27º estágio do desenvolvimento.

2.2 Desenvolvimento Embrionário de Gallus gallus – o embrião de galinha como organismo modelo

A galinha foi o primeiro organismo modelo utilizado em biologia animal, sua história de investigação teve início há cerca de 2.300 anos. Desde então, uma contribuição ímpar foi gerada para ciência principalmente nas áreas de biologia do desenvolvimento e imunologia (Rallis, 2007). Embriões de aves são muito semelhantes aos embriões de mamíferos, tanto na complexidade morfológica como no curso geral do desenvolvimento embrionário. No entanto, embriões de aves são muito mais fáceis de serem obtidos, manipulados e observados. Apesar de existirem algumas diferenças consideráveis entre o desenvolvimento inicial de embriões de galinha e camundongo, a gastrulação e os estágios mais tardios da embriogênese são muito semelhantes em ambos. Além disso, o embrião de

galinha oferece um complemento para os estudos da embriologia do camundongo (Wolpert, 2000).

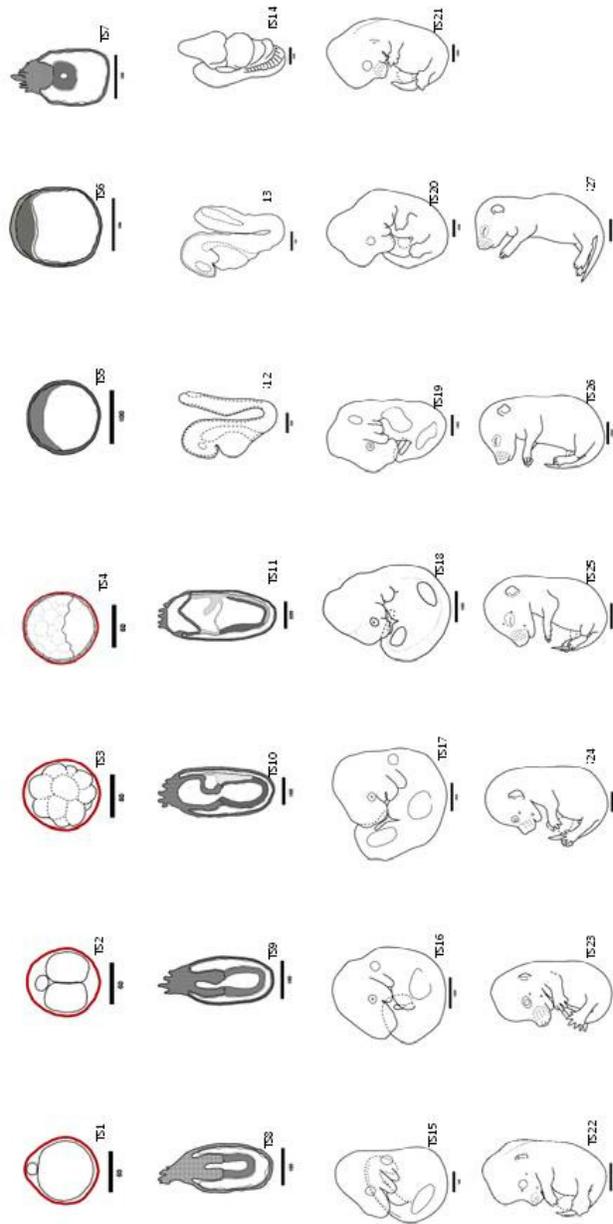


Figura 1: Estádios de desenvolvimento embrionário de camundongo *Mus musculus* de acordo com Theiler (1989). Fonte Theiler (1989).

De acordo com Hamburguer e Hamilton (1951) o desenvolvimento embrionário de galinha pode ser dividido em 46 estádios cronológicos que começa e termina com a postura e eclosão do ovo, respectivamente (Figura 2). Durante os três primeiros estádios do

desenvolvimento (HH1–3) ocorre a formação da linha primitiva. No estágio subsequente (HH4) a linha primitiva atinge o seu comprimento máximo: 1,88 mm. Ainda neste estágio, estão presentes o sulco primitivo e o nó de Hensen. Após 19-22 horas, o embrião atinge o quinto estágio de desenvolvimento (HH5) e surge a notocorda, que pode ser vista como uma haste de mesoderma condensado. Durante o próximo estágio (HH6), surge uma dobra no blastoderma anterior da notocorda que marca definitivamente a extremidade anterior do embrião. Os estágios HH7 até HH14 são morfologicamente classificados com base no número de somitos. Cada três pares de somitos que surgem no embrião caracterizam um novo estágio do desenvolvimento embrionário. Sendo assim, os estágios de 7 a 14 possuem respectivamente 1, 4, 7, 10, 16, 19 e 22 pares de somitos.

Durante o nono estágio os primórdios cardíacos começam a se fundir e as vesículas ópticas primárias estão presentes. No estágio subsequente, quando o embrião possui dez somitos, as vesículas cerebrais primárias são claramente visíveis e o coração está ligeiramente inclinado para a direita. Nos embriões HH12 a cabeça está se voltando para o lado esquerdo e o neuróporo anterior está completamente fechado. Durante o próximo estágio, com dezenove somitos, o embrião sofrerá um aumento considerável do telencéfalo. Com vinte e dois somitos, que correspondem a aproximadamente 50 horas de incubação, ocorre à flexão cranial e a invaginação da vesícula óptica. Neste estágio, o âmnio se estende do sétimo ao décimo somito. Após o estágio HH14 torna-se bastante difícil determinar com acurácia o número exato de somitos de cada embrião. Por esta razão, a partir do estágio HH15, os botões de membro, arcos branquiais e outras estruturas externas como o bico são utilizados para classificação.

Embriões HH15 possuem condensação inconspícua do mesoderma na área da asa e o âmnio se estende do somito 7 ao 14. Durante o próximo estágio (HH16) surgem os primórdios dos MP e a terceira fenda branquial possui forma oval. Os botões dos MA e MP apresentam-se como protusões de mesoderma de igual tamanho em embriões no estágio HH17. Neste mesmo estágio, o botão da cauda apresenta-se como mesoderma não segmentado. Após 65 horas de incubação, os embriões encontram-se no estágio HH18 durante o qual apresentam o âmnio fechado e os botões de MP ligeiramente maiores que os anteriores. Botões de membros simétricos podem ser vistos no próximo estágio. Um leve

azul acinzentado pode ser observado nos olhos de embriões HH20. No próximo estágio, os botões de MA e MP tornam-se ligeiramente assimétricos. Embriões HH22 possuem membros alongados e apontando para a cauda. Após quatro dias de incubação que correspondem ao estágio HH24, é possível identificar a placa dos dedos no MP, no entanto, os dedos dos pés só iniciarão sua demarcação no próximo estágio e esta só será nítida no estágio HH26. A demarcação para os dedos das mãos ocorre com atraso em relação à demarcação para os dedos dos pés e só poderá ser vista em embriões no estágio HH27. Uma nova e importante estrutura, o bico, pode ser observada em embriões em perfil durante o estágio HH28.

Com seis dias de incubação (HH29), a asa apresenta uma curvatura na região do cotovelo e o segundo dígito é distintamente mais longo que os demais. No MP é possível observar o rudimento do quinto dedo. Três fileiras de botões germinativos de penas podem ser vistas de cada lado da medula espinhal ao nível dos MP durante o estágio HH30. Embriões HH31 podem ser identificados através da janela que separa o primeiro e segundo dígitos da asa. No próximo estágio, o rudimento do quinto dedo já desapareceu. No estágio HH33 todos os dígitos apresentam-se bastante alongados. Contornos arqueados e côncavos entre os dedos das mãos e dos pés podem ser observados em embriões no estágio HH34. No estágio seguinte, as falanges de todos os dedos dos pés são distintas. Com dez dias de incubação os botões germinativos das penas de vôo são conspícuos. Embriões no estágio HH37 possuem a ponta dos dedos opaca indicando o início de cornificação para formação das garras. Após 12 dias de incubação (HH38) as pálpebras inferiores cobrem dois terços da córnea. No próximo estágio, o comprimento do terceiro dedo da pata é de aproximadamente 9,8mm.

Embriões entre os estágios HH40 e 44 são classificados principalmente com base no tamanho do bico e no comprimento do terceiro dígito da pata. Finalmente, em embriões HH45, com aproximadamente 20 dias de incubação, o saco vitelino está semifechado na cavidade corporal. O próximo estágio caracteriza-se pela eclosão e nascimento.

2.3 Desenvolvimento dos membros em vertebrados

Os membros de vertebrados são estruturas capazes de executar uma ampla gama de movimentos que combinam habilidades mecânicas requintadas à capacidade de atenuar a intensidade e a robustez da aplicação de força (Watson *et al.*, 2009). Um dos maiores desafios em biologia do desenvolvimento é entender como os detalhes anatômicos característicos dos membros de cada espécie são gerados. Os membros são estruturas complexas formadas por aproximadamente 50 músculos, elementos esqueléticos precisos e com forma individual, tendões com sítios específicos de fixação entre os músculos e o esqueleto e, além disso, estão presentes vasos sanguíneos e nervos (Tickle, 2003). No entanto, a origem e a natureza de todos os sinais que iniciam a formação do membro ainda permanecem desconhecidas.

Os botões dos membros são estruturas derivadas do mesênquima e se formam anterior e posteriormente no flanco do embrião ao nível do coração e rins respectivamente. O desenvolvimento do MP está atrasado cerca de 12 horas com relação ao desenvolvimento do MA em camundongo (Zeller *et al.*, 2009). Em embriões de galinha os membros começam a se desenvolver no terceiro dia após a postura, quando as estruturas do eixo principal do corpo já estão estabelecidas. Aos dez dias as principais estruturas do membro já se formaram (Wolpert *et al.*, 2000).

O botão de membro possui regiões específicas que o padronizam ao longo de três eixos: eixo ântero-posterior (AP), dorso-ventral (DV) e próximo distal (PD). A denominação PD determina a região proximal e distal do membro estendido em relação ao plano do corpo, a denominação AP determina a região anterior e posterior, e DV determinando a região dorsal e ventral (no membro superior, a palma da mão sendo ventral e o dorso da mão sendo dorsal) (Tickle, 2006). O crescimento PD do membro (ombro-dedo; coxa-artelho) é extraordinariamente rápido: o botão do membro de camundongo cresce 1.300 μm entre os dias embrionários 9,5 e 12, durante os quais os três domínios esqueléticos (estilópode, zeugópode e autópole) do membro são determinados (Figura 3). Tais modificações parecem ser controladas pelos sinais codificados pela família de proteínas do fator de crescimento de fibroblastos (FGF). O eixo AP parece ser regulado pela proteína Sonic hedgehog, e o eixo dorso-ventral é regulado, pelo menos em parte, por

Wnt7a. A interação dessas proteínas determina a diferenciação dos diferentes tipos de células (Capdevila e Belmont, 2001).



Figura 2: Estádios de desenvolvimento embrionário de galinha *Gallus gallus* de acordo com Hamburger e Hamilton (1951). Fonte: Hamburger e Hamilton (1951).

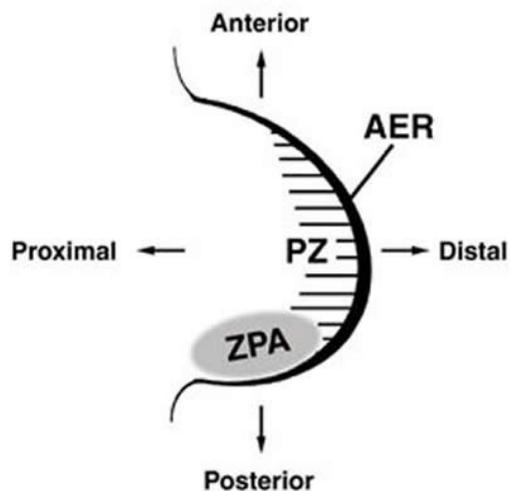


Figura 3: **Estrutura básica do botão do membro em vertebrados.** O botão do membro é composto por células mesenquimais envoltas por uma camada de células ectodérmicas e contém regiões específicas que o padronizam ao longo dos eixos ântero-posterior (AP), dorso-ventral (DV) e próximo distal (PD). ZPA: zona de atividade polarizadora, AER: crista ectodérmica apical, PZ: zona de progresso (Figura adaptada de Capdevila e Belmont, 2001).

O crescimento do botão do membro ao longo do eixo próximo-distal acontece através dos sinais secretados pela crista ectodérmica apical (do inglês, AER), um epitélio espesso localizado na extremidade distal do membro e que expressa genes da família FGF (Niswander *et al.*, 1993). A região denominada zona de progresso (PZ) possui células mesenquimais indiferenciadas e proliferativas e é o local em que as células adquirem a informação posicional que determina em que estrutura elas se desenvolverão, embora isso ainda seja controverso (Wolpert *et al.*, 2000). A zona de atividade polarizadora (ZPA) corresponde a um pequeno grupo de células mesenquimais indiferenciadas presentes na margem posterior do botão do membro e é responsável por padronizar o eixo AP.

A formação sequencial das estruturas próximo-distais é vista claramente no que diz respeito à formação dos elementos esqueléticos, os quais são inicialmente pré-formados como moldes de cartilagem hialina e podem ser identificados através do uso de coloração com azul de Alcian (Hinchliffe, 1977). Um único elemento esquelético, o qual dará origem ao úmero/fêmur se forma na parte proximal do membro, dentro de um compartimento do membro denominado estilópode (Figura 4). Um pouco mais tarde, pode ser vista uma

condensação de células mesenquimais que se agregam para formar um “Y”: os braços do “Y” representam o rádio/ulna ou fíbula/tíbia para MA e MP, respectivamente. Este novo compartimento dos membros é denominado zeugópode. Logo após, os elementos do punho/tornozelo podem ser vistos e, por fim, os dígitos (Tickle, 2003). Em conjunto com os elementos carpais/tarsais, os dígitos constituem o compartimento do membro conhecido como autópole. Com relação aos tendões, a indução de seus progenitores se inicia no botão do membro no dia 9,5. No entanto, a distinção evidente dos tendões só poderá ser vista claramente no dia 13,5 e o sistema de tendões completamente formado é visto pela primeira vez durante o dia 14.5 em camundongo (Murchison *et al.*, 2007).

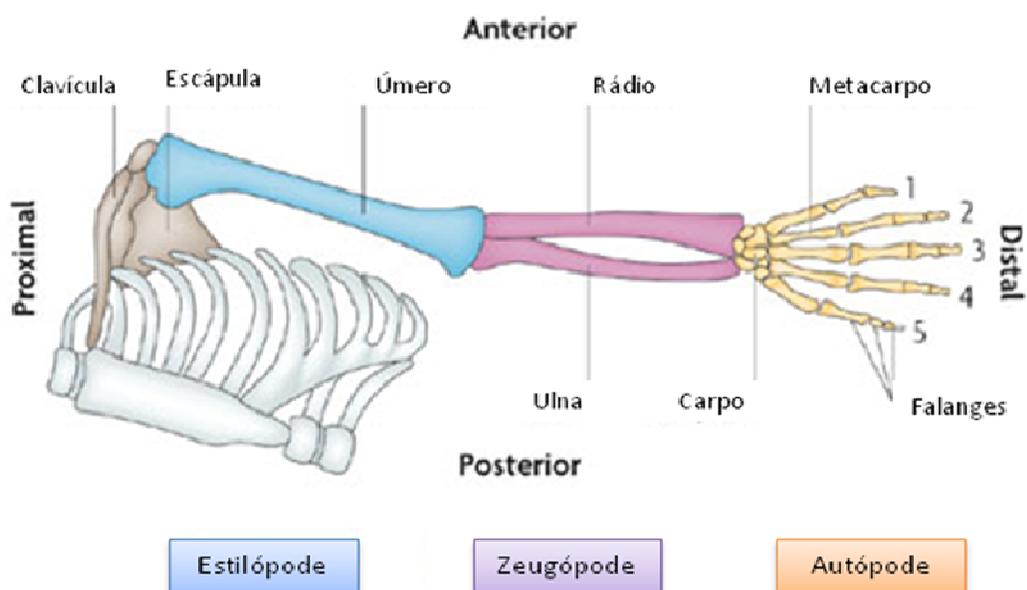


Figura 4: Os três domínios esqueléticos do membro representados no braço humano. O estilópode compreende o elemento esquelético proximal, o úmero (MA) e o fêmur (MP). O zeugópode compreende o rádio e ulna (MA) e tíbia e fíbula (MP). O autópole compreende os ossos do pulso (MA) e tarso (MP), ossos da palma da mão (metacarpos) e planta dos pés (metatarsos) e os ossos dos dígitos (falanges). A escápula e a clavícula são elementos esqueléticos que não derivam do botão do membro (Modificado de Zeller *et al.*, 2009).

Os dígitos são inicialmente vistos como linhas contínuas de cartilagem que alongam e segmentam-se periodicamente para formar as juntas interfalangeais e assim, formar o número preciso de falanges (Tickle, 2003). O número e a identidade dos dígitos são controlados através de sinalização proveniente da PZ e está relacionado com a largura do

botão do membro e com o tamanho da AER (Brickell e Tickle, 1989), e também com a expressão de Sonic Hedgehog (Shh) nesta região. Existem fortes evidências de que os sinais Shh sejam mediados pelas proteínas morfogenéticas do osso (BMP) (Sanz-Ezquerro e Tickle, 2001).

2.4 Vias de Sinalização

As vias de sinalização estão sempre presentes na vida de cada animal, desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta. Durante o desenvolvimento, diferentes vias de sinalização promovem a comunicação célula-célula coordenando inúmeras atividades, como por exemplo, a intensa migração celular durante a gastrulação. Na idade adulta, mecanismos similares de comunicação são utilizados para alcançar a homeostase e a regeneração tecidual. A regulação dessas vias de sinalização é crucial, uma vez que alterações em seu balanço podem causar resultados devastadores, tais como defeitos no desenvolvimento ou, na vida pós-natal, graves doenças (Gordon e Nusse, 2006). As principais vias de sinalização presentes durante o desenvolvimento embrionário são: Wnt, TGF- β , FGF e SHH. Diversos trabalhos presentes na literatura relacionam os genes *Dpr* com as vias de sinalização Wnt e TGF- β , portanto, para entendermos melhor qual o papel dos *Dprs* iremos dar mais detalhes de tais vias.

2.4.1 Sinalização Wnt

A sinalização através de moléculas Wnt, uma família de glicoproteínas secretadas, está presente em diversos processos do desenvolvimento, tais como segmentação, gastrulação e desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados. Ao nível celular, as Wnts ainda exercem diferentes funções: estabelecem destinos, controlam os níveis de proliferação, coordenam a migração de grupos de células para os sítios de diferenciação, determinam a polaridade e controlam a apoptose (Wodarz e Nusse, 1998). Em adultos, as proteínas da via de sinalização Wnt agem na manutenção da homeostase tecidual modulando a proliferação, diferenciação, morfologia e migração celular. Um controle adequado dessa sinalização é essencial para atividade fisiológica normal (Figura 5). Devido

a estas funções, a desregulação dos sinais Wnt está associada com vários tipos de doenças humanas, em particular com o câncer (Moon *et al.*, 2004; Aberle *et al.*, 1997).

São três as principais vias de sinalização Wnt: a via Wnt/ β -catenina (Wnt/ β -cat), que regula o destino das células durante o desenvolvimento e atua protagonizando vários processos pós-natais (Moon *et al.*, 2004); a via Wnt de polaridade celular planar, cuja função é regular a organização do citoesqueleto (Adler e Lee, 2001b) e, finalmente, a via Wnt/ Ca^{2+} , que participa do desenvolvimento embrionário e pode ter um papel importante durante a supressão de tumores (Angers e Moon, 2009). A análise de camundongos mutantes para os genes *Wnt* demonstrou que estes atuam na morfogênese de inúmeros tecidos e órgãos e são, portanto, necessários para o desenvolvimento normal de vertebrados (Kühl, 2004).

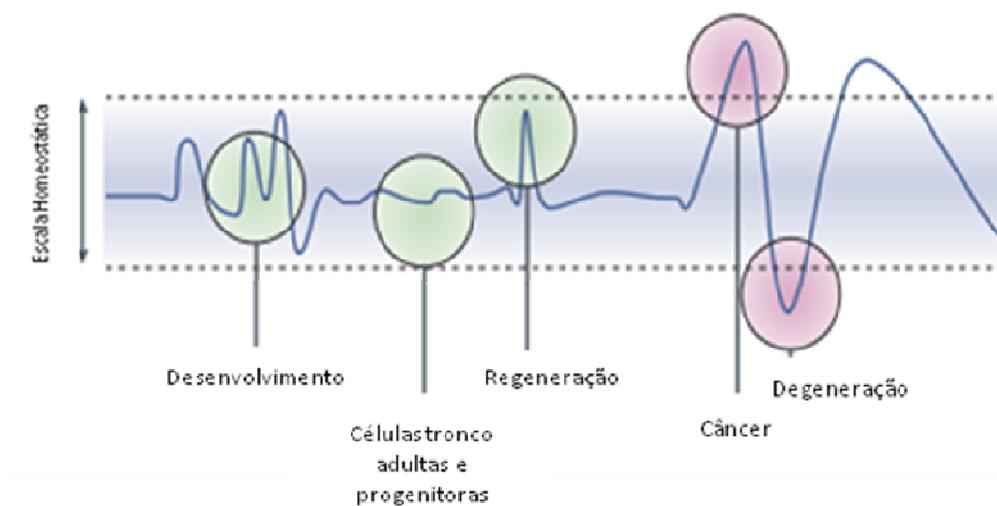


Figura 5: **Sinalização Wnt/ β catenina em metazoários.** O gráfico mostra a sinalização Wnt/ β -cat durante o desenvolvimento embrionário, em tecidos adultos e células progenitoras e durante a regeneração após injúria aguda. A sinalização Wnt/ β -cat é mantida em nível homeostático através de uma intrincada teia de proteínas, as quais regulam o destino, a proliferação e a autorrenovação celular. No entanto, quando os níveis de sinalização alteram seu perfil normal, doenças como o câncer podem surgir. Por outro lado, os baixos níveis de atividade sinalizadora podem estar por trás de muitas doenças degenerativas (Figura adaptada de Angers e Moon, 2009).

2.4.1.1 Sinalização Wnt Canônica

Nas mais variadas fases de desenvolvimento e crescimento dos organismos, a sinalização Wnt/ β -cat é mantida em escala homeostática por um arranjo intrincado de proteínas regulatórias. Entretanto, quando os níveis dessa sinalização excedem esta escala homeostática, podem surgir doenças. Inversamente, os baixos níveis dessa sinalização trazem circunstâncias degenerativas para o organismo (Angers e Moon, 2009).

Em células que não recebem sinalização Wnt, a proteína multifuncional β -cat se acumula nas junções de aderência. Fora das junções, o nível de β -cat é baixo devido à meia vida curta da mesma (Cadigan e Peifer, 2009). As moléculas de β -cat que se apresentam livres no citoplasma ligam-se a multicomplexos protéicos de destruição que são compostos pelas proteínas APC (proteína da polipose adenomatosa do cólon) e Axina, as quais são responsáveis por apresentar a β -cat para as quinases GSK3 (glicogênio-sintase-quinase-3) e CKI (caseína quinase I), facilitando a fosforilação sequencial de sítios amino-terminais na β -cat (Clevers, 2006). Uma ubiquitina ligase reconhece corretamente a β -cat fosforilada e a encaminha para poliubiquitinação e destruição via proteossomo. Enquanto isso, nos promotores de genes-alvo da via Wnt, os fatores transcricionais TCF/LEF ligam-se aos correpressores da família Groucho mantendo os genes-alvo de *Wnts* inativos (Arce *et al.*, 2006).

Na presença das proteínas *Wnt*, estes sinais são transduzidos através da interação com receptores de membrana Frizzled e correceptores LRP5/6 (Miller *et al.*, 1999). Esta interação leva à fosforilação da proteína citoplasmática Dsh, que uma vez fosforilada neutraliza o complexo de degradação da β -cat, fazendo com que esta se acumule no citoplasma e seja translocada para o núcleo da célula (Figura 6). No núcleo, a β -cat interage com os fatores de transcrição TCF/LEF e ativa a expressão de genes-alvo específicos (Logan e Nusse, 2004).

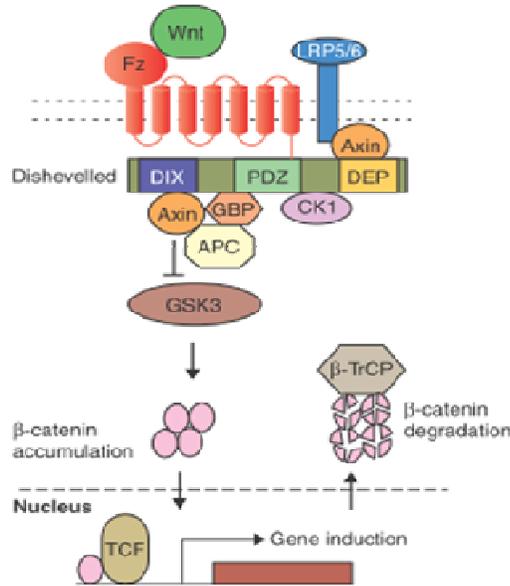


Figura 6: **Esquema representativo da via de sinalização canônica Wnt.** Para a via canônica a sinalização ocorre através dos receptores de membrana Frizzled (Fz) e LRP5/6, os quais induzem a estabilização da β -cat via domínios DIX e PDZ de Dsh e também um número de fatores que incluem Axina, GSK3 e caseína quinase 1 (CK1). A β -cat transloca-se para dentro do núcleo onde se associa aos fatores transcripcionais LEF/TCF para mediar à indução transcripcional de genes-alvo específicos. A β -cat é então exportada do núcleo e degradada via maquinaria proteossômica (Modificado de Habas e Dawid 2005).

2.4.1.2 Sinalização Wnt não Canônica

Via de Polaridade Celular Planar

Trabalhando com genética de *Drosophila*, o grupo do pesquisador Garcia Bellido, em 1982, descobriu o processo de polaridade celular planar (PCP). Desde então, estudos mostram que esta via está envolvida em vários processos importantes durante o desenvolvimento: movimentos de extensão convergente, fechamento do tubo neural, ciliogênese e migração neuronal. Recentemente estudos genéticos humanos sugerem que a via PCP possa estar envolvida em malformações e doenças humanas (Tada e Kai, 2009).

A via Wnt PCP controla a polarização das células também nos vertebrados e, consequentemente, movimentos celulares durante a gastrulação e a neurulação (Keller, 2002). Por meio do estabelecimento de localização assimétrica de componentes citoplasmáticos e de membrana, esta via regula a polaridade e os movimentos celulares

durante a embriogênese, particularmente os movimentos de extensão convergente que modelam as camadas germinativas imediatamente após a gastrulação na linha primitiva (Moon *et al.*, 2002). A via Wnt PCP também está envolvida na remodelação do citoesqueleto e influencia a polaridade celular por meio da quinase N-terminal Jun-quinase (JNK), das GTPase Rac e Rho (Figura 7). A proteína transmembranar Van Gogh-like (Vangl2) também tem um papel importante na via de sinalização PCP. As proteínas Vangl2 interagem diretamente com a proteína intracelular Dvl, componente central da via Wnt/ β -cat e PCP.

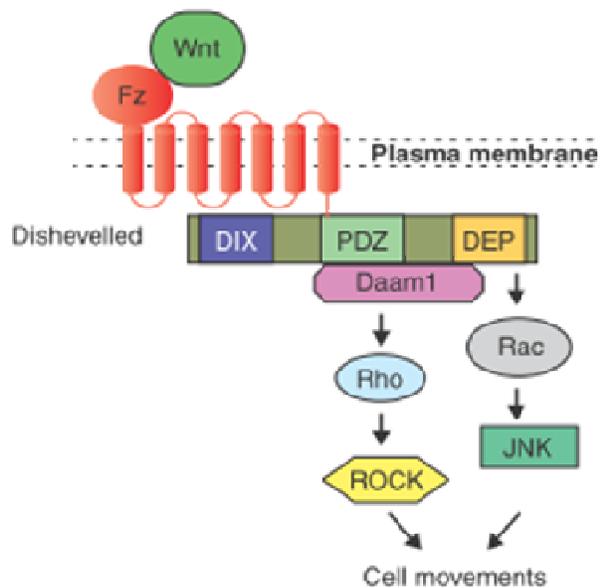


Figura 7. **Esquema representativo da cascata de sinalização não canônica dos sinais Wnt.** Na via PCP os sinais Wnt são transduzidos através dos receptores Frizzled de maneira independente aos coreceptores LPR5/6. Utilizando os domínios PDZ e DEP da molécula Dsh, esta via promove modificações do citoesqueleto através da ativação de pequenas GTPases: Rho e Rac (Modificado de Habas e Dawid, 2005).

Via Wnt/ Ca^{2+}

O cálcio é uma molécula sinalizadora muito importante que regula vários processos biológicos. Evidências sugerem o envolvimento do cálcio na padronização do eixo direita-esquerda na maioria dos vertebrados (camundongo, galinha, *Xenopus* e peixe-zebra) (Langenbacher e Chen, 2008). A via de sinalização Wnt/ Ca^{2+} tem papéis importantes no

desenvolvimento e na manutenção da homeostasia no organismo, desde modelação dorso-ventral do embrião, regulação da migração celular, assim como o desenvolvimento do coração, e também pode ter um papel essencial durante a supressão de tumores (Kühl, 2004). De acordo com Miller *et al.*, (1999) a via Wnt/Ca²⁺ pode influenciar tanto a via PCP como a Wnt canônica.

Ativação da via Wnt/Ca²⁺ pelos receptores de membrana Frizzled resulta na ativação de vários processos intracelulares, envolvendo a ativação de proteínas heterotriméricas G, as quais ativam a fosfolipase C (Figura 8). Por sua vez, a fosfolipase C causa liberação intracelular de Ca²⁺, resultando na ativação de duas quinases sensíveis ao Ca²⁺, a CamKII (*Ca²⁺- Calmodulin-dependent Protein Kinase-II*) e proteína quinase C (PKC). Finalmente, estas quinases estimulam o fator nuclear FNAT e outros fatores de transcrição tais como CREB (cAMP Response Element-Binding Protein-1), alterando, portanto, padrões de expressão gênica (Langenbacher e Chen, 2008) .

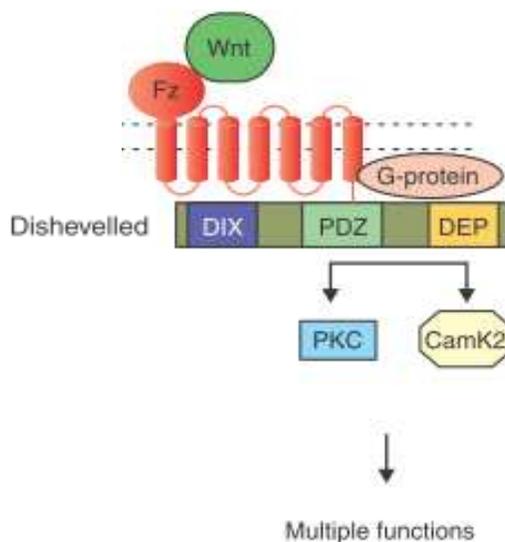


Figura 8. **Esquema representativo da cascata de sinalização não canônica dos sinais Wnt/Ca²⁺.** A sinalização Wnt através do receptor Frizzled promove a ativação de proteínas G heterotriméricas, as quais se ligam a Dsh, levando à ativação da fosfolipase C, da quinase cálcio 2 calmodulina e da proteína quinase C (PKC). Esta via também utiliza os domínios PDZ e DEP de Dsh para modular adesão celular e motilidade (Modificado de Habas e Dawid, 2005).

2.4.2 Sinalização Nodal

A sinalização TGF- β regula uma variedade de eventos celulares e desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário (Tian e Meng, 2006). Nodal é uma molécula que faz parte da superfamília de fatores de crescimento e diferenciação TGF- β . Estudos genéticos demonstraram que as proteínas Nodal agem na indução do mesoderma e endoderma, atuam na determinação do eixo AP dos embriões de vertebrados (Schier, 2003) e no estabelecimento de assimetria bilateral (Tian e Meng, 2006). Um controle preciso da sinalização nodal é essencial para o desenvolvimento embrionário normal (Zhang *et al.*, 2004). Os sinais Nodal podem agir como morfógenos, produzindo efeitos concentração-dependentes e agindo a distância do seu sítio de produção (Schier, 2003).

Tanto a estrutura como a via de transdução de sinal da molécula Nodal são conservadas evolutivamente. Isto sugere que funções desta via estejam relacionadas às características deste grupo, em particular à assimetria bilateral (Schier, 2003). Assim como para maioria dos sinais TGF- β , os ligantes Nodal ativam receptores quinase serina/treonina que fosforilam proteínas Smad para regular a expressão gênica (Wu e Hill, 2009). Para sinalização Nodal, o sinal é recebido através dos receptores activina tipo I e II e correceptores EGF-CFC. A ativação do receptor resulta da fosforilação dos fatores de transcrição Smad2 e Smad3. Isto leva à associação do complexo Smad2/3 a Smad4, translocação para o núcleo e subsequente associação com fatores de transcrição para ativar genes-alvo (Figura 9). Várias proteínas extracelulares, incluindo enzimas e antagonistas, controlam esta via. Além disso, moléculas intracelulares como cofatores transcricionais, proteínas envolvidas com a disponibilidade do receptor e miRNAs regulam a sinalização Nodal (Schier, 2003).

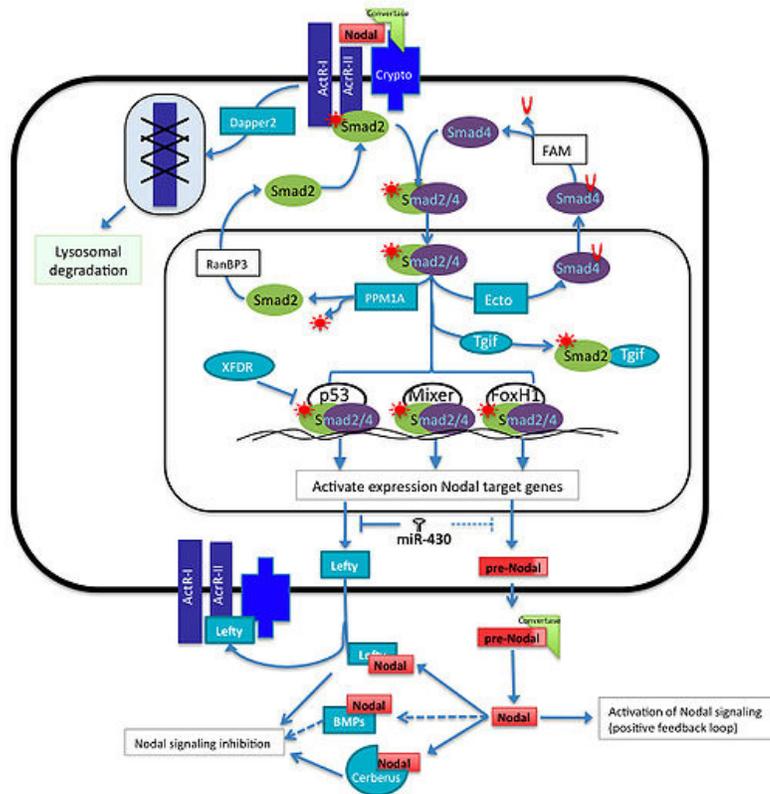


Figura 9: A **sinalização Nodal**. Após o processamento dos precursores nodais através de convertases, os ligantes Nodal se ligam aos receptores activinas e aos correceptores. Moléculas extracelulares denominadas Cerberus e Lefty agem como inibidores extracelulares. *Dpr2* é responsável pela degradação do receptor activina via lisossomo. A ativação da via é mediada pela fosforilação de Smad2 e sua associação com Smad4 e fatores de transcrição como FoxH1, Mixer e p53. Figura adaptada de Shen, 2007.

2.5 Genes *Dapper*

Os genes *Dpr* também são conhecidos como Dact ou Frodo (Brott e Sokol, 2005a) e fazem parte de uma família gênica constituída por três genes (*Dpr1*, *Dpr2* e *Dpr3*) em mamíferos, por dois genes (*Dpr1* e *Dpr2*) em galinha e por apenas um gene (*Dpr1*) em *Xenopus* (Waxman *et al.*, 2004). Interessantemente, nenhum ortólogo *Dpr* foi identificado no genoma de invertebrados, inclusive invertebrados cordados.

As proteínas codificadas por esta família contêm um zíper de leucina na região N-terminal e um domínio PDZ na extremidade C-terminal, os quais se ligam a Dsh para modular sinais da via de sinalização Wnt/ β -cat e Wnt/PCP (Fisher *et al.*, 2006; Cheyette *et al.*, 2002). No entanto, sua função na regulação da sinalização Wnt canônica permanece ambígua, enquanto alguns estudos indicam que as proteínas Dpr agem positivamente na transdução dos sinais Wnt (Gloy *et al.*, 2002; Waxman *et al.*, 2004), outros autores sugerem

uma função inibitória (Cheyette *et al.*, 2002; Yau *et al.*, 2005; Brott e Sokol, 2005a; Zhang *et al.*, 2006). Em adição, evidências sugerem que os parálogos *Dpr* apresentam atividades de sinalização distintas e que mesmo uma única proteína *Dpr* pode ter mais de um papel (Hikasa e Sokol, 2004; Brott e Sokol, 2005).

Além de modularem vias de sinalização, os genes *Dpr* desempenham papéis fundamentais durante o desenvolvimento embrionário, como especificação do tecido neural, formação dos olhos e do coração (Cheyette *et al.*, 2002; Gloy *et al.*, 2002; Hikasa e Sokol, 2004; Waxman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Brott e Sokol, 2005). Além disso, os genes *Dpr* são necessários para promover os movimentos morfogenéticos durante a gastrulação e neurulação (Hikasa e Sokol, 2004). Esta multiplicidade de funções é possível, pois as proteínas *Dpr* possuem habilidade de interagir com diferentes parceiros moleculares atuando como proteínas adaptadoras. Proteínas adaptadoras são aquelas que não apresentam domínio catalítico próprio, mas que atuam promovendo a interação entre diferentes proteínas para maximizar sua atividade biológica. Assim, dependendo do contexto celular no qual elas estejam inseridas, as proteínas *Dpr* podem desempenhar diferentes papéis ao longo da embriogênese dos vertebrados. Essas interações são mediadas por domínios estruturais distintos que têm sido conservados entre os parálogos desta família (Waxman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Ao longo do desenvolvimento embrionário cada membro da família *Dpr* apresenta um padrão de expressão distinto em relação ao local e estágio de desenvolvimento, o que sugere funções diferentes para cada parálogo (Fisher *et al.*, 2006). Recentemente, Kettunen *et al.*, (2010) evidenciou a expressão dos três genes *Dpr* em domínios distintos durante o desenvolvimento de dentes em embriões de camundongo reafirmando o que havia sido proposto por Fisher *et al.* (2006).

2.5.1 *Dapper1*

O gene *Dpr1* está localizado no cromossomo 12D1 de camundongo (Cheyette *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2006), codifica um RNAm com 2.420 pares de base (pb) e é composto por quatro exons. Este gene foi primeiramente localizado em *Xenopus* e, desde então, um acúmulo crescente de dados indica que a proteína *Dpr1* é uma proteína adaptadora que

colabora em diversos processos do desenvolvimento embrionário, interagindo com diferentes proteínas dependendo do contexto celular (Brott e Sokol, 2005a). *Dpr1* apresenta ação moduladora na via de sinalização Wnt, ao interagir com Dsh e induzir sua degradação via lisossomo (Zhang *et al.*, 2006).

A localização celular dos genes *Dpr* é complexa, em culturas celulares, *Dpr1* endógeno se apresenta espalhado por todo citoplasma como manchas pontuais e no núcleo se encontra difuso (Cheyette *et al.*, 2002). A observação de que alguns fragmentos carboxi-terminais de *Dpr1* estão localizados quase que exclusivamente no núcleo favorece a sugestão de que tal gene exerce papel nesta organela (Zhang *et al.*, 2006). No entanto, o significado fisiológico de *Dpr1* no núcleo ainda é incerto. De acordo com Gao e colaboradores (2008), a localização nuclear de *Dpr1* pode contribuir para sua função no controle da progressão do ciclo celular.

Em embriões de camundongo, a expressão de *Dpr1* é baixa durante os primeiros dias de gestação, porém, aumenta dramaticamente entre os dias 9,5 e 10,5 atingindo seu pico entre os dias 11,5 e 13,5 quando, então, diminui lentamente. No sétimo estágio, a expressão de *Dpr1* é detectada primeiramente no mesoderma e em níveis bastante baixos no neuroectoderma (Fisher *et al.*, 2006). No nono estágio, a expressão de *Dpr1* é maior no septo transversal, mesênquima cranial, mesoderma pré-somítico caudal (PSM) e nos somitos que derivam dele (Hunter *et al.*, 2005). *Dpr1* exibe um forte gradiente de expressão caudal-rostral, o qual está inversamente relacionado com a idade de desenvolvimento dos somitos, ou seja, há expressão maior nos somitos recentemente formados (caudal) e expressão menor naqueles mais maduros (rostral). Por volta do 10º estágio a expressão continua na placa mesodérmica segmentar e nos somitos caudais. *Dpr1* também está presente em baixos níveis em outras estruturas tais como o botão caudal e o mesoderma ventral do botão caudal. Neste estágio pode-se identificar a expressão de *Dpr1* nos brotos de MA e MP. A expressão exclusiva de *Dpr1* no PSM sugere uma função única neste tecido durante a segmentação (Fisher *et al.*, 2006). Já em embriões de galinha os domínios chave de expressão do gene *Dpr1* são a linha primitiva posterior, o nó anterior e a notocorda, mesoderma pré-somítico, mesoderma lateral e cardíaco, os placódios neurogênicos e o mesênquima dos membros. Em embriões de galinha *Dpr1*, é expresso na

linha primitiva e no nódulo de Hensen, na notocorda, no mesoderma pré-somítico, no mesoderma lateral, bem como no coração e nos botões dos membros em desenvolvimento (Alvares *et al.*, 2009).

Em camundongos adultos, *Dpr1* é expresso, principalmente, no cérebro, pulmão e útero com expressão significativamente menor em outros tecidos (Fisher *et al.*, 2006). Ensaios de ganho e perda de função realizados *in vitro* demonstraram que o gene *Dpr1* também está envolvido no controle da adipogênese em humanos e murinos através de sua modulação na via de sinalização Wnt (Lagathu *et al.*, 2009). Na vida pós-natal, *Dpr1* de humanos se encontra expresso em nível elevado em carcinomas hepatocelulares e esta superexpressão está relacionada com o acúmulo citoplasmático de β -cat (Yau *et al.*, 2005).

A grande maioria de camundongos homozigotos para mutação em *Dpr1* morre um dia após o nascimento. Tais neonatos possuem vários tipos de malformações envolvendo a região posterior do corpo como, por exemplo, cauda curta, ausência de ânus, canal urinário, genitália externa e de bexiga e cólon com fundo cego, além de ureteres fusionados com os ductos reprodutivos e rins hidronefróticos. Em adição ao fenótipo gastrointestinal e urogenital malformado, a maioria dos mutantes *Dpr1* possui segmentação corporal truncada, que se apresenta com maior frequência na região da cauda. Contudo, estas malformações podem afetar também as regiões sacral e lombar, sendo frequentemente acompanhadas de sirenomielia. De acordo com os autores, este espectro de malformações pode ser originário de distúrbios nos movimentos morfogenéticos na linha primitiva do embrião (Suriben *et al.*, 2009).

Em paralelo, outro grupo de pesquisa também descreveu o fenótipo de camundongos mutantes para *Dpr1* (Wen *et al.*, 2010). Estes autores observaram agenesia de vértebras caudais, malformações anorretais, agenesia e displasia renal, rins fusionados e ausência de bexiga. Além disto, em uma pequena parcela dos recém-nascidos (17%), ocorreu malformações nos MP. De acordo com os autores, tais malformações assemelham-se muito às encontradas em humanos portadores da doença congênita chamada síndrome de regressão caudal, uma condição rara que envolve um espectro de malformações congênitas dos sistemas urinário e genital, da espinha lombo-sacral e das extremidades inferiores (Almeida *et al.*, 2008). O conjunto de malformações descritas acima sugere uma falha da

migração celular na região da linha primitiva posterior nos camundongos mutantes para o gene *Dpr1*. Esta hipótese levou a descoberta de que *Dpr1* interage com a proteína Vangl2, um importante componente da via de sinalização PCP (Suriben *et al.*, 2009). Desta forma, acredita-se que *Dpr1* pode atuar na regulação da via de sinalização PCP controlando o nível e a localização celular da proteína Dvl.

2.5.2 *Dapper2*

Dpr2 está localizado no cromossomo 17A2 de camundongo (Cheyette *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2006), codifica um RNAm de 2.800 pb e é composto por quatro exons. Este gene foi primeiramente encontrado em *xenopus* (Cheyette *et al.*, 2002). Até agora, sabe-se que *Dpr2* modula a sinalização mediada pela proteína Nodal atuando sobre os receptores TGF- β : Alk4 e Alk5, acelerando sua degradação via lisossomo (Zhang *et al.*, 2004). Em peixe-zebra e quando super-expresso em células de mamíferos, este gene pode inibir a sinalização Nodal promovendo a degradação endocítica via lisossomo de receptores do tipo I para a via TGF β (Zhang *et al.*, 2004). Segundo Cheyette *et al.*, (2002), *Dpr2* em *Xenopus* pode estar envolvido na via de sinalização Wnt/PCP, pois na sua ausência há comprometimento dos movimentos normais de extensão convergente em embriões do peixe-zebra.

Durante o nono estágio do desenvolvimento, *Dpr2* é fracamente expresso em embriões de camundongo apesar de ser amplamente distribuído. Baixa expressão pode ser identificada na retina, na vesícula óptica, nas veias umbilicais, no tubo neural dorsal, e da mesma maneira que *Dpr1*, nos somitos. *Dpr2* mostra significativa expressão dorso-lateral nos somitos enquanto que *Dpr1* é mais expresso ventro-medialmente. Como consequência desta distribuição, os dois parálogos ocupam uma distribuição complementar nos somitos maduros. Durante o 10º estágio embrionário a expressão de *Dpr2* é fracamente detectável e o principal sítio é encontrado na vesícula ótica e em somitos caudais (Fisher *et al.*, 2006).

Em embriões de galinha, *Dpr2* é expresso na linha primitiva anterior, no nódulo de Hensen, nos somitos epiteliais, nas células-tronco de músculos embrionários, no ecto e endoderma orais, nas células da crista neural, no ectoderma do membro e nos brotos dos

pulmões (Alvares *et al.*, 2009). Em ratos adultos, *Dpr2* é altamente expresso nos queratinócitos epidérmicos e folículos do pelo (Meng *et al.*, 2008).

Diferente de camundongos mutantes para *Dpr1* que morrem logo após o nascimento, ratos deficientes em *Dpr2* possuem desenvolvimento embrionário e pós-natal normais e alcançam a vida adulta sem nenhum distúrbio no comportamento. No entanto, a deficiência de *Dpr2* causa acelerada reepitelização durante a cicatrização de feridas. A perda da função de *Dpr2* aumenta a resposta dos queratinócitos frente à estimulação de TGF- β , os quais são responsáveis por promover adesão da fibronectina e migração de queratinócitos através da regulação da expressão de genes específicos da integrina. Portanto, *Dpr2* desempenha papel inibitório na reepitelização de feridas em ratos adultos atenuando a sinalização TGF- β . Esta aceleração está associada com o aumento da força adesiva devido à expressão de integrinas específicas como consequência da elevada sinalização TGF- β (Meng *et al.*, 2008).

2.5.3 *Dapper3*

Dpr3 está localizado no cromossomo 7A2 de camundongo, codifica um RNAm de 2.828 pb e, da mesma forma que os outros dois membros desta família, é composto por quatro exons. Dentre os três membros da família Dpr, este é o gene que possui menor quantidade de dados na literatura, pois parece ser exclusivo de mamíferos. Em humanos, *Dpr3* localiza-se no cromossomo 19q13.32 onde codifica uma proteína 85% idêntica aquela codificada por *Dpr3* em camundongo (Fisher *et al.*, 2006).

A expressão de *Dpr3* nos embriões de camundongo é baixa durante o início do desenvolvimento, porém tende a aumentar tendo seu pico durante o 10° dia de gestação, e após este dia, a expressão segue diminuindo. Assim como *Dpr1*, *Dpr3* é expresso no mesênquima crânio-facial, porém é mais proeminente no mesênquima dos arcos branquiais, no saco e arcos aórticos. No 10,5° dia embrionário a expressão de *Dpr3* é bastante proeminente por todo o mesênquima dos arcos branquiais, no mesênquima dos brotos de membros e nos somitos em amadurecimento. Esta forte expressão torna consistente a importância deste gene na migração e diferenciação de células da crista neural e das células mesodérmicas derivadas do mesênquima. Após este estágio, a expressão de *Dpr3* da

mesma maneira que a de *Dpr2* começa a se concentrar no desenvolvimento do sistema nervoso central. A presença de transcritos *Dpr3* em animais adultos é bastante restrita, estando presente principalmente no útero e cérebro (Fisher *et al.*, 2006).

Desde a descoberta dos genes *Dpr*, muitos avanços têm sido realizados na compreensão de suas funções no desenvolvimento dos vertebrados, porém ainda restam dúvidas que necessitam ser esclarecidas. A maioria das informações disponíveis sobre expressão de tais genes vem de trabalhos realizados em organismos anamniotos (*Xenopus laevis* e peixe-zebra), que têm diferenças importantes quanto ao desenvolvimento embrionário em relação aos amniotos.

Objetivos



3. Objetivos

Para elucidar o papel dos genes *Dpr* no desenvolvimento de vertebrados amniotos faz-se necessária a investigação do padrão espacial e temporal de expressão destas moléculas ao longo da ontogênese do organismo. Frente a isso, o objetivo do presente trabalho é estudar o padrão de expressão dos genes *Dpr* durante a embriogênese de camundongo. Desta forma será possível criar hipóteses fundamentadas sobre o papel dos genes em questão no desenvolvimento dos vertebrados amniotos, que serão testadas, num horizonte próximo, por meio de ensaios funcionais. No conjunto, este trabalho também poderá trazer informações que permitam realizar associação entre a atividade dos genes *Dpr* e as malformações congênitas no homem.

A escolha de embriões de camundongo como modelo experimental justifica-se por este ser um organismo amnioto para o qual há estudos detalhados dos estádios de desenvolvimento, e por haverem poucos dados sobre a função dos genes *Dpr* durante sua ontogênese. Além disso, o desenvolvimento embrionário de camundongo se assemelha bastante ao de outros mamíferos e desta maneira, os resultados obtidos podem ser aplicados para outros organismos. Além do mais, embriões de camundongo podem ser facilmente obtidos e manipulados em laboratório.

O padrão de expressão dos genes *Dpr* só está estabelecido com detalhes para embriões de peixes (Waxman *et al.*, 2004; Gillhouse *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004) e anfíbios (Gloy *et al.*, 2002; Cheyette *et al.*, 2002). Para embriões de camundongos e galinha, ainda não existem na literatura, dados relativos ao padrão de expressão durante a ontogênese dos membros.

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização do padrão de expressão dos genes *Dpr* durante a ontogênese de embriões de camundongo. Além disso, nosso objetivo também foi estudar a expressão dos genes *Dpr* durante o desenvolvimento dos membros em embriões de camundongo e galinha.

3.2 *Objetivos Específicos*

- 1) Síntese de sondas de RNAm para camundongo e galinha.
- 2) Hibridação *in situ whole mount* para os genes *Dpr1*, *Dpr2*, *Dpr3* em embriões de camundongo e para os genes *Dpr1* e *Dpr2* em membros de embriões de galinha em diferentes fases do desenvolvimento.
- 3) Realização de cortes seriados dos embriões em vibrátomo, para detalhamento do padrão de expressão.
- 4) Hibridação *in situ* em corte histológico de MP de embriões de camundongo (TS23) e galinha (HH30).
- 5) Comparação do padrão de expressão dos genes *Dpr* com o de marcadores para tendão (*Scx*), células condroprogenitoras (*Sox9*), articulação (*Gdf5*) e músculo (*MyoG*).
- 6) Elaboração de pranchas fotográficas para documentação do padrão de expressão dos genes.

Material e Métodos



4. Material e Métodos

4.1 Obtenção de embriões

4.1.1 Camundongo

Neste trabalho foram utilizados embriões de camundongo da linhagem C57BL/6 provenientes do CEMIB/UNICAMP. Estes foram mantidos em gaiolas com temperatura e iluminação controladas, com acesso à água e alimentação *ad libitum*. A definição de prenhez foi feita a partir da observação do *plug* vaginal, momento no qual se estabeleceu o dia 0 gestacional. As fêmeas prenhes foram sacrificadas nos dias gestacionais que correspondessem aos estádios TS18, TS19, TS20, TS21, TS22 e TS23 segundo os critérios de desenvolvimento embrionário estabelecidos por Theiler (1989). Após coleta, os embriões foram fixados em PFA 4% durante um período de no mínimo 16 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados com autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp com número de protocolo 1837-1.

4.1.2 Galinha

Embriões de galinha foram obtidos a partir de ovos fertilizados provenientes da granja Yamaguishi (www.yamaguishi.com.br). Após incubação em atmosfera úmida a 38,5 °C os embriões foram coletados e dissecados para remoção das membranas extraembrionárias em solução salina fosfatada (PBS). Após coleta, os embriões foram fixados em PFA 4% durante um período de no mínimo 16 horas. Os estádios escolhidos para coleta foram HH24, HH25, HH28, HH30, HH32 e HH34, os quais, de acordo com Wolpert *et al.* (2000), são equivalentes aos estádios de camundongo previamente mencionados. Para estadiamento dos embriões de galinha foram utilizados os critérios estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951).

4.2 Processamento dos embriões para hibridação *in situ* (HIS)

Os embriões, previamente fixados em PFA 4%, foram lavados em PBT (PBS + Tween 20 0,1%), desidratados em uma sequência de soluções de metanol a 25%, 50%, 75%

e 100%, e clareados por uma hora em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 6% à temperatura ambiente. Nesta etapa, os embriões previamente desidratados são clareados, havendo diminuição da intensidade de pigmentos presentes no sangue e olho, por exemplo, ao mesmo tempo em que há inativação das fosfatases endógenas (Kadota *et al.*, 1987) que poderiam gerar reação de fundo. Finalmente, os embriões foram armazenados, por no máximo, dois meses, em metanol 100% a -20 °C para serem utilizados nos ensaios de HIS.

4.3 Hibridação *in situ*

A introdução de RNases em qualquer momento de um experimento de hibridação, desde a coleta até a formação do híbrido de RNA endógeno/sonda, pode ser a causa de um sinal ausente ou fraco. Para evitar isso, possíveis fontes de RNase foram descontaminadas conforme descrito abaixo:

- água e soluções foram tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC), por 16 – 24 horas e em seguida esterilizadas em autoclave (ex.: água_{DEPC} e PBS_{DEPC});
- materiais de vidro e metal foram fornados (aquecidos a 180 °C por 4 horas);
- materiais de plástico foram tratados com solução de hidróxido de sódio 0,5 molar por 10 minutos e em seguida lavados com água_{DEPC}.

4.3.1 Transcrição das sondas

Duas metodologias diferentes para síntese de sondas foram empregadas neste trabalho. Utilizamos sondas plasmidiais e sondas sintetizadas a partir de *primers* que continham o promotor da enzima RNA polimerase T7 acoplado a sua extremidade 5', conforme sumarizado na Tabela 1.

4.3.1.1 Síntese de sonda plasmidial para *Dpr1*(Mm), *Dpr2*(Mm), *Dpr3*(Mm), *Dpr1*(Gg), *Dpr2*(Gg) e *Gdf5* (Mm)

Os clones para a síntese das sondas dos genes *Dapper* de camundongo foram preparados no vetor pCR4 –TOPO e continham um fragmento do exon 4 de cada gene. Estes clones foram cedidos pela Dra. Susanne Dietrich da *School of Biomedical and Health*

Sciences do King's College London na Inglaterra, colaboradora deste trabalho. Os clones para síntese das sondas *Dpr* de galinha são os mesmos descritos por Alvares *et al.* (2009).

Aproximadamente 30 ng de DNA plasmidial foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* M13 direto e reverso a fim de amplificar a sequência-molde para a síntese da ribossonda. Os produtos de PCR foram submetidos a extrações sequenciais de Fenol:Clorofórmio (1:1) e Clorofórmio 100%, com o intuito de eliminar eventual atividade de RNases. Os produtos de PCR foram precipitados e ressuspendidos em água_{DEPC}. Depois de efetuada a ressuspensão, o DNA purificado foi utilizado para a transcrição e marcação da ribossonda. Para tanto, adicionamos 1 µg de DNA purificado, 4 µg de tampão de transcrição 5X, 2 µL de 0,1M de DTT, 2 µL de uma mistura contendo ribonucleotídeos e UTP conjugado a Digoxigenina (DIG), 1 µL de inibidor de RNase, 1 µL de T7 RNA polimerase e água_{DEPC} para completar o volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37 °C por duas horas. A seguir, foram adicionados 2 µL de DNase I à reação para remover o produto de PCR (DNA) utilizado como molde. Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a 37 °C e depois colocada em gelo.

O RNA transcrito foi purificado em coluna (Sigma S5059) e armazenado a -20 °C. Para verificar a qualidade da ribossonda, retirou-se uma alíquota de 1 µL da solução final e realizou-se eletroforese em gel de agarose 1%. A qualidade da ribossonda foi avaliada através da intensidade e definição da banda obtida. Subsequentemente, a sonda foi quantificada por leitura em nanodrop (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 260/290 nm para posterior diluição em solução de pré-hibridação na concentração de 1 µg de sonda/mL, na qual as sondas foram armazenadas a -20°C.

4.3.1.2 Sondas sintetizadas a partir de primers contendo o promotor da enzima RNA polimerase T7

Este grupo de sondas foi preparado utilizando a sequência da região promotora da enzima RNA polimerase T7 acoplada à extremidade 5' de cada *primer* gene- específico durante as reações de síntese (Tabela 1). Quatro etapas foram necessárias para a geração do segundo grupo de sondas, a saber: (1) Extração de RNA total, (2) Síntese de DNA complementar (cDNA) por reação da transcriptase reversa seguida de PCR (RT-PCR), (3)

Amplificação do produto desejado por PCR utilizando *primers* sem promotor da enzima RNA polimerase T7 e (4) PCR a partir do produto obtido no item anterior. Para a PCR foram utilizados *primers* gene-específicos, sendo que os *primers* reversos possuíam o promotor da enzima RNA polimerase T7 acoplado a extremidade 5'. Cada um destes passos será detalhado a seguir.

(1) *Extração de RNA total*

Imediatamente após coleta, embriões inteiros de camundongo (TS19) e galinha (HH23) foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida, realizou-se a homogeneização do conteúdo com o auxílio de agulha e seringa até que todo o tecido fosse dissolvido. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Para cada 300 µL do homogenado, adicionou-se 200 µL de clorofórmio seguido de homogeneização em vórtex durante 30 segundos. Após 5 min à 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 1,5 mL e a ela foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico. Após suave homogeneização, 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. Ao *pellet* formado adicionou-se 1 mL 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 1 mL de etanol absoluto gelado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 x g a 4 °C por 10 min. Finalmente, após secagem à temperatura ambiente, o *pellet* foi solubilizado em 40 µL de água_{DEPC} e o RNA estocado a -80 °C.

(2) *Síntese de cDNA*

A partir do RNA obtido no passo anterior, realizou-se a síntese do cDNA utilizando o *Kit SuperScript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e *primer* oligo dT15-18. Para tanto, a 1 µg de RNA total foi acrescentada água_{DEPC} a fim de se obter volume final igual a 12 µL. Em seguida, o RNA foi incubado a 65 °C por 5 min e transferido para banho de gelo visando promover sua denaturação. Posteriormente acrescentou-se 4 µL do Tampão 10X (Tris-HCl

200mM pH8,4 e KCL 25mM), 2 µL de dNTPs (0,5mM de cada nucleotídeo), 1 µL do RNA *Inhibitor* e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação foi então 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 utilizados posteriormente em reações de PCR visando a geração de sondas de RNA.

(3) Primeira PCR

Para os ensaios de PCR foram utilizados *primers* apropriados para cada sonda, conforme apresentado na Tabela 1. Cada reação de PCR foi feita em volume final igual a 25 µL que incluíam 2 µL de cDNA, 10 pmoles dos *primers* direto e reverso, 1 µL de dNTP 10mM, 1,5mM de MgCl₂, 4,5 µL de tampão de PCR 10X, 2,5% de DMSO e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As condições de ciclagem de todas as reações de PCR foram: 5 ciclos iniciais de denaturação a 95 °C por 15s; anelamento dos *primers* a 60 °C por 10s; extensão a 72 °C por 2 min. Em seguida, 30 ciclos de denaturação a 95 °C por 15 min; anelamento dos *primers* a 60 °C por 2 min; extensão a 72 °C por 2 min e a extensão final a 72 °C por 15 min.

(4) Segunda PCR

O produto de PCR obtido no item anterior foi diluído 10x e 1 µL foi submetido a nova PCR. Os reagentes e as condições de ciclagem utilizados foram os mesmos empregados durante a primeira PCR com exceção dos *primers* reversos gene-específicos que foram substituídos por *primers* gene-específicos que continham a região promotora para a enzima RNA polimerase T7 acoplada a sua extremidade 5'. O produto de PCR obtido foi purificado utilizando o Kit QIAquick – PCR Purification Kit (Qiagen) e, em seguida, o DNA purificado foi utilizado para transcrição das sondas.

Tabela 1. ***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>Wnt14</i>	1ª PCR	Direto 5' TGCTGGATGGGTCCCTTCTG 3'	390 pb
Mm		Reverso 5' CAGAAGAGATGGCGTAGAGG3'	
	2ª PCR	Direto 5' TGCTGGATGGGTCCCTTCTG 3'	
		Reverso 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAC CAGAAGAGATGGCGTAGAGG 3'	
<i>Sox9</i>	1ª PCR	Direto: 5' AGAGCGAGGAAGATAAGTTC 3'	454 pb
Mm		Reverso 5' ATTAGGAGAGATGTGAGTCT 3'	
	2ª PCR	Direto: 5' AGAGCGAGGAAGATAAGTTC 3'	
		Reverso 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA ATTAGGAGAGATGTGAGTCT 3'	
<i>MyoG</i>	1ª PCR	Direto 5' AACTACCTTCCTGTCCACCT 3'	487 pb
Mm		Reverso 5' GGTGGGACCGAACTCCAGT 3'	
	2ª PCR	Direto 5' AACTACCTTCCTGTCCACCT 3'	
		Reverso 5' TAATACGACTCACTATAGGGAG AGTTGGGACCGAACTCCAGT 3'	
<i>Scx</i>	1ª PCR	Direto 5' CTCCAAGATTGAGACGCTGC 3'	457 pb
Mm		Reverso5'GTCCATCTCTCTGTTTCATAG 3'	
	2ª PCR	Direto 5' CTCCAAGATTGAGACGCTGC 3'	
		Reverso5' TAATACGACTCACTATAGGGAG ATCCATCTCTCTGTTTCATAG 3'	
<i>Scx</i>	1ª PCR	Direto 5' ACAGCGTCAACACCGCCTTC 3'	370pb
Gg		Reverso 5' GTCCGTCCGCTCCTCCGCTC 3'	
	2ª PCR	Direto 5' ACAGCGTCAACACCGCCTTC 3'	
		Reverso 5' TAATACGACTCACTATAGGGAG ATCCGTCCGCTCCTCCGCTC 3'	
<i>Wnt14</i>	1ª PCR	Direto 5' AAGTCTGTGACCGCCTGAAG 3'	486 pb
Gg		Reverso 5'CGTGGCACTTACAGGTTGTT 3'	
	2ª PCR	Direto 5' AAGTCTGTGACCGCCTGAAG 3'	
		Reverso 5' TAATACGACTCACTATAGGGAG ACGTGGCACTTACAGGTTGTT 3'	
<i>Gdf5</i>	1ª PCR	Direto 5'CGAAGAAGACTAAAGAGCCT 3'	426 pb
Gg		Reverso 5' TTGGTGTGTCGGTGATACTG 3'	

	2ª PCR	Direto 5' CGAAGAAGACTAAAGAGCCT 3'	
		Reverso 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGATTGGTGTGTC</u> CGTGATACTG 3'	
<i>MyoG</i>	1ª PCR	Direto 5' CGTTTCCTGAGCGTCCCGAG 3'	497 pb
<i>Gg</i>		Reverso 5' GCGGTCCTCTGCCTGGTCAT 3'	
	2ª PCR	Direto 5' CGTTTCCTGAGCGTCCCGAG 3'	
		Reverso 5' <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> CGGTCCTCTGCCTGGTCAT 3'	

4.3.2 Procedimento para embriões inteiros

Os embriões previamente armazenados em metanol 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 tratados três vezes por 20 min com um mix de detergentes (Igepal 1%, SDS 1%, Deoxicolato 0,5%, Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 1mM pH8,0 e NaCl 150mM). Essas lavagens são fundamentais, pois permitem o acesso da ribossonda ao RNAm no interior de cada célula no momento da hibridação, sem que o embrião tenha sua integridade danificada. A ação do mix de detergentes foi interrompida lavando-se os embriões duas vezes em PBT durante 5 min à temperatura ambiente. Após esse período, os embriões foram refixados em solução de PFA 4% por 20 min e lavados três vezes em PBT por 5 min à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, os embriões refixados foram incubados em tampão de Pré-Hibridação (formamida 50%, SSC 5X pH 4,5, 50 µg/mL de tRNA de levedura, SDS 1% e 50 µg/mL de heparina) durante 2 horas a 70°C. A hibridação realizou-se em Tampão de Hibridação (tampão de Pré-Hibridação contendo 1µg/mL da ribossonda), durante pelo menos 16 horas a 70°C.

No dia seguinte, os embriões foram lavados por quatro vezes durante 30 min em Solução X (formamida 50%, SSC 2X pH 4,5 e SDS 1%) pré-aquecida a 70 °C. Após o tratamento com Solução X, os embriões foram lavados por 10 min em Solução X 50% diluída em MABT previamente aquecida a 70 °C. Após esse período os embriões foram lavados rapidamente por três vezes 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. Após essa etapa, os embriões foram pré-bloqueados em reagente de bloqueio Boehringer Mannheim (BBR) a 2% em tampão MABT durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões continuaram a ser pré-bloqueados em uma solução de alta concentração protéica (BBR 2%, soro de ovelha inativado 10% em tampão MABT). A etapa de pré-bloqueio 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 2% de BBR 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 16 horas a 4 °C. No dia seguinte, os embriões foram lavados em tampão MABT (oito lavagens de 1 hora) à temperatura ambiente, e por mais pelo menos 16 horas a 4°C para completa eliminação de marcação inespecífica pela fosfatase alcalina.

Antes de começar a revelação do sinal, os embriões foram lavados quatro vezes por 10 min em solução tampão NTMT (NaCl 100mM, Tris 100mM pH 9,5, MgCl₂ 50mM, Tween-20 0,1%, Levamisole 2mM) à temperatura ambiente. Após essas lavagens, os embriões foram tratados com Tampão NTMT juntamente ao substrato para fosfatase alcalina, NBT/BCIP (18.75 mg/mL de NBT, 9.4 mg/mL de BCIP), protegidos da luz, a fim de detectar a ação da fosfatase alcalina até a reação atingir a intensidade desejada. Para interromper a reação, os embriões foram lavados em PBT 1X, fixados em PFA 4% a 4°C por pelo menos 20 min. Após a fixação os embriões foram lavados em PBS 1X, diafanizados em série crescente de glicerol em PBT (25%, 50% e 80%) e armazenados em glicerol 80%.

4.3.3 Cortes dos embriões em vibrátomo

Para maior detalhamento do padrão de expressão, algumas peças foram incluídas em gelatina 20%, fixadas em PFA 4% *overnight* e cortadas em vibrátomo (OTS-3000; Electron Microscopy Sciences) com aproximadamente 50 µm de espessura.

4.3.4 Procedimentos para cortes histológicos

Os MP de embriões de camundongo (TS23) e galinha (HH30) foram dissecados após a coleta, fixados *overnight* em PFA 4%, desidratados e incluídos em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo rotativo (Leica RM2145) com 8 µm de espessura, os quais foram coletados em lâminas adesivas (Starfrost). As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol seguidos de uma série etanólica decrescente (100-50%) e lavadas em PBS. Em seguida deixou-se as lâminas em solução de digestão (0,5 µL ProteinaseK/mL PBS) durante três e seis min para lâminas de embriões de galinha e camundongo respectivamente. Após, as lâminas foram incubadas por 10 min a 37 °C em solução de glicina 0,2% em PBS. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram refixadas em PFA 4% por 5 min e lavadas em PBS. Logo após, foram adicionados 300 µL de solução de pré-hibridação por lâmina, as quais foram cobertas com parafilme e colocadas em câmara úmida a 65 °C. Posteriormente, adicionou-se a solução de hibridação e as lâminas foram deixadas *overnight* em câmara úmida a 65 °C. Na manhã seguinte foram realizadas duas lavagens com tampão SSC 1x por 15 min a 65 °C e duas lavagens com solução X por 15 min a 65 °C. Terminadas as lavagens pós-hibridação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBT e quatro com MABT, tendo cada lavagem duração de 5 min à temperatura ambiente. Após as várias lavagens com MABT, as lâminas foram incubadas com BBR/MABT 2% por uma hora. A imunodeteção foi realizada no escuro, em câmara úmida *overnight* com anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:2000 na solução BBR/MABT 5%. Na manhã seguinte as lâminas foram lavadas quatro vezes em MABT, duas vezes em NTMT e só então foram incubadas no escuro com solução de revelação (2,5 µL NBT/BCIP por mL de NTMT). A coloração surgiu dentro de dois ou três dias e foi interrompida através de lavagens das lâminas em PBS 1x e posterior fixação em PFA 4% por 10 min. Após o término da coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas em meio de montagem e/ou glicerol 80%, analisadas e fotografadas.

4.3.5 Análise dos Embriões – Identificação do padrão de expressão

A análise dos embriões inteiros foi realizada em lupa estereoscópica Olympus SZX7 visando à identificação das estruturas/tecidos que apresentam transcritos para os genes

analisados. O registro fotográfico foi realizado através do software Image-Pro Plus 6, posicionando os embriões inteiros com o lado direito voltado para cima. A análise das lâminas foi realizada junto ao fotomicroscópio Nikon Eclipse E800. As fotomicrografias foram organizadas em pranchas para facilitar a compreensão dos padrões de expressão dos genes analisados.

Resultados



5. Resultados

Durante este projeto de mestrado foram realizadas hibridações *in situ* de embriões inteiros, bem como em cortes histológicos, visando estabelecer o padrão de expressão dos genes *Dpr*, como um pré-requisito para estudos futuros visando elucidar o papel desempenhado por esses genes durante o desenvolvimento nestes organismos.

5.1 Análise do padrão de expressão dos genes *Dpr* durante a ontogênese de embriões de camundongo

Ensaio de HIS foram realizados ao longo da ontogênese de embriões de camundongo com a finalidade de estabelecer temporal e espacialmente o padrão de expressão dos genes *Dpr*. Uma vez que a expressão de todos os três genes *Dpr* já havia sido estabelecida para embriões de camundongo jovens (Hunter *et al.* 2005, Fisher *et al.* 2006 e Su *et al.*, 2007), decidimos trabalhar com estádios mais avançados do desenvolvimento: TS19 a TS22 (Figura 10). A seguir, será feita uma descrição geral do padrão de expressão dos três genes *Dpr* com base em nossos ensaios de HIS em embriões inteiros. Note, contudo, que outros sítios de expressão, em adição aos mencionados abaixo, podem existir. Uma descrição mais aprofundada irá requerer, futuramente, o corte em vibrátomo dos espécimes estudados.

A sonda específica para o gene *Dpr1* detectou forte expressão em todo o embrião durante o estágio TS19, sendo os sítios de expressão mais evidentes o encéfalo e medula espinhal em desenvolvimento, os somitos, os brotos dos membros e o broto da cauda (Fig. 10 A). No estágio subsequente (TS20) a expressão já não é tão forte quanto no estágio anterior. No entanto, pode ser observada na porção hipaxial dos somitos caudais, no encéfalo, nos brotos dos membros, cauda e tubérculo genital (não mostrado) (Fig. 10 D). Em embriões TS21, a expressão de *Dpr1* é evidente nos somitos da cauda, no tubérculo genital, nos membros, no focinho e na hérnia umbilical fisiológica (Fig. 10 G). Embriões TS22 possuem expressão de *Dpr1* nos membros, encéfalo, cauda, hérnia umbilical fisiológica e no focinho (Fig. 10 J).

Transcritos *Dpr2* foram identificados nos somitos, encéfalo, mesênquima dos membros e broto da cauda durante o estágio TS19 (Fig. 10 B). No estágio subsequente (TS20) a expressão de *Dpr2* é observada fracamente nos somitos da cauda, nos membros, no focinho e na hérnia umbilical fisiológica (Fig. 10 E). Transcritos *Dpr2* podem ser observados nos membros, focinho, hérnia umbilical fisiológica, tubérculo genital e somitos da cauda durante o estágio TS21 (Fig. 10 H). Embriões TS22 possuem expressão de *Dpr2* nos membros, focinho, hérnia umbilical fisiológica e tubérculo genital (não mostrado) (Fig. 10 K).

A sonda específica para *Dpr3* identificou transcritos na porção hipaxial dos somitos, encéfalo, brotos dos membros e broto da cauda durante o estágio TS19 (Fig. 10 C). No estágio subsequente (TS20) *Dpr3* pode ser observado nos membros, tubérculo genital e, de maneira menos intensa, no focinho (Fig. 10 F). Embriões TS21 possuem transcritos *Dpr3* nos membros, somitos caudais, tubérculo genital e focinho (Fig. 10 I). Durante o estágio seguinte (TS22), a expressão de *Dpr3* é vista nos membros, somitos caudais, hérnia umbilical fisiológica, tubérculo genital, encéfalo, focinho e pavilhão auditivo (Fig. 10 L).

O controle negativo desses experimentos foi realizado com sonda senso para cada gene, que não produziu sinal detectável. Devido à expressão dinâmica e amplamente distribuída dos três genes *Dpr* durante o desenvolvimento embrionário de camundongo, optamos por investigar, com maior nível de detalhes, a expressão dos genes *Dpr* apenas durante a ontogênese dos membros.

5.2 Análise do padrão de expressão dos genes Dpr durante a ontogênese dos membros

5.2.1 Embriões de camundongo

Como as análises feitas por WISH mostraram que os membros constituíam um importante local de expressão dos genes *Dpr* e, considerando o fato de não haver, até o momento, descrição do padrão de expressão de tais genes durante a formação e o desenvolvimento dos membros de vertebrados, optamos por estudar, com maior nível de detalhes, a expressão dos genes *Dpr* nos membros de embriões de camundongo nos estádios TS18 a TS23 (Figura 11).

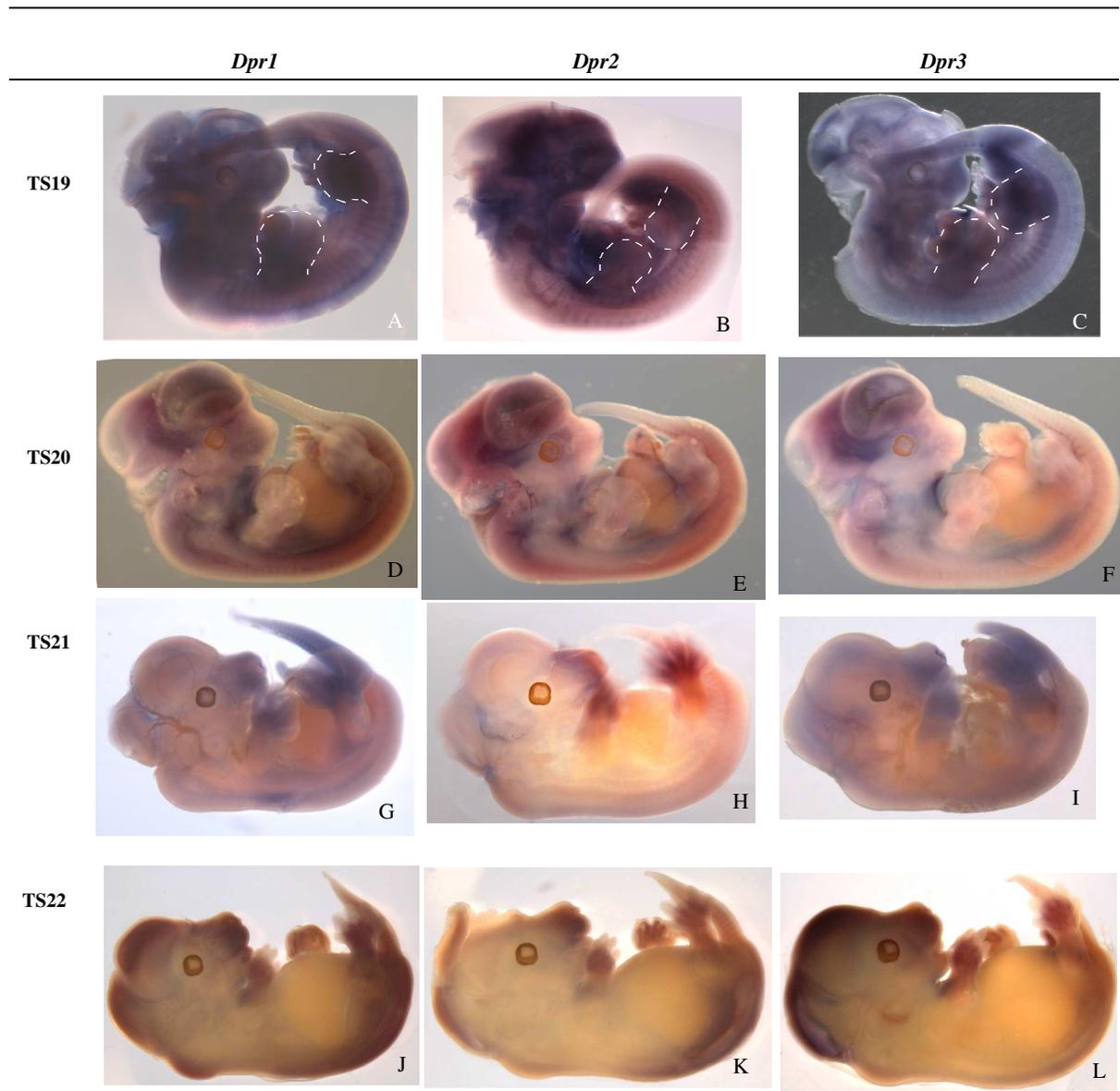


Figura 10: *Expressão de genes Dpr durante o desenvolvimento embrionário de camundongo nos estádios TS19 a TS22.* (A, D, G e J: sonda específica para *Dpr1*), (B, E, H e K: sonda específica para *Dpr2*) (C, F, I e L: sonda específica para *Dpr3*). A expressão dos genes *Dpr* é amplamente distribuída no estágio inicial analisado (TS19) e termina concentrada nos membros, focinho, tubérculo genital, hérnia umbilical fisiológica e extremidade da cauda. Os respectivos estádios de cada embrião se encontram ao lado esquerdo da figura. O ventre está posicionado para cima e a parte distal de cada embrião se encontra do lado direito.

Dpr1

No estágio TS18 a expressão de *Dpr1* apresenta-se forte no mesênquima proximal do membro (Fig. 11 A, A'). No próximo estágio (TS19), a expressão se mantém forte no mesênquima proximal e alcança o mesênquima medial sendo praticamente ausente na extremidade distal dos membros (Fig. 11 D, D'). Transcritos flanqueando as condensações cartilaginosas podem ser vistos no autópode dos membros de embriões no estágio (TS20) (Fig. 11 G, G'). Durante o estágio seguinte (TS21), pode-se observar expressão no zeugópode e autópode em desenvolvimento. Neste último, a expressão se dá na região de formação dos ossos metacarpais, ao redor das áreas de formação dos dígitos e nos locais de desenvolvimento das articulações metacarpo/metatarso falangeanas (Fig. 11 J, J'). No estágio seguinte (TS22), a expressão concentra-se no mesênquima do autópode (Fig. 11 M, M'). No último estágio analisado (TS23), a expressão é bem delimitada no autópode: ao redor das articulações metacarpo/metatarso falangeanas e iniciando na articulação interfalangeana (Fig. 11 P, P').

Dpr2

Membros de embriões TS18 possuem forte expressão de *Dpr2* no mesênquima proximal e medial (Fig. 11 B, B'). No próximo estágio (TS19) a expressão se mantém no mesênquima proximal e medial, porém, evita a parte distal (Fig. 11 E, E'). Transcritos *Dpr2* são observados no estilópode, zeugópode e raios digitais nos membros de embriões TS20 (Fig. 11. H, H'). No estágio seguinte (TS21), os membros possuem forte expressão no estilópode, zeugópode e autópode, neste último mais especificamente na região de formação dos ossos metacarpais (Fig. 11 K, K'). No próximo estágio (TS22) há forte expressão no autópode, mais especificamente na região de desenvolvimento dos ossos metacarpais e metatarsais (Fig. 11 N, N'). Embriões no último estágio analisado (TS23) apresentam forte expressão de *Dpr2* no autópode, no entanto, ao contrário da marcação bem delimitada observada para *Dpr1* a marcação de *Dpr2* é bastante difusa (Fig. 11 Q, Q').

Dpr3

A sonda específica para *Dpr3* identificou transcritos em todo o mesênquima do membro (proximal, medial e distal) de embriões TS18 e TS19 (Fig. 11 C, C', F, F'). Membros de embriões TS20 possuem marcação em seus três compartimentos: estilópode,

zeugópode e autópole sendo que, neste último, a expressão se dá nos raios digitais (áreas de condensação do mesênquima para formação dos dígitos) (Fig. 11 I, Γ). Transcritos *Dpr3* são observados no autópole, ao redor das condensações de cartilagem durante o estágio TS21 (Fig. 11 L, L'). Somente neste estágio, transcritos *Dpr3* foram encontrados nas regiões de desenvolvimento das articulações metatarsofalangeanas. Embriões TS22 possuem fraca expressão no autópole que se concentra na região de formação dos ossos metacarpais e metatarsais (Fig. 11 O, O'). No último estágio analisado (TS23), há forte expressão no autópole dos MA e MP. Neste estágio, para os MP, é possível ver expressão de *Dpr3* ao redor das condensações cartilaginosas que darão origem aos elementos ósseos dos dígitos (Fig. 11 R, R').

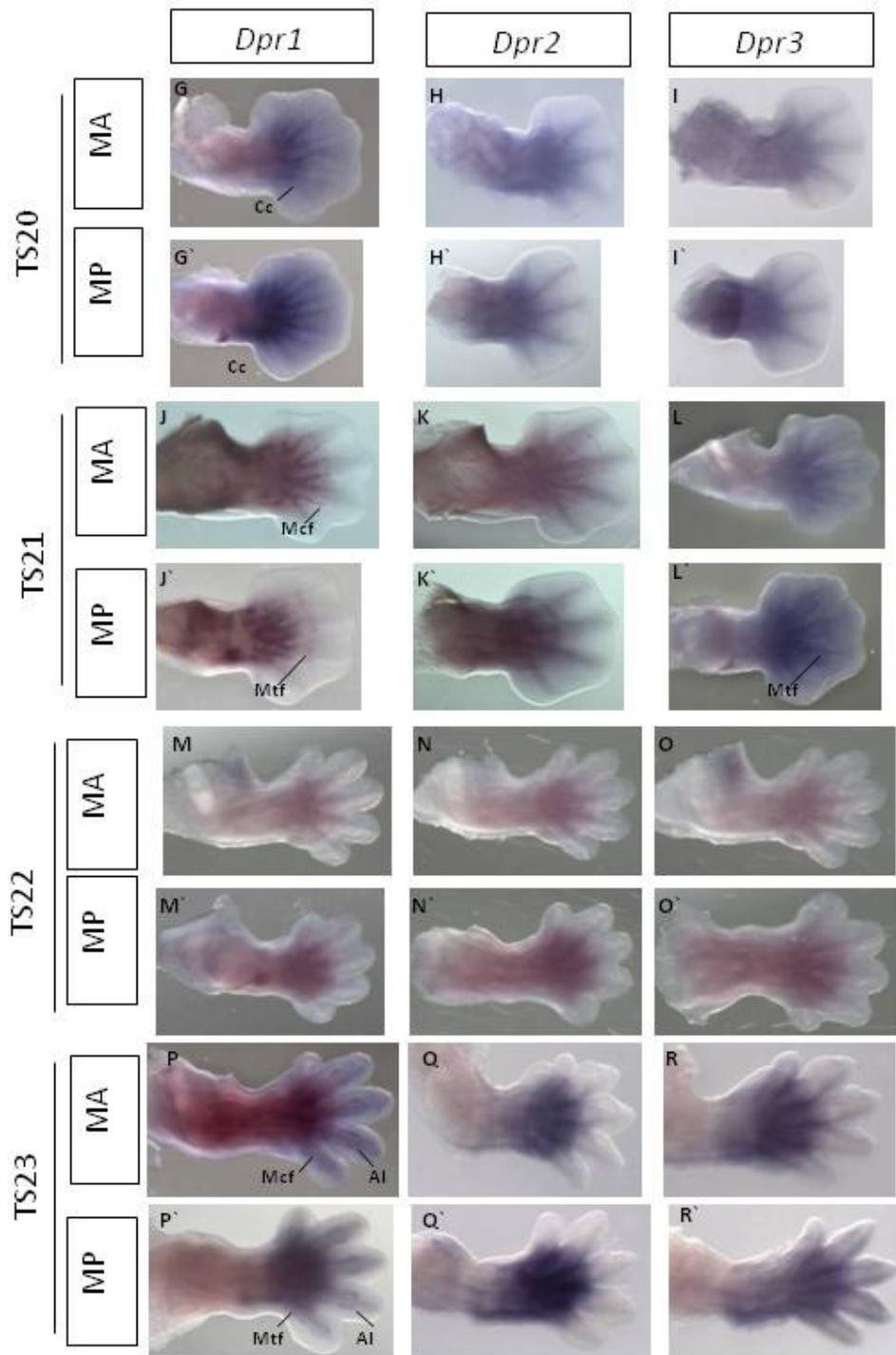


Figura 11: **Padrão de expressão dos genes *Dpr* em MA e MP de camundongo nos estádios TS18 a TS23.** Nos primeiros estádios do desenvolvimento a expressão está localizada principalmente no mesênquima dos membros. Na medida em que os membros se desenvolvem, possuem expressão principalmente nas articulações Mcf, Mtf e AI (*Dpr1*) e ao redor dos dígitos em desenvolvimento (*Dpr3*). Vista dorsal, a parte distal dos membros está posicionada à direita de cada painel. Cc: condensações cartilaginosas, AI: articulações interfalangeanas, Mtf: metatarsofalangeanas, Mcf: metacarpofalangeanas.

Ensaio de HIS em cortes de parafina foram realizados em MP de embriões de camundongo no estágio TS23 para elucidar a expressão dos genes *Dpr1* e *Dpr3* no contexto do desenvolvimento das articulações e dígitos respectivamente (Figura 12). Como resultado, foi possível observar que, neste estágio, os genes *Dpr* possuem padrões de expressão distintos. Transcritos *Dpr1* são vistos nas articulações metatarsofalangeanas e interfalangeanas (Fig. 12 A, a). *Dpr3* possui expressão ao redor das regiões de condensação de cartilagem hialina e ao redor dos elementos cartilagosos do tarso (Fig. 12 B, b).

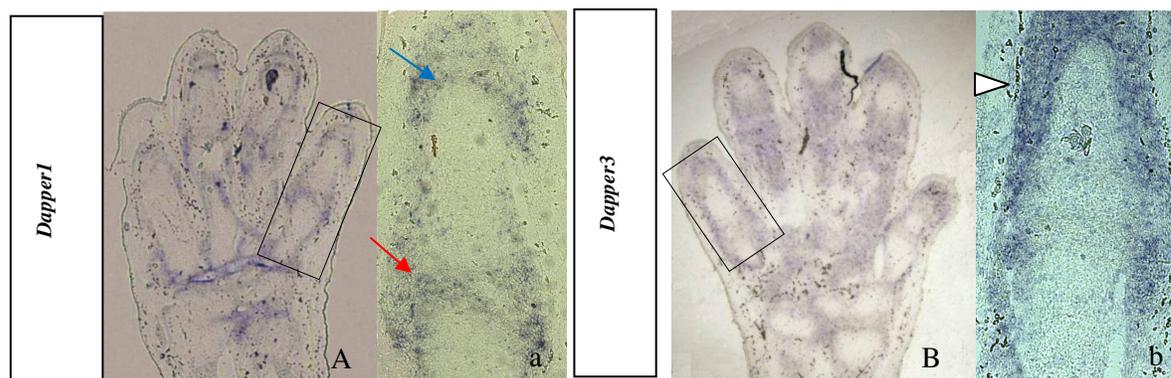


Figura 12: **Padrão de expressão dos genes *Dpr* em MP de camundongo no estágio TS23.** HIS em cortes longitudinais de parafina (A, B) e seus respectivos detalhes (a, b). As imagens ampliadas estão emolduradas em preto na imagem original. Expressão de *Dpr1* pode ser vista no autópode (A), nas Mtfs (seta vermelha) e AI (seta azul) (a). Marcação para *Dpr3* é detectada ao redor dos elementos cartilagosos do tarso e dos raios digitais (cabeça de seta) (B,b).

Além disso, analisamos o padrão de expressão de vários marcadores moleculares para diferentes tecidos/estruturas dos membros de embriões de camundongo no estágio TS23 para elucidar o padrão de expressão dos genes *Dpr*. Os marcadores utilizados foram *Miogenina* (*Myog*), marcador para músculo; *Gdf5*, marcador para articulação e *Sox9*, marcador para células condroprogenitoras. Como resultado (Figura 13), observamos que transcritos *Gdf5* são expressos nas articulações metatarsofalangeanas (Mtf) e entre as falanges proximal (FP) e medial (FM) (Fig. 13 A, a). Expressão de *Sox9* é vista nos locais de ossificação endocondral do membro (Fig. 13 C, c) e, transcritos *Myog* encontram-se nos músculos interósseos e lumbricais (Fig 13 B, b). A comparação do padrão de expressão de *Dpr1* com tais marcadores deixa claro que há sobreposição parcial com *Gdf5*, o qual possui um papel chave durante a diferenciação de condrócitos e formação de articulações (Merino *et al.*, 1999). No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação com o padrão de

Myog. Por outro lado, o local de expressão de *Sox9* no núcleo cartilaginoso dos dígitos em formação parece situar-se internamente ao domínio de expressão *Dpr1*, que parece ser expresso nas articulações (Fig. 13 D, d).

Em conjunto, estes dados sugerem um possível envolvimento de *Dpr1* na formação de articulações embora não possa ser excluída a sua participação na formação de outras estruturas/tecidos dos membros. Portanto, análises adicionais serão necessárias para que possam ser feitas conclusões sobre o papel exato de *Dpr1* no desenvolvimento dos membros de camundongo.

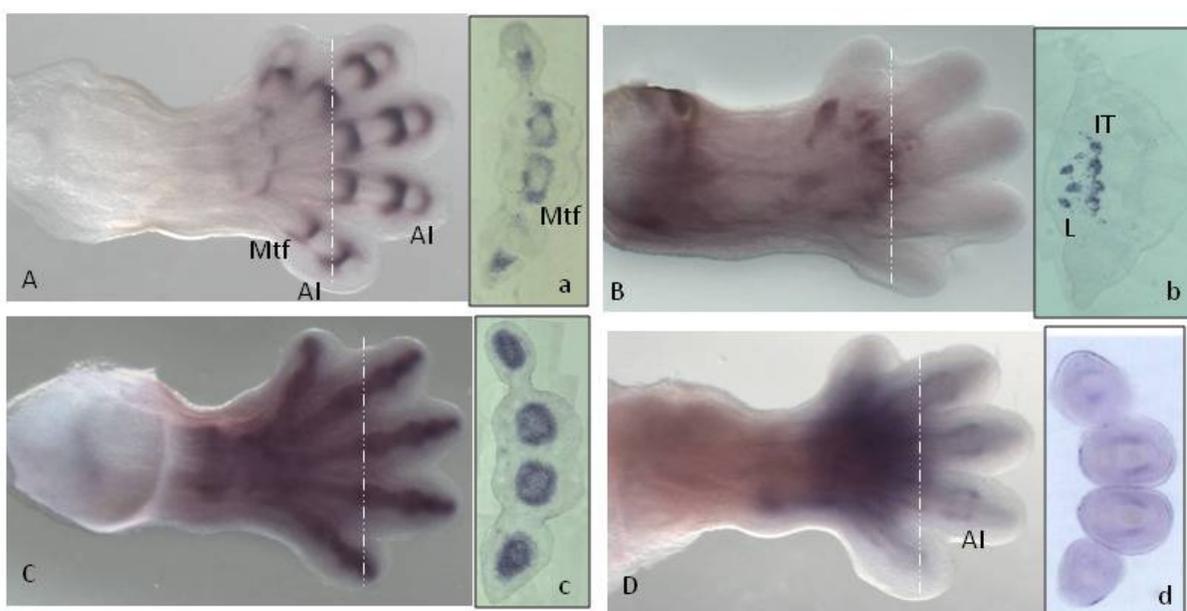


Figura 13: Comparação do padrão de expressão de *Dpr1* com *Gdf5*, *Sox9* e *Myog* em MP de embrião camundongo no estágio TS23. WISH com vista dorsal (A, B, C e D), a parte distal dos membros está posicionada à direita. HIS em cortes transversais de parafina (a, b, c) e corte transversal em vibrátomo (d). Os planos de corte estão indicados por linhas brancas pontilhadas na figura original. A,a: o sinal *Gdf5* pode ser visto nas articulações Mtf e AI. B,b: *Myog* é expresso nos músculos interósseos (IT) e lumbricais (L) C,c: transcritos *Sox9* são vistos nos locais de ossificação endocondral e núcleo cartilaginoso do dígito. D,d: a expressão de *Dpr1* é forte na região dos metatarsos e ao redor das AI e Mtf.

5.2.2 Embriões de galinha

Ensaio de HIS foram realizados ao longo da ontogênese dos membros em embriões de galinha nos estádios HH24 a HH34 para determinar temporal e espacialmente o padrão de expressão dos genes *Dpr1* e *Dpr2* (Figura 14).

No estágio HH24, a expressão de *Dpr1* é forte no mesênquima central do broto do membro, o qual irá sofrer condensação para formar os elementos esqueléticos do membro (Fig. 14 A, A'). Nos membros de embriões no estágio HH25 a expressão de *Dpr1* se expande distalmente alcançando o autópode (Fig. 14 D, D'). No próximo estágio (HH28), a expressão de *Dpr1* pode ser vista no tecido conjuntivo ao redor das condensações condrogênicas nos três compartimentos do membro, provavelmente em um domínio que inclui as células do pericôndrio (Fig. 14 G, G'). Membros de embriões HH30 possuem transcritos *Dpr1* no pericôndrio, ao redor dos dígitos e nas articulações do carpo e tarso (Fig. 14 J, J'). No estágio HH32, os membros possuem transcritos *Dpr1* localizados principalmente nas articulações (Fig. 14 M, M'). Finalmente, em HH34 *Dpr1* é expresso no autópode: na região dos metacarpos, metatarsos e das articulações interfalangeanas (Fig. 14 P, P').

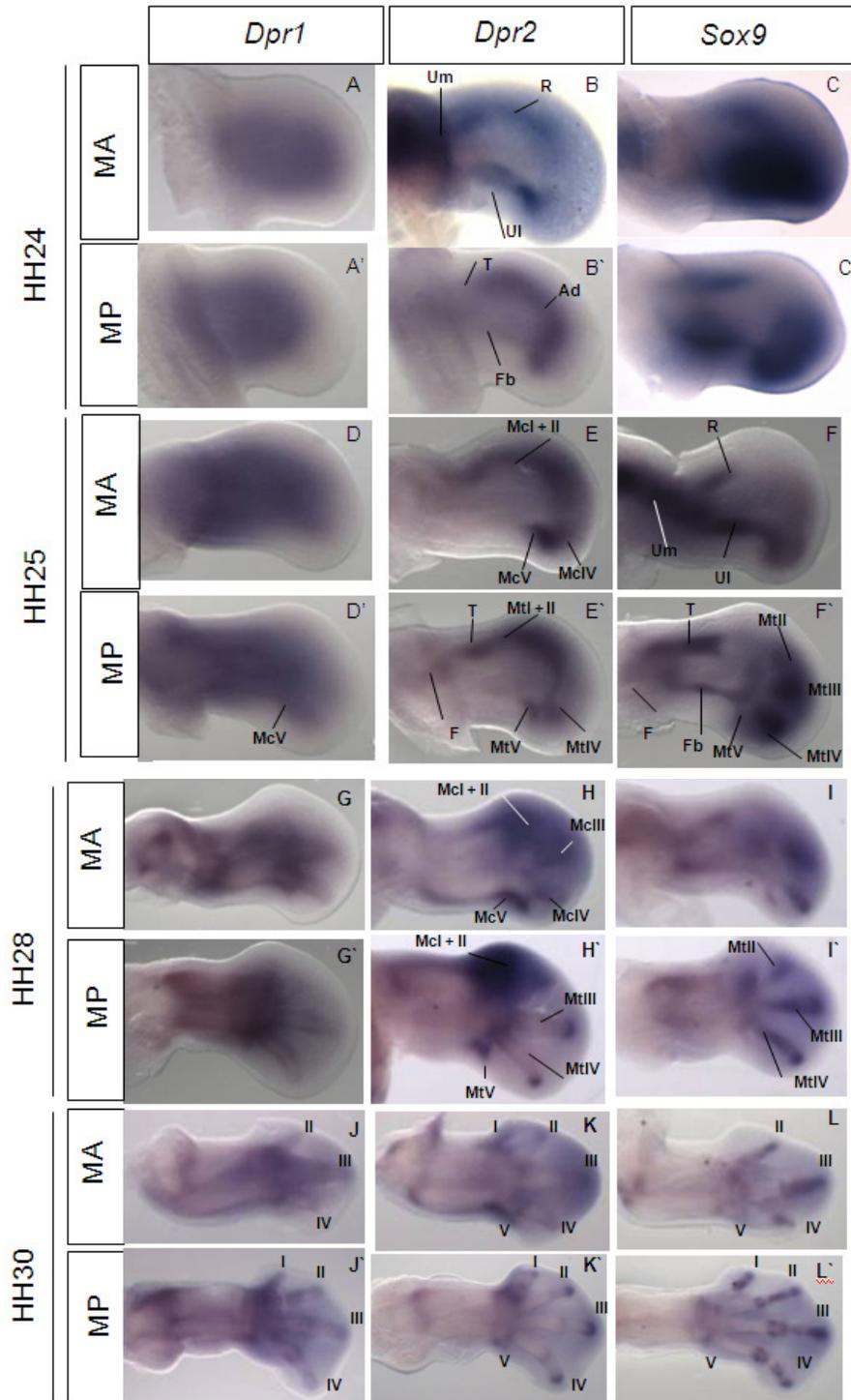
MA de embriões no estágio HH24 mostram expressão de *Dpr2* nos locais de condensação do mesênquima do membro que irão formar os elementos esqueléticos do zeugópode e autópode, enquanto nos MP o domínio de expressão deste gene assume a forma de gancho o qual pré-figura o esqueleto do estilópode, zeugópode e autópode (Fig. 14 B, B'). No estágio HH25, os transcritos *Dpr2* concentram-se nos elementos pré-cartilagosos em forma de gancho mencionado anteriormente. Além disso, no autópode podem ser vistas as condensações para formação dos ossos metacarpais III, IV e V (Fig. 14 E, E'). Anterior ao metacarpo III, outro domínio de expressão pode ser observado na região presumida precursora dos metacarpos I e II conforme previamente descrito para *Sox9* (Koyama *et al.*, 1995). Expressão fraca de transcritos *Dpr2* pode ser vista ao redor dos elementos ósseos do zeugópode (rádio/ulna e fíbula/tíbia) no estágio HH28. Proeminente expressão de *Dpr2* é vista nas regiões que englobam a região precursora dos ossos metacarpos I e II, assim como na extremidade dos dígitos III, IV e V (Fig. 14 H, H'). Interessantemente, essa expressão localiza-se nos locais de condensação do mesênquima para formação dos primórdios dígitos vestigiais I e V de aves. De acordo com Welten *et al.*,

(2005) estes dígitos não chegam a atingir o estágio de pré-cartilagem, o que resulta no padrão típico dos dígitos encontrados nos autópodas de aves, nos quais os dígitos I e V estão ausentes nas asas e o dígito V não é formado nos pés. Distribuição intensa de transcritos nas articulações interfalangeanas e também na extremidade dos dígitos é vista no estágio HH30 (Fig. 14 K, K'). Ainda neste estágio é evidente a expressão de *Dpr2* nos locais de desenvolvimento dos dígitos vestigiais I e V no MA e V no MP. Este padrão de expressão se assemelha aquele descrito por Welten *et al.*, (2005) para *Sox9*. Nos últimos estádios analisados (HH32 e 34), chama atenção à presença marcante de transcritos *Dpr2* nas regiões de articulação interfalangeana e na extremidade dos dígitos (Fig. 14 N, N', Q, Q').

Após criteriosa análise dos resultados descritos acima suspeitamos que o padrão de expressão de *Dpr1* e *Dpr2* nos membros de embriões de galinha nos estádios HH24 a HH34 estivesse relacionado com o desenvolvimento de estruturas cartilagineas do membro. Visto que *Sox9* é um marcador estritamente relacionado com o desenvolvimento de cartilagem, realizamos HIS para o marcador *Sox9* nos mesmos estádios que haviam sido realizadas para *Dpr1* e 2 e comparamos os resultados.

O padrão de expressão de *Sox9* nos membros de galinha progride de uma maneira segmentada e está estritamente relacionado com o mesênquima pré-condrogênico. No primeiro estágio analisado (HH24), transcritos *Sox9* são encontrados em três domínios distintos no MP: dois destes são longitudinais e marcam a posição das cartilagens do zeugópode, precursoras da tíbia (T) e fíbula (Fb), enquanto o terceiro domínio em forma de arco, o arco digital (Ad) marca a posição das cartilagens do autópodas, que irão gerar os ossos dos pés de galinha. Para o MA apenas os domínios de expressão longitudinais podem ser vistos, que correspondem aos elementos precursores do rádio (R) e da ulna (Ul) (Fig. 14 C', C). Durante o próximo estágio analisado (HH25), continuamos observando, no MP, o domínio de expressão do estilópode e o domínio digital, no entanto, estes estão mais desenvolvidos e o domínio digital deixou de ser uma faixa contínua. Para o MA observamos um domínio de expressão com forma de Y com um arco incompleto em sua extremidade (Fig. 14 F, F'). Para membros de embriões no estágio HH28 é possível identificar o domínio digital como zonas descontínuas de grande expressão (Fig. 14 I, I').

Presença de transcritos apenas na extremidade dos dígitos e nas regiões de articulação dos membros são características dos estádios HH30 e HH32 (Fig. 14 L, L', O, O'). Finalmente, no último estádio analisado, a expressão de *Sox9* é bastante evidente na extremidade dos dígitos e regiões de articulação (R, R').



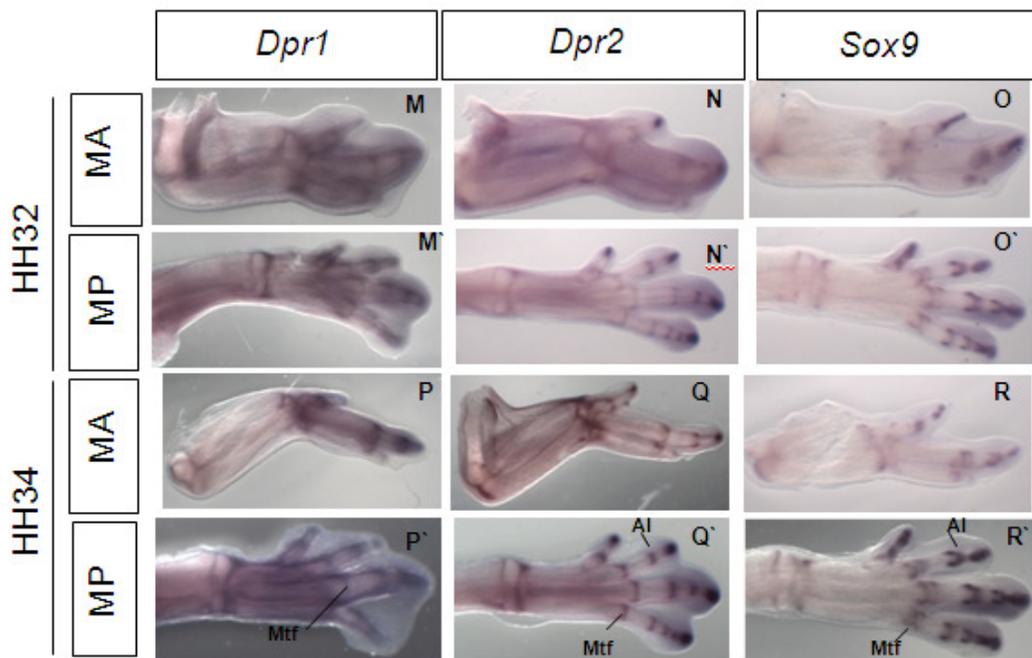


Figura 14: Padrão de expressão dos genes *Dpr1* e *Dpr2* em membros de embriões de galinha nos estádios HH24 a HH34. Vista dorsal, a parte distal dos membros está posicionada à direita. As sondas utilizadas estão indicadas no topo da figura e os respectivos estádios estão indicados a esquerda. Abreviações: Mc: metacarpo, Mtf: metatarsofalangeana, AI: articulação interfalangeana, Um: úmero, R: rádio, Ul: ulna, Ad: arco digital, T: tibia, Fb: fíbula, F: fêmur.

Os domínios de expressão de *Dpr1* e *Dpr2* possuem similaridade com os de *Sox9*, com destaque para a extremidade dos dígitos e as regiões de formação de articulação. HIS em cortes de parafina foram realizadas em MP de embriões de galinha no estágio HH30 para confirmar o padrão de expressão de *Dpr1* e compará-lo com os marcadores *Sox9* e *Scx* (Figura 15). Como resultado, observamos que *Dpr1* é expresso ao redor das regiões de condensação de cartilagem hialina (pericôndrio) e ao redor dos tendões flexores em desenvolvimento (Fig. 15 A, a, a'). Nenhuma expressão de *Dpr1* pode ser vista nas regiões de cartilagem hialina, ao contrário do que é observado para *Sox9* que se expressa no núcleo cartilaginoso dos dígitos em formação (Fig. 15 B, b). A sonda específica para *Scx* identificou transcritos nos tendões flexores e extensores do membro (Fig. 15 C).

Estes dados sugerem um possível envolvimento de *Dpr1* na formação de articulações e tendões embora não possa ser excluída a sua participação na formação de

outras estruturas/tecidos dos membros. Portanto, análises adicionais serão necessárias para que possam ser feitas conclusões sobre o papel exato de *Dpr1* no desenvolvimento dos membros de galinha. A HIS em corte de parafina para *Dpr2* não mostrou resultados que permitissem comparação com os resultados descritos abaixo.

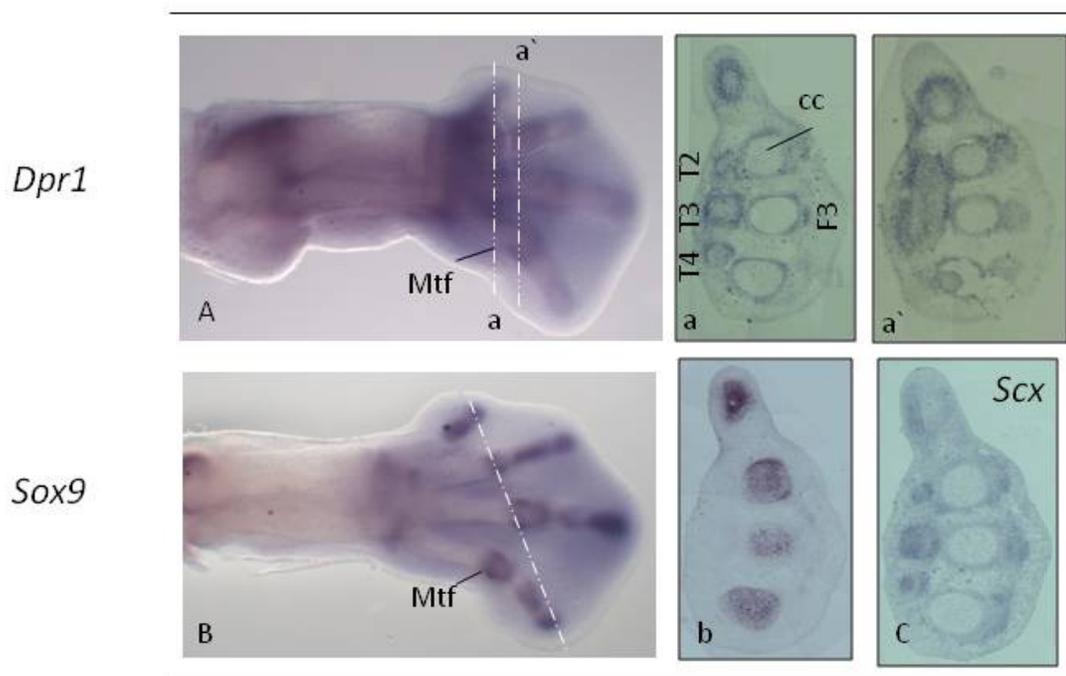


Figura 15: **Comparação do padrão de expressão de *Dpr1* com *Sox9* e *Scx* em MP de embrião de galinha no estágio HH30.** WISH com vista dorsal, a parte distal dos membros está posicionada à direita de cada painel (A, B). ISH em cortes transversais de parafina (a, a', b e C). Os planos de corte estão indicados por linhas brancas pontilhadas na figura original. A, a, a': transcritos *Dpr1* estão localizados ao redor das Cc, ao redor dos tendões flexores relacionados aos dígitos 2 (T2), 3 (T3) e quatro (T4), no tendão extensor relacionado ao dígito 3 (F3), ao redor dos tendões extensores e flexores e nas Mtf. B: a expressão de *Sox9* é vista nas Mtf e no blastema dos dígitos. C: transcritos *Scx* são vistos nos tendões extensores e flexores. As sondas utilizadas estão indicadas no topo da figura.

Os *primers* confeccionados para a produção de sonda específica para os genes *Wnt14* de camundongo e galinha e *Scx* de camundongo não são específicos e, conseqüentemente não amplificaram o fragmento durante a primeira PCR. Devido à falta de tempo hábil, não foi possível estabelecer comparação entre a expressão dos genes *Dpr* com estes marcadores.

Discussão



6. Discussão

4.1 Os genes *Dpr* são expressos em tecidos/estruturas onde ocorre intensa sinalização Wnt e TGF- β

O desenvolvimento embrionário é controlado por uma série de processos básicos, que incluem a regulação do crescimento, da polaridade celular, das taxas de apoptose e da diferenciação celular. Os processos do desenvolvimento necessitam de uma interação recíproca entre epitélio e o mesênquima adjacente. Tal interação é frequentemente mediada pelas vias de sinalização Wnt, Fgf e TGF- β . Perturbações nestes processos causam anomalias no desenvolvimento embrionário. Parte destas anomalias é ocasionada por falhas no *cross-talk* (conversa cruzada) entre as principais vias de sinalização (Miyagawa *et al.*, 2009). Até o momento, não entendemos com clareza o funcionamento do *cross-talk* entre as vias de sinalização durante o desenvolvimento embrionário.

As proteínas Dpr foram identificadas como moduladores das vias de sinalização Wnt e TGF- β . Neste contexto, ainda não há consenso sobre a modulação positiva ou negativa de *Dpr1* e *Dpr3* durante a sinalização Wnt. Com relação a *Dpr2*, sabemos que este regula positivamente a sinalização Wnt não canônica e negativamente a sinalização TGF- β (Brott e Sokol, 2005a). Apesar de sua importância para o desenvolvimento embrionário dos vertebrados e para a manutenção da homeostase na vida pós-natal, pouco se sabe sobre o padrão de expressão e a importância dos genes da família *Dpr* durante a ontogênese tardia de embriões de camundongo e sobre o padrão de expressão dos genes *Dpr* durante o desenvolvimento dos membros em embriões de galinha e camundongo. Com o intuito de contribuir para o entendimento do papel biológico dos genes *Dpr* durante os processos do desenvolvimento, nossa abordagem foi estabelecer os domínios chave de expressão de tais genes ao longo do desenvolvimento embrionário tardio de camundongo e ao longo da ontogênese dos membros em embriões de camundongo e galinha.

Como resultado, encontramos sobreposição dos domínios de expressão para os genes *Dpr* durante a ontogênese de embriões de camundongo nos estádios analisados. Nossos experimentos revelaram seis domínios-chave de expressão desses genes durante a embriogênese: somitos, tubérculo genital, membros, focinho, encéfalo e hérnia umbilical

fisiológica. Nos somitos, a expressão é mantida apenas caudalmente à medida que os embriões se desenvolvem. Tendo em vista que os genes *Dpr* tiveram origem comum a partir de um único gene ancestral antes dos dois eventos de duplicação genômica completos ocorridos na linhagem dos vertebrados (Alvares *et al.*, 2009), é possível que *Dpr1*, *Dpr2* e *Dpr3* de camundongo possuam, também, funções moleculares comuns durante o desenvolvimento embrionário de camundongo, e por isso, compartilhem os mesmos locais de expressão.

Os domínios de expressão dos genes *Dpr* em embriões de camundongo são sítios conhecidos de sinalização Wnt e TGF- β . Por exemplo, a sinalização Wnt é responsável pelo controle da segmentação e padronização dos somitos (Bryson-Richardson e Currie, 2008; Buckingham e Montarras, 2008; Ozbudak e Pourquie, 2008). Ademais, os sinais Wnt são importantes para o desenvolvimento dos membros (Towers *et al.*, 2009). Igualmente, a sinalização Wnt/ β -cat desempenha papel chave na formação do tubérculo genital induzindo fatores múltiplos como Fgf-8 o qual também é expresso nos membros. De maneira semelhante, sinais TGF- β são cruciais para o desenvolvimento dos músculos derivados dos somitos, sendo a miostatina um dos membros mais estudados desta família, devido ao seu papel no controle do crescimento dos músculos esqueléticos (McPherron *et al.* 1997). No contexto dos membros, as proteínas TGF- β s, as activinas e as BMPs, todos componentes da superfamília TGF- β , são expressos em múltiplos estágios do desenvolvimento do membro, coordenando o processo de condrogênese, a especificação dos dígitos e o desenvolvimento dos tendões (Kawakami *et al.*, 2006). Finalmente, durante o desenvolvimento genital, o fator inibitório Mulleriano que é também uma proteína TGF- β , está envolvido na determinação sexual em mamíferos (Gilbert, 2003).

O tubérculo genital e os membros exibem similaridades em seu desenvolvimento, ambos passam por crescimento intenso antes da diferenciação de seus tecidos e, com isso, são estruturas representativas adequadas para analisar interações entre as vias de sinalização (Miyagawa *et al.*, 2009). Outra similaridade está no fato de que tanto nos membros como no tubérculo genital encontramos expressão de *Sox9*. Nos membros, *Sox9* está diretamente relacionado com condrogênese, e no tubérculo genital, com a determinação sexual (Laudet *et al.*, 1993; Pevny e Lovell-Badge, 1997; Southard-Smith *et*

al., 1998; Lefebvre *et al.*, 1998). Até o momento, nenhum trabalho havia mencionado o envolvimento dos genes *Dpr* no desenvolvimento do tubérculo genital. Novas abordagens serão necessárias para detalhar o padrão de expressão nessa estrutura e esclarecer a função dos genes *Dpr* no contexto do desenvolvimento da genitália externa em camundongos.

Transcritos *Dpr1* concentram-se nos somitos, na cauda, nos membros, focinho, tubérculo genital e hérnia umbilical fisiológica. Suriben *et al.*, (2009) observou malformações gastrointestinais, genitais e encurtamento na cauda em camundongos nocautes para *Dpr1* e sugeriu que tais anomalias são devidas a falhas nos movimentos morfogenéticos durante o desenvolvimento da linha primitiva em embriões jovens. Interessantemente, no trabalho mencionado acima, não foram encontradas anomalias durante o desenvolvimento da face nos animais mutantes para *Dpr1*, o que seria esperado frente a nossos resultados que apresentam forte expressão de transcritos *Dpr1* durante o desenvolvimento do focinho em embriões de camundongo. Uma explicação provável para este fato é a redundância genética dos genes *Dpr* que, conforme descrevemos são todos expressos durante o desenvolvimento do focinho, em sítios de expressão que se sobrepõem completamente. A função exata destes transcritos permanece por ser elucidada, talvez quando mutantes duplo ou triplos para os genes *mDpr* sejam desenvolvidos.

Ao contrário do observado para camundongos nocautes para o gene *Dpr1* que possuem defeitos congênitos severos e morrem logo após o nascimento, camundongos nocautes para *Dpr2* desenvolvem-se normalmente e chegam à vida adulta sem nenhum defeito morfológico e comportamental. A única característica diferente apresentada por esses animais é possuir reepitelização acelerada durante ferimentos cutâneos como resultado da resposta exacerbada dos queratinócitos à estimulação TGF- β (Meng *et al.*, 2008). De maneira semelhante ao exposto acima, nós podemos postular que a semelhança no padrão de expressão dos três genes *Dpr* durante o desenvolvimento tenha possibilitado que *Dpr1* e *Dpr3* efetuassem um mecanismo compensatório durante a ausência de *Dpr2* e, em razão disso, malformações não estejam presentes em camundongos nocautes para o gene *Dpr2*.

Durante nossos experimentos observamos que *Dpr3* é expresso nos somitos, focinho, encéfalo, tubérculo genital, hérnia umbilical fisiológica e membros. Dentre os três

membros da família *Dpr*, este é o gene que possui menor descrição de seu padrão de expressão e menor quantidade de dados na literatura. Sendo assim, nosso trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento sobre os domínios de expressão do gene *Dpr3*, tanto no contexto do desenvolvimento embrionário geral como no desenvolvimento dos membros. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que ocorre sobreposição dos domínios-chave de expressão para os genes *Dpr* nos estádios embrionários analisados (TS19 a TS22), o que sugere que os mesmos compartilhem funções durante a transdução de sinais.

4.2 Os genes *Dpr* parecem atuar na especificação condrogênica, no desenvolvimento dos elementos cartilaginosos, na formação de tendões e articulações

Nos últimos anos, progressos significativos têm sido conquistados e estão contribuindo para o entendimento da rede molecular que regula o desenvolvimento dos membros (Capdevila e Belmonte, 2001; Chen *et al.*, 2004; Kmita *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008). Inesperadamente, ao comparar o padrão de expressão dos genes *Dpr* durante a ontogênese dos membros em embriões de camundongo e galinha é possível notar que aves e mamíferos apresentam diferenças significativas nos seus domínios de expressão *Dpr*. Tal fato sugere que algumas das funções dos genes *Dpr* tenham divergido durante a evolução no contexto da ontogênese dos membros. Apenas nos estádios mais tardios do desenvolvimento (HH32-34 e TS23), é possível encontrar semelhanças entre o gene *Dpr1* de camundongo e os genes *Dprs* de galinha, os quais compartilham expressão nas articulações falangeanas e metacarpo/metatarso falangeanas.

Os genes *Dpr*, durante o desenvolvimento dos membros em embriões de galinha, parecem ter expressão relacionada ao desenvolvimento dos moldes de cartilagem, tendões e articulações. O desenvolvimento do esqueleto apendicular segue uma sequência altamente regulada de eventos que iniciam com a condensação de células precursoras esqueléticas e sua subsequente diferenciação em condrócitos (Kornak e Mundlos, 2003). A condrogênese, um processo obrigatório na formação endocondral do osso, tem início com o recrutamento

de células condrogênicas mesenquimais para condensação, seguida pela diferenciação destas em condrócitos, que irão produzir proteínas da matriz extracelular cartilagem-específica (MEC), incluindo colágeno tipo II e o proteoglicano agregan (Akiyama *et al.* 2002; Akiyama *et al.* 2004). Durante a formação dos elementos cartilagosos do esqueleto, *Dpr1* parece ser expresso principalmente no pericôndrio, ou seja, ao redor dos agregados de condrócitos durante o desenvolvimento dos membros em embriões de galinha. Estas células têm sido descritas como sendo responsáveis por sinalizarem para os condrócitos subjacentes e receberem sinais provenientes dos mesmos. Este mecanismo de indução recíproca permitiria definir com precisão que células irão formar condrócitos ou osteoblastos (Kronenberg, 2007). Em contraste, *Dpr2* é expresso nas fases iniciais da condrogênese, em células mesodérmicas precursoras começam a se agregar para formar os moldes de cartilagem. Interessantemente, em galinha o gene *Dpr2* parece ser um marcador para células condrogênicas tão ou mais precoce do que *Sox9*. Este fator transcricional regula diretamente o gene do colágeno tipo II (*Col2a1*), a principal proteína presente na matrix extracelular de cartilagem, sendo considerado um dos marcadores mais precoces de conversão das células mesodérmicas do botão do membro ao destino condrogênico (Bell *et al.*, 1997).

Os tendões, assim como a cartilagem presente no membro, são estruturas derivadas da placa mesodérmica lateral (Kardon, 1998). Apesar de possuírem origens embrionárias distintas, a morfogênese dos músculos e tendões ocorre em estreita associação. A morfogênese dos tendões é o aspecto menos entendido do desenvolvimento músculo-esquelético (Kardon, 1998). Até o momento, poucas proteínas foram relacionadas com o desenvolvimento de tendão em vertebrados: *Scx*, *Mohawk* (*Mkx*) e, recentemente, os fatores de transcrição *EGR* (Lejard *et al.*, 2010). Nossos resultados indicam que *Dpr1* pode ser um novo marcador para desenvolvimento embrionário de tendão.

O desenvolvimento das articulações sinoviais é foco de intensa pesquisa devido ao fato de que estas são essenciais para a função do esqueleto e qualidade de vida (Kayoama *et al.*, 2007). A primeira evidência clara do desenvolvimento das articulações é o aparecimento da interzona (Holder, 1977). A interzona consiste de células mesenquimais achatadas fortemente associadas que provêm uma demarcação clara dos elementos

cartilagenosos adjacentes. É evidente a marcação dos genes *Dprs* de galinha e de *Dpr1* de camundongo nas regiões de interzona que, posteriormente, darão origem às articulações metatarsais e interfalangeais. Estes resultados sugerem um papel específico dos genes *Dpr* durante o desenvolvimento das articulações em galinha e camundongo. Além dos genes *Dpr*, a via de sinalização Wnt e as moléculas BMP têm sido relacionadas com a ontogênese das articulações sinoviais (Hartmann e Tabin, 2001; Wolfman *et al.*, 1997).

Interessantemente, encontramos evidente expressão do gene *Dpr2* nos territórios de desenvolvimento dos primórdios dos dígitos vestigiais do MA e MP de galinha. Frente a isso, além deste gene estar envolvido com a morfogênese de elementos do membro (cartilagem e articulações), acreditamos que *Dpr2* possa estar envolvido com a padronização dos dígitos nos membros de embriões de galinha.

Os resultados das HIS para membros de embriões de camundongo mostram que os três genes *Dpr* possuem padrões de expressão distintos durante o desenvolvimento dos membros. *Dpr1* parece estar relacionado com o desenvolvimento de articulações enquanto que *Dpr2* possui expressão difusa nos três compartimentos (estilópode, zeugópode e autópole) ao longo do desenvolvimento do membro. *Dpr3*, assim como *Dpr2*, também possui expressão difusa, entretanto, durante o último estágio analisado, transcritos *Dpr3* parecem estar relacionados com o desenvolvimento dos dígitos nos MP.

Apesar de MA e MP dos vertebrados serem estruturas homólogas, sua morfologia é distinta, o que sugere que diferentes mecanismos estejam associados ao desenvolvimento de cada tipo de membro para proporcionar sua identidade. Os mecanismos de sinalização que proporcionam a morfologia membro-específica ainda permanecem desconhecidos (DeLaurier *et al.*, 2006). Os genes *Dpr* possuem expressão semelhante, porém não idêntica nos MA e MP no decorrer de todos os estádios analisados principalmente em galinha. Este fato sugere uma atuação dos genes *Dpr* que leva em conta a identidade do membro e não somente da espécie. Estudos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos que controlam a expressão destes genes em diferentes espécies ou em diferentes domínios de expressão.

Conclusão



7. Conclusão

Este trabalho determinou detalhadamente a expressão temporal e espacial de todos os genes da família *Dpr* em galinha e camundongo durante o desenvolvimento dos membros. Além disso, fornecemos a base para uma análise mais profunda sobre o papel dos genes *Dpr* durante o desenvolvimento dos membros e condrogênese. Em todos os estádios analisados, nossos dados sugerem que os genes *Dprs* contribuem para o desenvolvimento dos membros em embriões de camundongo e galinha, porém, ensaios futuros serão necessários para identificar especificamente os tipos celulares em que há expressão dos genes *Dpr*.

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

1. Transcritos *Dpr* são expressos em seis domínios chave (somitos, membros, focinho, tubérculo genital, cauda e hérnia umbilical fisiológica) durante o desenvolvimento embrionário de camundongo.
2. Nos membros de aves, os principais sítios de expressão do gene *Dpr1* são o mesênquima dos botões dos membros (HH24-25), o pericôndrio, tendões e articulações em desenvolvimento (HH28-32). Por sua vez, os domínios de expressão de *Dpr2* são as células precursoras condrogênicas dos botões dos membros (HH24-25), o mesênquima que coincide com o local de desenvolvimento dos dígitos vestigiais I e V, as extremidades dos dígitos em crescimento (HH28-30) e as articulações (HH32-34).
3. Nos membros de camundongo, os principais sítios de expressão do gene *Dpr1* são o mesênquima proximal do botão dos membros (TS18-19), o mesênquima no entorno dos elementos cartilagosos (TS20-23), as membranas interdigitais (TS20) e as articulações (TS21-23). Os sítios predominantes de expressão de *Dpr2* são o mesênquima proximal e medial do botão dos membros (TS18-19) e o mesênquima próximo aos locais de desenvolvimento dos elementos cartilagosos (TS20-23). Por fim, para *Dpr3* os domínios de expressão são o mesênquima do botão dos membros (TS18-19), o mesênquima que envolve os moldes de cartilagem (TS20-23) e as articulações (TS21).

Referências Bibliográficas



6. Referências bibliográficas

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. 1997. **Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.** *Embo. J.*, 16: 3797-804.

Adler, P. N., Lee, H. 2001, b. **Frizzled signaling and cell-cell interactions in planar polarity.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 635-40.

Akiyama, H., Chaboissier, C., Martin, J. F., Schedl, A., Crombrughe, B. 2002. **The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6.** *Genes e Development*, 16: 2813–28.

Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., Mccrea, P. D., Crombrughe, B. 2004. **Interactions between Sox9 and β -cat control chondrocyte differentiation.** *Genes and Development*, 18: 1072-87.

Almeida, P. O., Menezes, T. C. E., Aguiar, S. M. H. C. A. 2008. **Síndrome da Regressão Caudal: um relato de caso.** *Revista Odontológica de Araçatuba*, 29: 75-79.

Alvares, L. E., Winterbottom, F. L., Sobreira, D. R., Xavier, J. N., Schubert, F. R., Dietrich, S. 2009. **Chicken Dapper Genes Are Versatile Markers for Mesodermal Tissues, Embryonic Muscle Stem Cells, Neural Crest Cells, and Neurogenic Placodes.** *Developmental Dynamics*, 238: 1166–78.

Angers, S., Moon, R. T. 2009. **Proximal events in Wnt signal transduction.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 468-77.

Arce, L., Yokoyama, N. N., Waterman, M. L. 2006. **Diversity of LEF/TCF action in development and disease.** *Oncogene*, 25: 7492–504.

Badley, E. M. 1995. **The effect of osteoarthritis on disability and health care use in Canada.** *J. Rheumatol. Suppl.* 43: 19–22.

Bell, D. M., Leung, K. K., Wheatley, S. C., Ng, L. J., Zhou, S., Ling, K. W., Sham, M. H., Koopman, P., Tam, P. P., Cheah, K. S. 1997. **Sox9 directly regulates the type-II collagen gene.** *Nat Genet.* 16: 174-8.

Botas, J., Moscoso del Prado, J. e García-Bellido, A. 1982. **Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in Drosophila.** *The Embo Journal*, 1: 307-310.

Brickell, P. M., Tickle, C. 1989. **Morphogens in chick limb development.** *Bioessays*, 11: 145–149.

Bryson-Richardson R. J., Currie, P. D. 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat. Rev. Genet.*, 9: 632–646.

Brott, B. K., Sokol, S. 2005. **Frodo proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development.** *Differentiation*, 73: 323-9.

Buckingham, M., Montarras, D. 2008. **Skeletal muscle stem cells.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 330–336.

Cadigan, K. M., Peifer, M. 2009. **Wnt signaling from development to disease: insights from model systems.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1: a002881.

Capdevila, J., Belmont, J. C. I. 2001. **Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development.** *Annual Review of Cell Development Biology.* 17: 87-132.

Carroll, S. B., Grenier, J. K., Weatherbee, S. D. 2005. Building animals. *In* Carroll, S. B. **From DNA to Diversity** – 2nd ed. Blackwell Publishing, MA, pp. 55-102.

Chen, Y., Knezevic, V., Ervin, V., Hutson, R., Ward, Y. and Mackem, S. 2004. **Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh.** *Development* 131: 2339-47.

Cheyette, B. N., Waxman, J. S., Miller, J. R., Takemaru, K., Sheldahl, L. C., Khlebtsova, N., Fox, E. P., Earnest, T., Moon, R. T. 2002. **Dpr, a Dishevelled-associated antagonist of**

beta catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev. Cell*, 2: 449-61.

Clevers, H. 2006. **Wnt/ β -catenin signaling in development and disease.** *Cell*, 127: 469–80.

DeLaurier, A., Schweitzer, R., Logan, M. 2006. **Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb.** *Dev Biol*. 299: 22-34.

Fisher, D. A., Kivimae, S., Hishino, J., Suriben, R., Martin, P. M., Baxter, N., Cheyette, B. N. R. 2006. **Three Dact Gene Family Members are expressed during embryonic development and in the adult brains of mice.** *Developmental Dynamics*, 235: 2620-30.

Franco, M. G. 2006. **Animais de laboratório - o camundongo.** Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/animais.htm>. [14 out 2006].

Gao, X., Wen, J., Zhang, L., Li, X., Ning, Y., Meng, A., Chen, Y. 2008. **Dpr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein that negatively modulates Wnt signaling in the nucleus.** *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 35679-88.

Gilbert, S. F. 2003. **Developmental biology.** 7 ed. Sinauer. p. 547.

Gillhouse, M., Nyholm, M. W., Hikasa, H., Sokol, S. Y., Grinblat, Y. 2004. **Two Frodo/Dpr homologs are expressed in the developing brain and mesoderm of peixe-zebra.** *Developmental Dynamics*, 230: 403-9.

Gloy, J., Hikasa, H., Sokol, S. Y. 2002. **Frodo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals.** *Nat. Cell Biol.*, 4: 351-7.

Gordon, M. D., Nusse, R. 2006. **Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcriptionfactors.** *J. Biol. Chem.* 281: 22429-33.

Gray, H. 1918. *Anatomy of the Human Body.* Philadelphia: Lea e Febiger.

Habas, R., Dawid, I. B. 2005. **Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?** *Journal of Biology*, 4, 2.

Hamburger, V., Hamilton, H. L. 1951. **A series of normal stages in the development of the chick embryo.** *Developmental Dynamics*, 195: 231-72.

Hartmann, C., Tabin, C. J. 2001. **Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton.** *Cell*, 104: 341–351.

Heywood, R. 1987. **The use of animals in testing.** *ATLA*, 14: 329-33.

Hikasa, H., Sokol, S. Y. 2004. **The involvement of Frodo in TCF-dependent signaling and neural tissue development.** *Development*, 131: 4725-34.

Hinchliffe, J. 1977. **The Chondrogenic Pattern in Chick limb morphogenesis: a problem of development and evolution.** In: Ede, D., Hinchcliffe, J. R., Balls, M., editors. *The Third Symposium of the British Society for Developmental Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 293–310.

Holder, N. 1977. **An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint.** *J Embryol Exp Morphol*, 39: 115–127.

Hunter, N. L., Hisaka, H., Dymecki, S. M., Sokol, S. Y. 2005. **Vertebrate homologues of Frodo are dynamically expressed during embryonic development in tissues undergoing extensive morphogenetic movements.** *Dev. Dyn.* 235: 279-84.

Kadota, S., Fantus, I. G., Deragon, G., Guyda, H. J., Hersh, B. e Posner, B. I. 1987. **Peroxides of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 259–66.

Kardon, G. 1998. **Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb.** *Development*, 125: 4019–32.

Kmita, M., Tarchini, B., Zakany, J., Logan, M., Tabin, C. J., Duboule, D. 2005. **Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function.** *Nature*, 435: 1113-16.

Kawakami, Y., Rodriguez-León, J., Belmonte, J. C. 2006. **The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18:723-9.

Koyama, E., Leatherman, J. L., Shimazu, A., Nah, H., Pacific, M. 1995. **Syndecan-3, Tenascin-C, and the Development of Cartilaginous Skeletal Elements and Joints in Chick Limbs.** *Developmental Dynamics*, 203: 152-162.

Keller, R. 2002. **Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements.** *Science*, 298: 1950-54.

Kettunen, P., Kivimäe, S., Keshari, P., Klein, O., Cheyette, B., Luukko, K. 2010. **Dact1-3 RNAs exhibit distinct expression domains during tooth development.** *Gene Expression Patterns*, 10: 140-43.

Kornak, U., Mundlos, S. 2003. **Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach [review].** *Am. J. Hum. Genet.* 73: 447-474.

Koyama, E., Leatherman, J. L., Shimazu, A., Nah, H.-D., Pacici, M. 1995. **Syndecan-3, tenascin-C, and the development of cartilaginous skeletal elements and joints in chick limbs.** *Dev. Dyn.*, 203: 152-62.

Kronenberg, H. M. 2007. **The role of the perichondrium in fetal bone development.** *Ann N Y Acad Sci.* 1116: 59-64.

Kühl, M. 2004. **The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements.** *Front. Biosci.* 9: 967-74.

Lagathu, C., Christodoulides, C., Virtue, S., Cawthorn, W. P., Franzin, C., Kimber, W. A. Nora, E. D., Campbell, M., Medina-Gomez, G., Cheyette, N. R. B., Vidal-Puig, A. J., Sethi, J. K. 2009. **Dact1, a Nutritionally Regulated Preadipocyte Gene, Controls Adipogenesis by Coordinating the Wnt/ β -Catenin Signaling Network.** *Diabetes*, 58: 609-19.

Langenbacher, A., Chen, J. 2008. **Calcium Signaling: A Common Thread in Vertebrate Left-Right Axis Development.** *Developmental Dynamics*, 237: 3491-96.

Laudet, V., Stehelin, D. Clevers, H. 1993. **Ancestry and diversity of the HMG box superfamily.** *Nucleic Acids Res*, 21: 2493-501.

Lefebvre, V., Li, P., Crombrughe, B. 1998. **A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene.** *The EMBO Journal*. 17: 5718-33.

Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M. J., Bonnet, A., Bonnin, M. A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C. B., Maro, C., Hebenstreit, P. G., Rossert, G., Ruggiero, F., Duprez, D. 2010. **Egr1 and Egr2 involvement in vertebrate tendon differentiation.** *J Biol Chem*, [Epub ahead of print].

Logan, C. Y., Nusse, R. 2004. **The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease.** *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 20: 781-810.

Mattick, J. S. 2007. **A new paradigm for developmental biology.** *J. Exp. Biol*, 210: 1526-47.

Meng, F., Cheng, X., Yang, L., Hou, N., Yang, X., Meng, A. 2008. **Accelerated re-epitheliazation in Dpr2-deficient mice is associated with enhanced response to TGF β signaling.** *Journal of Cell Science*, 121, 2904-12.

Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K. T., Varona, P., Hurler, J. M. 1999. **Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud.** *Dev Biol*. 206:33-45.

McPherron, A. C., Lawler, A. M., Lee, S. J. 1997. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member.** *Nature*. 387: 83-90.

Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D., Moo, R. T. 1999. **Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathway.** *Oncogene*, 18: 7860-72.

Miyagawa, S., Moon, A., Haraguchi, R., Inoue, C., Harada, H., Nakahara, C., Suzuki, K., Matsumaru, D., Kaneko, T., Matsuo, I., Yang, I., Taketo, M., Iguchi, T., Evans, S. M., Yamada, G. 2009. **Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/ β -catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program.** *Development*, 136: 3969-78.

Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., Kaykas, A. 2004. **WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies.** *Nat Rev Genet*, 5: 691-701.

Moon, R. T., Shah, K. 2002. **Developmental biology: signaling polarity.** *Nature* 417: 239-40.

Murchison, N. D., Conner, D. A., Keene, D. R., Olson, E. N., Tabin, C. J. Schweitzer, R. 2007. **Regulation of tendon differentiation by Scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons.** *Development*, 128: 3855-66.

Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., Martin, G. 1993. **FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb.** *Cell*, 75: 1-20.

Ozbudak, E. M., Pourquie, O. 2008. **The vertebrate segmentation clock: the tip of the iceberg.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 317-323.

Pevny, L. H. Lovell-Badge, R. 1997. **Sox genes find their feet.** *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 7: 338-344.

Rallis, C. 2007. **Chicken get their place in the sun.** *Genome Biology*, 8: 306.

Ribeiro, S. M. L., Campos, P., Tirapegui, J. 1995. **O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso.** *Rev. Farm. Bioquím., Univ São Paulo*. 31: 21-8.

Sanz-Ezquerro, J. J., Tickle, C. 2001. **'Fingering' the vertebrate limb.** *Differentiation*, 69: 91–99.

Santos, B. F. 2002. **Camundongos mutantes mais utilizados.** In: Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. *Animais de laboratório: criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz, 139-42.

Schier, A. S. 2003. **Nodal signaling in vertebrate development.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 589-621.

Snitkoff, G. G. 2004. **Testes biológicos.** In: Gennaro AR. *Remington: a ciência e a prática da farmácia.* 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 556-68.

Southard-Smith, E. M., Kos, L., Pavan, W. J. 1998. **Sox10 mutation disrupts neural crest development in *Dom* Hirschsprung mouse model.** *Nature Genet.* 18: 60-64.

Shen, M. M. 2007. **Nodal signaling: developmental roles and regulation.** *Development*, 134: 1023–34.

Su, Y., Zhang, L., Gao, X., Meng, F., Wen, J., Zhou, H., Meng, A., and Chen, Y. G. 2007. **The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling.** *Faseb J.* 21: 682-690.

Suriben, R., Kivimäe, S., Fisher, D. A. C., Moon, R. T., Cheyette, B. N. R. 2009. **Posterior malformations in *Dact1* mutant mice arise through misregulated *Vangl2* at the primitive streak.** *Nat. Genet.*, 41: 977-85.

Tada, M., Kai, M. 2009. **Noncanonical Wnt=PCP Signaling During Vertebrate Gastrulation.** *ZEBRAFISH* 6: 29-40.

Theiler, K. 1989. **The House Mouse: Atlas of Embryonic Development.** New York: Springer-Verlag.

- Tickle, C. 2003. **Patterning Systems - From One End of the Limb to the Other.** *Developmental Cell*, 4, 449–58.
- Tickle, C. 2006. **Making digit patterns in the vertebrate limb.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 45-53.
- Tian, T., Meng, A. M. 2006. **Nodal signals pattern vertebrate embryos.** *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 672-85.
- Towers, M., Fisunov, G., Tickle, C. 2009. **Expression of E2F transcription factor family genes during chick wing development.** *Gene Expression Patterns.* 9: 528–531.
- Watson, S. S., Riordan, T. J., Pryce, B. A., Schweitzer, R. 2009. **Tendons and Muscles of the Mouse Forelimb During Embryonic Development.** *Developmental Dynamics*, 238: 693–700.
- Waxman, J. S., Hocking, A. M., Stoick, C. L., Moon, R. T. 2004. **Peixe-zebra *Dpr1* and *Dpr2* play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes.** *Development*, 13: 5909-21.
- Welten, M. C., Verbeek, F. J., Meijer, A. H., Richardson, M. K. 2005. **Gene expression and digit homology in the chicken embryo wing.** *Evol. Dev.* 7: 18–28.
- Wen, J., Chiang, J. Y., Gao, C., Xue, H., Xu, J., Ning, Y., Hodes, R. J. Gao, X., Chen, G. 2010. **Loss of *Dact1* Disrupts Planar Cell Polarity Signaling by Altering Dishevelled Activity and Leads to Posterior Malformation in Mice.** *The Journal of biological chemistry*, 285: 11023–30.
- Wodarz, A., Nusse, R. 1998. **Mechanisms of Wnt signaling in development.** *Annu. Rev. Dev. Biol.*, 14: 59-88.
- Wolfman, N. M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A. J., Nelson, R. 1997. **Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- β gene family.** *J Clin Invest*, 100: 321-330.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. 2000. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.

Wu, M. Y., Hill, C. S. 2009. **Tgf- β superfamily signaling in embryonic development and homeostasis**. *Dev Cell*, 16: 329–43.

Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M., Rossant, J. 1994. **Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation**. *Genes Dev.* 8: 3032-44.

Yang, L., Cai, C. L., Lin, L., Qyang, Y., Chung, C., Monteiro, R. M., Mummery, C. L., Fishman, G. I., Cogen, A. Evans, S. 2006. **Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development**. *Development*, 133: 1575-85.

Yau, T. O., Chan, C.Y., Chan, K. L., Lee, M. F., Wong, C. M., Fan, S. T., Ng I. O. 2005. **HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/ β -catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing**. *Oncogene*, 24: 1607–14.

Zeller, R., López-Ríos, J., Zuniga, A. 2009. **Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis**. *Nature Reviews Genetics*, 10: 845-58.

Zhang, L., Gao, X., Wen, J., Ning, Y., Chen, Y. G. 2006. **Dpr1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation**. *J. Bio. Chem.* 281: 8607-612.

Zhang, L., Zhou, H., Su, Y., Sun, Z., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, Y., Ning, Y., Chen, Y. G., Meng, A. 2004. **Peixe-zebra Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors**. *Science*, 306:114-7.

Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Bao, X., Akiyama, H., Mackem, S. 2008. **Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud**. *Dev. Cell* 14, 624-32.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

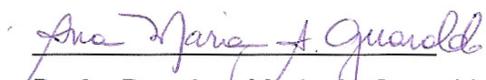
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1837-1**, sobre "**Caracterização do padrão de expressão dos genes da família Dapper no desenvolvimento embrionário de camundongos (C57)**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Lúcia Elvira Alvares / Lucimara Aparecida Sensiate**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **04 de maio de 2009**.

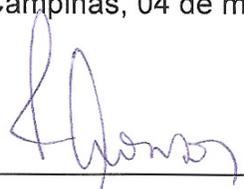
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1837-1**, entitled "**Characterization of the expression pattern of the Dapper genes during mouse development (C57)**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 4, 2009**.

Campinas, 04 de maio de 2009.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva