



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

Jaqueline Isoppo da Cunha

**Cooperação entre estruturas pré-cordais no desenvolvimento inicial da cartilagem  
trabécula no crânio dos gnatostomados**

Florianópolis

2021

*Jaqueline Isoppo da Cunha*

**Cooperação entre estruturas pré-cordais no desenvolvimento inicial da cartilagem  
trabécula no crânio dos gnatostomados**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Biologia Celular e do Desenvolvimento da  
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção  
do título de mestre em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Isoppo da Cunha, Jaqueline  
Cooperação entre estruturas pré-cordais no  
desenvolvimento inicial da cartilagem trabécula no crânio  
dos gnatostomados / Jaqueline Isoppo da Cunha ;  
orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2021.  
116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Neurocrânio  
pré-cordal. 3. Células da crista neural. 4. Cartilagem  
trabécula. I. Castilho Garcez, Ricardo. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Jaqueline Isoppo da Cunha

**Cooperação entre estruturas pré-cordais no desenvolvimento inicial da cartilagem trabécula no crânio dos gnatostomados**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Diego Amarante da Silva  
Paris-Saclay Institute of Neuroscience

Profa. Dra. Talita da Silva Jeremias  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Giordano Vosgrau Calloni  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

---

Prof. Dra. Evelise Maria Nazari  
Coordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez  
Orientador

Florianópolis, 22 de setembro de 2021

Eu dedico este trabalho à todas as vítimas da  
pandemia por Covid-19 no Brasil e no mundo.  
**Ciência salva vidas.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço e principalmente, aqui reconheço, o privilégio que eu tive em realizar um mestrado, especialmente em uma universidade pública. Que este privilégio um dia se torne direito de todos os brasileiros. Já aproveito e deixo minha gratidão à Universidade Federal de Santa Catarina que me acolheu por tantos anos propiciando estrutura para a minha formação e aos órgãos de fomento que estão sendo desmantelados diante dos ataques do atual governo às instituições públicas de ensino: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ao Laboratório de Células Tronco (LACERT), obrigada por todo o auxílio e à Fundação Garcez de Apoio a Pesquisa (FUGAP) por financiar tanto em tempos de desgoverno.

Ao meu orientador Ricardo, agradeço o tempo e confiança investidos em mim nestes seis anos da minha carreira. És um exemplo de profissional que eu quero seguir sempre. Obrigada também por se preocupar com a saúde mental dos seus orientandos.

Agradeço profundamente aos meus pais, Josimari e José, por investirem nos meus estudos. Este presente nunca se perderá, pois já se tornou parte de quem eu sou.

Aos meus irmãos João e José, obrigada por serem pessoas com quem eu posso contar e confiar. José, obrigada por trocar chocolate quente por minutos de massagem comigo!

À minha madrinha/tia Silvia, que é especial como uma vó para mim;

À minha vó Maria (*in memoriam*), que faz as melhores visitas aos meus sonhos;

Quiara, obrigada por ser minha companheira canina há 16 anos; Chumaia, obrigada por tornar meus dias engraçados com a sua enorme autosuficiência felina, inversamente proporcional ao seu tamanho; Mingo, você alegra os meus olhos só com a sua beleza felina.

Bianca, você foi um portal para eu descobrir um mundo de muita arte, ancestralidade e sagrado feminino. Saudade das nossas fogueiras e músicas. Obrigada por tudo, irmã.

Pri, a mais leal aos amigos que eu conheço, dona de uma força gigante;

Marina, gêmea em temperamento, pessoa amável que espalha brilho por onde passa;

Bianca, aventureira, melhor dupla para viajar e fazer mergulhos, exemplo de preocupação e mudança de hábitos pelo bem do planeta, presente do TAMAR;

À toda a galera da República in Wood: Dani (o pisciano menos pisciano), Anastácia (companheira, sincera, engraçada), Dai (trilheira de todas as horas), Teta (o mais engraçado), Gab, Luan e é claro, Chacka-Nika e Jango (o pitbull que não sabe que é um pitbull);

Mai, Andi, Renan, Bruno, Duda, Cairé, turminha que nunca perdia a oportunidade de fazer rodas de música na república, com muito instrumento improvisado e alegria contagiante.

Tai, a vegana mais inspiradora que eu conheço e uma bailarina de tecido incrível;

Jay, o elfo com os cookies mais deliciosos do Bradamundo, pessoa admirável;

Ao meu amigo espacial, Erik, navegador de mares;

Laura, amiga leal, dona de uma visão incrível e pra frente sobre moda e que caminha junto comigo na desconstrução e reconstrução constante do “ser mulher” nessa sociedade;

Fabi, uma dessas amizades que você não encontra muitas vezes na vida;

Carol e Débora, mulheres incríveis, minha segunda família em Porto Alegre,

Jé, a bióloga que ama campo mais dedicada e inspiradora que eu conheço;

Moara, minha irmã de coração que sempre me ensinou e apoiou tanto;

Alice, pessoa inspiradora que corre atrás dos seus sonhos, parceira de forrós;

Renan, dono de uma inteligência absurda, meu guia de botânica das trilhas, rs;

Letícia sol, batalhadora e dedicada, será uma incrível geógrafa; acaso do universo;

Tai, Bazinha, Geo e Léo, galerinha incrível com quem tive o prazer das últimas risadas coletivas de quase fazer xixi na calça naquele gramado antes da pandemia começar;

Meus primos Junior e Gustavo, parcerias bem humoradas para as dificuldades e alegrias da vida;

Ale (deusa da bionfo), Dani (minha pupilhina que fala tão bem em público), Felipe (meu pupilo mais empolgado com ciência), Gab (que nos mata de saudades constantemente), Fer e toda a turma de lacertianos (os atuais e os que já seguiram outros caminhos);

Às minhas tias Marli, Teresa, que ficam tão felizes em ver que tenho as oportunidades e a liberdade de escolha que elas tanto almejavam para sí em suas épocas;

À minha tia Taia e minha prima Kayla, vocês fazem muita falta;

Aos meus colegas, uma turminha muito capaz e dedicada: Marina, Luan, Amanda, Ariane, Cierle, Kath, João, Bruna, Janaina, Breno, José, Julia Puñal, Rafael, Fabi, Francielle, Julia Bizatto, Rafael, Elvis, Elis, Jeanine, Sabrina e Camila. Obrigada por formarem uma boa equipe em sala de aula e por comprarem tantas palhas italianas de mim (me ajudou muito);

Às minhas professoras e professores durante o mestrado: Yara Muniz, Cláudia, Juliana, Franceli, Ricardo, Guilherme, Luísa, Evelise, Yara Müller, Geison e Gustavo Rezende (com quem tive o prazer de vivenciar a disciplina de Evo-Devo), obrigada por serem tão inspiradores;

A todo o pessoal da secretaria e coordenação por tamanha eficiência e agilidade;

A todos que não estão aqui por algum motivo, saibam que vocês estão em meu coração (que é muito maior do que este papel).

## RESUMO

O crânio dos vertebrados, uma das aquisições evolutivas mais recentes, é formado por duas populações de células, uma delas derivada do mesoderma e outra das células da crista neural (CN). Elementos do crânio derivados das células da CN desenvolvem em posição anterior à notocorda, na região pré-cordal. Já elementos derivados do mesoderma, desenvolvem na presença da notocorda, na região cordal. Para o mesoderma formar cartilagem é fundamental a presença da notocorda, como ocorre no restante do corpo. A região anterior à notocorda desperta especial interesse, pois nessa região a interação entre diferentes estruturas embrionárias formam um microambiente capaz de estimular a formação de cartilagem pelas células da CN, condição encontrada apenas nessa região. A cartilagem da região pré-cordal localizada imediatamente anterior a região cordal, é a trabécula, que se forma no encontro de três estruturas pré-cordais: a placa pré-cordal (PPC), a células da linha média rostroventral do tubo neural (células da LMRV do tubo neural) e a ectoderma do estomodeu (EE). Este trabalho aborda como essa região pré-cordal participa, molecularmente do desenvolvimento inicial da trabécula nos gnatostomados. Para isso, foi realizado um levantamento de proteínas expressas na região pré-cordal em *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*. Em seguida, foi realizado um extenso levantamento bibliográfico a fim de selecionar as proteínas mais promissoras, que junto com análises *in silico*, foram utilizados para traçar interações moleculares da região pré-cordal que cooperam para a formação da trabécula. Os resultados mostraram que SHH secretado pela PPC é capaz de induzir a sua expressão nas células da LMRV do tubo neural; BMP7 em cooperação com SHH secretados pela PPC induzem a expressão de *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural; A ativação da expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural desencadeia um ciclo de feedback positivo com *SIX3* e *GLII*, presentes na mesma estrutura e SHH secretado nas células da LMRV do tubo neural induz a sua expressão na EE, atuando na formação inicial da trabécula. Estes resultados mostram que a cooperação molecular entre três estruturas pré-cordais distintas, no embrião em desenvolvimento, são fundamentais para o desenvolvimento craniofacial inicial.

**Palavras-chave:** Neurocrânio pré-cordal. Células da Crista Neural. Placa pré-cordal. Tubo neural. Estomodeu. SHH.



## ABSTRACT

The vertebrate skull, one of the most recent evolutionary acquisitions, is formed by two populations of cells derived from mesoderm and neural crest (CN) cells. Skull elements derived from CN cells develop anterior to the notochord, in the prechordal region. On the other hand, elements derived from mesoderm develop in the presence of the notochord in the chordal region. For the mesoderm to form cartilage, the presence of the notochord is essential, as it occurs in the rest of the body. The region anterior to the notochord arouses special interest, because in this region the interaction between different embryonic structures forms a microenvironment able to stimulate the formation of cartilage by CN cells, a condition found only in this region. The cartilage of the prechordal region, located immediately anterior to the chordal region, is the trabecula, which is formed at the meeting of three prechordal structures: the prechordal plate (PCO), the rostroventral midline cells of the neural tube (cells of the LMRV of the neural tube) and the ectoderm of the stomodeum (ES). This work discusses how this prechordal region participates, molecularly, during the initial development of the trabecula in gnathostomes. For this purpose, proteins present in the prechordal region in *Gallus gallus*, *Mus musculus*, and *Danio rerio* were recruited. Then, an extensive bibliographic survey was carried out to select the most promising proteins, which, together with in silico analysis, were used to trace molecular interactions in the prechordal region that cooperates in the trabecula formation. The results showed that SHH secreted by PCP can induce its expression in RVM neural tube cells. BMP7 in cooperation with SHH PPC-secreted induce *NKX2.1* expression in RVM neural tube cells. The activation of *SHH* expression in RVM neural tube cells triggers a positive feedback cycle with *SIX3* and *GLI1* present in the same structure and SHH secreted in the RVM neural tube cells induces its expression in EE, acting in the initial formation of the trabecula. These results show that molecular cooperation among three distinct prechordal structures in the developing embryo is fundamental for early craniofacial development.

**Keywords:** Prechordal neurocranium. Neural Crest Cells. Prechordal Plate. Neural tube. Stomodeum. SHH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Crânio das espécies <i>Homo sapiens</i> (humano) e <i>Gallus gallus</i> (galinha).....	19
Figura 2 - Base do neurocrânio na espécie <i>Gallus gallus</i> (galinha) .....	20
Figura 3 - Processo de ossificação endocondral .....	20
Figura 4 - A maior parte do crânio dos vertebrados é originado a partir da CN .....	22
Figura 5 - A trabécula em <i>Danio rerio</i> , <i>Gallus gallus</i> e <i>Mus musculus</i> .....	24
Figura 6 - Formação e migração da CN .....	25
Figura 7 - Domínios e migração da CN.....	26
Figura 8 - Mecanismo simplificado de uma molécula sinalizadora que atua como fator solúvel (morfógenos) sobre uma célula-alvo, induzindo a expressão ou ativação de fatores de transcrição específicos.....	27
Figura 9 - Origem, rotas de migração e destino final das células da CN que irão a trabécula .	29
Figura 10 - Formação de fibrila na matriz extracelular de cartilagem .....	30
Figura 11 - SOX9 ativa a expressão de <i>COL2A1</i> .....	31
Figura 12 - Atuação de SOX9 sobre o processo de condrogênese .....	32
Figura 13 - SOX9 e COL2A1 inseridos no nosso contexto de estudo .....	33
Figura 14 - Trabécula não desenvolve para formar o neurocrânio anterior (pré-cordal) na ausência da expressão de <i>shh</i> .....	34
Figura 15 - A trabécula nos agnatos e nos gnatostomados.....	35
Figura 16 - Trabécula não desenvolve para formar o neurocrânio pré-cordal em embriões mutantes para <i>shh</i> ( <i>shh</i> +/-).....	38
Figura 17 - Página de busca pelo GEISHA .....	42
Figura 18 - Página de busca pelo ZFIN .....	44
Figura 19 - Página de busca pelo MGI.....	45
Figura 20 - Página de busca pelo EMAGE.....	46
Figura 21 - Realizando pesquisa utilizando GeneMANIA.....	50
Figura 22 - Exemplo de análise proteica .....	52
Figura 23 - Resultados a serem apresentados de acordo com a metodologia.....	53
Figura 24 - Análise comparativa do desenvolvimento entre <i>Danio rerio</i> (peixe-zebra), <i>Gallus gallus</i> (galinha) e <i>Mus musculus</i> (camundongo) .....	54
Figura 25 - Padrões de expressão gênica selecionados no contexto embrionário de formação da trabécula.....	57

Figura 26 - Expressão do gene <i>SHH</i> ortólogo em <i>Gallus gallus</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Danio rerio</i> .....	58
Figura 27 - Expressão do gene <i>GLI1</i> ortólogo em <i>Gallus gallus</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Danio rerio</i> .....	59
Figura 28 - Expressão do gene <i>NKX2.1</i> ortólogo em <i>Gallus gallus</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i> .....	60
Figura 29 - Expressão do gene <i>SIX3</i> ortólogo em <i>Gallus gallus</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Danio rerio</i> .....	60
Figura 30 - Relações feitas para pesquisa na etapa de interações de genes.....	61
Figura 31 - A PPC induz a expressão de <i>SHH</i> e <i>NKX2.1</i> no tubo neural.....	63
Figura 32 - A PPC atua na especificação das células da LMRV do tubo neural.....	64
Figura 33 - SHH é necessário, mas não é suficiente para induzir <i>Nkx2.1</i> nas células da LMRV do tubo neural .....	65
Figura 34 - SHH exógeno induz a própria expressão em explantes da placa neural lateral.....	66
Figura 35 - SHH e BMP7 cooperam para induzir a expressão de <i>Nkx2.1</i> no tubo neural .....	67
Figura 36 - A necessidade de SHH e BMP7 para induzir a expressão de <i>Nkx2.1</i> nas células da LMRV do tubo neural ocorre em momentos distintos .....	68
Figura 37 - <i>SHH</i> e <i>BMP7</i> secretados pela PPC atuam sobre a expressão de <i>SHH</i> e <i>NKX2.1</i> nas células da LMRV do tubo neural.....	68
Figura 38 - SHH e <i>SIX3</i> atuam sobre a expressão de <i>NKX2.1</i> no tubo neural .....	69
Figura 39 - A expressão de <i>NKX2.1</i> em progenitores neurais é dose-dependente de SHH .....	70
Figura 40 - <i>NKX2.1</i> atua sobre a formação de neurônios do sistema nervoso .....	71
Figura 41 - A via de sinalização Hedgehog.....	72
Figura 42 - O receptor LRP2 torna possível a detecção de SHH nas células da LMRV do tubo neural em uma específica temporalidade.....	73
Figura 43 - SHH secretado pela PPC atua sobre as células da LMRV do tubo neural .....	74
Figura 44 - Análise de genes-alvo da via de sinalização de SHH .....	75
Figura 45 - Sobreposição do padrão de expressão de <i>Shh</i> e <i>Six3</i> nas células da LMRV do tubo neural .....	76
Figura 46 - Ausência de alelo para <i>Shh</i> reduz drasticamente a expressão de <i>Six3</i> nas células da LMRV do tubo neural .....	77
Figura 47 - Expressão de <i>Six3</i> nas células da LMRV do tubo neural é perturbada em embriões <i>Lrp2(-/-)</i> .....	77

Figura 48 - Análise de interações entre SHH e SIX3 .....	78
Figura 49 - Shh é necessário para ativar a expressão de <i>six3b</i> no tubo neural em <i>Danio rerio</i> .....	79
Figura 50 - Shha é suficiente para induzir a expressão de <i>six3b</i> no tubo neural em <i>Danio rerio</i> .....	80
Figura 51 - <i>SIX3</i> é um gene-alvo da sinalização SHH nas células da LMRV do tubo neural..	80
Figura 52 - A expressão de <i>Six3</i> é necessária para a indução da expressão de <i>Shh</i> nas células da LMRV do tubo neural e na PPC.....	81
Figura 53 - A atividade de <i>SIX3</i> como um ativador da expressão de <i>Shh</i> nas células da LMRV do tubo neural é direta .....	82
Figura 54 - A sequência gênica de <i>SBE2</i> é altamente conservada entre espécies de gnatostomados .....	83
Figura 55 - Padrão de atividade de <i>SBE2</i> de diferentes espécies de gnatostomados.....	83
Figura 56 - A atividade de <i>Sbe2</i> atua sobre a expressão de <i>Shh</i> .....	84
Figura 57 - Mutação na sequência gênica de <i>Sbe2</i> .....	84
Figura 58 - Mutação em <i>Sbe2</i> reduz a sua atividade nas células da LMRV do tubo neural ...	85
Figura 59 - Perda de atividade de <i>Sbe2</i> em embriões mutantes sobrepõe com expressão de <i>Shh</i> e <i>Six3</i> .....	86
Figura 60 - <i>SIX3</i> atua sobre a expressão de <i>SHH</i> nas células da LMRV do tubo neural .....	87
Figura 61 - Shh secretado nas células da LMRV do tubo neural atua na formação inicial da trabécula.....	88
Figura 62 - Shh secretado na EE atua na formação da trabécula .....	89
Figura 63 - Necessidade temporal da atividade de Shh para formação da trabécula .....	90
Figura 64 - Em embriões <i>smo+/-</i> , as células da CN na região dorsal da EE falham em condensar .....	91
Figura 65 - A CN não necessita da sinalização de Shh diretamente para condensar .....	92
Figura 66 - Estomodeu selvagem é capaz de retomar a condensação das células da CN em embriões <i>smo+/-</i> .....	93
Figura 67 - Período crucial para estomodeu detectar Shh e promover condensação das células da CN é no final da gastrulação.....	94
Figura 68 - O primórdio cerebral ventral é a fonte de Shh para o estomodeu promover a condensação das células da CN .....	95
Figura 69 - SHH expresso nas células da LMRV do tubo neural induz a condensação das células da CN pela EE .....	96

Figura 70 - A expressão de <i>Sox9</i> e <i>Co2A1</i> são ausentes em embriões <i>Shh</i> -/- .....	97
Figura 71 - Estomodeu contribui para a expressão de <i>sox9a</i> nas células da CN.....	98
Figura 72 - Análise de interação entre SHH e SOX9 .....	99
Figura 73 - A atuação da atividade de SHH na EE sobre a expressão de <i>SOX9</i> nas células da CN permanece desconhecida.....	100
Figura 74 - Resumo temporal da sinalização envolvida na formação da trabécula .....	101
Figura 75 - SHH secretado pelas células da LMRV do tubo neural e EE sobre a formação da trabécula.....	102
Figura 76 - Resumo das sinalizações previamente conhecidas e das apresentadas nos resultados do atual trabalho .....	104

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estágios para identificação da expressão de genes ortólogos nos bancos de imagens.....	41
---	----

### LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no GEISHA.....	43
Quadro 2 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no ZFIN .....	45
Quadro 3 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no MGI .....	46
Quadro 4 - Tipos de interações presentes no GeneMANIA.....	51
Quadro 5 - Padrões de expressão gênica identificados no GEISHA.....	55
Quadro 6 - Padrões de expressão gênica identificados no GEISHA.....	56
Quadro 7 - Padrões de expressão gênica identificados em <i>Gallus gallus</i> , <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i> nos bancos de imagens GEISHA, ZFIN E MGI/IMAGE, respectivamente .....	56
Quadro 8 - Padrão de expressão gênica excluídos na segunda etapa .....	57
Quadro 9 - Padrões de expressão gênica selecionados durante o levantamento bibliográfico (etapa de seleção de genes).....	57
Quadro 10 - Genes selecionados ortólogos em <i>Mus musculus</i> , <i>Gallus gallus</i> e <i>Danio rerio</i> ..	61
Quadro 11 – Estudos do levantamento bibliográfico utilizados para estruturar a rede regulatória presente na região pré-cordal.....	113
Quadro 12 - Termos de busca utilizados na base de dados PUBMED para os genes selecionados .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Para a padronização da nomenclatura de genes e proteínas, foi utilizado o “Standard Gene Name and Symbols” encontrados nas bases de dados específicas para cada organismo. Portanto, dependendo de qual modelo era utilizado para cada experimento apresentado, era utilizada uma nomenclatura específica. Quando os genes citados não faziam referência a nenhuma espécie especificamente, era utilizada a regra geral (ver quadro abaixo). No entanto, independente da regra aplicada, genes, RNAm e DNAc sempre estarão em itálico e proteínas sempre em não-itálico.

Nomenclatura científica utilizada para genes e proteínas		
Para citar genes e proteínas...	Gene	Proteína
sem espécie específica	<i>SHH</i>	SHH
para <i>Gallus gallus</i>	<i>SHH</i>	SHH
para <i>Mus musculus</i>	<i>Shh</i>	SHH
para <i>Danio rerio</i>	<i>shh</i>	Shh

\*RNAm e DNAc seguem as mesmas regras para gene.

### Outras abreviaturas e siglas

<b>BMP7</b>	Proteína Morfogenética de Osso (Do inglês: <i>Bone morphogenetic protein</i> )
<b>CN</b>	Crista Neural
<b>COL2A</b>	Colágeno do Tipo II (Do inglês: <i>Colagen Type II Alpha I Chain</i> )
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico (Do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>E</b>	Período de 1 dia para o desenvolvimento de <i>Mus musculus</i>
<b>EE</b>	Ectoderma do estomodeu
<b>GLI1</b>	Proteína de dedo de zinco 1 (Do inglês: <i>Gli Family Zinc Finger 1</i> )
<b>GLI2</b>	Proteína de dedo de zinco 2 (Do inglês: <i>Gli Family Zinc Finger 2</i> )
<b>GLI3</b>	Proteína tipo dedo de zinco 3 (Do inglês: <i>Gli Family Zinc Finger 3</i> )
<b>HH</b>	Estágio de desenvolvimento HAMBURGER; HAMILTON (1951)
<b>hpf</b>	Horas pós-fertilização para o desenvolvimento de <i>Danio rerio</i>
<b>LMRV</b>	Linha média rostroventral
<b>LRP2</b>	Proteína Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade – 2 (Do inglês: <i>Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 2</i> )
<b>Nkx2.1</b>	Fator de transcrição da tireoide 1 (Do inglês: <i>Nk2 Homebox 1</i> )
<b>PPC</b>	Placa pré-cordal
<b>PTCH1</b>	Proteína Homóloga Patched 1 (Do inglês: <i>Protein Patched Homolog 1</i> )

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico (Do inglês: <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (Do inglês: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>SBE2</b>	(Do Inglês: <i>Shh Brain enhancer 2</i> )
<b>SHH</b>	Proteína Sonic Hedgehog (Do inglês: <i>Sonic Hedgehog Protein</i> )
<b>SIX3</b>	Proteína Homeobox Six3 (Do inglês: <i>Homeobox Protein Six3</i> )
<b>SMO</b>	(Do Inglês: <i>Frizzled Class Receptor Smoothened</i> )
<b>SOX9</b>	(Do inglês: <i>Sry-related HMG box 9</i> )
<b>ss</b>	Estágio somítico (Do inglês: <i>Somite stage</i> )
<b>SuFu</b>	(Do inglês: <i>Supressor of Fused Protein</i> )
<b>TEM</b>	Transição epitélio-mesenquimal

#### Glossário de Terminologias-chave

<b>Interação parácrina</b>	Proteínas sintetizadas por uma célula que podem difundir sobre pequenas distâncias para induzir mudanças nas células vizinhas. Os fatores parácrinos são, portanto, moléculas solúveis difusíveis (BOLLENBACH et al., 2008)
<b>Interação Autócrina</b>	Célula que secreta uma molécula mensageira como um fator solúvel, que se liga aos receptores da mesma célula (CAICEDO, 2013).
<b>Morfógeno</b>	Molécula que quando secretada de uma fonte celular, ocasiona um gradiente espacial de concentração, induzindo a uma expressão gênica diferencial que ocorre em diferentes limiares de concentração, resultando em identidades celulares distintas (GILBERT, 2011)
<b>Genes ortólogos</b>	Dois genes de duas espécies diferentes que derivam de um único gene no último ancestral comum das espécies (HEIDELBERG et al., 2002).
<b>Haploinsuficiência</b>	Deleção de um alelo ou substituição do alelo selvagem por alelos mutantes em um gene (GENG et al., 2008).

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>O CRÂNIO .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Anatomia do Crânio .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Origem embrionária do Crânio.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2</b>	<b>TRABÉCULA .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.1</b>	<b>A Crista Neural (CN).....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Contexto embrionário do desenvolvimento da trabécula .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento da trabécula na região pré-cordal .....</b>	<b>30</b>
<i>1.2.3.1</i>	<i>Fator de transcrição e proteína de matriz-extracelular.....</i>	<i>30</i>
<i>1.2.3.2</i>	<i>Fator solúvel.....</i>	<i>34</i>
<b>1.2.4</b>	<b>A trabécula localizada no neurocrânio pré-cordal é uma sinapormofia dos gnatostomados.....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ESTRUTURAS PRÉ-CORDAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Análise em <i>Gallus gallus</i> – GEISHA .....</b>	<b>41</b>
<i>4.1.1.1</i>	<i>Termos anatômicos utilizados para busca .....</i>	<i>42</i>
<i>4.1.1.2</i>	<i>Estágios selecionados para busca .....</i>	<i>43</i>
<b>4.1.2</b>	<b>Análise em <i>Danio rerio</i> - ZFIN .....</b>	<b>44</b>
<i>4.1.2.1</i>	<i>Termos anatômicos utilizados para busca .....</i>	<i>44</i>
<b>4.1.3</b>	<b>Análise para <i>Mus musculus</i> - MGI e EMAGE.....</b>	<b>45</b>
<i>4.1.3.1</i>	<i>Termos anatômicos utilizados para busca .....</i>	<i>46</i>



4.2	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	46
4.2.1	<b>Etapa de Seleção de Genes</b> .....	<b>47</b>
4.2.2	<b>Etapa de Interação de Genes</b> .....	<b>47</b>
4.2.3	<b>Etapa de Busca Ampliada</b> .....	<b>49</b>
4.3	ANÁLISES COMPLEMENTARES DOS GENES SELECIONADOS .....	49
4.3.1	GeneCards .....	49
4.3.2	SIGnaling Network Open Resource - SIGNOR.....	49
4.3.3	GeneMANIA .....	50
4.4	CONFECÇÃO DE IMAGENS.....	52
5	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
5.1	ANÁLISE COMPARATIVA DO DESENVOLVIMENTO ENTRE <i>DANIO RERIO</i> , <i>GALLUS GALLUS</i> E <i>MUS MUSCULUS</i> .....	53
5.2	GENES EXPRESSOS NA REGIÃO PRÉ-CORDAL IDENTIFICADOS NO GEISHA	
5.3	GENES SELECIONADOS NAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS DA REGIÃO PRÉ-CORDAL .....	55
5.3.1	<b>Sonic Hedgehog Protein (SHH)</b> .....	<b>58</b>
5.3.2	<b>Proteína Morfogenética de Osso 7 (BMP7)</b> .....	<b>59</b>
5.3.3	<b>Gli Family Zinc Finger 1 (GLI1)</b> .....	<b>59</b>
5.3.4	<b>Nk2 Homeobox 1 (NKX2.1)</b> .....	<b>60</b>
5.3.5	<b>Proteína Homeobox Six3 (SIX3)</b> .....	<b>60</b>
5.4	INTERAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS DA REGIÃO PRÉ-CORDAL .....	61
5.5	PPC ATUA SOBRE A INDUÇÃO DE SHH E NKX2.1 NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL .....	62
5.6	A EXPRESSÃO DE <i>NKX2.1</i> NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL CONTRIBUI PARA A FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO, MAS NÃO PARA A FORMAÇÃO INICIAL DA TRABÉCULA .....	69

5.7	HÁ UMA FINA REGULAÇÃO TEMPORAL NA CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE SHH SECRETADO PELA PPC PELAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL .....	71
5.8	A SECREÇÃO DE SHH PELA PPC INDUZ DE FORMA INDIRETA A EXPRESSÃO DE <i>SHH</i> NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL .....	75
5.9	SHH ATIVA A EXPRESSÃO DE <i>SIX3</i> NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL, INICIANDO UM FEEDBACK POSITIVO .....	76
5.10	<i>SIX3</i> COMPLETA O CICLO DE FEEDBACK POSITIVO ATUANDO COMO UM ATIVADOR DA EXPRESSÃO DE <i>SHH</i> NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL .....	81
5.11	SHH EXPRESSO NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL ATUA NA FORMAÇÃO DA TRABÉCULA ATRAVÉS DA EE.....	87
5.12	SHH ATIVA A EXPRESSÃO DE <i>SOX9</i> VIA <i>GLI1</i> NA REGIÃO PRÉ-CORDAL .	96
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>100</b>
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

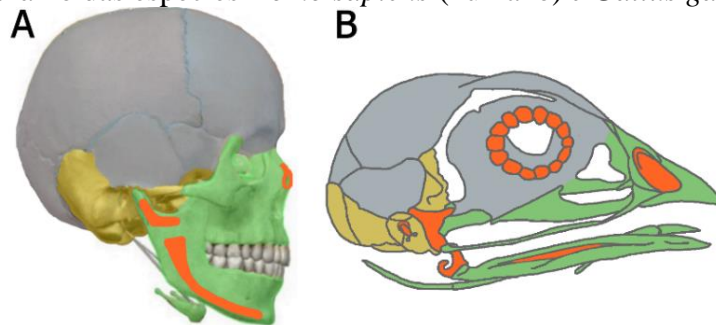
O esqueleto dos vertebrados é dividido em duas unidades principais: o esqueleto craniano, também conhecido como crânio, o qual será abordado no presente trabalho, e o esqueleto pós-craniano, composto por estruturas ósseas posteriores ao crânio, como coluna vertebral, costelas, membros e estruturas associadas (KARDONG, 2009).

### 1.1 O CRÂNIO

#### 1.1.1 Anatomia do Crânio

O crânio dos vertebrados é formado pela fusão do neurocrânio (em torno do cérebro) e o esplanocrânio (formando a face). Em ambos, podem ocorrer dois tipos de ossificação para a formação dos elementos ósseos: a intramembranosa ou a endocondral. No neurocrânio, ossos com ossificação endocondral formam a base do crânio e ossos com ossificação intramembranosa formam a calota craniana (LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, 2009; MCBRATNEY-OWEN et al., 2008). Já no esplanocrânio, a disposição de ossos com ossificação endocondral e intramembranosa é mais variada (ver figura 1).

Figura 1 - Crânio das espécies *Homo sapiens* (humano) e *Gallus gallus* (galinha)

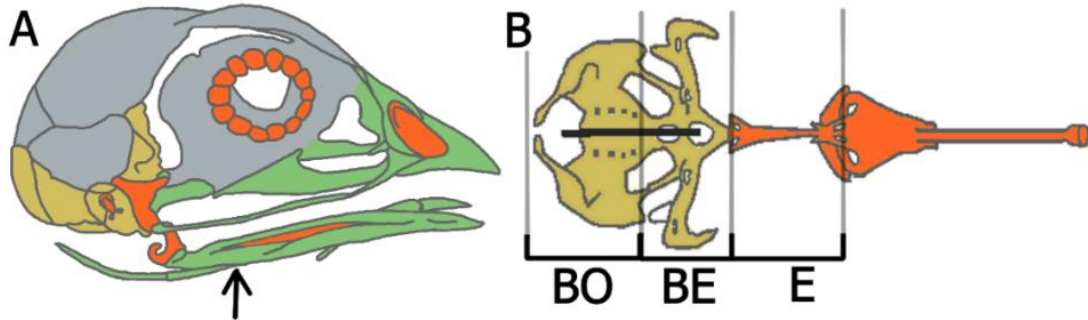


Fonte: Adaptado de LE DOUARIN, N. M.; CREUZET (2009).

Nota: Crânio de *Homo sapiens* em **A** e de *Gallus gallus* em **B** divididos em duas principais regiões: neurocrânio formado por ossificação intramembranosa (cinza) e endocondral (amarelo) e esplanocrânio formado por ossificação intramembranosa (verde) e endocondral (laranja).

A parte basal do crânio é delimitada pela ponta do septo nasal cartilaginoso, localizado anteriormente e o forame magno, localizado posteriormente. Na região da linha média, a parte basal do crânio é composta pelos ossos etmoide, base esferoide (dividido em base pré-esferoide anteriormente e base pós-esferoide posteriormente) e base occipital, que estendem lateralmente para se unir às cápsulas sensoriais (ver figura 2).

Figura 2 - Base do neurocrânio na espécie *Gallus gallus* (galinha)

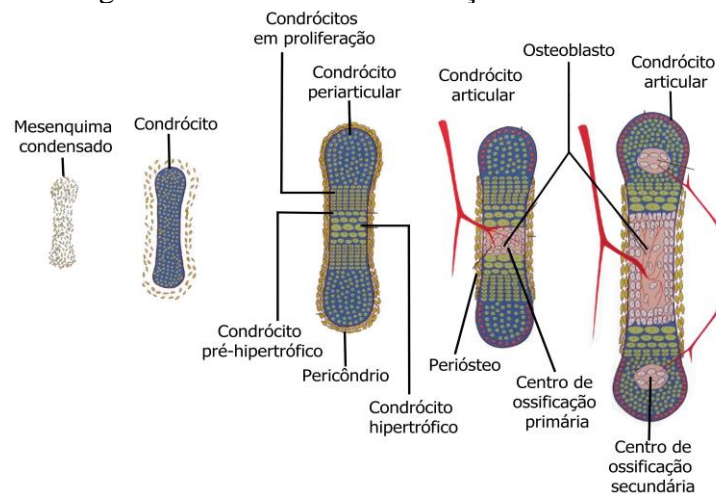


Fonte: Adaptado de LE DOUARIN, N. M.; CREUZET (2009).

Nota: Em **A**, esquema mostrando visão lateral do crânio de *Gallus gallus* com neurocrânio formado por ossificação intramembranosa (em cinza) e endocondral (em amarelo) e esplanocrânio formado por ossificação intramembranosa (em verde) e endocondral (laranja). Flecha em **A** apontando para o ângulo de visão da imagem vista em **B**. Em **B**, esquema mostrando visão basal da base do crânio, localizado na região ventral do cérebro, sem os elementos ósseos do arco faríngeo 1 (maxila e mandíbula). Divisão da base do crânio nas regiões etmoidal (E), base esfenoidal (BE) e base occipital (BO).

Estruturas ósseas da base do crânio possuem ossificação endocondral, ou seja, se formam a partir de estruturas cartilaginosas (MACKIE et al., 2008) (ver figura 3).

Figura 3 - Processo de ossificação endocondral



Fonte: Retirado de DE CROMBRUGGHE; AKIYAMA (2009).

Nota: Representação esquemática dos passos envolvidos na ossificação endocondral.

Para este processo, ocorre inicialmente a condensação, através do agregamento de células mesenquimais que prefiguram a futura forma dos ossos endocondrais. A seguir, ocorre a condrogênese, através do comprometimento das células mesenquimais com uma linhagem condrogênica. Neste momento, as células destas condensações mesenquimais diferenciam em

condrócitos e produzem uma matriz extracelular de cartilagem. Após, estas células diferenciam em condrócitos pré-hipertróficos e depois hipertróficos. Os condrócitos hipertróficos mais maduros morrem por apoptose. Esse tecido é invadido por vasos sanguíneos e células mesenquimais, que ao invadir a matriz extracelular cartilaginosa, diferenciam para osteoblastos, secretando a matriz mineral que formará o osso. Uma vez mineralizado, os osteoblastos na matriz mineral diferenciam em osteócitos (DE CROMBRUGGHE; AKIYAMA, 2009).

Portanto, quando as cartilagens do condrocrânio sofrem ossificação endocondral para formar os ossos da base do crânio, a origem estrutural destes ossos endocondrais pode ser traçada a partir de uma ou mais cartilagens (MCBRATNEY-OWEN et al., 2008).

Em conjunto, essas informações relacionadas à formação do crânio nos vertebrados suscitam algumas questões importantes: *Qual(is) a(s) origem(ns) das células que formam o crânio? Qual(is) a(s) origem(ns) das células com capacidade para formar tanto cartilagem quanto osso da base do crânio? Como são controlados os processos de formação de cartilagem?*

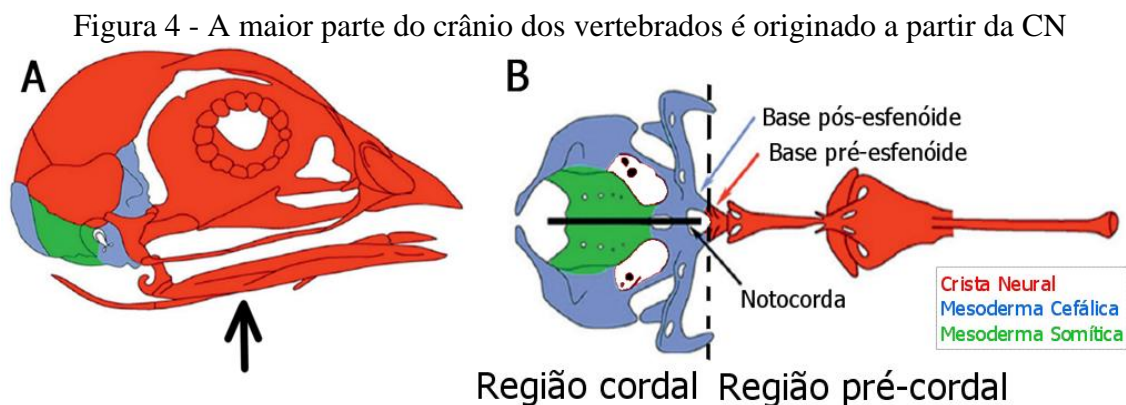
### **1.1.2 Origem embrionária do Crânio**

O crânio é a única parte do esqueleto dos vertebrados que não é originado somente do mesoderma (LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, 2009). Essa ideia, apresentada em 1893 pela pesquisadora Julia Platt, propôs que a ectoderma contribui junto com a mesoderma, para a formação do esqueleto craniofacial através de cartilagens e ossos originados a partir de um derivado do ectoderma, as células da Crista Neural (CN) (PLATT, 1893). Ela ainda cunhou o termo “*mesectoderma*” para células com comportamento mesenquimal originadas do ectoderma, como as células da CN e “*mesentoderma*” para células com comportamento mesenquimal originadas do mesoderma. Suas observações, embora mais tarde apoiadas por vários pesquisadores no final do século 19, foram ganhando aceitação muito lentamente (LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, 2009).

Importante destacar que as duas linhagens celulares que formam o crânio, ectoderma (representada aqui pela células da CN) e mesoderma, não correspondem exatamente às divisões esqueléticas mostradas anteriormente (neurocrânio e esplancocrânio ou dermatocrânio e condrocrânio) (KURATANI; OTA, 2009).

Utilizando diferentes abordagens experimentais, em destaque para os experimentos realizados com embriões aviários quiméricos, foi criado um mapa de origem dos elementos do crânio. Neste mapa, dois grandes domínios de derivados ocorrem na base do crânio: 1) o domínio pré-cordal, derivado das células da CN e 2) o domínio cordal, derivado do mesoderma. Curiosamente, o que delimita o domínio pré-cordal e cordal é a ausência e presença da notocorda, respectivamente (COULY; COLTEY; LE DOUARIN, 1993).

Analisando comparativamente as estruturas derivadas da CN e mesoderma com a divisão entre neurocrânio e esplanocrânio, é possível perceber que as células da CN formam o esplanocrânio e neurocrânio pré-cordal (ver parte vermelha figura 4, B), enquanto que o mesoderma forma o neurocrânio cordal (ver parte azul figura 4, B) (KURATANI; OTA, 2009) (ver figura 4).



Fonte: Retirado de LE DOUARIN, N. M.; CREUZET (2009).

Nota: Embrião de *Gallus gallus* mostrando as estruturas derivadas da CN em vermelho e as derivadas do mesoderma cefálico em azul e verde. Em **A**, visão lateral do crânio com flecha apontando para o ângulo de visão em **B**. Em **B**, visão basal da base do crânio (sem maxila e mandíbula) marcando o limite entre a região pré-cordal e cordal (ver linha pontilhada em **B**).

Essa divisão extremamente precisa entre derivados da CN na região pré-cordal e derivados do mesoderma na região cordal (ver derivados da CN em vermelho e do mesoderma em azul delimitados pela linha pontilhada preta na figura 4, B) chamou a atenção dos pesquisadores e levantou questionamentos sobre a presença da notocorda para que as células do mesoderma possam formar ossos craniais. E de fato, estes questionamentos corroboram com a necessidade da notocorda no local de formação de cartilagem pelas células de origem mesodérmica (POURQUIÉ et al., 1993), ao contrário das células da CN (COULY; COLTEY; LE DOUARIN, 1993).

Nesse sentido, a região pré-cordal passa a despertar especial interesse, por formar cartilagem na ausência da notocorda. Além disso, as células que formam cartilagem nesta região são originadas a partir da CN. Logo, foi questionado se estruturas embrionárias presentes na região pré-cordal, diante da ausência da notocorda, poderiam atuar sobre as células da CN para formar cartilagens do neurocrânio pré-cordal.

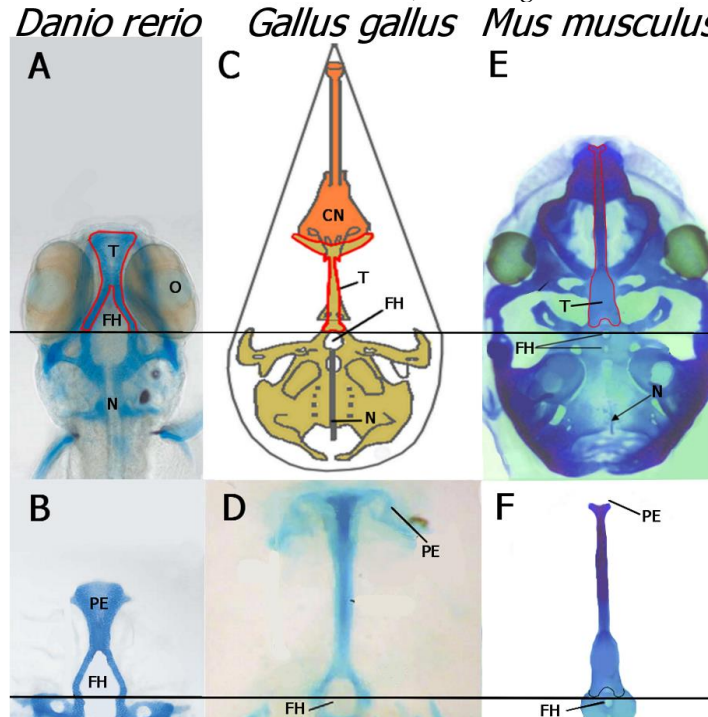
Durante o desenvolvimento, as cartilagens que demarcam o limite entre o neurocrânio pré-cordal e cordal, são a trabécula na região pré-cordal e as cartilagens paracordais na região cordal (COULY; COLTEY; LE DOUARIN, 1993). Logo, a trabécula é o elemento que se forma no limite mais posterior da região pré-cordal (ver figura 5) e, portanto, imediatamente livre de notocorda, mas com a presença de outras estruturas pré-cordais. A partir disso, este trabalho se dedicou a compreender como a região pré-cordal e estruturas associadas participam, molecularmente, do desenvolvimento da trabécula no crânio nos gnatostomados.

## 1.2 TRABÉCULA

A trabécula é formada por um par de cartilagens localizadas na região medial (linha média) do neurocrânio pré-cordal durante o desenvolvimento dos gnatostomados (KARDONG, 2009; KURATANI, 2012; OTA; KURAKU; KURATANI, 2007). Em estágios mais posteriores do desenvolvimento, a trabécula ossifica. Na parte anterior, as unidades bilaterais da trabécula se fundem para formar parte do osso etmoide, denominada placa etmoidal. Posteriormente, ela estende na linha média através de um par bilateral de cartilagens cuja extremidade posterior vão formar a região anterior do base esfenoide, conhecida como base pré-esfenoide, localizado latero-anteriormente ao local de formação da hipófise (GRIFFIN et al., 2013; KIMMEL; MILLER; MOENS, 2001; MCBRATNEY-OWEN et al., 2008).

A configuração morfológica básica do neurocrânio descrita acima é altamente conservada entre os gnatostomados (DE BEER, 1937b), sugerindo que não houveram quase mudanças significativas ou extensas no seu programa de desenvolvimento durante a evolução. A seguir, compreenderemos um pouco sobre a estrutura embrionária que dá origem as células que formam o neurocrânio pré-cordal e, conseqüentemente a trabécula: as células da CN (ver figura 5).

Figura 5 - A trabécula em *Danio rerio*, *Gallus gallus* e *Mus musculus*



Fonte: Editado a partir de EBERHART et al. (2006); LE DOUARIN, NICOLE M. AND CREUZET, (2009); MCBRATNEY-OWEN et al. (2008); SWARTZ et al. (2011); WADA; NOHNO; KURATANI, (2011).

Nota: Visão dorsal da trabécula em *Danio Rerio* após o processo de formação da trabécula em **A** e **B**, *Gallus gallus* em **C** e **D** e *Mus musculus* em **E** e **F**. Região anterior do embrião no lado superior da imagem e região posterior no lado inferior. A região destacadas por traços vermelhos em **A**, **C** e **E** marcam a trabécula, que em **B**, **D** e **F** é apresentada sozinha. Os embriões estão alinhados de acordo com o limite entre a região pré-cordal (superior) e cordal (inferior), de forma que as linhas pretas horizontais demarcam o limite entre estas duas regiões. Em todas as figuras, exceto a **D**, as imagens foram retiradas de experimentos utilizando Alcian blue, um marcador de tecido cartilaginoso. Os embriões não estão colocados de acordo com a proporção de tamanho de cada um. CN, cápsula nasal; FH, fenda hipofisária; N, notocorda; O, olhos; PE, placa etmoidal; T, trabécula.

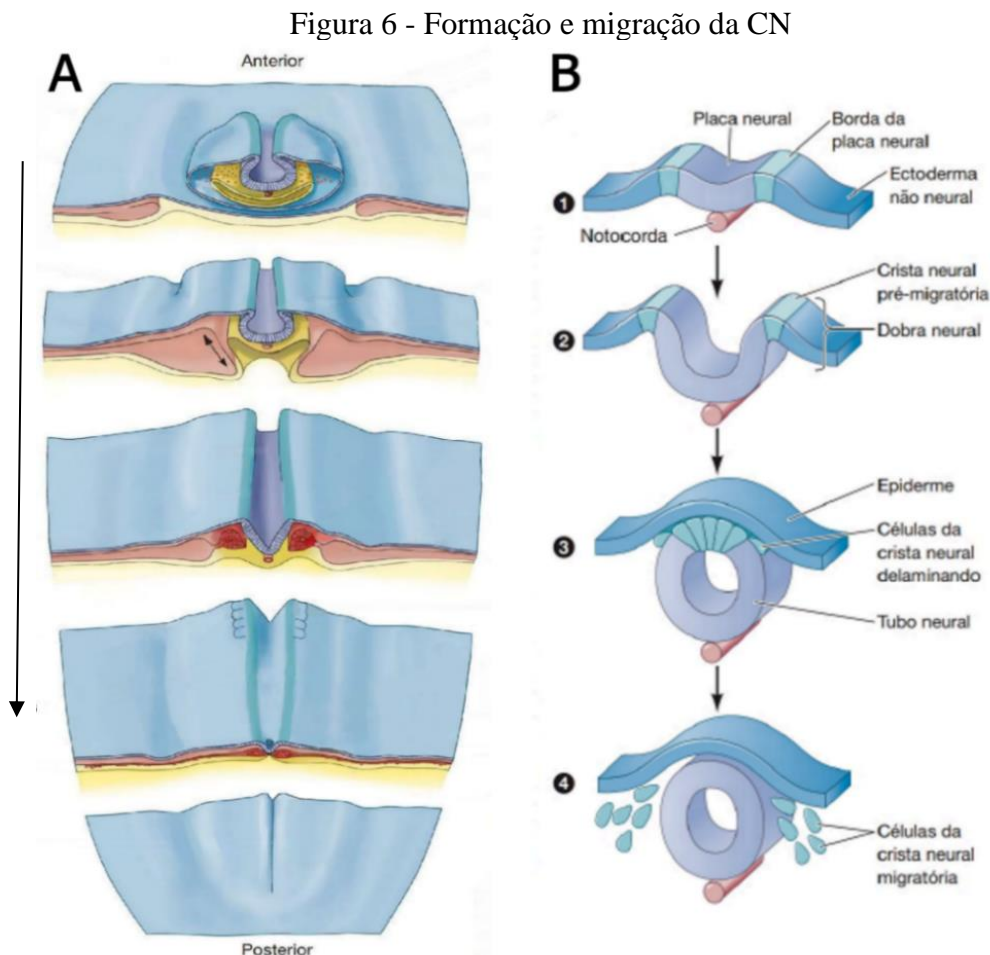
### 1.2.1 A Crista Neural (CN)

A CN é uma estrutura embrionária que foi primeiramente descrita em embriões de *Gallus gallus*, pelo histologista alemão Wilhem His, em 1868. É constituída por uma população de células-tronco multipotentes originadas a partir do ectoderma dorsal do tubo neural, ao longo do eixo anteroposterior do embrião, durante a neurulação (TRAINOR, 2014b) (ver figura 6, A).

A CN é uma estrutura transitente. Indivíduos adultos não têm CN e nem os embriões em estágios mais avançados. Durante neurulação, as células da CN sofrem transição epitélio-mesenquimal (TEM), uma alteração de comportamento, que resulta na migração das células da CN do tubo neural dorsal para diferenciar em diferentes tipos celulares (GILBERT, 2011). A migração ocorre por diferentes rotas embrionárias e, dependendo dos fatores solúveis presentes



no microambiente embrionário na rota pela qual as células da CN migram, elas darão origem a determinados tipos celulares (TRAINOR, 2014b) (ver figura 6).

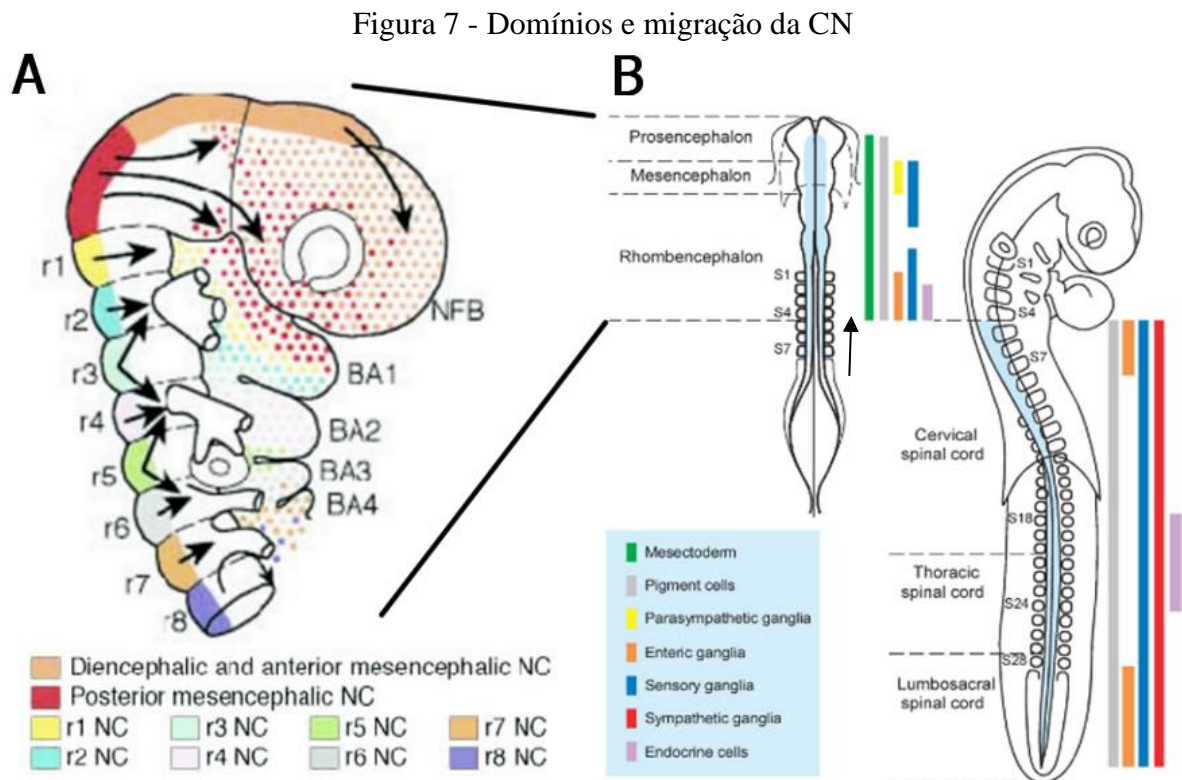


Fonte: Retirado de GILBERT (2017).

Nota: Em **A** temos um embrião durante o processo de neurulação, que inicia na região anterior em direção a região posterior do eixo axial embrionário (ver flecha preta em **A**). A imagem retrata com cortes transversais em diferentes regiões do embrião, as diferentes temporalidades do processo de neurulação ao longo do eixo axial embrionário, sendo este processo, mais desenvolvido na região anterior, que na posterior. Em **B** um esquema da formação do tubo neural através do dobramento da placa neural e formação da CN pela borda da placa neural em 1,2,3, seguido pela sua migração em 4. Importante destacar que cada região ao longo do eixo embrionário antero-posterior da figura **A** vai passar por todos os processos descritos em **B**, o que muda é o momento em que cada um deles vai ocorrer nas diferentes regiões.

A CN pode ser dividida em quatro principais domínios anatômicos (com sobreposição): CN truncal, CN vagal e sacral, CN cardíaca e CN cranial/cefálica. Dentre a diversidade de células produzidas pelos domínios da CN, estão os neurônios e células gliais dos sistemas nervosos sensorial, simpático e parassimpático; células produtoras de adrenalina da

glândula suprarrenal; melanócitos e componentes ósseos e cartilagosos do crânio (GILBERT, 2011) (ver figura 7). No entanto, a CN da região cefálica é o único domínio da CN com potencial de diferenciação condrogênica (para gerar cartilagem) e osteogênica (para gerar osso), *in vivo* (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975) (ver figura 7, B).



Fonte: Retirado de CREUZET et al. (2002); LE DOUARIN et al. (2004).

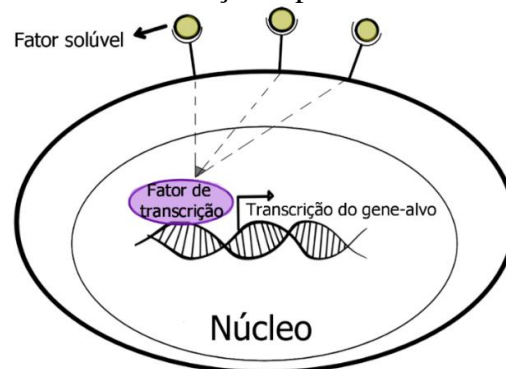
Nota: Em **A**, a migração das células da CN cefálica, mostrando os diferentes destinos para cada população migratória. Em **B**, os tipos de células formados pelas células da CN cefálica (esquerda) e a CN truncal (direita).

Cada derivado é representado por uma cor e o conjunto de cores relacionado ao embrião da esquerda faz referência aos derivados da CN cefálica enquanto que os do embrião a direita faz referência aos derivados da CN truncal. Em verde (ver flecha preta em B), a representação dos derivados mesectodermiais cartilagosos e ósseos, mostrando que somente o domínio da CN cefálica é capaz de origina-los.

A diferenciação celular pode ser definida como a restrição da potencialidade celular (potencial para formar diferentes tipos de células). Os fatores que controlam a diferenciação das células da CN podem ser intracelulares ou extracelulares. Os intracelulares são os fatores de transcrição produzidos pelas células em diferenciação. Já os fatores extracelulares são os fatores solúveis (sinalizadores) presentes no microambiente onde a célula está inserida. Estes fatores podem ser secretados por células de tecidos adjacentes e pelas próprias células da CN (YAN, 2005) e atuando de forma parácrina ou autócrina sobre as células-alvo, respectivamente

(BOLLENBACH et al., 2008; CAICEDO, 2013). Além destes, as proteínas da matriz extracelular também são capazes de influenciar na diferenciação das células da CN (BRONNER-FRASER, 1984; COSTA-SILVA et al., 2009; LORING; GLIMELIUS; WESTON, 1982). Os fatores solúveis e as proteínas presentes na matriz extracelular formam o microambiente embrionário, induzindo a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela migração e diferenciação das células-alvo (BRIAN K., 2009; CHEUNG et al., 2005; GILBERT, 2011) (ver figura 8).

Figura 8 - Mecanismo simplificado de uma molécula sinalizadora que atua como fator solúvel (morfógenos) sobre uma célula-alvo, induzindo a expressão ou ativação de fatores de transcrição específicos



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Na imagem acima, um esquema de como sinalizações extracelulares como as mediadas por morfógenos, podem desencadear respostas celulares como migração e diferenciação. Moléculas secretadas por células de tecidos específicos durante o desenvolvimento atuam como fator solúvel interagindo com receptores das células-alvo. Ao fazê-lo, desencadeiam cascatas de sinalização que resultam na indução da expressão ou na ativação de determinados fatores de transcrição e consequentemente, na alteração do comportamento celular.

A seguir, serão apresentadas as estruturas embrionárias que compõe o microambiente onde a trabécula é formada, bem como as sinalizações moleculares compostas por fatores solúveis que atuam sobre os fatores de transcrição durante a condrogênese na região craniofacial.

### 1.2.2 Contexto embrionário do desenvolvimento da trabécula

As células da CN que dão origem à trabécula emergem das bordas dorsais do tubo neural na região do diencéfalo posterior e mesencéfalo anterior em desenvolvimento. Estas células migram circundando a vesícula óptica através de dois caminhos: a via pré-óptica e pós-óptica (ver flechas vermelhas esquerda e direita, respectivamente, na figura 9, C) (COULY; COLTEY;

LE DOUARIN, 1993; JOHNSTON, 1966; KURATANI, 2005; LE LIEVRE, 1978; NODEN, 1975; SHIGETANI; NOBUSADA; KURATANI, 2000).

Ao chegarem na região pré-cordal, as células da CN que irão formar a cartilagem trabécula ficam localizadas especificamente na região dorsal do ectoderma do estomodeu (EE), onde vão iniciar o processo de formação inicial da trabécula (ver região em azul na figura 9, C) (WADA et al., 2005a). Derivado do ectoderma, o estomodeu dá origem a grande parte da cavidade bucal, formando a futura boca (HAMILTON, 1952).

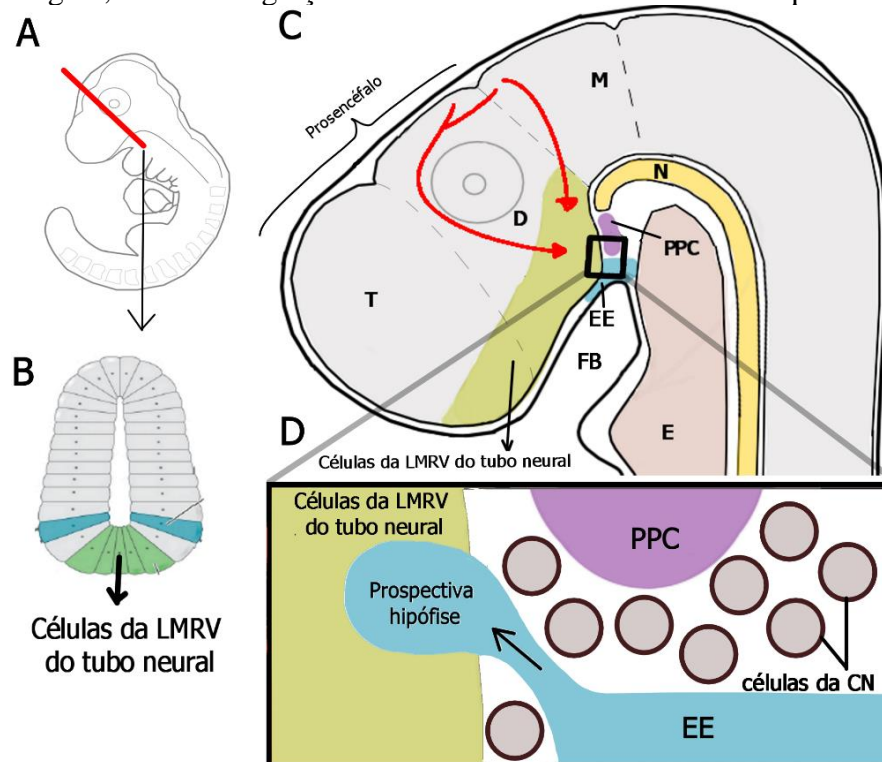
Acima da EE, estão as células da linha média ventral, caracterizadas por um conjunto de células neuroepiteliais originadas a partir da placa neural que, durante o fechamento do tubo neural, formam a linha média ventral deste (ver figura 9, B) (DALE et al., 1999; PLACZEK et al., 1990; PLACZEK; JESSELL; DODD, 1993). Estas células atuam na regulação da diferenciação de células neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados (PLACZEK et al., 1990).

Em diferentes níveis anteroposteriores do embrião, as células da linha média ventral exibem diferentes propriedades moleculares e atividades de sinalização (DALE et al., 1997). Ao nível do tubo neural caudal, as células da linha média ventral formam as células do assoalho (do inglês, “*floor plate*”) do tubo neural. Na região mais rostral do tubo neural onde é formado o prosencéfalo, as células da linha média adquirem características rostrais em comparação com o nível caudal, daí o nome células da linha média rostroventral (células da LMRV). Inicialmente estas células formam a região da linha média rostroventral da placa neural, que mais tarde irá formar o prosencéfalo (DALE et al., 1997, 1999). Quando o prosencéfalo divide em diencéfalo e telencéfalo, estas células passam a formar as células da LMRV do diencéfalo/telencéfalo, respectivamente. No presente trabalho, por uma questão de padronização, este conjunto de células será chamado de “células da LMRV do tubo neural”, independente do período do desenvolvimento.

Logo atrás do estomodeu está localizada a Placa pré-cordal (PPC). A PPC é formada por um conjunto de células do mesoderma cujo limite com a EE está localizado logo abaixo das células da LMRV do tubo neural, mais especificamente, no local de invaginação da EE para formar a futura hipófise (ver figura 9, D) (HAMILTON, 1952). Além disso, a PPC está localizada imediatamente anterior a notocorda (ver figura 9, C) (HAMILTON, 1952), formando o limite pré-cordal (pela PPC) e cordal (pela notocorda).

Diante do contexto das estruturas embrionárias pré-cordais durante a formação da trabécula, esta cartilagem inicialmente se forma acima da EE, abaixo das células da LMRV do tubo neural e à frente da PPC (ver esferas marrom na figura 9, D).

Figura 9 - Origem, rotas de migração e destino final das células da CN que irão a trabécula



Fonte: **A**, **C** e **D** produzidos pela autora (2021) e **B** retirado de GILBERT (2011).

Nota: Em **A**, esquema de embrião de *Mus musculus* mostrando em vermelho o local da seção coronal apresentada em **B**. Em **B**, esquema mostrando seção coronal do tubo neural com destaque para as células da LMRV do tubo neural em verde. Em **C**, visão lateral de embrião de *Gallus gallus* após a chegada das células da CN na região dorsal da EE. As células da CN que sofrem TEM do diencéfalo posterior migram pela rota pré-óptica (flecha vermelha da esquerda em **C**). Já as células da CN que sofrem TEM do mesencéfalo anterior migram pela rota pré-óptica e pós-óptica (bifurcação da flecha esquerda e flecha direita vermelhas em **C**). Ao final do processo migratório, as células que migraram por ambas as rotas chegarão na EE, onde irão condensar para formar a trabécula. Na figura **D**, local de formação da futura hipófise anterior no encontro da PPC, EE e células da LMRV do tubo neural, corroborando com a formação da região anterior do fenda hipofisária pela parte posterior da trabécula (em caso de dúvidas, rever figura 5). D, diencéfalo; E, endoderma; EE, ectoderma do estomodeu; FB, futura boca; M, mesencéfalo; N, notocorda; PPC, placa pré-cordal; T, telencéfalo.

Portanto, a população de células da CN que irá formar a trabécula migra para a região formada pelo encontro de três estruturas embrionárias pré-cordais: a PPC, a EE e as células da LMRV do tubo neural (ver quadrado preto na figura 9, C). Logo, estas três estruturas embrionárias se tornaram alvo de estudo no presente trabalho, por poderem participar da formação do microambiente molecular, que permite o desenvolvimento da trabécula.

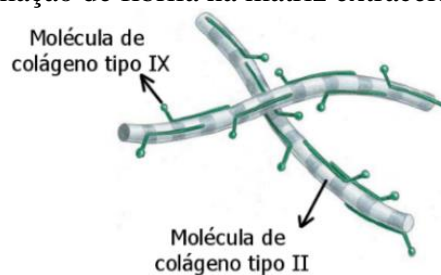
### 1.2.3 Mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento da trabécula na região pré-cordal

A condrogênese é um processo de várias etapas cuidadosamente orquestrado, onde a regulação desse processo requer a interação de um grande número de fatores, que podem ser fatores extrínsecos, como moléculas sinalizadoras indutivas de tecidos circundantes e fatores intrínsecos, como proteínas produzidas dentro dos próprios condrócitos. Em resposta a conjuntos específicos de fatores extrínsecos, como os fatores de crescimento, as células ativam, de acordo com o estágio de diferenciação condrogênica, a expressão de conjuntos únicos de fatores de transcrição, que as comprometem com comportamentos celulares particulares, incluindo diferenciação. Por sua vez, uma consequência da expressão desses fatores de transcrição é a regulação da secreção de outras proteínas. Esses fatores intrínsecos e extrínsecos são, portanto, componentes de uma integrada e complexa rede de interações moleculares (KRONENBERG; MCMAHON; TABIN, 2009).

#### 1.2.3.1 Fator de transcrição e proteína de matriz-extracelular

Um dos principais componentes do esqueleto dos vertebrados são os colágenos fibrilares, dos quais o colágeno tipo II é codificado pelo gene *COL2A* (BRIAN K., 2005). O colágeno tipo II constitui a maior parte de proteínas secretadas na matriz extracelular, onde se encontra associado com outros tipos de colágeno, como o colágeno IX (DE CROMBRUGGHE; AKIYAMA, 2009) (ver figura 10).

Figura 10 - Formação de fibrila na matriz extracelular de cartilagem



Fonte: Retirado de ALBERTS (2017).

Nota: Molécula de colágeno tipo IX associada ao colágeno tipo II para formação de fibrilas na matriz extracelular de cartilagem.

Durante a condrogênese, *COL2A* é expresso pelas células que formam condrócitos junto a *SOX9*, uma proteína que atua como fator de transcrição, sugerindo uma interação entre



ambos (DE CROMBRUGGHE; AKIYAMA, 2009). Essa possibilidade é apoiada por trabalhos que identificaram sequências regulatórias que possuem sítios de ligação para SOX no primeiro íntron do gene *COL2A1* (LEFEBVRE et al., 1997; NG et al., 1997; ZHOU et al., 1998), mostrando que SOX9 atua sobre a expressão de *COL2A1* regulando-o positivamente através da sua ligação nestas sequências regulatórias (ver figura 11).

Figura 11 - SOX9 ativa a expressão de *COL2A1*



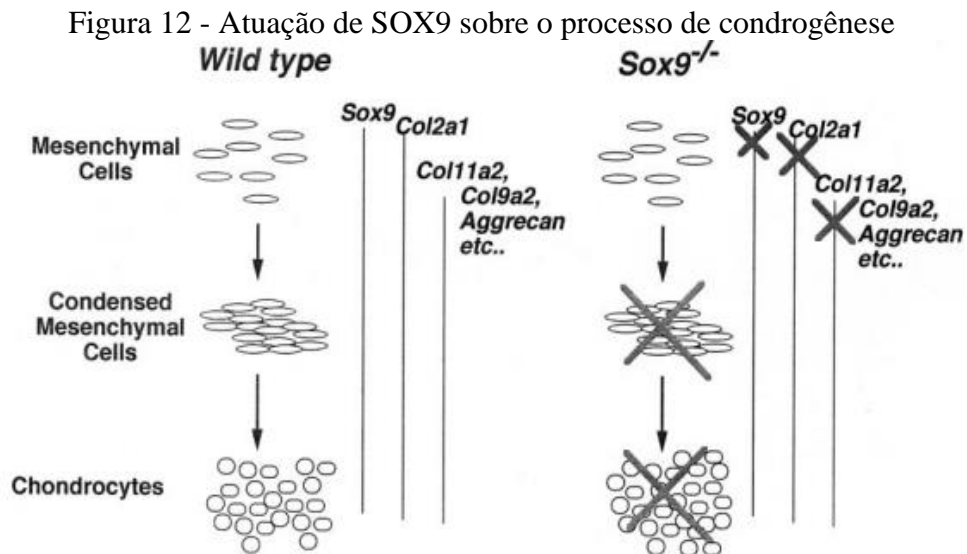
Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Ligação de SOX9 em regiões regulatórias de *COL2A1*, induzindo a sua transcrição durante o processo de condrogênese.

Durante o desenvolvimento de *Mus musculus*, a expressão de *Sox9* foi detectada em todos os progenitores de condrócitos, mas sua expressão é abolida em condrócitos hipertróficos, sugerindo um papel crucial de *Sox9* no desenvolvimento de cartilagem (NG et al., 1997; WRIGHT et al., 1995; ZHAO et al., 1997). A evidência definitiva da importância dos níveis de SOX9 na condrogênese veio de estudos em *Mus musculus*, no qual embriões mutantes heterozigotos para *Sox9* manifestaram alterações esqueléticas conhecidas como displasia campomélica (BI et al., 2001; KIST et al., 2002). Nestes mutantes, condensações mesenquimais condrogênicas menores ocasionam diminuição na formação de ossos endocondrais. Os mutantes também mostram um aumento dos condrócitos hipertróficos e mineralização prematura dos ossos endocondrais. Esses resultados fornecem evidências de que um nível adequado de SOX9 é necessário para a condensação adequada das células mesenquimais formadoras de cartilagem e a diferenciação de condrócitos hipertróficos (DE CROMBRUGGHE; AKIYAMA, 2009).

A letalidade em embriões de *Mus musculus* mutantes heterozigotos para *Sox9* impossibilita o uso de cruzamentos de animais heterozigotos para gerar mutantes homozigotos para *Sox9* a fim de compreender mais sobre o papel do gene SOX9 na condrogênese. Esse obstáculo foi superado pela geração de quimeras de embrião de *Mus musculus* através da injeção de células-tronco embrionárias mutante homozigótica para *Sox9* (*SOX9*<sup>-/-</sup>) em blastocistos de tipo selvagem (*SOX9*<sup>+/+</sup>). Portanto, a composição celular dos embriões

quimeras consistiu em células tipo selvagem e mutantes para *Sox9*. As células mutantes para *Sox9* foram incapazes de expressar marcadores condrogênicos típicos, como *Col2a1*, *Col9a2*, *Col11a2* e agrecana (ver figura 12), sugerindo que SOX9 é necessário para o comprometimento das células formadoras de cartilagem com a diferenciação para a linhagem celular condrogênica (BI et al., 1999).



Fonte: Retirado de DE CROMBRUGGHE et al. (2000).

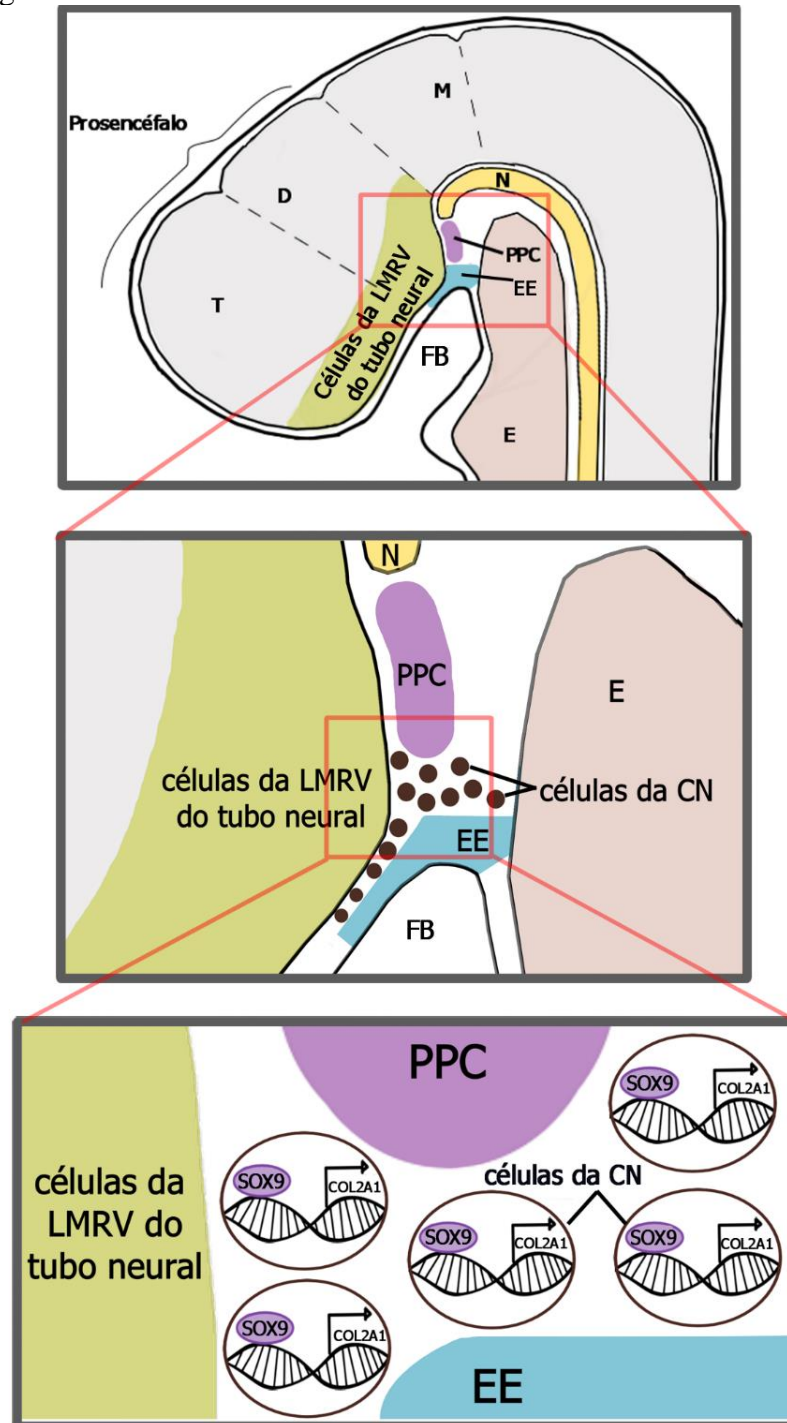
Nota: Esquema mostrando células de selvagens (esquerda) e células mutantes homocigóticas para *Sox9* (direita) durante o processo de condrogênese. Em células com expressão normal de *Sox9*, a expressão de marcadores condrogênicos ocorre normalmente, assim como o processo de condensação e diferenciação de condrócitos. Já em células sem expressão de *Sox9*, a expressão de outros marcadores importantes no processo de condrogênese não ocorre, assim como a condensação e diferenciação das células para formar cartilagem.

E por fim, a expressão de *SOX9* é necessária para a determinação da linhagem celular condrogênica pelas células da CN cefálica, pois sua inativação resulta em ausência completa de cartilagens e ossos endocondrais derivados destas células (MORI-AKIYAMA et al., 2003).

Portanto, a partir destas informações, chamam a atenção três pontos: (1) SOX9 e COL2A1 são duas proteínas importantes envolvidas no processo de condrogênese; (2) SOX9 atua dentro das células progenitoras de condrócitos como um fator de transcrição, induzindo a expressão de genes-alvo como o próprio *COL2A1*; (3) COL2A1 é uma proteína secretada do tipo colágeno, que atua na matriz extracelular de células progenitoras de condrócitos durante o processo de condrogênese (ver figura 13).



Figura 13 - SOX9 e COL2A1 inseridos no nosso contexto de estudo



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Na imagem acima temos três perspectivas espaciais do contexto de formação da trabécula, indo de uma perspectiva menos aproximada para uma mais aproximada. À medida que as aproximações vão acontecendo, é possível ver na última imagem as células da CN expressando *Sox9*, que ativa a expressão de *Col2A1*, induzindo a sua expressão durante o processo de condrogênese da trabécula. D, diencéfalo; E, endoderma; FB, futura boca; M, mesencéfalo; N, notocorda; T, telencéfalo.

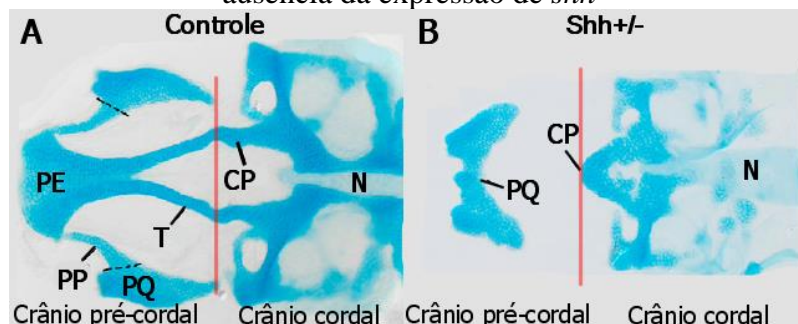
### 1.2.3.2 Fator solúvel

Com relação aos fatores solúveis, dentre os diversos fatores sinalizadores relacionados ao processo de condrogênese, está Sonic Hedgehog Protein (SHH). SHH é uma proteína sinalizadora que pode agir de forma autócrina e parácrina sobre a célula-alvo, atuando como um morfógeno durante o desenvolvimento (GILBERT, 2011), sendo um fator de sinalização chave no processo de formação de cartilagem (WADA et al., 2005b).

De acordo com YOUNG et al. (2006), a base cranial parece ser uma estrutura esquelética na qual o crescimento e padrão de ossificação ao longo do seu eixo antero-posterior é orquestrado por SHH. Além disso, segundo WADA et al. (2005b), *SHH* é expresso em vários tecidos craniofaciais, e uma ou mais dessas fontes podem estar mediando a padronização do neurocrânio anterior.

A fim de analisar qual a necessidade da expressão de *shh* para a formação no neurocrânio anterior, EBERHART et al. (2006) realizaram experimentos utilizando embriões de *Danio rerio* mutantes heterozigotos para *shh* (*shh*<sup>+/-</sup>), nos quais um dos alelos é hipomórfico. Os embriões mutantes tiveram perda da trabécula que compõe o neurocrânio anterior e do processo pterigoide, que faz parte do lábio dorsal e conecta a mandíbula ao neurocrânio (ver figura 14). Estes dados apontam para uma necessidade da expressão de *shh* para a formação de cartilagem na região pré-cordal. Estruturas da região cordal, como as cartilagens paracordais, não foram alteradas (ver PC em figura 14, A).

Figura 14 - Trabécula não desenvolve para formar o neurocrânio anterior (pré-cordal) na ausência da expressão de *shh*



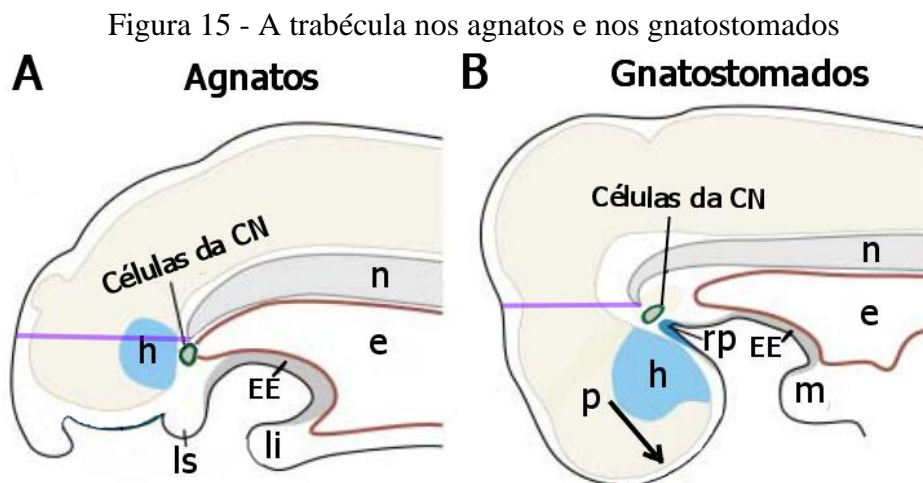
Fonte: Retirado de EBERHART et al. (2006).

Nota: Embriões de *Danio rerio* com 4dpf. Em **A** um embrião selvagem. Em **B**, embrião mutante para *shh* <sup>+/-</sup>, nos quais não desenvolvem a cartilagem trabécula no neurocrânio anterior e o processo pterigoide, no esplanocrânio. T, Trabécula; PE, Placa Etmoidal; CP, Cartilagem polar; PP, Processo pterigoide; N, Notocorda; PQ, Palatoquadrado.

Estes dados apontam fortemente para a importância da sinalização de Shh para o processo de formação da trabécula. No entanto, apesar da participação de Shh no processo de condrogênese como descrito acima, a existência desses múltiplos eventos de sinalização no desenvolvimento craniofacial significa que os precisos papéis de sinalização shh em etapas individuais permanecem amplamente não resolvidos (EBERHART et al., 2006).

#### 1.2.4 A trabécula localizada no neurocrânio pré-cordal é uma sinapormofia dos gnatostomados

Nos agnatos (animais que não tem mandíbula e maxila) a estrutura homóloga à trabécula forma o lábio superior. Já nos gnatostomados (animais que têm mandíbula e maxila), devido a expansão rostral do tubo neural para formar o volumoso córtex cerebral (ver flecha preta na figura 15, B), ocorreu uma reorganização do aparato oral. Essa alteração parece ter levado as células da CN que formavam o lábio superior dos agnatos (representada em verde na figura 15, A) a formarem o neurocrânio pré-cordal nos gnatostomados através da sua incorporação no neurocrânio destes (representadas em verde na figura 15, B) (KURATANI, 2018; KURATANI; AHLBERG, 2018).



Fonte: Modificado a partir de KURATANI (2004).

Nota: Nos agnatos, as células da CN (em verde) formam o lábio superior (ls). Já nos gnatostomados as células da CN (em verde) formam a trabécula. As esferas verdes representam as células da CN após a sua migração do tubo neural, no destino final para começar a condensar e formar a trabécula. A flecha preta significa a expansão rostral do tubo neural durante a transição dos agnatos para os gnatostomados. O traço em roxo delimita a região pré-cordal e cordal nos agnatos e gnatostomados. e, endoderma; h, hipotálamo; li, lábio inferior; ls, lábio superior; m, mandíbula; n, notocorda; rp, rathke's pouch (local de formação da futura hipófise).

Comparando agnatos e gnatostomados, é possível observar dois contextos principais com relação à expansão do sistema nervoso central e a localização da trabécula no desenvolvimento craniofacial dos vertebrados. Nos agnatos, representados atualmente por lampreias e peixe-bruxa, o tubo neural expande muito pouco durante o desenvolvimento. Logo, a extremidade rostral da notocorda está localizada mais próxima da extremidade rostral da cabeça (ver na figura 15, A o traço em roxo mostrando a extremidade rostral da notocorda). Com menos espaço “livre” de notocorda na cabeça, e a região pré-codal é menor. Já nos gnatostomados, o tubo neural apresenta grande expansão, e conseqüentemente, a extremidade rostral da notocorda fica mais afastada da extremidade rostral da cabeça e, proporcionalmente, mais posterior ao longo do eixo axial (ver na figura 15, B o traço em roxo mostrando a extremidade rostral da notocorda). Portanto, há mais espaço livre de notocorda na cabeça, aumentando a região pré-codal dos gnatostomados em relação aos agnatos.

Isso faz com que o neurocrânio dos agnatos seja predominantemente formado na presença da notocorda, corroborando com a sua origem mesodérmica. Neste contexto, a estrutura homóloga à trabécula não participa da formação do neurocrânio e sim do lábio superior. Já nos gnatostomados, uma parte do neurocrânio é formado na ausência de notocorda e outra parte na presença, corroborando com a sua origem derivada nas células da CN e mesoderma. E neste contexto, a expansão rostral do tubo neural permitiu a incorporação do mesênquima que formava o lábio superior dos agnatos ao neurocrânio dos gnatostomados (DE BEER, 1931, 1937a; KARDONG, 2009; KURATANI; AHLBERG, 2018), tornando a trabécula como elemento do neurocrânio pré-codal, uma sinapormofia dos gnatostomados (KURATANI; OTA, 2009). Logo, o mecanismo de sinalização envolvido na formação da trabécula possivelmente possui muitas interações moleculares sinapormórficas também.

Dentro deste contexto, é provável que alterações morfológicas que ocorreram durante o processo evolutivo de transição dos agnatos para os gnatostomados afetaram as interações moleculares entre estruturas embrionárias da cabeça. Estas conversas moleculares ocorrem principalmente através de fatores solúveis e fatores de transcrição, que formam o microambiente onde as células da CN migram e diferenciam. Portanto, tais alterações morfológicas contribuem para mudanças na formação da trabécula, pois a diferenciação das células da CN que irão formar esta estrutura depende da conversa molecular presente no

microambiente. Interessantemente, isso torna o contexto molecular presente no microambiente de formação da trabécula dos gnatostomados uma sinapormofia deste táxon.

*Portanto, a hipótese deste trabalho é de que o microambiente formado pelo arranjo tecidual na região pré-cordal dos gnatostomados atua sobre a formação inicial da trabécula através da indução da expressão de SOX9 e COL2A nas células da CN cefálica.*

Dentro deste contexto de estudo, a pergunta principal que moveu este trabalho foi:

*Como os tecidos pré-cordais coordenam molecularmente a formação da trabécula?*

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar como estruturas embrionárias presentes na região pré-cordal atuam molecularmente sobre as células da CN cefálica para formar a cartilagem trabécula

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

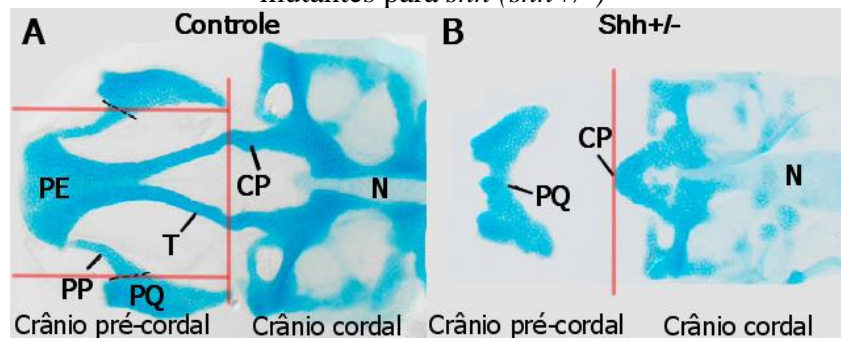
- ✓ Identificar os genes expressos nas estruturas pré-cordais (PPC, EE, células da LMRV do tubo neural e células da CN cefálica) em comum para *G. gallus*, *D. rerio* e *M. musculus* através da análise de bancos de imagens;
- ✓ Selecionar, dentre os genes expressos nas estruturas pré-cordais, os que tem relação com a atividade de SHH nestas estruturas através de pesquisa bibliográfica;
- ✓ Estabelecer correlações moleculares complementares entre os genes expressos na PPC, EE, e células da LMRV do tubo neural, utilizando pesquisa bibliográfica e ferramentas de bioinformática.

## **3 DESENVOLVIMENTO**

### **3.1 JUSTIFICATIVA**

Estudos anteriores realizados por WADA et al. (2005) apontam para a ausência da cartilagem trabécula em embriões mutantes heterozigóticos para *shh* (*shh*<sup>+/-</sup>) (ver figura 16).

Figura 16 - Trabécula não desenvolve para formar o neurocrânio pré-cordal em embriões mutantes para *shh* (*shh*<sup>+/-</sup>)



Fonte: Retirado de EBERHART et al. (2006).

Nota: Embriões de *Danio rerio* com 4dpf. Linhas horizontais vermelhas em **A** marcam o limite entre a região da linha média e regiões laterais. Linhas verticais vermelhas em **A** e **B** marcam o limite entre a região pré-cordal e cordal. Em **A** um embrião selvagem. Em **B**, embrião mutante para *shh* <sup>+/-</sup>, nos quais não desenvolvem a cartilagem trabécula no neurocrânio anterior ou o processo pterigoide, que atua como o lábio dorsal. T, Trabécula; PE, Placa Etmoidal; CP, Cartilagem polar; PP, Processo Pterigoide; N, Notocorda; PQ, Palatoquadrado.

Além da trabécula, o processo pterigoide também está ausente nestes embriões. Interessantemente, tanto a trabécula quanto o processo pterigoide, são localizados na linha média do crânio pré-cordal (delimitados pelos traços horizontais vermelhos na figura 16, A). Isso faz contraste com estruturas da região pré-cordal localizadas lateralmente, como o palatoquadrado ou com estruturas da região cordal, como as cartilagens paracordais. Estas estruturas estão presentes nos embriões mutantes *Shh*<sup>+/-</sup>, juntando-se na região da linha média na ausência da trabécula e processo pterigoide (WADA et al., 2005)

A perda da trabécula e do processo pterigoide formando a linha média do crânio pré-cordal, mas não da região lateral do crânio pré-cordal e cordal, aponta para uma distinta necessidade da sinalização *Shh* para a formação de estruturas cartilaginosas na linha média do crânio pré-cordal. Falha nas estruturas da linha média do crânio podem ocorrer durante o desenvolvimento, resultando em uma doença congênita chamada Holoprosencefalia. Esta doença é caracterizada por uma anomalia no desenvolvimento que pode se apresentar como uma variedade de malformações craniofaciais e neurais nas estruturas da linha média da cabeça, sendo caracterizada em casos mais graves, pela separação anormal do telencéfalo nos hemisférios esquerdo e direito (LANA-ELOLA et al., 2011) e ciclopia (ADELMANN, 1936). Bebês menos gravemente afetados demonstram anomalias craniofaciais específicas, incluindo fendas faciais na linha média e irregularidades nasais, com desenvolvimento cerebral normal

ou quase normal. As causas da holoprosencefalia podem ser exposição da gestante a teratógenos ou etiologia genética (HENDI et al., 2004; JEFFREY, A.; GOLDEN, 1998).

A diferença na necessidade de Shh para a formação de estruturas da linha média do crânio pré-cordal corrobora com o fato de que as células da CN progenitoras da trabécula e processo pterigoide migram do tubo neural para a região dorsal da EE. Já as células da CN progenitoras de estruturas laterais do crânio pré-cordal, como palatoquadrado, e outras estruturas do esplanocrânio como a cartilagem de Meckel, migram para regiões posteriores a ectoderma do estomodeu, denominadas primeiro arco branquial ou arco mandibular (WADA et al., 2005b). Alguns autores consideram que a região dorsal da EE, por ser anterior ao arco mandibular, como um domínio pré-mandibular. Aqui, o termo 'pré-mandibular' não implica na presença de um arco pré-mandibular, apenas uma posição rostral ao arco-mandibular (KURATANI, 2004). De qualquer forma, os resultados apresentados por WADA et al. (2005) mostram que o contexto de sinalização molecular ao qual as células da CN trabécula e o processo pterigoide estão sujeitas na região dorsal da EE, é bastante peculiar, especialmente com relação a necessidade de SHH no microambiente, tornando o contexto molecular presente no desenvolvimento destas estruturas importante de ser estudado.

Apesar do processo pterigoide fazer parte das células da CN que migram para a região dorsal da EE (WADA et al., 2005b), esta estrutura é considerada parte do esplanocrânio (LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, 2009). Muitos são os trabalhos presentes na literatura que abordam a influência de estruturas embrionárias como a EE e o tubo neural na formação de estruturas do esplanocrânio (HU; MARCUCIO, 2009; MARCUCIO et al., 2005). No entanto, pouquíssimos estudos abordam a influência de estruturas pré-cordais na formação do neurocrânio pré-cordal.

Portanto, a trabécula possui um desenvolvimento que despertou interesse na construção deste trabalho por dois motivos principais: (1) é formada por células da CN progenitoras submetidas ao microambiente molecular presente na região dorsal da EE, que mostrou ter uma dinâmica única quanto a necessidade de SHH e (2) é localizada no limite mais posterior do neurocrânio pré-cordal, fazendo fronteira com o neurocrânio cordal, cujo desenvolvimento recebe sinalização Shh vinda da notocorda. Como o desenvolvimento da trabécula ocorre em uma região de transição das estruturas embrionárias presentes durante a formação de cartilagem, levantou-se questionamentos sobre o papel de estruturas embrionárias

pré-cordais como a EE, PPC e células da LMRV do tubo neural na formação desta cartilagem. Compreender os processos moleculares associados ao desenvolvimento de estruturas da linha média do crânio, como a trabécula, contribuirá para a compreensão e uma grande gama de malformações craniofaciais.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ESTRUTURAS PRÉ-CORDAIS

Esta etapa consiste em um levantamento dos genes expressos na região pré-cordal (PPC, células da LMRV do tubo neural e EE) com o objetivo de criar um banco de dados destes genes. Para isso, foi analisado o padrão de expressão de genes ortólogos em três espécies: *Gallus gallus* (galinha), *Mus musculus* (camundongo) e *Danio Rerio* (peixe-zebra), que estão entre os modelos mais importantes para estudar biologia do desenvolvimento atualmente (STERN, 2005).

As ferramentas de análise dos padrões de expressão de genes foram quatro bancos de imagens: Gallus Expression *in Situ* Hybridization Analysis (GEISHA), disponível em [geisha.arizona.edu](http://geisha.arizona.edu), para o desenvolvimento de *Gallus gallus* (galinha); Mouse Genome Informatics (MGI), disponível em <http://www.informatics.jax.org> e Emouse Atlas (EMAGE), disponível em <https://www.emouseatlas.org/emage/home.php> para o desenvolvimento de *Mus musculus* (camundongo); e o The Zebrafish Information Network (ZFIN), disponível em <https://zfin.org>, para o desenvolvimento de *Danio rerio* (peixe-zebra).

O banco de imagens GEISHA possibilita pesquisar genes em uma determinada região anatômica e estágio do desenvolvimento embrionário sem necessariamente determinar qual o gene de interesse, a fim de que todos os genes possíveis apareçam nos resultados a serem analisados. Por isso, este foi o banco de imagens escolhido dentre os quatro (ZFIN, GEISHA e MGI/EMAGE) para iniciar o levantamento dos genes. Após o levantamento de genes expressos na região pré-cordal pelo GEISHA, estes foram analisados nos bancos de dados ZFIN e MGI/EMAGE a fim de excluir do estudo genes que não estão presentes nas três espécies de interesse.

Para buscar genes presentes na região pré-cordal (PPC, células da LMRV do tubo neural e EE) em um determinado estágio do desenvolvimento, foi utilizada a opção de busca por “múltiplos parâmetros”. Os parâmetros utilizados para o levantamento das expressões gênicas foram o padrão espacial e temporal das mesmas. As estruturas embrionárias



consideradas durante o levantamento foram a PPC, as células da LMRV do tubo neural e a EE. O período de análise vai desde o início do desenvolvimento das estruturas pré-cordais até o momento em que as células da CN chegam ao estomodeu para mais tarde, condensar e formar cartilagem (ver tabela 1).

Tabela 1 - Estágios para identificação da expressão de genes ortólogos nos bancos de imagens

Estrutura Anatômica	<i>Gallus gallus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio Rerio</i>
PPC	HH4 – HH11	E7.5 – E9.25	75%E – 15ss
células da LMRV do tubo neural	HH4 – HH21	E7.5 – E10.75	75%E – Prim25
EE	HH14 – HH25	E9.75- E11.75	27ss – Long-pec
Células da CN	HH9 – HH25	E9 – E11.75	7ss – Long-pec

Para *Danio rerio*, os períodos do desenvolvimento embrionário estão marcados pela porcentagem do embrião que sofreu epibolia (75%E), a quantidade de somitos (15ss), um momento específico do período da farínghula (Prim25) e a aparência das barbatanas dorsais (Long-pec). Em *Gallus gallus* os estágios são apresentados de acordo com a classificação de HAMBURGER; HAMILTON, 1951) e em *Mus musculus* são apresentados de acordo com os dias do desenvolvimento (E). E (para *Danio rerio*), epibolia; E (para *Mus musculus*), dias de desenvolvimento; HH, Hamilton and Hamburger; Long-pec, barbatana dorsal com o comprimento maior do que a largura da base; Prim, farínghula; ss, somitos; Tailbud, broto da caudal.

Para os períodos do desenvolvimento considerados, foi encontrado o grande desafio de realizar a “equivalência” dos estágios do desenvolvimento o mais fiel possível entre *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio* para a identificação dos genes ortólogos. Sendo assim, considerando que cada espécie apresenta particulares características temporais e morfológicas durante o desenvolvimento, foi realizado uma análise comparativa dos estágios do desenvolvimento entre estas três espécies que será apresentada nos resultados (ver item 5.2, figura 24).

Nesta etapa, como os materiais oferecidos pelo GEISHA utilizam apenas a técnica de hibridização *in situ*, foi padronizado para que durante a pesquisa nos outros bancos de imagens, somente resultados utilizando esta técnica fossem considerados. Portanto, a análise espacial e temporal dos padrões de expressão gênica na região pré-cordal foi executado analisando a expressão do RNA mensageiro dos mesmos. Além disso, somente genes que codificam proteínas que atuam como fatores solúveis ou fatores de transcrição foram selecionados.

#### 4.1.1 Análise em *Gallus gallus* – GEISHA

A plataforma GEISHA é um banco de dados com informações de padrões de expressão gênica em embriões de *Gallus gallus*, elaborado para mapear a localização de sequências de

mRNA expressas ao longo do desenvolvimento. É construído a partir de dados adicionados por pesquisadores individuais a partir de fontes publicadas (DARNELL et al., 2007).

Para a busca por “múltiplos parâmetros” no GEISHA, foram selecionados os estágios HH de acordo com HAMBURGER; HAMILTON (1951) desejados e as regiões anatômicas de interesse (ver figura 17).

Figura 17 - Página de busca pelo GEISHA

The screenshot displays the search interface for the GEISHA database. It is divided into two main sections: 'Stage' and 'Anatomical Location'.

**Stage Selection (Red Box):** This section allows users to select embryonic stages. The options are:
 

- Stage X:
- Stage XI:
- Stage XII:
- Stage XIII:
- Stage XIV:
- Stage 1:
- Stage 2:
- Stage 3:
- Stage 4:
- Stage 5:
- Stage 6:
- Stage 7:
- Stage 8:
- Stage 9:
- Stage 10:
- Stage 11:
- Stage 12:
- Stage 13:
- Stage 14:
- Stage 15:
- Stage 16:
- Stage 17:
- Stage 18:
- Stage 19:
- Stage 20:
- Stage 21:
- Stage 22:
- Stage 23:
- Stage 24:
- Stage 25:
- Stage 26:
- Stage 27:
- Stage 28:
- Stage 29:
- Stage 30:
- Stage 31:
- Stage 32:
- Stage 33:
- Stage 34:
- Stage 35:
- Stage 36:
- Stage 37:
- Stage 38:
- Stage 39:
- Stage 40:
- Stage 41:
- Stage 42:
- Stage 43:
- Stage 44:

**Anatomical Location Selection (Purple Box):** This section allows users to select specific anatomical locations. It includes:
 

- Early Embryo:**
  - Area Opaca:
  - Extraembryonic Mesoderm:
  - Area Pellucida:
  - Early Endoderm:
  - Early Mesoderm:
  - Epiblast:
  - Germinal Crescent:
  - Headfold:
  - Hypoblast:
  - Kohler's Sickle:
  - Primitive Streak:
  - Hensen's Node:
- Ectoderm:**
  - Central Nervous System:
  - Neural Crest:
  - Peripheral Nervous System:
  - Sensory Organs:
  - Surface Ectoderm:
  - Feathers/Scutae:
- Endoderm:**
  - Anterior Intestinal Portal:
  - Gut:
  - Liver:
  - Lung:
  - Pancreas:
  - Thyroid:
  - Germ Cells/PGCs:
  - Mesoderm:
    - Facial Muscles:
    - Head Mesenchyme:
    - Face Mesenchyme:
    - Head Process:
    - Trunk Mesenchyme:
    - Cardiovascular:
- Mesoderm (cont.):**
  - Intermediate Mesoderm:
  - Lateral Plate Mesoderm:
  - Notochord:
  - Paraxial Mesoderm:
  - Multiple Origins:
    - Extraembryonic:
    - Limb Buds:
    - Pharyngeal Arches and Clefts:
    - Tail:
    - Widespread Expression:
    - Ubiquitous:
    - Unlabeled:

 There are 'clear all' and 'set all' buttons at the top and bottom of the Anatomical Location section.

Fonte: Retirado de GEISHA, disponível em: <http://geisha.arizona.edu/geisha/advanced.jsp>

Nota: Opções para seleção durante a pesquisa por múltiplos parâmetros no GEISHA. No quadrado roxo, opções de seleção de localizações anatômicas do embrião de *Gallus gallus* e no quadrado vermelho, opções para seleção dos estágios embrionários do desenvolvimento.

#### 4.1.1.1 Termos anatômicos utilizados para busca

As estruturas embrionárias da região pré-cordal, utilizadas para as buscas no GEISHA, foram representadas pelos seguintes termos anatômicos de busca (ver quadro 1):

Quadro 1 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no GEISHA

Estruturas pré-cordais	Termos anatômicos utilizados para pesquisa
<p>PPC Células da LMRV do tubo neural</p>	<p><i>Early Mesoderm, Head Process Forebrain, Diencephalon, Hypothalamus e Neural Plate/Tube</i></p>
<p>EE Células da CN cefálica</p>	<p><i>Surface Ectoderm Neural Crest</i></p>

Como o GEISHA não oferece a opção de selecionar termos anatômicos mais específicos de acordo com os interesses do presente trabalho, esta especificidade se deu através de uma refinada análise das imagens, considerando apenas padrões de expressão gênica presentes nas estruturas pré-cordais de interesse. Por exemplo, no caso das células da CN cefálica, o termo anatômico de busca utilizado se refere à crista neural (“*neural crest*”) como um todo, no entanto, foram consideradas expressões somente no domínio, a CN cefálica. Para as células da LMRV do prosencéfalo foram analisadas expressões apenas na região ventral desta estrutura, uma vez que o termo anatômico de busca se refere a todo o prosencéfalo (“*forebrain*”), e não somente à região da linha média rostroventral; além disso, foram consideradas expressões que obrigatoriamente estivessem presentes no diencéfalo, independentemente de estarem presentes no telencéfalo, uma vez que a formação da trabécula ocorre ao nível axial do diencéfalo. A mesma lógica foi utilizada para a PPC, que nos termos anatômicos de busca foi referida como “*Early mesoderm, Head Process*”, mas durante as análises das imagens foram consideradas somente expressões especificamente na PPC. Já com a ectoderma do estomodeu/ectoderma oral, o termo disponível abordava toda a ectoderme (“*Surface ectoderm*”) mas ao analisar as imagens, foi possível selecionar somente as expressões no estomodeu/ectoderma oral.

#### 4.1.1.2 Estágios selecionados para busca

Para a determinação dos estágios embrionários para análise na PPC e nas células da LMRV do tubo neural, foi escolhido o momento em que a PPC se forma – por ser a primeira estrutura pré-cordal de interesse neste estudo a se formar durante o desenvolvimento - até o momento em que as células da CN presentes no local da prospectiva trabécula apresentam expressão dos primeiros genes marcadores de condensação para formar cartilagem (equivalente a HH4 - HH25 para *Gallus gallus*). Já na EE, a análise de genes foi realizada entre HH14-25, equivalente ao momento em que as células da CN chegam ao estomodeu até o período em que

iniciam o processo de condensação para formar cartilagem. E por fim, nas células da CN, os estágios analisados foram de HH9-25, pois é o momento em que estas células iniciam a TEM do tubo neural até o momento em que já iniciaram o processo de condensação para formação de cartilagem. Todos os estágios selecionados para *Gallus gallus* estão especificados na tabela 1, junto com *Danio rerio* e *Mus musculus*.

#### 4.1.2 Análise em *Danio rerio* - ZFIN

A plataforma The Zebrafish Network (ZFIN) coleta, organiza, e torna disponível uma ampla gama de dados sobre zebrafish, incluindo genes, função do gene, seqüências, mutantes, linhas transgênicas, modelos, expressão e fenótipo (DANIEL E SHUMER, 2017). Para a busca por “múltiplos parâmetros” pelo ZFIN, foram selecionados os estágios do desenvolvimento e as regiões anatômicas de interesse (ver figura 18).

Figura 18 - Página de busca pelo ZFIN

The screenshot shows the ZFIN search interface with the following elements:

- Modify your search** (with a help icon)
- Gene/EST**: Input field containing "shh".
- Fish**: Input field.
- Target Gene**: Input field.
- Author**: Input field.
- Anatomy Terms** (highlighted with a purple box):
  - ✘ [prechordal plate](#)
  - ✘ [axial mesoderm](#)
  - Input field
  - Include substructures
- Between stages** (highlighted with a red box):
  - Gastrula:75%-epiboly &
  - Segmentation:14-19 somites
  - [Developmental Staging Series](#)
- Assay**: mRNA in situ hybridization
- Filter options:
  - Show only WT expression
  - Show only reporter genes in transgenic fish
  - Show only figures with images
  - Show only direct submission data
  - Show only published literature
  - Show all
- Buttons: Search, Reset

Fonte: Retirado de ZFIN, disponível em: <https://zfin.org/action/expression/search>

Nota: Opções para seleção durante a pesquisa por múltiplos parâmetros no ZFIN. No quadrado roxo, opções de seleção de localizações anatômicas do embrião de *Danio rerio* e no quadrado vermelho, opções para seleção dos estágios embrionários do desenvolvimento.

##### 4.1.2.1 Termos anatômicos utilizados para busca

As estruturas embrionárias da região pré-cordal, utilizadas para as buscas no ZFIN, foram representadas pelos seguintes termos anatômicos de busca (ver quadro 2).

Quadro 2 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no ZFIN

Estruturas pré-cordais	Termos anatômicos utilizados para pesquisa
PPC Células da LMRV do tubo neural EE CN	Axial Mesoderm, Prechordal Plate Forebrain Oral Ectoderm, Stomodeum Neural Crest, Neural Crest Diencephalon, Neural Crest Midbrain

#### 4.1.3 Análise para *Mus musculus* - MGI e EMAGE

Para as análises de padrão de expressão gênica em *Mus musculus* foram utilizados dois bancos de dados. O objetivo disso foi complementar a análise, uma vez que para *Mus musculus* especificamente, mais de um banco de dados estava disponível.

O Mouse Genome Informatic (MGI) e o EMAGE são dois bancos de dados com dados de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário de *Mus musculus* (CHRISTIANSEN et al., 2006; EPPIG, 2017).

Para a busca por “múltiplos parâmetros” pelo MGI, foram selecionados os estágios do desenvolvimento para *Mus musculus* desejados e as regiões anatômicas de interesse (ver figura 19).

Figura 19 - Página de busca pelo MGI

The screenshot shows the MGI search interface with the following sections:

- Genes:** Find expression data for... One gene e.g., *Shh* or *kit* oncogene. Genes with similar nomenclature e.g., *Hoxa*\*. List of genes e.g., *Wnt1*, *Bmp7*, *En1*, *Isl1*... OR A set of genes defined by: Function e.g., *cell-cell signalling*, Phenotype e.g., *obese*, Disease e.g., *DiGeorge Syndrome*. Input: *bmp7*.
- Genome location:** Find expression data for a set of genes defined by genomic interval(s) (genome build GRCm39). e.g., *Chr12:3000000-10000000*. Input: [ ] bp.
- Anatomical structure or stage:** Find assay results where expression is  detected in  not detected in  either.
  - Anatomical Structures:** Input: *axial mesoderm TS11-21* (highlighted in a purple box).
  - AND / OR Developmental Stages:**
    - Use Theiler Stages | Use Ages (dpc)
    - Any, Embryonic, Postnatal, E0.5, E1.0, E1.5, E2.0 (highlighted in a red box).
- Mutant / wild type:** Find expression data in ...  Specimens mutated in gene: [ ]  Wild type specimens only  All specimens.
- Assay types:** Find expression data by assay type.
  - In situ assays:  Immunohistochemistry,  In situ reporter (knock in),  RNA in situ hybridization.
  - Blot assays:  Northern blot,  Nuclease S1,  RNase protection,  RT-PCR,  Western blot.
  - Whole genome assays:  RNA-Seq.

Fonte: Retirado de MGI, disponível em: <http://www.informatics.jax.org/expression.shtml>

Nota: Opções para seleção durante a pesquisa por múltiplos parâmetros no MGI. No quadrado roxo, opções de seleção de localizações anatômicas do embrião de *Danio rerio* e no quadrado vermelho, opções para seleção dos estágios embrionários do desenvolvimento.

Para a busca no EMAGE não foi possível utilizado a opção por “múltiplos parâmetros” como nos outros bancos de dados, uma vez que a opção para escolha das estruturas anatômicas de interesse não estava disponível nesta plataforma. Portanto, foram selecionados apenas os estágios do desenvolvimento para *Mus musculus* (ver figura 20).

Figura 20 - Página de busca pelo EMAGE

Gene / Protein:   exact match  
 include synonyms, common IDs and orthologues

Where is expression  from  to  ?

Fonte: Retirado de IMAGE, disponível em:

[https://www.emouseatlas.org/emagewebapp/pages/emage\\_gene\\_query.html](https://www.emouseatlas.org/emagewebapp/pages/emage_gene_query.html)

Nota: Opções para seleção durante a pesquisa no IMAGE. No quadrado vermelho, opções para seleção dos estágios embrionários do desenvolvimento.

#### 4.1.3.1 Termos anatômicos utilizados para busca

As estruturas embrionárias da região pré-cordal, utilizadas para as buscas no MGI foram representadas pelos seguintes termos anatômicos de busca (ver quadro 3).

Quadro 3 - Termos anatômicos utilizados para pesquisa no MGI

Estruturas pré-cordais	Termos anatômicos utilizados para pesquisa
PPC	<i>Prechordal Mesoderm, Prechordal Plate</i>
Células da LMRV do tubo neural	<i>Forebrain</i>
EE	<i>Oral Region Ectoderm, Stomodeum</i>
CN	<i>Neural Crest, Prosencephalon Neural Crest</i>

## 4.2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Para a seleção e análise de interações de genes, foram executados recrutamentos de artigos relacionados ao tema, realizado em duas etapas: (1) a etapa de **seleção de genes**, realizada com o objetivo de selecionar dentre os genes encontrados nos bancos de imagens, somente genes cujas proteínas são potencialmente envolvidas na formação da trabécula; e (2) etapa de **interações de genes**, realizada com o objetivo de aprofundar os mecanismos de interação entre as proteínas selecionadas. Para ambas, o levantamento bibliográfico foi realizado através do banco de dados PubMed, disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

Para elaborar uma busca mais refinada considerando variações nos nomes das estruturas embrionárias, foi utilizado nos termos de busca, variações de nomenclaturas como “Prechordal mesoderm” ou “Prechordal plate” para PPC, “Oral Ectoderm” ou “Stomodeum” para EE e “Cephalic Neural Crest” ou Cranial Neural Crest” para as células da CN cefálica.

#### 4.2.1 Etapa de Seleção de Genes

Nesta etapa, foram realizadas pesquisas bibliográficas sobre os genes expressos nas estruturas pré-cordais, identificados através dos bancos de imagens para *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*. O objetivo desta etapa foi selecionar dentre os genes identificados, somente genes que de acordo com a literatura, estão envolvidos diretamente ou indiretamente, na formação da trabécula.

Destes, o único gene que mostrou estar diretamente envolvido na formação da trabécula nos materiais encontrados através do levantamento bibliográfico, foi *SHH*. Portanto, a seleção de genes indiretamente envolvidos na formação inicial da trabécula se deu pelo recrutamento de genes que, de acordo com a literatura, codificam proteínas que interagem com a atividade de SHH na região pré-cordal. Esta interação é caracterizada pela alteração na expressão de um gene em função do outro nas estruturas pré-cordais onde eles foram identificados no presente trabalho. Esta análise, com um viés mais integrativo para as interações proteicas, foi realizada a fim de detectar novos genes que podem estar envolvidos no processo de formação da trabécula, mas que não são descritos como tais na literatura por atuarem indiretamente sobre este processo.

Nesta etapa, foram utilizados termos de busca compostos por:

*nome do gene + nome da estrutura embrionária pré-cordal onde ele é expresso*

Por exemplo:

*((SIX3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]))*

#### 4.2.2 Etapa de Interação de Genes

Após a seleção de genes codificadores de proteínas potencialmente atuantes na formação da trabécula, foi executado um segundo levantamento bibliográfico para contemplar o máximo possível de informações que mostrassem como ocorrem as interações entre estas

proteínas. Consequentemente, esta parte do levantamento bibliográfico possibilitou analisar informações mais específicas sobre estas interações, como os mecanismos celulares envolvidos nestas interações. Nesta etapa, foram traçadas buscas envolvendo duas proteínas por vez, contemplando todas as combinações possíveis entre as proteínas selecionadas. Importante pontuar que para proteínas expressas em locais diferentes, foram consideradas buscas diferentes para cada local de expressão desta mesma proteína.

Para isso, se utilizou termos de busca constituídos por três combinações possíveis. Primeiro, o padrão de busca contendo o nome das duas proteínas envolvidas na interação e o local onde cada uma foi encontrada, totalizando quatro termos no padrão de busca.

*nome da proteína 1 + nome da proteína 2 + local de expressão da proteína 1 + local de expressão da proteína 2*

Por exemplo:

*((SHH[Title/Abstract]) AND (SIX3[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]))*

Para proteínas expressas no mesmo local, foi utilizado o nome das proteínas e o nome do local onde ambas são expressas, totalizando três termos no padrão de busca.

*nome da proteína 1 + nome da proteína 2 + local de expressão de ambas*

Por exemplo:

*((SHH[Title/Abstract]) AND (SIX3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]))*

E para a mesma proteína que teve padrão de expressão em mais de uma estrutura pré-cordal, foi utilizado o nome dela e o nome de duas das estruturas onde foi expressa, por vez, totalizando termos no padrão de busca.

*nome da proteína + local de expressão 1 + local de expressão 2*

Por exemplo:

*((SHH[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]))*



### 4.2.3 Etapa de Busca Ampliada

Os trabalhos encontrados no banco de dados PubMed pela etapa de seleção de genes - realizada a fim de selecionar genes potencialmente envolvidos na formação da trabécula - e pela etapa de interação de genes - realizada a fim de aprofundar a compreensão das interações entre as proteínas codificadas pelos genes selecionados -, moveram boa parte da base de dados utilizada para construir os resultados deste trabalho. Além disso, ao longo do desenvolvimento do trabalho, surgiu a necessidade da realização de buscas amplificadas para tópicos bastante específicos do trabalho a fim de aprofundar o desenvolvimento deste com conteúdos encontrados fora dos termos de busca padrões citados anteriormente. Nesta etapa, outros termos de busca foram utilizados.

Por exemplo:

*(shh[Title/Abstract]) AND (sox9[Title/Abstract] )*

Os materiais encontrados nos levantamentos bibliográficos realizados pelo PubMed foram utilizados para a criação de um banco de dados.

## 4.3 ANÁLISES COMPLEMENTARES DOS GENES SELECIONADOS

### 4.3.1 GeneCards

Os genes encontrados através do levantamento de dados no GEISHA, ZFIN, MGI e EMAGE foram selecionados através das informações encontradas no levantamento bibliográfico feito pelo PubMed, foram posteriormente analisadas no GeneCards. O GeneCards é um banco de dados pesquisável e integrativo que fornece informações abrangentes e fáceis de usar sobre todos os genes humanos anotados e previstos. Disponível em <https://www.genecards.org>, integra automaticamente dados de genes como informações genômicas, transcriptômicas, proteômicas, genéticas, clínicas e funcionais (STELZER et al., 2016).

### 4.3.2 SIGnaling Network Open Resource - SIGNOR

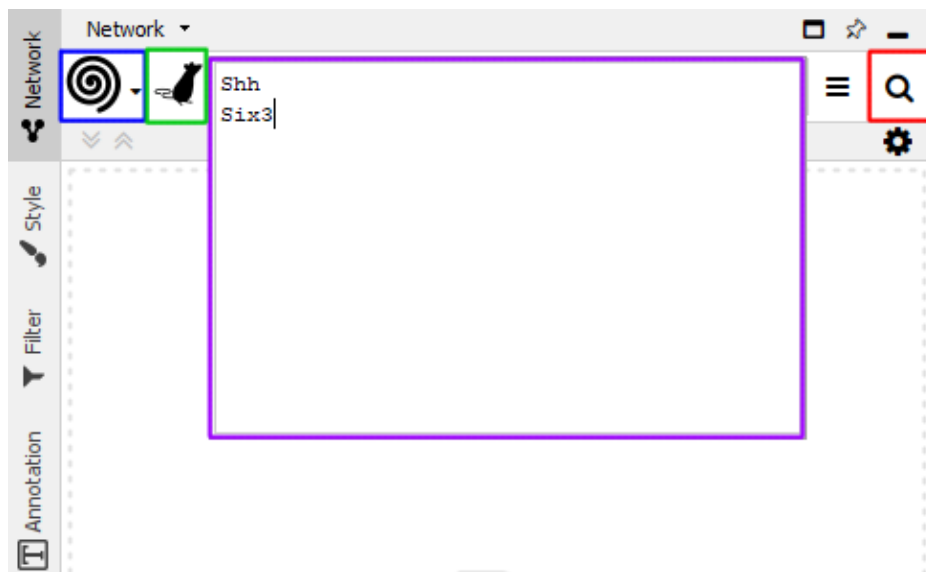
Análise de vias de sinalização foram realizadas utilizando o Signor - SIGnaling Network Open Resource – disponível em <https://signor.uniroma2.it>, é uma base de dados que

capta interações causais entre proteínas e outras entidades biológicas e tem o mesmo objetivo de precisão, profundidade de curadoria e cobertura que foi alcançado com bancos de dados de interação de proteínas (PERFETTO et al., 2016).

### 4.3.3 GeneMANIA

As análises de interações entre proteínas foram realizadas na plataforma GeneMANIA, disponível em <https://genemania.org>. O GeneMANIA é um site utilizado para gerar hipóteses sobre a função de um gene por meio de análise e priorização de genes para a realização de ensaios funcionais através de dados de genômica e proteômica. No entanto, para gerar as análises para este trabalho, foi utilizado o Software Cytoscape com Plugin para o GeneMANIA. Optouse por analisar nos resultados, os vinte genes mais relevantes para a interação entre os genes escolhidos para análise (ver imagem 21, quadrado roxo).

Figura 21 - Realizando pesquisa utilizando GeneMANIA



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Para iniciar as análises de interação entre genes pelo GeneMANIA é utilizado inicialmente, a opção para seleção do plugin do GeneMANIA (quadrado azul). Ao selecionar este plugin, irá aparecer as opções para seleção da espécie para a qual será feita a análise (quadrado verde) e uma caixa para escrever os nomes dos genes a serem analisados na interação (quadrado roxo). Após o preenchimento destas, por último, é selecionado a opção para iniciar pesquisa (quadrado vermelho).

Dado um ou mais genes de consulta, o GeneMANIA encontra genes propensos a compartilhar funções com ele com base em suas interações (FRANZ et al., 2018) (ver os tipos de interações no quadro 4).

Quadro 4 - Tipos de interações presentes no GeneMANIA

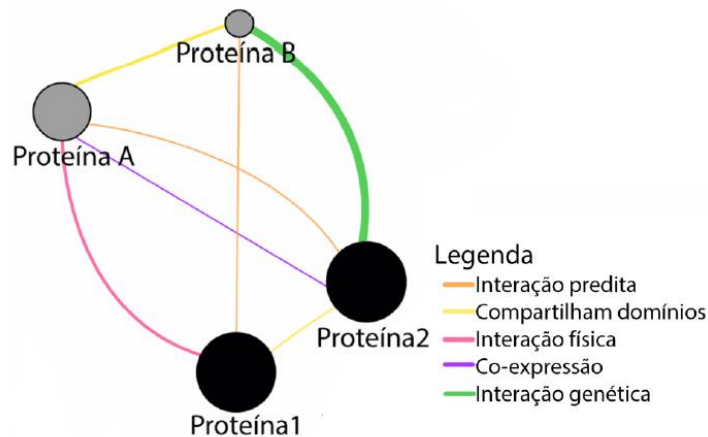
<b>Tipo de Interação</b>	<b>Características da Interação</b>
<b>Co-expressão</b>	Genes ligados por níveis de expressão semelhantes em estudos de expressão gênica. A maioria desses dados são coletados do Gene Expression Omnibus (GEO), onde o GeneMANIA apenas coleta dados associados a uma publicação.
<b>Interação física</b>	Genes ligados por interagirem em um estudo de interação proteína-proteína. Esses dados são coletados de estudos primários encontrados em bancos de dados de interação de proteínas, incluindo BioGRID e PathwayCommons.
<b>Interação genética</b>	Genes funcionalmente associados se os efeitos da perturbação de um gene forem modificados por perturbações em um segundo gene. Esses dados são coletados de estudos primários e BioGRID.
<b>Domínios proteicos compartilhados</b>	Genes ligados por ter o mesmo domínio de proteína. Esses dados são coletados de bancos de dados de domínio, como InterPro, SMART e Pfam.
<b>Co-localização</b>	Genes ligados por serem expressos no mesmo tecido
<b>Via de Sinalização</b>	Genes ligados se participarem da mesma reação dentro de uma via. Esses dados são coletados de vários bancos de dados de origem, como Reactome e BioCyc, via PathwayCommons.
<b>Prevista</b>	Frequentemente relacionada a interações de proteínas, a principal fonte de dados previstos é o mapeamento de relações funcionais conhecidas de outro organismo por meio da ortologia. Por exemplo, é previsto que duas proteínas interajam se seus ortólogos são conhecidos por interagir em outro organismo.
<b>Outros</b>	Redes que não se enquadram em nenhuma das categorias acima, como correlações de fenótipo.

Para encontrar genes relacionados, o GeneMANIA pesquisa grandes conjuntos de dados biológicos publicamente disponíveis. Estes incluem proteína-proteína, proteína-DNA e interações genéticas, vias, reações, dados de expressão de genes e proteínas, domínios de proteínas e perfis de triagem fenotípica (WARDE-FARLEY et al., 2010).

Com isso, o aplicativo usa o algoritmo GeneMANIA para encontrar outros genes e produtos genéticos que estão mais relacionados à lista original e mostra como eles estão relacionados. Na análise do resultado, cada nó representa um gene e seus produtos (FRANZ et al., 2018; WARDE-FARLEY et al., 2010) (ver figura 22).

Além disso, os usuários podem personalizar sua pesquisa selecionando a espécie e conjuntos de dados específicos para análise (FRANZ et al., 2018). A plataforma GeneMANIA não apresenta dados de proteínas para a espécie *Gallus gallus* portanto, as análises foram realizadas somente para *Mus musculus* ou *Danio rerio*.

Figura 22 - Exemplo de análise proteica



Fonte: Produzido por Alessandra Barauna (2020).

#### 4.4 CONFECÇÃO DE IMAGENS

As imagens produzidas pela autora deste trabalho foram criadas a partir do Krita, um programa de pintura profissional gratuito, disponível para download em <https://krita.org/en/>.

### 5 RESULTADOS

Os resultados apresentados neste trabalho são produtos de uma extensa revisão bibliográfica, associados a análises realizadas em plataformas e bancos de dados de acesso aberto. A apresentação dos resultados foi dividida em partes I e II.

A **parte I**, será apresentada pelos seguintes tópicos:

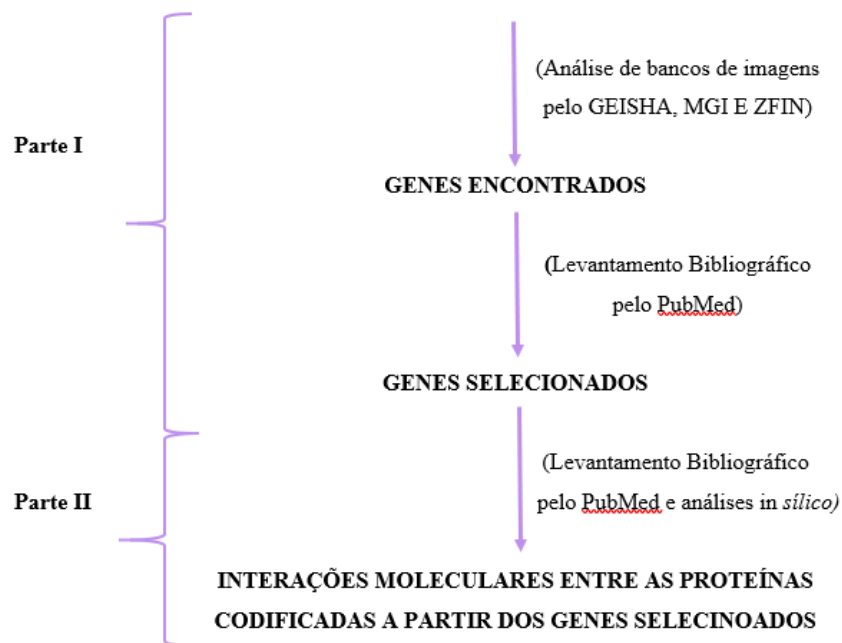
**1) Identificação de genes expressos nas estruturas pré-cordais de estudo** (PPC, EE, células da CN e células da LMRV do tubo neural), feitas através dos bancos de imagens para *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*;

**(2) Análise comparativa dos estágios do desenvolvimento** de *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*, utilizada para realizar as análises de expressão gênica feitas através dos bancos de imagens (tópico 1) em estágios equivalentes do desenvolvimento para as três espécies, considerando as particularidades do desenvolvimento de cada uma;

**(3) Seleção de Genes**, realizada para eleger, dentre os genes expressos nas estruturas pré-cordais de estudo em *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*, aqueles envolvidos com a atividade de SHH na região pré-cordal e, portanto, potencialmente envolvido na formação da trabécula. Esta seleção foi realizada através da primeira etapa do levantamento bibliográfico: **etapa de seleção de genes**.

Na parte II será apresentada a **(4) rede regulatória formada por interações entre as proteínas codificadas pelos genes selecionados**. Esta etapa consiste na junção dos resultados da primeira e da segunda etapa do levantamento bibliográfico, etapa de seleção e interação de genes, respectivamente. Juntas, estas informações permitiram melhorar a compreensão de como a PPC, a EE, as células da CN e da LRMV do tubo neural interagem através da expressão dos genes selecionados, resultando em uma sinalização local que atua sobre a formação inicial da trabécula. Além disso, este aprofundamento foi complementado com estudos de interações proteicas feitas em plataformas *online* (ver figura 23).

Figura 23 - Resultados a serem apresentados de acordo com a metodologia



Fonte: Produzido pela autora (2021).

## PARTE I

### 5.1 ANÁLISE COMPARATIVA DO DESENVOLVIMENTO ENTRE *DANIO RERIO*, *GALLUS GALLUS* E *MUS MUSCULUS*

Para uma análise mais precisa possível os estágios do desenvolvimento equivalentes em cada espécie e, considerando as particularidades de cada uma, foi gerada uma análise comparativa do desenvolvimento entre as três espécies (ver figura 24).

Figura 24 - Análise comparativa do desenvolvimento entre *Danio rerio* (peixe-zebra), *Gallus gallus* (galinha) e *Mus musculus* (camundongo)

	<i>Danio rerio</i>		<i>Gallus gallus</i>		<i>Mus musculus</i>	
	Estágio	Tempo (hora)	Estágio	Tempo (hora)	Estágio	Tempo (dia)
Gastrulação	75% E	← NBP 8	HH4	← NBP	E7.5	← NBP
	90% E	9	HH5	20	E8	8
	Tailbud	10	HH6	23		
	1ss	10.3			E8.5	
	3ss	11	HH8	26		
Neurogênese	7ss	12	HH9	29	E9	9
	15ss	16,5	HH11	39	E9.5	
	25ss	21	HH13	49		
	Prim-5	25,5	HH17	59	E10	10
	Prim-15	30	HH19	69	E10.5	
	Prim-25	34,5	HH21	79		
	Prim-35	39	HH22	89	E11	11
	High-pec	43,5	HH23	99		
	Long-pec	48	HH25	109	E11.75	

Fonte: Adaptado de TRAINOR (2014a) com informações de (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; KIMMEL et al., 1995).

Nota: Análise comparativa do desenvolvimento de *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*. A análise inicia no final da gastrulação, quando a borda da placa neural (prospectivo tubo neural, em caso de dúvidas rever figura 6) inicia a expressão de marcadores característicos desta (representado pelo retângulo roxo superior). O segundo evento do desenvolvimento é quando as bordas da placa neural se encontram para formar o tubo neural (ver retângulo roxo do meio). O último evento é o início da expressão de COL2A pelas células da CN que vão formar a trabécula (representado pelo retângulo roxo inferior). Em *Danio rerio*, o final da gastrulação é marcado pela porcentagem do embrião que sofreu epibolia (E), seguido pelo aparecimento do broto da cauda (Tailbud), a formação de somitos (ss), o estágio da farínghula (Prim) e a aparência das barbatanas dorsais (High-pec e Long-pec). O estágio da farínghula é um período do desenvolvimento que ocorre após a gastrulação, quando todos os embriões de vertebrados passam por um estágio no qual se assemelham morfologicamente, mostrando características de cordados: notocorda, tubo neural dorsal, somitos e arcos branquiais (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Já o estágio High-pec e Long-pec está relacionado, de acordo com KIMMEL et al. (1995), a aparência das barbatanas peitorais. No estágio High-pec a altura do botão da nadadeira é quase igual à largura de sua base e no Long-pec, a altura dos botões da nadadeira peitoral são o dobro da sua largura. Em *Gallus gallus* os estágios são apresentados de acordo com a classificação HAMBURGER; HAMILTON (1951) e em *Mus musculus* são apresentados de acordo com os dias do desenvolvimento (E). E, epibolia; Tailbud, broto da caudal; ss, somitos; Prim, farínghula, HH, Hamilton and Hamburger.

A análise comparativa foi realizada a partir de dois tipos de eventos do desenvolvimento: (1) expressão de marcadores moleculares e (2) eventos morfológicos. Portanto, os marcos considerados foram: (1) o início da expressão de marcadores da borda da placa neural, (2) fechamento do tubo neural ao nível axial de formação da trabécula e (3) início da expressão de *COL2A* nas células da CN que formam a trabécula, todos representados na figura 19 pelos três retângulos roxos, respectivamente. Estes eventos foram escolhidos para comparar com maior precisão o desenvolvimento de *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*, baseando-se na formação e diferenciação das células da CN que vão formar a trabécula

## 5.2 GENES EXPRESSOS NA REGIÃO PRÉ-CORDAL IDENTIFICADOS NO GEISHA

Ao pesquisar os genes expressos na região pré-cordal utilizando o banco de imagens GEISHA, foram identificados 19 RNAm de genes expressos na região pré-cordal durante o desenvolvimento de *Gallus gallus*. Dos 19 padrões de expressão gênica, 6 foram identificados na PPC, 7 nas células da LMRV do tubo neural, 2 na EE e 4 nas células da CN cefálica.

Além disso, como alguns padrões de expressão gênica *FOXA2*, *SHH* e *SIX3* foram encontrados em mais de uma estrutura embrionária, os 19 padrões de expressão gênica identificados foram compostos por 15 genes (ver quadro 5).

Quadro 5 - Padrões de expressão gênica identificados no GEISHA

PPC	Células da LMRV do tubo neural	EE	Células da CN Cefálica
<b><i>BMP2</i></b>	<i>FOXA2</i>	<b><i>FGF8</i></b>	<b><i>FGF3</i></b>
<b><i>BMP7</i></b>	<i>GLI1</i>	<b><i>SHH</i></b>	<i>NHLH1</i>
<i>FOXA2</i>	<i>HOXB13</i>		<b><i>NOGGIN</i></b>
<i>GSC</i>	<i>LMX1B</i>		<i>SOX9</i>
<b><i>SHH</i></b>	<i>NKX2.1</i>		
<i>SIX3</i>	<b><i>SHH</i></b>		
	<i>SIX3</i>		

Fonte: Produzida pela autora (2021).

Nota: Os padrões cujos genes estão destacados em negrito são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator solúvel e sem destaque são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator de transcrição.

## 5.3 GENES SELECIONADOS NAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS DA REGIÃO PRÉ-CORDAL

A partir dos 19 padrões de expressão gênica identificados nos bancos de imagens, foram aplicadas duas etapas de exclusão: (1) exclusão de genes que não eram expressos em

comum para *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus* e (2) exclusão de genes que não mostraram interação com a atividade de SHH na região pré-cordal.

Na primeira etapa de exclusão, os 19 padrões de expressão gênica encontrados para *Gallus gallus* no GEISHA foram analisados para *Danio rerio* e *Mus musculus*, utilizando os bancos de imagens ZFIN e MGI/EMAGE, respectivamente (ver quadro 6).

Quadro 6 - Padrões de expressão gênica identificados no GEISHA

<b>Estrutura</b>	<b>Gene</b>	<b>Motivo de Exclusão</b>
PPC	<b><i>BMP2</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> ; identificado para <i>Mus musculus</i>
	<b><i>FOXA2</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> ; identificado para <i>Mus musculus</i>
	<b><i>SIX3</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i>
Células da LMRV do Tubo Neural	<b><i>FOXA2</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> ; identificado para <i>Mus musculus</i>
	<b><i>HOXB13</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i>
	<b><i>LMX1B</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i>
EE	<b><i>FGF8</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> ; identificado para <i>Mus musculus</i>
Células da CN Cefálica	<b><i>FGF3</i></b>	Não identificado para <i>Mus musculus</i>
	<b><i>NHLH1</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> e <i>Mus musculus</i>
	<b><i>NOGIN</i></b>	Não identificado para <i>Danio rerio</i> ; identificado para <i>Mus musculus</i>

Fonte: Produzida pela autora (2021).

Nota: Os padrões cujos genes estão destacados em negrito são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator solúvel e sem destaque são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator de transcrição.

Os padrões de expressão gênica após a primeira exclusão foram (ver quadro 7):

Quadro 7 - Padrões de expressão gênica identificados em comum para *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus* no GEISHA, ZFIN E MGI/IMAGE, respectivamente

<b>PPC</b>	<b>Células da LMRV do tubo neural</b>	<b>EE</b>	<b>Células da CN Cefálica</b>
<b><i>BMP7</i></b>	<i>GLI1</i>	<b><i>SHH</i></b>	<b><i>SOX9</i></b>
<b><i>GSC</i></b>	<i>NKX2.1</i>		
<b><i>SHH</i></b>	<b><i>SHH</i></b>		
	<i>SIX3</i>		

Fonte: Produzida pela autora (2021).

Nota: Os padrões cujos genes estão destacados em negrito são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator solúvel e sem destaque são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator de transcrição.

Na segunda etapa de exclusão, o levantamento bibliográfico (etapa de seleção de genes) identificou quais genes codificam proteínas que não mostraram interação com SHH na região pré-cordal (ver quadro 8).



Quadro 8 - Padrão de expressão gênica excluídos na segunda etapa

Estrutura	Gene	Motivo de Exclusão
PPC	<i>GSC</i>	A proteína codificada pelo gene <i>GSC</i> não se mostrou envolvida com <i>SHH</i> através do padrão de busca utilizado
Células da CN	<i>SOX9</i>	A proteína codificada pelo gene <i>SOX9</i> não se mostrou envolvida com <i>SHH</i> através do padrão de busca utilizado

Portanto, os padrões de expressão gênica após a segunda exclusão e consequentemente, utilizados para este trabalho foram (ver quadro 9 e figura 25):

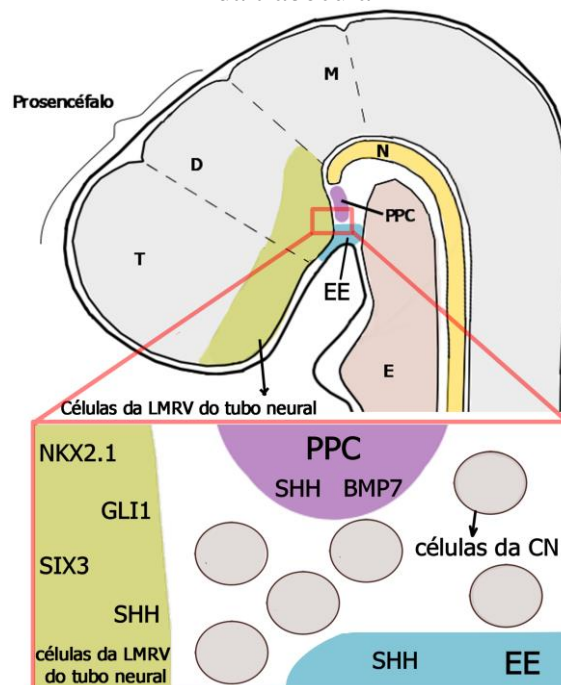
Quadro 9 - Padrões de expressão gênica selecionados durante o levantamento bibliográfico (etapa de seleção de genes)

PPC	Células da LMRV do tubo neural	EE	CN cefálica
<b><i>BMP7</i></b> <b><i>SHH</i></b>	<i>GLI1</i> <i>NKX2.1</i> <i>SIX3</i> <b><i>SHH</i></b>	<b><i>SHH</i></b>	-

Fonte: Produzida pela autora (2021).

Nota: Os padrões cujos genes estão destacados em negrito são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator solúvel e sem destaque são referentes à genes cujas proteínas codificadas atuam como fator de transcrição.

Figura 25 - Padrões de expressão gênica selecionados no contexto embrionário de formação da trabécula



Fonte: Produzida pela autora (2021).

Nota: Esquema com vista lateral de um embrião mostrando o local de encontro entre as células da LMRV do tubo neural, a PPC e a EE ampliado pelo quadrado vermelho na região inferior da imagem. As cores fazem

referência à estrutura onde a proteína está presente, sendo roxo para a PPC, amarelo para as células da LMRV do tubo neural e verde para a EE. Em cada estrutura, estão presentes os nomes dos genes cujos padrões de expressão nas respectivas estruturas pré-cordais foram selecionados por serem potencialmente atuantes na formação inicial da trabécula, de acordo com a primeira etapa do levantamento bibliográfico (etapa de seleção de genes).

A seguir, as descrições de características principais das proteínas codificadas pelos genes selecionados, iniciando por SHH (proteína principal envolvida na formação inicial da trabécula), seguido pelas proteínas potencialmente envolvidas neste processo.

### 5.3.1 Sonic Hedgehog Protein (SHH)

SHH faz parte das proteínas da família Hedgehog composta por fatores parácrinos que quando liberadas no meio extracelular, atuam em células-alvo ativando a transcrição de genes-alvo para induzir a diferenciação de determinados tipos celulares. Durante o desenvolvimento, SHH atua como um morfógeno (GILBERT, 2011).

SHH é inicialmente secretada pela PPC no início da neurulação, sendo necessário para a sobrevivência das células da PPC. Neste momento, *SHH* também é expresso pelas células da LMRV da placa neural. Em seguida, *SHH* para a ser expresso nas células da EE. Quando o tubo neural se divide em telencéfalo e diencéfalo, a expressão de *SHH* não ocorre mais nas células da LMRV, mas sim em regiões mais laterais do tubo neural (AOTO et al., 2009; CORDERO et al., 2004; OHYAMA; DAS; PLACZEK, 2008) (ver figura 26).

Figura 26 - Expressão de *SHH* ortólogo em *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*



Fonte: Fonte: Produzido pela autora (2021) com informações do GEISHA, ZFIN e MGI/ EMAGE.  
Nota: Expressão dos genes ortólogos de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*.

### 5.3.2 Proteína Morfogenética de Osso 7 (BMP7)

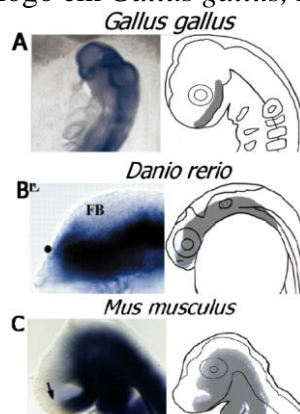
BMP7 é uma molécula de sinalização secretada membro da superfamília altamente conservada de fatores de crescimento, Transforming Growth Factor (TGFb). Sua ação sinalizatória ocorre pela ligação de BMP7 a um receptor celular, resultando na fosforilação de proteínas Smad que atuam como fatores de transcrição de gene alvo (HOOGAN, 1996). BMO7 é expresso na PPC durante a gastrulação e neurulação (DALE et al., 1997).

### 5.3.3 Gli Family Zinc Finger 1 (GLI1)

GLI1 é um fator de transcrição presente na cascata de sinalização de SHH que fica ligado aos microtúbulos do cílio primário. Na ausência de SHH, uma parte de GLI1 permanece ligado aos microtúbulos e uma parte é clivada através de várias proteínas, entrando no núcleo para atuar como um repressor transcricional. Na presença de SHH, GLI1 é liberada completamente dos microtúbulos por Smoothened, entrando completa no núcleo para atuar como um ativador transcricional dos mesmos genes que GLI1 costumava reprimir na ausência de SHH (GILBERT, 2011).

*GLI1* é normalmente expresso nas células da LMRV da placa neural durante a gastrulação, onde é transcricionalmente ativado por sinalização SHH e GLI1 (LEE et al., 1997). Após o fechamento do tubo neural, *GLI1* permanece expresso nas células da LMRV do tubo neural (equivalente a HH10 em *Gallus gallus*) (ver figura 27), mas torna-se ausente logo depois (equivalente a HH15 em *Gallus gallus*) (OHYAMA; DAS; PLACZEK, 2008).

Figura 27 - Expressão de *GLI1* ortólogo em *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*



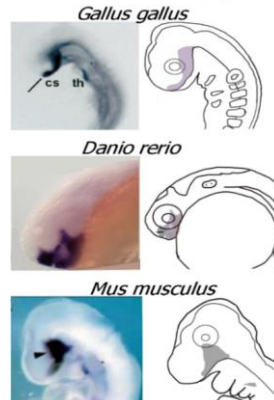
Fonte: Fonte: Produzido pela autora (2021) com informações do GEISHA, ZFIN e MGI/EMAGE.

Nota: Expressão dos genes ortólogos de *GLI1* nas células da LMRV do tubo neural em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*.

### 5.3.4 Nk2 Homeobox 1 (NKX2.1)

NKX2.1 é uma proteína que atua como fator de transcrição. É expressa no tubo neural ventral ao nível do prosencéfalo e logo após, sua expressão ocorre no telencéfalo (área pré-óptica) e diencéfalo (hipotálamo rostral) (GERMAIN et al., 2013b) (ver figura 28).

Figura 28 - Expressão de *NKX2.1* ortólogo em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*

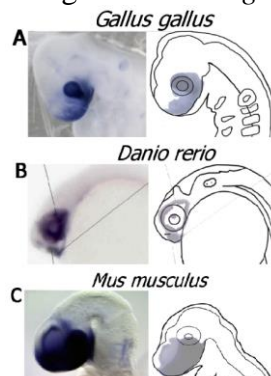


Fonte: Fonte: Produzido pela autora (2021) com informações do GEISHA, ZFIN e MGI/ EMAGE.  
Nota: Expressão dos genes ortólogos de *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*.

### 5.3.5 Proteína Homeobox Six3 (SIX3)

SIX3 é uma proteína que atua como fator de transcrição e participa da formação da linha média do tubo neural (WALLIS et al., 1999). Em *Mus musculus*, é expressa após a gastrulação no ectoderma neural anterior (futuro tubo neural), localizada acima da PPC, sendo restrita nas células da LMRV do tubo neural (GENG et al., 2008) (ver figura 29).

Figura 29 - Expressão de *SIX3* ortólogo em *Gallus gallus*, *Mus musculus* e *Danio rerio*



Fonte: Produzido pela autora (2021) com informações do GEISHA, ZFIN e MGI/ EMAGE.  
Nota: Expressão dos genes ortólogos de *SIX3* nas células da LMRV do tubo neural em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*.

Nomenclatura dos genes ortólogos em *Mus musculus*, *Gallus Gallus* e *Danio rerio* para os genes selecionados *SHH*, *BMP7*, *GLI1*, *NKX2.1* e *SIX3* (ver quadro 10).

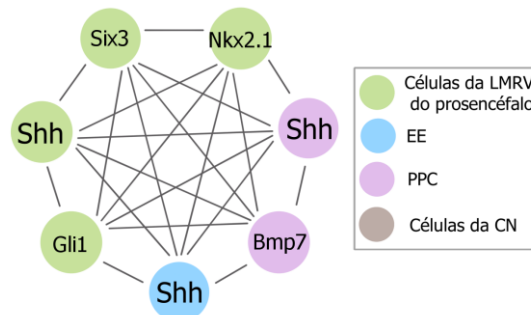
Quadro 10 - Genes selecionados ortólogos em *Mus musculus*, *Gallus gallus* e *Danio rerio*

Organismos	Genes ortólogos
<i>Mus musculus</i>	<i>Shh</i>
<i>Gallus Gallus</i>	<i>SHH</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>shha, shhb, shh</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Bmp7</i>
<i>Gallus Gallus</i>	<i>BMP7</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>Bmp7b</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Gli1</i>
<i>Gallus Gallus</i>	<i>GLI1</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>gli1</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Nkx2.1</i>
<i>Gallus Gallus</i>	<i>NKX2.1</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>nkx2.1b, titf1b</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Six3</i>
<i>Gallus Gallus</i>	<i>SIX3</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>six3a, six3b</i>

#### 5.4 INTERAÇÃO ENTRE OS GENES SELECIONADOS NAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS DA REGIÃO PRÉ-CORDAL

A partir do contexto molecular apresentado, foi questionado como as proteínas codificadas pelos genes selecionados interagem na região pré-cordal. Para isso, foi realizada a segunda etapa do levantamento bibliográfico pelo PubMed, a etapa de interação de genes. Nessa análise todas as possíveis combinações entre os padrões de seleção gênica selecionados foram traçadas para montar os termos de busca utilizados no PubMed, a fim de recrutar o máximo possível de trabalhos relacionados ao tema (ver figura 30).

Figura 30 - Relações feitas para pesquisa na etapa de interações de genes



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Relações feitas para a montagem dos padrões de busca utilizados na etapa de interação de genes do levantamento bibliográfico, relacionando as proteínas selecionadas nas células da LMRV do tubo neural (verde), EE (rosa), células da CN (marrom) e EE (azul) com todas as combinações possíveis. Cada linha cinza representa um termo de busca montado para a etapa de interação de genes.

Junto com os resultados da etapa de interação de genes, os resultados da primeira etapa do levantamento bibliográfico - etapa de seleção de genes -, permitiram formar um raciocínio lógico para estas interações proteicas, traçando uma rede regulatória entre elas. Estes resultados serão apresentados de forma ordenada na parte II e ao final, as interações moleculares apresentadas representarão o que sabemos até o momento sobre o processo de condensação das células da CN que irão formar a trabécula.

## **PARTE II**

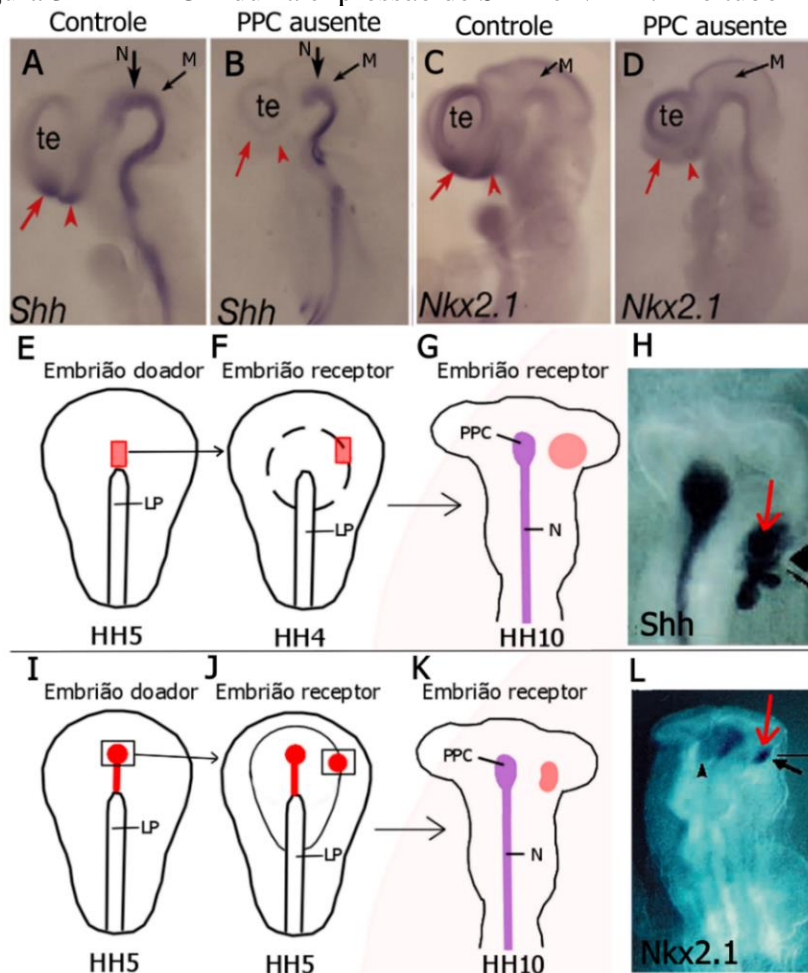
Esta seção apresentará as interações moleculares encontradas atualmente na literatura, relacionando as proteínas expressas na EE, PPC e células da LMRV do tubo neural, selecionadas por serem potencialmente atuantes na formação da trabécula. Os resultados serão apresentados de forma lógica, até chegar a uma proposta de sinalização local que atua diretamente na formação inicial da trabécula. Essa proposta será formada por dados da literatura e dados oriundos de análises *in silico* de associações entre genes.

### **5.5 PPC ATUA SOBRE A INDUÇÃO DE SHH E NKX2.1 NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL**

Trabalhos realizados por AOTO et al. (2009) e GARCÍA-CALERO et al. (2008) apresentaram experimentos de retirada da PPC de embriões para analisar a influência dessa estrutura sobre o desenvolvimento do tubo neural (futuro telencéfalo e diencéfalo), através da expressão de *SHH* e *NKX2.1*, *in vivo*. AOTO et al. (2009) realizaram a retirada da PPC de embriões de *Mus musculus*, resultando na ausência total da expressão de *Shh* e *Nkx2.1* na região ventral do telencéfalo (flecha vermelha em figura 31, B e D) e diencéfalo (ponta da flecha vermelha em 26, B e D) em comparação aos controles (ver figura 31, A e C). Já GARCÍA-CALERO et al. (2008) realizaram remoção da PPC em embriões de *Gallus gallus* na gastrulação (equivalente a HH4) resultou na ausência de expressão de *SHH* e *NKX2.1* no tubo neural (dados não mostrados).

Ao contrário dos estudos de AOTO et al. (2009) e (GARCÍA-CALERO et al., 2008), que estudaram o efeito da PPC sobre o tubo neural através da retirada desta, PERA; KESSEL (1997) realizaram transplante de PPC ectópica com embriões de *Gallus gallus*. Para isso, foi transplantada a PPC prospectiva (ver figura 31, E e I) de um embrião doador, logo após o início da gastrulação, para um embrião hospedeiro (ver figura 31, F e J). Os embriões analisados após a formação do tubo neural mostraram expressão ectópica de *SHH* e *NKX2.1* na região do tubo neural adjacente ao local de transplante da PPC (ver figura 31, G, H, K e L).

Figura 31 - A PPC induz a expressão de *SHH* e *NKX2.1* no tubo neural



Fonte: Retirado de AOTO et al. (2009); GARCÍA-CALERO et al. (2008); PERA; KESSEL (1997).

Nota: Em A-D, experimentos de retirada da PPC em embriões de *Mus musculus* e em E-L, experimentos de transplante ectópico de PPC em embriões de *Gallus Gallus*. Em A-D, visão lateral dos embriões mostrando que a remoção da PPC durante o estágio pré-somítico, causou redução da expressão de *Shh* e *Nkx2.1* em B e D, respectivamente, sendo detectadas no telencéfalo (flecha vermelha) e diencefalo (ponta da flecha vermelha), mas não no mesencéfalo. Além disso, também foi detectado em B e D um fenótipo de holoprosencefalia, caracterizado por redução das vesículas encefálicas. Em E-L, visão dorsal de experimentos de transplante ectópico da prospectiva PPC (E-H) e da PPC (I-L). Em E-F e I-J, esquema mostrando o processo de transplante,

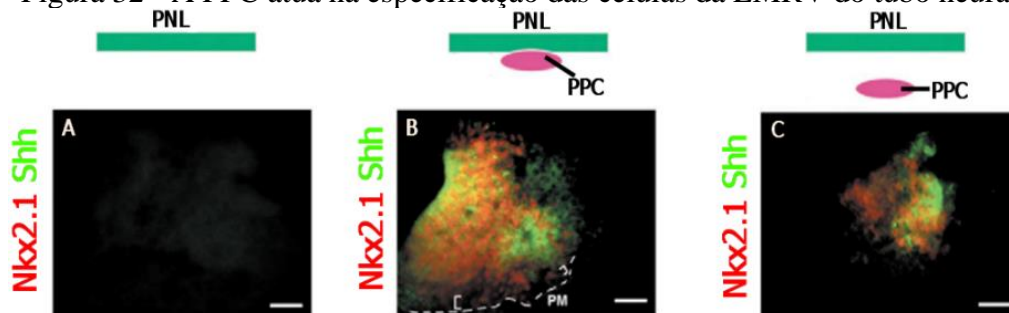


com a retirada da prospectiva PPC (retângulo vermelho em **E**) e a PPC (círculo vermelho destacado pelo quadrado preto em **I**) e sua posição com relação a placa neural lateral (retângulo e círculo vermelhos em **F** e **J**). Em **G** e **K**, esquema representando resultado do experimento (**H** e **L**), mostrando a região anterior do embrião com marcação para *SHH* (**G**) e *NKX2.1* (**K**), onde foi detectada expressão endógena de *SHH* na notocorda e PPC localizadas na linha média (em roxo) e expressão exógena de *SHH* (em rosa) na neuroectoderma adjacente ao transplante ectópico da prospectiva PPC. Em **H** e **L**, imagem real do experimento com hibridização *in situ* para *SHH* (**H**) e *NKX2.1* (**L**) com marcação endógena e a exógena (flecha vermelha em **H** e **L**). LP, linha primitiva; M, mesencéfalo; N, notocorda; PPC, placa pré-cordal; Te, telencéfalo.

Os resultados de retirada e transplante ectópico da PPC apresentados na figura 31 apontam para a capacidade da PPC de induzir a expressão de *SHH* e *NKX2.1* no tubo neural, *in vivo*.

OHYAMA et al. (2005) realizaram experimentos analisando a influência da PPC na expressão de marcadores na placa neural lateral (futuro tubo neural). Para isso, foram cultivados *in vitro*, explantes da placa neural lateral de embriões de *Mus musculus* na ausência da PPC (ver figura 32, A), em contato com a PPC (ver figura 32, B) e a uma pequena distância da PPC (ver figura 32, C). O resultado mostrou células positivas para a expressão de *Shh* e *Nkx2.1* nos explantes cultivados na presença da PPC (ver figura 32, B e C), independente da distância de contato. Já na ausência da PPC não houve expressão de *Shh* ou *Nkx2.1* nos explantes da placa neural lateral (ver figura 32).

Figura 32 - A PPC atua na especificação das células da LMRV do tubo neural



Fonte: Retirado de OHYAMA et al. (2005).

Nota: Cultivo *in vitro* de explantes da placa neural lateral de embriões de *Mus musculus* no início da gastrulação (equivalente a E4-5 em *Mus musculus*) na ausência da PPC (**A**), em contato com a PPC (**B**) e em contato próxima da PPC (**C**). Após 48h, os resultados por imuno-histoquímica mostram que na presença da PPC, seja em contato ou próxima, ocorre a presença da expressão de *Shh* e *Nkx2.1*, concomitantemente. PNL, lateral neural plate; PPC, placa pré-cordal.

Os dados abordando atuação da PPC sobre a expressão de *Shh* e *Nkx2.1* no tubo neural apresentados na figura 32, apontam para a capacidade da PPC de induzir a expressão de *Shh* e *Nkx2.1* na placa neural (futuro tubo neural), *in vitro*, corroborando com os experimentos

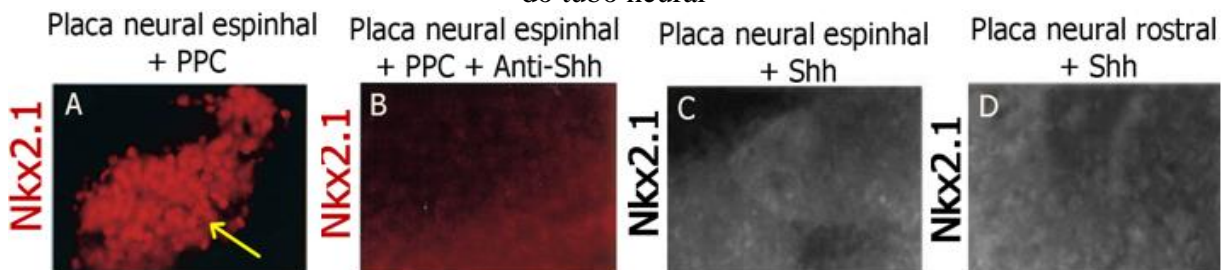


apresentados anteriormente na figura 31, que abordam a capacidade da PPC de induzir a expressão de *SHH* e *NKX2.1*, *in vitro*.

Isso direcionou este estudo para análises de experimentos que abordam a influência de SHH e BMP7 - proteínas selecionadas neste trabalho por serem potencialmente envolvidas na formação da trabécula e que são expressas na PPC -, sobre a expressão de *SHH* e *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural.

Outro estudo encontrado foi realizado por DALE et al. (1997), no qual os autores testaram se SHH é um dos fatores da PPC que contribui para induzir a expressão de *Nkx2.1* nas células da LMRV do tubo neural. Sabendo previamente que a PPC é capaz de induzir a expressão de *Nkx2.1* em explantes da placa neural em *Mus musculus* ao nível espinhal (isso é, ao nível da notocorda), os autores cultivaram explantes da placa neural ao nível espinhal em contato com a PPC, acrescentando anticorpos de bloqueio de função para SHH (anti-SHH). O resultado mostrou ausência da expressão de *Nkx2.1* nos explantes tratados com anti-SHH, mostrando que SHH é necessário para induzir a expressão de *Nkx2.1* na placa neural (ver figura 33 A-B).

Figura 33 - SHH é necessário, mas não é suficiente para induzir *Nkx2.1* nas células da LMRV do tubo neural



Fonte: Retirado de DALE et al. (1997)

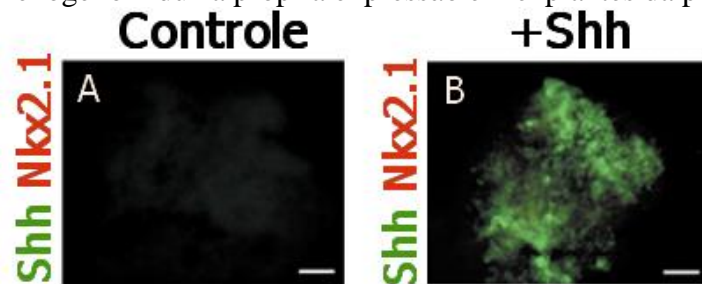
Nota: Cultivo *in vitro* de explantes da placa neural espinhal em A-C e ao nível do tubo neural em D de embriões de *Mus musculus*, realizado na presença da PPC em A, na presença da PPC + anti-SHH em B e na presença de SHH exógeno em C-D. Os resultados por imunohistoquímica mostraram que na presença da PPC em A, a expressão de *Nkx2.1* nos explantes da placa neural foi positiva (flecha amarela em A). Na ausência da atividade de SHH em B, a expressão de *Nkx2.1* foi ausente. No entanto, somente na presença de SHH exógeno, também não houve expressão de *Nkx2.1* nos explantes da placa neural ao nível espinhal e nem ao nível rostral (C e D).

Para testar se SHH é suficiente para induzir a expressão de *Nkx2.1* na placa neural, DALE et al. (1997) cultivaram explantes da placa neural originada ao nível do tubo neural que formará o futuro prosencéfalo e ao nível da notocorda sob presença de SHH exógeno. Em ambos os experimentos, não houve células positivas para *Nkx2.1* (ver figura 33, C e D),

sugerindo que SHH é necessário para a expressão de *Nkx2.1* no tubo neural, mas não é o suficiente para tal indução.

Além disso, em experimentos realizados por OHYAMA et al. (2005), os pesquisadores cultivaram explantes da placa neural lateral de embriões de *Mus musculus* cultivados na presença de SHH exógeno. Não foi detectada expressão de *Nkx2.1* nos explantes da placa neural lateral tratados com SHH exógeno (ver figura 34, B), corroborando com os resultados apresentados por DALE et al. (1997) (ver figura 33, C-D). No entanto, foi detectada a expressão de *Shh* em explantes da placa neural lateral submetidos a SHH exógeno (ver marcação em verde na figura 34, B), sugerindo que, apesar de SHH exógeno não ser suficiente para a indução da expressão de *Nkx2.1* nos explantes da placa neural, SHH é suficiente para a indução da expressão de *Shh* nestas células (ver figura 34).

Figura 34 - SHH exógeno induz a própria expressão em explantes da placa neural lateral



Fonte: Retirado de OHYAMA et al. (2005).

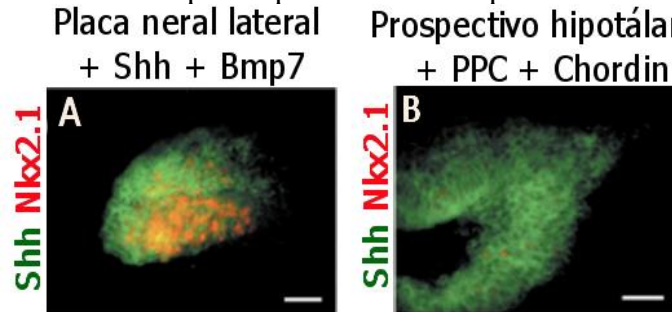
Nota: Cultivo *in vitro* da placa neural lateral de embriões de *Mus musculus* no início da gastrulação (equivalente à E4-5) em meio controle (A) e na presença de SHH exógeno (B). Após 48h, os resultados por imunohistoquímica mostram que na presença de SHH exógeno, ocorreu expressão de *Shh*, mas não de *Nkx2.1*, nos explantes da placa neural.

Os resultados da atuação de SHH exógeno sobre explantes da placa neural encontrados na figura 34, demonstram uma capacidade de SHH secretado pela PPC de induzir a expressão *Shh* nas células da placa neural lateral, *in vitro*. Além disso, o resultado de cultivo da placa neural exposta a anti-SHH aponta para a importância de SHH secretado pela PPC para induzir a expressão de *Nkx2.1* nas células da placa neural (ver figura 33, B), mas cultivos da placa neural feitos com SHH exógeno apontam para a insuficiência de SHH para induzir sozinho, a expressão de *Nkx2.1* nestas células, *in vitro* (ver figura 33, C e D).

Interessantemente, experimentos feitos por OHYAMA et al. (2005) ainda observaram que a atuação da PPC sobre a placa neural para a indução da expressão de *Shh* e *Nkx2.1* depende

de um fator rostral diferente de SHH, mas que atua junto com este para o processo, denominado BMP7. BMP7 é uma molécula sinalizadora expressa na PPC durante a neurulação (DALE et al.,1997). Em experimentos realizados por OHYAMA et al. (2005), os autores cultivaram explantes da placa neural lateral na presença de SHH e BMP7, concomitantemente, resultando na expressão de *Nkx2.1* e *Shh* nos explantes (ver figura 35, A), em comparação ao controle (ver figura 35, A). Além disso, quando explantes do prospectivo hipotálamo, uma região do diencefalo, foram cultivados na presença da PPC e Chordin (um antagonista de BMP7), não houve expressão de *Nkx2.1* nos explantes, apenas de *Shh* (ver figura 35, B).

Figura 35 - SHH e BMP7 cooperam para induzir a expressão de *Nkx2.1* no tubo neural

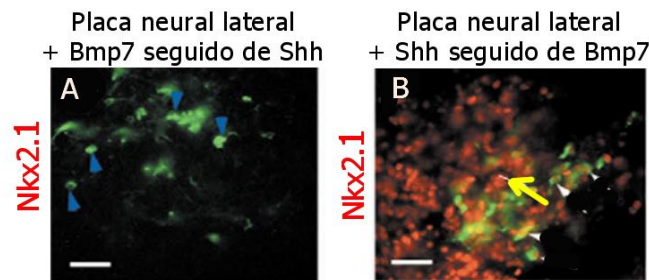


Fonte: Retirado de OHYAMA et al. (2005).

Nota: Cultivo *in vitro* da placa neural lateral e do prospectivo hipotálamo de embriões de *Mus musculus* no início da gastrulação (equivalente à E4-5 em *Mus musculus*) em meio com SHH e BMP7 exógenos em **A** e na presença da PPC acrescida do antagonista de BMP7 (Chordin), em **B**. Após 48h, os resultados mostram que na presença de SHH e BMP7 exógenos, ocorreu expressão de *Shh* e *Nkx2.1* nos explantes da placa neural (**A**). Na presença da PPC acrescida de Chordin, houve expressão de *Shh*, mas não de *Nkx2.1* no explante do prospectivo hipotálamo.

Os resultados do cultivo da placa neural com BMP7 e SHH exógenos aplicados concomitantemente, ou na presença da PPC e Chordin, apontam para a necessidade de BMP7 para a indução da expressão de *Nkx2.1* na placa neural (prospectivo tubo neural). No entanto, em explantes da placa neural lateral submetidos a BMP7 exógeno sem SHH, não formaram células *Nkx2.1* positivas (dados não mostrados), sugerindo que a atividade de BMP7 ocorre em cooperação com SHH. Além disso, segundo OHYAMA et al. (2005), há uma ordem na necessidade de SHH e BMP7 para que ocorra a indução de *Nkx2.1* nas células da LMRV do tubo neural, sendo primeiro necessária a exposição dos explantes da placa neural lateral a SHH e depois a BMP7 para que ocorra a expressão de *Nkx2.1* nestas células (ver figura 36).

Figura 36 - A necessidade de SHH e BMP7 para induzir a expressão de Nkx2.1 nas células da LMRV do tubo neural ocorre em momentos distintos

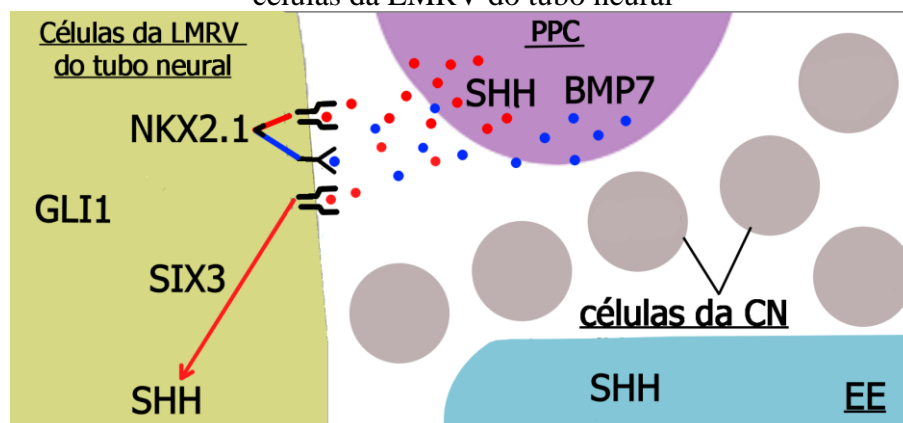


Fonte: Retirado de OHYAMA et al. (2005).

Nota: Cultivo *in vitro* da placa neural lateral embriões de *Mus musculus* no início da gastrulação (equivalente à E4-5 em *Mus musculus*) em meio com SHH e BMP7 exógenos aplicados em diferentes ordens. Em **A** ocorre exposição a BMP7 seguido de SHH e em **B**, ocorre exposição primeiro de SHH seguido de BMP7. Após 48h, os resultados mostram que na presença de SHH seguido de BMP7 exógenos, ocorreu expressão de *Shh* e *Nkx2.1* nos explantes da placa neural (**B**), o que não ocorreu quando os explantes foram submetidos a ordem contrária de fatores sinalizatórios (**A**).

Os resultados apresentados nas figuras 32-36 abordando a atuação de SHH e BMP7 secretados pela PPC sobre a expressão de *SHH* e *NKX2.1* no tubo neural, corroboram com os resultados da figura 31, que mostram que a retirada ou transplante ectópico da PPC reduz a expressão de *SHH* e *NKX2.1* no tubo neural. Juntos, estes dados fornecem evidências de duas importantes informações: (1) SHH e BMP7 secretados pela PPC atuam cooperativamente para a indução da expressão de *NKX2.1* no tubo neural e (2) SHH secretado pela PPC é suficiente para induzir a expressão de *SHH* no tubo neural (ver figura 37).

Figura 37 - *SHH* e *BMP7* secretados pela PPC atuam sobre a expressão de *SHH* e *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (figura 25), acrescido do resultado mostrando a indução de SHH secretado pela PPC (esferas vermelhas) sobre a expressão de *SHH* expresso nas células da LMRV do tubo neural e SHH e BMP7 (esferas azuis) secretados pela PPC cooperando na indução da expressão de *NKX2.1* nas

células da LMRV do tubo neural. Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

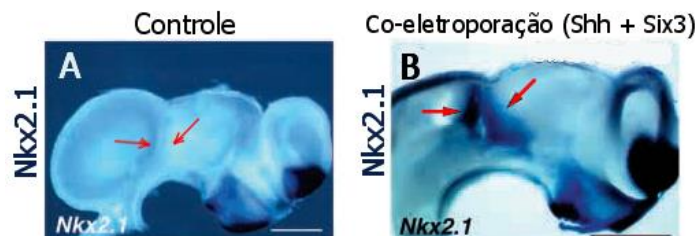
A seguir, se buscou por interações envolvendo a atividade de SHH e NKX2.1 nas células da LMRV do tubo neural com outras proteínas também codificadas por genes selecionados por serem potencialmente envolvidos na formação da trabécula. Primeiramente será apresentado os resultados encontrados para NKX2.1 e em seguida para SHH.

### 5.6 A EXPRESSÃO DE *NKX2.1* NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL CONTRIBUI PARA A FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO, MAS NÃO PARA A FORMAÇÃO INICIAL DA TRABÉCULA

De acordo com OHYAMA et al. (2005), a expressão de *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural causada pela atividade de SHH e BMP7 secretados pela PPC contribui para a diferenciação de neurônios específicos do hipotálamo, os neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos. No entanto, sendo o foco deste trabalho encontrar interações proteicas na região pré-cordal que atuem na formação inicial da trabécula, foi verificado se *NKX2.1* atua sobre a expressão de alguma outra proteína dentre as selecionadas por serem potencialmente atuantes neste processo.

Um estudo realizado por KOBAYASHI et al., (2002) mostrou que a atuação de SHH e SIX3 sobre a expressão de *NKX2.1*, regulando-o positivamente. Para isso, os autores realizaram experimentos com co-eletroporação de construções que levavam a expressão de *SHH* e *SIX3* em embriões de *Gallus gallus*, que resultou na expansão do domínio de expressão de *NKX2.1* no limite entre o diencéfalo e o mesencéfalo (ver flecha vermelha em figura 38, B) em comparação ao controle (ver flecha vermelha em figura 38, A).

Figura 38 - SHH e SIX3 atuam sobre a expressão de *NKX2.1* no tubo neural



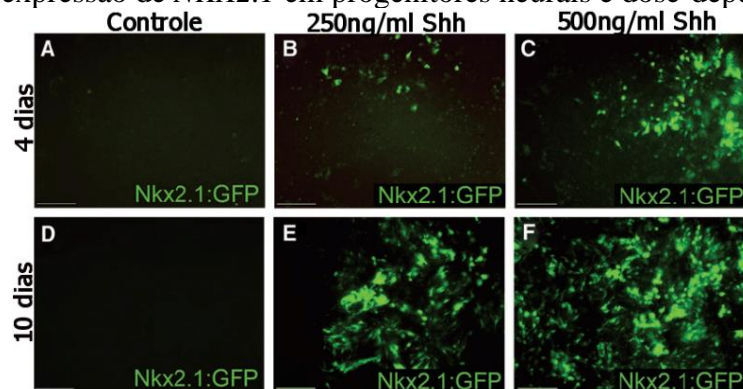
Fonte: Retirado de KOBAYASHI et al., (2002).

Nota: Visão lateral do sistema nervoso dissecado de embriões de *Gallus gallus* no período inicial de condensação das células da CN que irão formar a trabécula. Em **A**, controle e em **B**, embriões co-eletroporados

para *SHH* e *SIX3* durante a formação do tubo neural (equivalente HH8-10). Resultados de hibridização *in situ* para *NKX2.1* mostraram expansão do domínio de expressão de *NKX2.1* na região limite entre o diencéfalo e o mesencéfalo de embriões co-eletroporados (ver flechar vermelhas em **B**) com relação ao controle (**A**).

Experimentos desenvolvidos por GERMAIN et al., (2013) mostraram que a quantidade de progenitores neurais do tubo neural ventral, positivos para *NKX2.1* é dose-dependente de SHH. Para mostrar isso, os autores realizaram cultivo *in vitro* de células progenitoras neurais de *Homo sapiens* sob diferentes quantidades de exposição a SHH, mostrando que quanto maior esta quantidade, maior o número de células *NKX2.1* positivas (ver figura 39). Além disso, o tempo de exposição também influenciou de forma proporcional. Portanto, o cultivo com maior número de células *NKX2.1* positivas foi o cultivo de 500mg/ml por 10 dias (ver figura 39, F).

Figura 39 - A expressão de *NKX2.1* em progenitores neurais é dose-dependente de SHH



Fonte: Retirado de (GERMAIN et al., 2013a).

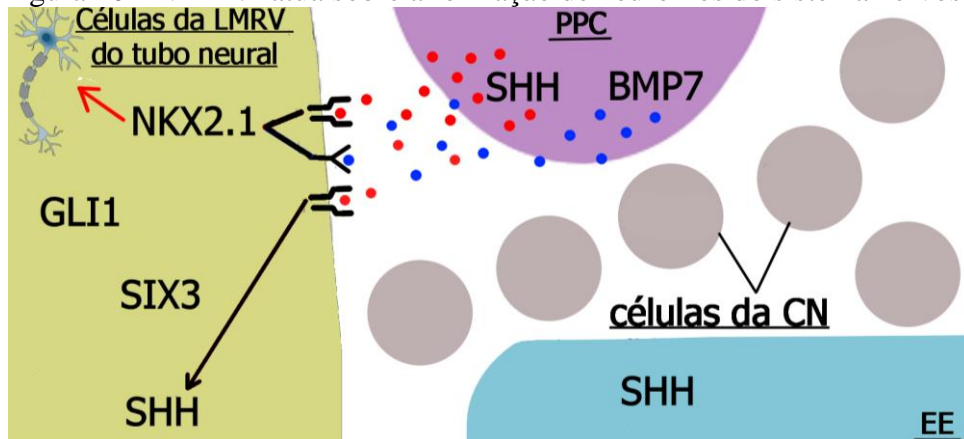
Nota: Cultivo *in vitro* de progenitores neurais de embriões de *Homo sapiens*. O cultivo foi realizado em tratamento controle (**A** e **D**) e tratamento com 250ng/ml de SHH exógeno (**B**, **C**) e 500ng/ml de SHH exógeno (**E** e **F**). Todos os tratamentos foram aplicados durante 4 e 10 dias. Os resultados com imunocitoquímica para *NKX2.1* mostrou que a quantidade de progenitores neurais positivos para *NKX2.1* foi diretamente relacionada a quantidade de SHH exógeno aplicado somado do tempo de tratamento. Portanto, o cultivo com maior número de células *NKX2.1* positivas foi o tratamento com 500ng/ml de SHH exógeno durante 10 dias.

Diante dos resultados mostrando SHH e *SIX3* atuando como reguladores positivos sobre a expressão de *NKX2.1* (ver figuras 38 e 39), *NKX2.1* parece ser um gene-alvo da sinalização de SHH, atuando na diferenciação neural. Além disso, ALTABA (1998), mostraram que a atuação da sinalização SHH sobre a expressão de *NKX2.1* pode estar ocorrendo via *GLI1*. Para isso, os autores realizaram experimentos com embriões de *Danio rerio* utilizando injeção de mRNA para *GLI1* aumentou o domínio de expressão de *NKX2.1* lateralmente no tubo neural dorsal (dados não mostrados). No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho mostrando a



atuação de NKX2.1 sobre qualquer uma das proteínas expressas na região pré-cordal que foram selecionadas neste trabalho por se mostrarem potencialmente envolvidas na formação da trabécula. Portanto, de acordo com trabalhos descritos na literatura, NKX2.1 está envolvido na formação do sistema nervoso, mas não do esqueleto craniofacial (ver figura 40).

Figura 40 - NKX2.1 atua sobre a formação de neurônios do sistema nervoso



Fonte: Produzido pela autora (2021).

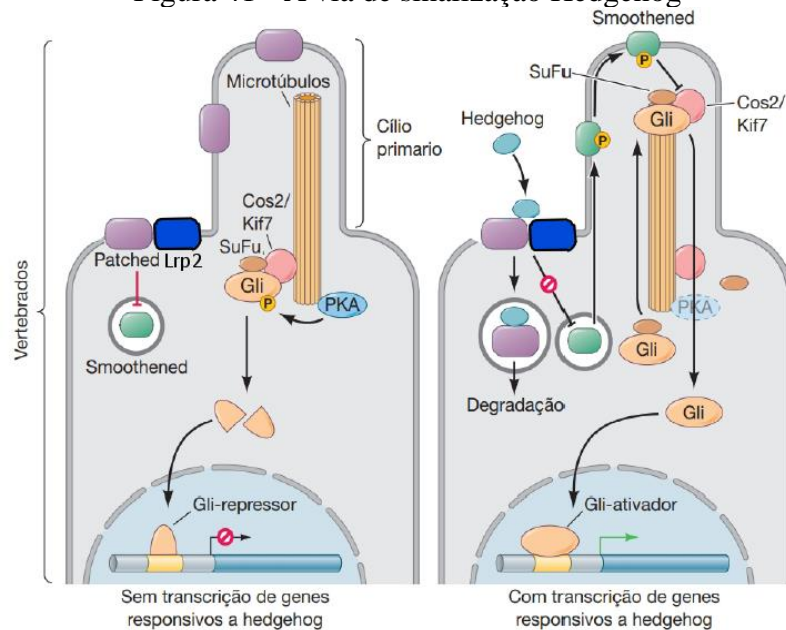
Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 37), acrescido do resultado mostrando a atuação de NKX2.1 nas células da LMRV do tubo neural sobre a formação dos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, localizados no hipotálamo. Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

A partir disso, o presente trabalho foi dedicado a compreender como estaria ocorrendo o processo de indução da expressão de SHH secretado pela PPC sobre SHH expresso nas células da LMRV e sinalizações *downstream* a esta que resultaram na sinalização local sobre as células da CN para a formação inicial da trabécula. Este resultado será apresentado a seguir de forma escalonada nos itens 5.7 – 5.10.

## 5.7 HÁ UMA FINA REGULAÇÃO TEMPORAL NA CAPACIDADE DE DETECÇÃO DE SHH SECRETADO PELA PPC PELAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL

Um dos trabalhos encontrados mostrou como ocorre a captação da molécula de SHH extracelular pelas células-alvo. Segundo CHRIST et al., (2012), durante a neurulação, a Proteína Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade – 2 (LRP2) e a Proteína Homóloga Patched1 (PTCH1) formam um complexo co-receptor nas células da LMRV do tubo neural para sequestrar SHH extracelular secretado pela PPC (ver figura 41).

Figura 41 - A via de sinalização Hedgehog



Fonte: Modificado de GILBERT (2011).

Nota: A proteína PTCH1 (em roxo) na membrana celular das células da LMRV do tubo neural (em cinza) atuam como inibidoras da proteína SMO (em verde). Na ausência de SHH extracelular (imagem a esquerda), não ocorre a ligação de SHH ao receptor PTCH1 e LRP2. Logo, SMO será bloqueada e não irá migrar para o cílio primário, desencadeando o restante da cascata de sinalização. Por conta disso, as proteínas GLI são clivadas por proteínas como Supressor of Fused (SUFU), e somente uma parte das proteínas GLI entra no núcleo, atuando como repressores de genes-alvo. Na presença de SHH extracelular (imagem da direita), SHH se liga ao complexo PTCH1 e LRP2. Quando SHH se liga à PTCH1, sua mudança conformacional impede a inibição que PTCH1 exerce sobre a proteína SMO. SMO é transportado para o cílio primário onde é fosforilado e libera as proteínas GLI completas da sua interação com os microtúbulos. As proteínas GLI completas, por sua vez, entram no núcleo e atuam como ativadores de genes-alvo.

A captação de SHH induz a captação do complexo ligante-receptor e resulta na ativação da sinalização SHH dependente de Ptc1 e de Frizzled Class Receptor Smoothened (SMO), resultando na transcrição de genes-alvo através dos fatores de transcrição GLI (CHRIST et al., 2012).

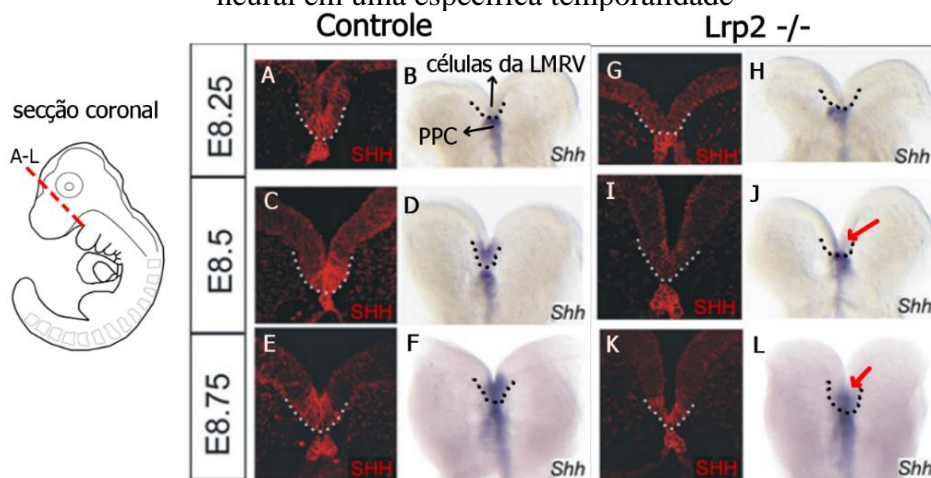
CHRIST et al. (2012) mostraram ainda que a detecção de SHH extracelular secretado pela PPC, ocorre em uma janela de tempo específica nas células da LMRV do tubo neural, sendo crítica para especificação do tubo neural. Para isso, eles realizaram experimentos utilizando embriões de *Mus musculus* mutante homocigóticos para *Lrp2*(-/-).

Também conhecida como Megalina (SAITO et al., 1994), LRP2 é uma proteína de membrana integral que media a endocitose de SHH (MCCARTHY; ARGRAVES, 2003). Mutação em LRP2 em embriões de *Mus musculus* (LRP2 -/-) causa HPE associada a graves defeitos craniofaciais (SPOELGEN et al., 2005; WILLNOW et al., 1996).



Resultados de experimentos utilizando camundongos mutantes para *LRP2* mostraram que a expressão de *Shh* foi fortemente reduzido (quase ausente) nas células da LMRV do tubo neural em embriões mutantes (ver flecha vermelha na figura 42, J). Além disso, mesmo com a retomada da expressão de *Shh* após o período de redução da sua expressão (apresentado na figura 42, J), a recuperação não foi total (ver flecha vermelha na figura 42, L) quando comparados aos embriões selvagens (ver figura 42, F). Isso sugere uma necessidade temporal específica das células da LMRV do tubo neural na captação de SHH secretada pela PPC para que sua expressão ocorra adequadamente. Importante dizer que a expressão de *Shh* não foi alterada em nenhum momento na PPC. Ainda segundo CHRIST et al. (2012), a ausência de atividade de LRP2 resultou na incapacidade das células da LMRV do tubo neural de detectarem SHH secretado pela PPC mesmo com expressão normal de PTCH1 e SMO, sugerindo que LRP2 atua na definição temporal da competência das células da LMRV do tubo neural para responder a SHH secretado pela PPC (ver figura 42).

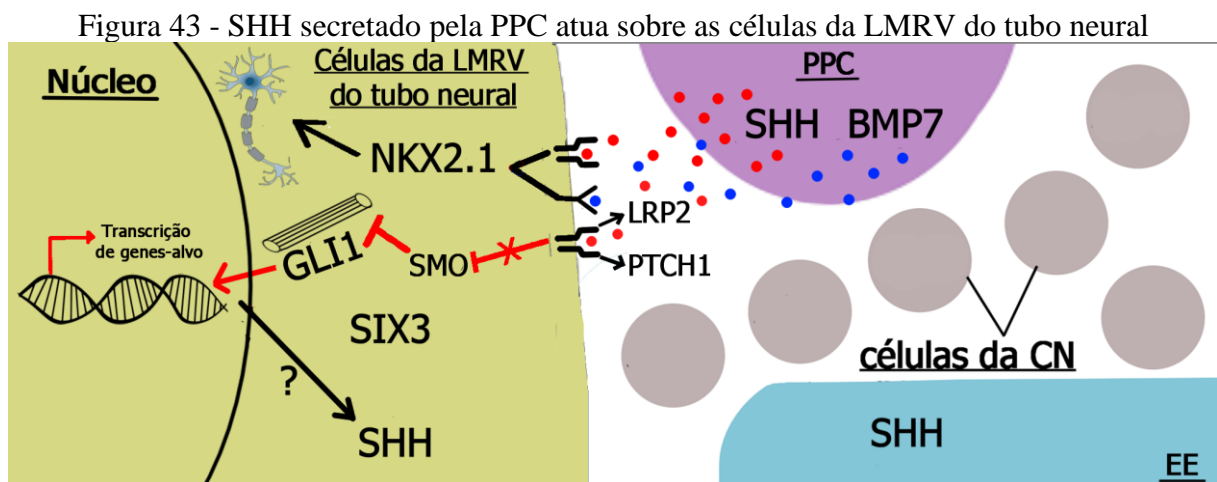
Figura 42 - O receptor LRP2 torna possível a detecção de SHH nas células da LMRV do tubo neural em uma específica temporalidade



Fonte: Retirado de CHRIST et al. (2012).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A-L. Embriões de *Mus musculus* controle (A-F) e mutantes *Lrp2*<sup>-/-</sup> (G-L) com secções coronais mostrando as células da LMRV do tubo neural (acima da linha pontilhada) e a PPC (abaixo da linha pontilhada). Nas colunas à esquerda para controle e *Lrp2*<sup>-/-</sup> (A, C, E, G, I e K), imunohistoquímica para SHH e nas colunas da direita para controle e *Lrp2*<sup>-/-</sup> (B, D, F, H, J e L), hibridização *in situ* para *Shh*. Os estágios de desenvolvimento estão indicados a esquerda para as imagens das respectivas linhas. Em embriões de controle, a proteína SHH é secretada pela PPC, induzindo a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural. Em embriões *Lrp2*<sup>-/-</sup>, *Shh* é expresso normalmente na PPC, mas falha em ocorrer nas células da LMRV do tubo neural no início da neurulação (equivalente a E8.5 para *Mus musculus*) (flecha vermelha em J) e não consegue recuperar sua expressão adequada após este período (flecha vermelha em L).

Os experimentos da atuação do receptor LRP2 sobre a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural apresentados na figura 42, revelam que SHH secretado pelas células da PPC, atua sobre as células da LMRV do tubo neural através do complexo LRP2/PTCH1. Ao ativar o complexo proteína-receptor entre SHH, LRP2 e PTCH1, também ocorre ativação da via de sinalização de SHH nas células da LMRV do tubo neural, resultando curiosamente, na ativação da expressão de *Shh* nestas células. Estes resultados (figura 42), corroboram com resultados apresentados anteriormente *in vivo*, nos quais cirurgia de retirada da PPC resultou em ausência da expressão de *Shh* na região ventral tubo neural e transplante ectópico da PPC resultou em expressão ectópica de *Shh* na neuroectoderma (futuro tubo neural) adjacente ao transplante ectópico (apresentados na figura 31). Também vão ao encontro dos experimentos *in vitro* apresentados, nos quais explantes da placa neural submetidos a SHH exógeno resultaram em células SHH positivas (ver figura 34). Juntos, estes resultados apontam para a atuação de SHH secretado pela PPC sobre a indução da expressão de SHH nas células da LMRV do tubo neural (ver figura 43).



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 40), acrescido do resultado mostrando em vermelho a atuação de SHH secretado pela PPC sobre as células da LMRV do tubo neural. Nas células da LMRV do tubo neural, SHH se liga aos receptores de superfície celular PTCH1 e LRP2. Esta ligação proteína-receptores impede que PTCH1 se ligue a SMO, bloqueando-o. SMO, por sua vez, bloqueia a interação dos fatores de transcrição GLI1 com os microtúbulos que formam o cílio primário, possibilitando a entrada de GLI1 completa no núcleo. No núcleo, estes fatores de transcrição vão atuar ativando a expressão de genes-alvo da sinalização de SHH. A flecha preta com um ponto de interrogação representa as informações ainda não conhecidas até aqui sobre como a atuação desta cascata induz a ativação da expressão de SHH nas células da LMRV do tubo neural. Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

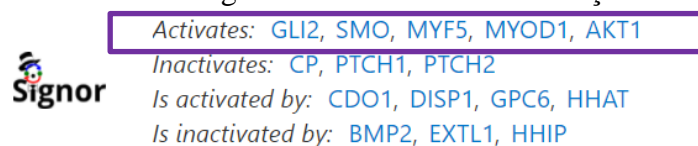
A seguir, o presente trabalho foi dedicado a compreender como estaria ocorrendo a indução da expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural induzido pela sua própria cascata de sinalização (ver flecha com ponto de interrogação na figura 43).

### 5.8 A SECREÇÃO DE SHH PELA PPC INDUZ DE FORMA INDIRETA A EXPRESSÃO DE *SHH* NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL

Sabendo que SHH atua como um fator solúvel, o esperado é que a sua atuação sobre as células da LMRV do tubo neural induza a expressão de genes *downstream* da sinalização de SHH nestas células-alvo. Portanto, foi questionado a possibilidade de SHH secretado pela PPC, ao chegar nas células da LMRV do tubo neural, ativar a sua própria expressão nestas células-alvo (ver ponto de interrogação na figura 43). Isso é possível através de duas vias: (1) direta, na qual *SHH* é um gene-alvo de sua própria cascata de sinalização ou (2) indireta, na qual SHH ativa a expressão de um gene-alvo da sua sinalização que quando expresso, induz a expressão de *SHH* novamente. Para compreender qual das duas ocorre neste contexto molecular, foi executada uma busca por genes-alvo da sinalização de SHH (isso é, genes que são ativados após a ativação da cascata de sinalização de SHH), utilizando a plataforma SIGNOR.

A análise da via de sinalização de SHH mostrou que na presença de SHH, ocorre a ativação dos fatores de transcrição GLI 1, 2 e 3, que ao entrarem no núcleo, modulam a transcrição de genes-alvo. Porém, *SHH* não está entre os genes-alvo que tem sua transcrição ativada por estes fatores de transcrição (ver figura 44).

Figura 44 - Análise de genes-alvo da via de sinalização de SHH



Fonte: Retirado da plataforma SIGNOR.

Nota: Esquema mostrando as moléculas sinalizadores envolvidas ativando, reprimindo, sendo ativadas ou sendo reprimidas a SHH. Disponível em: <[https://signor.uniroma2.it/relation\\_result.php?id=Q15465](https://signor.uniroma2.it/relation_result.php?id=Q15465)>. Acesso em: 13/06/2021.

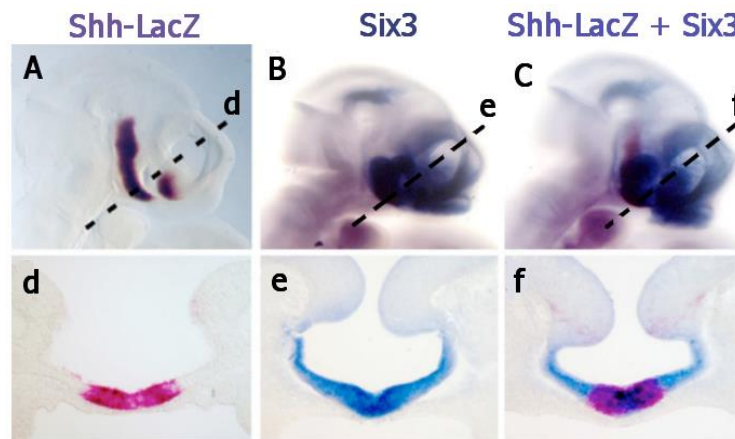
O resultado apresentado na figura 44, mostrando os genes-alvo da sinalização de SHH, os quais o próprio gene *SHH* não está incluso, sugerem que a indução da expressão de *SHH* nas

células da LMRV do tubo neural ocorrem através de um feedback positivo envolvendo outra(s) molécula(s) sinalizadora(s).

### 5.9 SHH ATIVA A EXPRESSÃO DE SIX3 NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL, INICIANDO UM FEEDBACK POSITIVO

Segundo GENG et al. (2008), existe um feedback positivo entre *SIX3* e *SHH* que opera nas células da LMRV do tubo neural. Estas informações corroboram com análises realizadas pelo GeneCards que apontam *SIX3* como um regulador direto da expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural, e *SHH* por sua vez, mantém a expressão de *SIX3*. Isso corrobora com dados apresentados por JEONG et al. (2009), que ao analisar o padrão de expressão de *Shh* e *Six3* nas células da LMRV do tubo neural de embriões de *Mus musculus*, detectaram sobreposição na expressão destas proteínas. Esta sobreposição é necessária para que *SIX3* seja um regulador direto da expressão de *Shh* e para que *SHH* possa regulá-lo através de sua cascata de sinalização (ver figura 45).

Figura 45 - Sobreposição do padrão de expressão de *Shh* e *Six3* nas células da LMRV do tubo neural



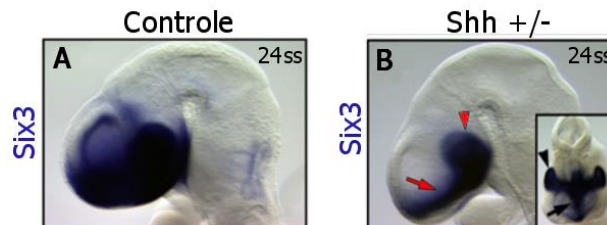
Fonte: Retirado de JEONG et al. (2009).

Nota: Visão lateral de embriões de *Mus musculus* em **A**, **B** e **C** com marcação para a expressão de *Shh* (através da atividade de X-gal), *Six3* (através de hibridização *in situ*) e sobreposição de ambas, respectivamente. Em **d**, **e** e **f**, secções coronais das imagens acima, mostrando a expressão de *Shh* (em rosa) e *Six3* (em azul) nas células da LMRV do tubo neural.

Além disso, experimentos realizados por GENG et al. (2008) utilizando embriões de *Mus musculus* haploinsuficientes para *Shh* (*Shh*<sup>+/-</sup>), mostraram que a expressão de *Six3* nas células da LMRV do tubo neural reduz drasticamente em embriões mutantes comparados ao

controle (ver flecha e ponta da flecha vermelhas em figura 46, B), sugerindo atuação de *Shh* sobre a expressão de *Six3*, regulando-o positivamente neste local (ver figura 46)

Figura 46 - Ausência de alelo para *Shh* reduz drasticamente a expressão de *Six3* nas células da LMRV do tubo neural

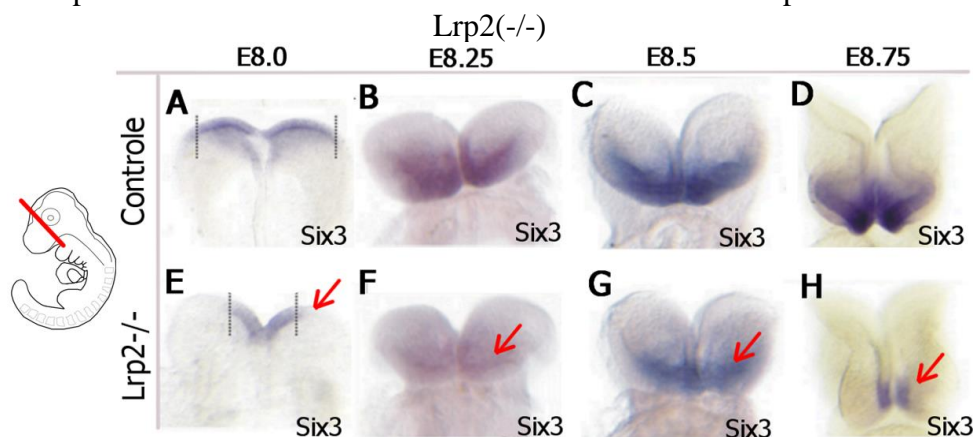


Fonte: Retirado de GENG et al. (2008).

Nota: Vista lateral de embriões de *Mus musculus* logo após o fechamento do tubo neural para formar o prosencéfalo (equivalente a E10 em *Mus musculus*). Embriões controle em A e haploinsuficientes para *Shh* em B, com marcação por hibridização *in situ* para *Six3*. Nos embriões com perda de um dos alelos para *Shh* ocorreu uma redução gritante da expressão de *Six3* no tubo neural.

Interessantemente, nos experimentos CHRIST et al. (2012) com embriões de *Mus musculus* mutantes para um co-receptor de SHH, o LRP2 (*Lrp2*  $-/-$ ), a expressão *Six3* foi severamente reduzida nas células da LMRV do prosencéfalo (ver flecha vermelha em figura 47, E), mesmo antes que alterações na expressão de *Shh* pudesse ser observada, permanecendo severamente reduzida nos estágios posteriores (CHRIST et al., 2012) (ver flecha vermelha em figura 47, F, G e H).

Figura 47 - Expressão de *Six3* nas células da LMRV do tubo neural é perturbada em embriões



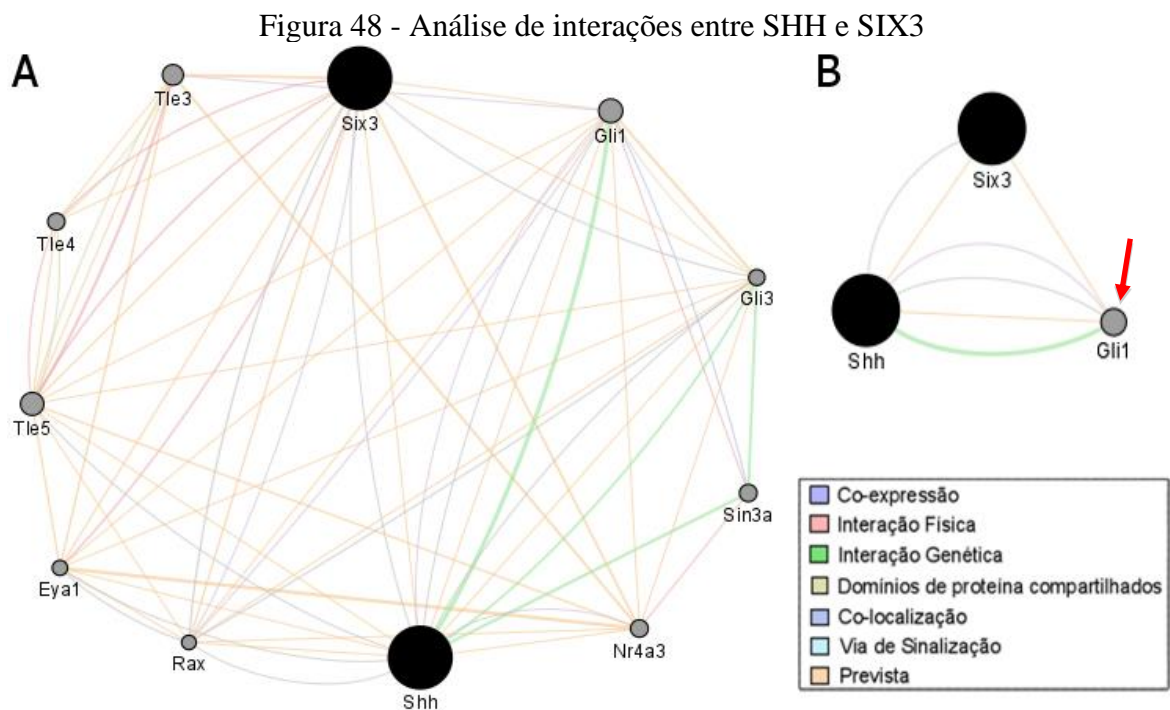
Fonte: Retirado de CHRIST et al. (2012).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da secção coronal do embrião apresentado em A-H. Secções coronais do tubo neural em embrião de *Mus musculus* nos períodos iniciais da neurulação, com hibridização *in situ* para *Six3*. Na linha de cima, embriões controle e na de baixo, embriões *Lrp2*  $-/-$ . Os estágios de desenvolvimento estão indicados acima para os embriões das respectivas colunas. Em embriões *Lrp2*  $-/-$ , *Six3* é



drasticamente reduzido nas células da LMRV do tubo neural em estágio E8.0 (flecha vermelha em **E**), continuando com expressão reduzida após este estágio (flecha vermelha em **F**, **G** e **H**).

A redução na expressão de *Six3* nas células da LMRV do tubo neural de embriões *Lrp2*(-/-), antes de qualquer alteração na expressão de *Shh*, sugere que *Six3* é um gene-alvo da maquinaria de sinalização de SHH e que pode estar atuando sobre a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural. Para compreender como a expressão de *Shh* poderia atuar sobre expressão de *Six3*, uma análise *in silico* desta interação foi realizada através do GeneMANIA (ver figura 48).



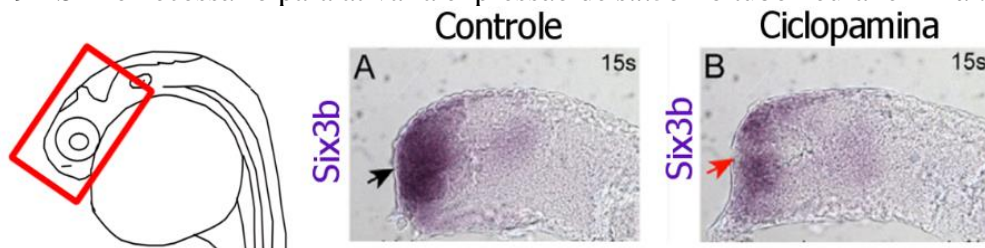
Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Análise de interações entre as proteínas SIX3 e SHH para *Mus musculus*. Cada cor de linha descreve uma relação, conforme a legenda apresentada no canto inferior à direita. Esferas pretas representam as primárias, ou seja, proteínas-alvo de estudo na análise. Esferas cinzas representam proteínas secundárias, ou seja, proteínas apresentadas nos resultados da análise e que podem estar mediando a interação entre as proteínas primárias, SHH e SIX3. A fim de visualizar as interações de forma mais limpa, a análise foi configurada para mostrar apenas as vinte proteínas mais relevantes, das quais somente proteínas que atuam como fator de transcrição e que consequentemente podem estar atuando diretamente sobre a expressão de SIX3, foram deixadas na análise (apresentadas em **A**). Em **B**, foi selecionada apenas a proteína GLI1 (flecha vermelha) por ser a única expressa nas células da LMRV do tubo neural dentre as proteínas apresentadas no resultado em **A**. Esta seleção se deve ao fato de que a interação em **A** mostra proteínas cuja atuação ocorre em diversas partes do organismo e não somente no local alvo de estudo. Análise original disponível em <<https://genemania.org/search/mus-musculus/six3/shh/>>. Acesso em 16/06/2021.

A análise de interações entre SIX3 e SHH mostrou que dentre as vinte proteínas mais relevantes, a única que atua como fator de transcrição e é expressa pelas células da LMRV do tubo neural, é GLI1. GLI1 faz parte da cascata de sinalização de SHH e de acordo com as interações encontradas na análise de interações entre *Shh* e *Six3*, *Gli1* apresenta interação prevista (laranja) com *Six3* (ver figura 48). Segundo o GeneMANIA, esta interação prevista entre as proteínas *Gli1* e *Six3* significa que, genes ortólogos dos genes que codificam estas proteínas em *Mus musculus* (para significado de genes ortólogos, ver Glossário de Palavras-chave) são conhecidos por interagir entre si em outras espécies.

SANEK et al. (2009) questionaram se esta relação regulatória de *Shh* sobre a expressão de *Six3* demonstrada no tubo neural de *Mus musculus* por (GENG et al., 2008) também ocorre em *Danio rerio*. Para testar isso, a sinalização Hedgehog foi bloqueada, mostrando redução do domínio de expressão de *six3b* no tubo neural (ver flecha vermelha na figura 49, B), sugerindo que *Shh* é necessário para possibilitar níveis adequados de expressão de *six3b* nestas células (ver figura 49).

Figura 49 - *Shh* é necessário para ativar a expressão de *six3b* no tubo neural em *Danio rerio*

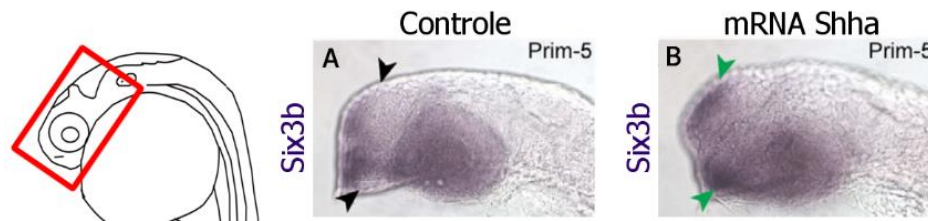


Fonte: Retirado de SANEK et al. (2009).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A e B. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* logo após o fechamento do tubo neural ao nível do prosencéfalo (equivalente ao estágio de 15ss em *Danio rerio*) após tratamento no estágio de 2-4 células do tipo controle em **A** e com ciclopamina em **B**. Os resultados mostram através de hibridização *in situ* que, *six3b* reduziu drasticamente em embriões tratados com ciclopamina (flechas vermelhas em **B**), comparado a embriões tratados com controle (flechas pretas em **A**).

A seguir, SANEK et al. (2009) perguntaram se a expressão de *shh* é suficiente para ativar a transcrição do gene *six3b* no tubo neural em *Danio rerio*. Para isso, os autores injetaram RNAm de *shha* nos embriões, que mostrou leve expansão da expressão de *six3b* no tubo neural ao nível do telencéfalo e diencéfalo (ver ponta de flecha verde na figura 50, B).

Figura 50 - *Shha* é suficiente para induzir a expressão de *six3b* no tubo neural em *Danio rerio*

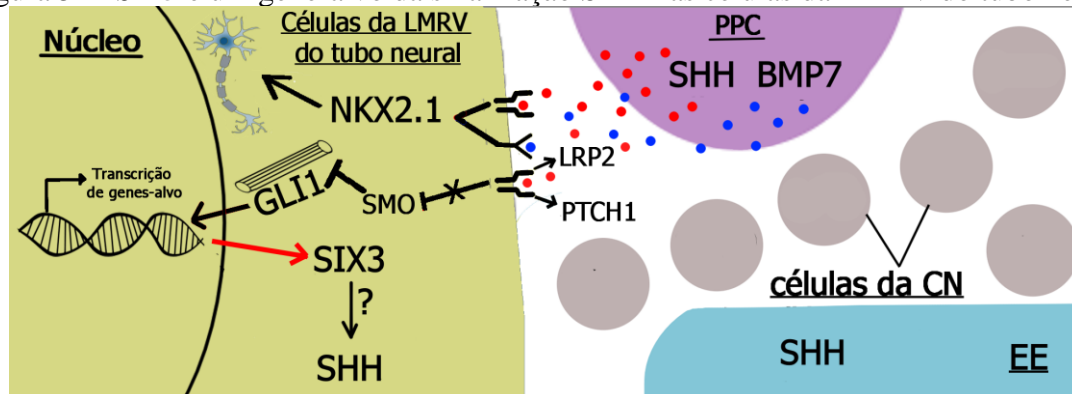


Fonte: Retirado de SANEK et al, (2009).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A e B. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* após o período de formação dos somitos (equivalente ao estágio de Prim-5 em *Danio rerio*). Após tratamento controle em **A** e com injeção de mRNA de *shha* em **B**, os embriões foram submetidos a hibridização *in situ* para *six3b*, mostrando que em embriões injetados com mRNA para *shha*, a expressão de *six3b* expandiu (setas verdes em **B**).

Diante dos resultados de (1) sobreposição da expressão de *Shh* e *Six3* nas células da LMRV do tubo neural (ver figura 45); (2) redução da expressão de *Six3* em embriões mutantes *Shh*<sup>+/-</sup> ou mutantes *Lrp2*<sup>-/-</sup> ou expostos a ciclopamina (ver figura 46, 47 e 49, respectivamente) e (3) expansão da expressão de *six3* em embriões expostos a injeção de RNAm de *shha* (ver figura 50), *SIX3* é um gene-alvo da sinalização de SHH nas células da LMRV do tubo neural. Além disso, de acordo com o resultado da análise de interação entre *SHH* e *SIX3* (ver figura 48), esta interação ocorre através dos fatores de transcrição GLI1 (ver figura 51).

Figura 51 - *SIX3* é um gene-alvo da sinalização SHH nas células da LMRV do tubo neural



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 43), acrescido do resultado mostrando a atuação da via de sinalização de SHH regulando positivamente a expressão de *SIX3*. No núcleo, o fator de transcrição GLI1 vai atuar ativando a expressão de *SIX3*, um gene-alvo da sinalização de SHH. A flecha preta com um ponto de interrogação mostrada na figura 43, aparece aqui entre *SIX3* e SHH, uma vez que a expressão de *SIX3* é ativada pela sinalização SHH, mas ainda não se sabe como a expressão de SHH é ativada por *SIX3*. Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

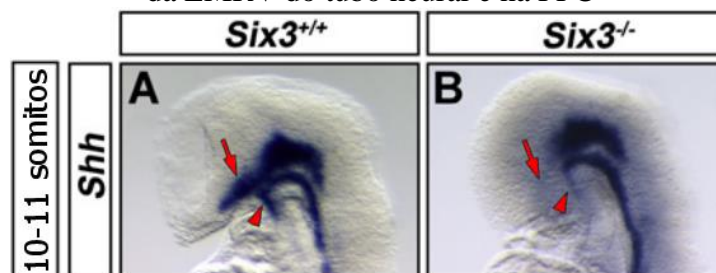


O resultado mostrando a atuação de SHH sobre a expressão de *SIX3* (ver figura 51) converge para a possibilidade de existir um ciclo de feedback positivo entre *SHH* e *SIX3* no tubo neural. A primeira etapa deste ciclo ocorre através da atuação de SHH ativando a expressão de *SIX3*, que parece ocorrer via atividade do fator de transcrição GLI1. No entanto a segunda etapa, que é a atuação de *SIX3* ativando a expressão de *SHH*, ainda permanece desconhecida quanto aos seus mecanismos moleculares (ver flecha com ponto de interrogação na figura 51). Essas informações direcionaram a próxima parte do trabalho para abordagens a respeito dos mecanismos moleculares utilizados por *SIX3* para ativar a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural. Juntos, estes resultados irão explicar como a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural é induzida a partir da sua própria cascata de sinalização.

#### 5.10 SIX3 COMPLETA O CICLO DE FEEDBACK POSITIVO ATUANDO COMO UM ATIVADOR DA EXPRESSÃO DE *SHH* NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL

Para confirmar que alterações na expressão de *Six3* resultam na ausência da expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural, GENG et al. (2008) utilizaram embriões de *Mus musculus* com deleção em homozigose para *Six3* (*Six3*<sup>-/-</sup>). Os resultados mostraram que embriões mutantes perdem a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural (ver flecha vermelha em figura 52, B) e apresentam severa *downregulação* da expressão de *Shh* na PPC (ver ponta de flecha vermelha em figura 52, B).

Figura 52 - A expressão de *Six3* é necessária para a indução da expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural e na PPC

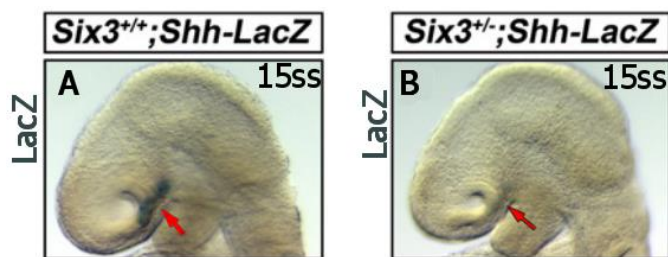


Fonte: Retirado de GENG et al. (2008)

Nota: Visão lateral de embriões de *Mus musculus* no estágio inicial de neurulação (equivalente ao período de 10-11 somitos para *Mus musculus*). Embriões selvagem em **A** e com deleção em homozigose para *Six3* em **B**. Os resultados mostram através de hibridização *in situ* para *Shh*, que sua expressão nas células da LMRV do tubo neural (flecha vermelhas em **A**) e PPC (ponta de flecha vermelha em **A**) foi completamente perdida e severamente reduzida, respectivamente em embriões mutantes.

Para saber se SIX3 controla diretamente a expressão de *Shh*, GENG et al. (2008) analisaram a expressão de *Shh* em embriões de *Mus musculus* mutantes heterozigóticos para *Six3*, através do gene repórter *Shh-LacZ* (*Six3<sup>+/-</sup>; Shh-LacZ*). O resultado mostrou que a expressão de *Shh* é ausente nas células da LMRV do tubo neural de embriões mutantes (ver flecha vermelha na figura 53, B) comparado ao controle (ver flecha vermelha na figura 53, A). Logo, *Shh* é um gene-alvo direto de SIX3 nas células da LMRV do tubo neural.

Figura 53 - A atividade de SIX3 como um ativador da expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural é direta



Fonte: Retirado de GENG et al. (2008).

Nota: Visão lateral de embriões de *Mus musculus* após o fechamento do tubo neural para formar o prosencéfalo (equivalente a 15 somitos para *Mus musculus*). Embriões controle em **A** e *Six3<sup>+/-</sup>; Shh-LacZ* em **B**. Os resultados mostram através da atividade de X-gal, que *Shh* foi ausente nas células da LMRV do tubo neural de embriões mutantes (ver flecha vermelha em **B**) em comparação a embriões selvagens (ver flecha vermelha em **A**).

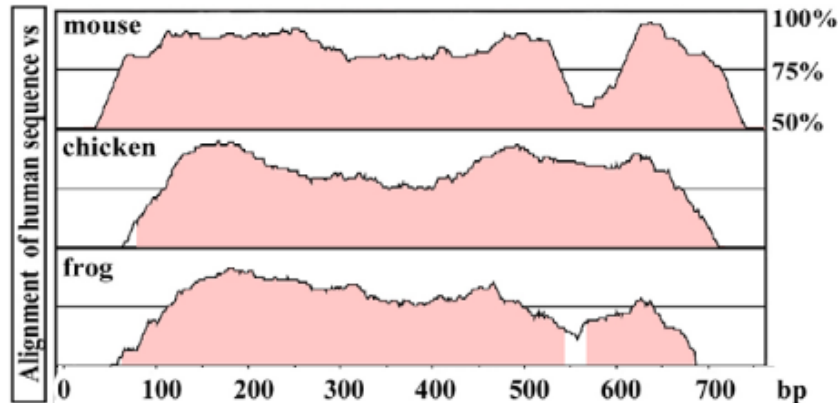
Estes resultados demonstram que a atividade de SIX3 é diretamente necessária para a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural (GENG et al., 2008). Para compreender o mecanismo utilizado por SIX3 para regular positivamente a expressão de *Shh*, JEONG et al. (2009) mostrou a existência de uma região regulatória (*enhancer*) denominada *Shh Brain enhancer 2* (*SBE2*), que atua sobre a expressão de *SHH*, especificamente nas células da LMRV do tubo neural.

<b>SBE2</b>	Sequência gênica que funciona como região regulatória ( <i>enhancer</i> ) da expressão do gene <i>SHH</i> (JEONG et al., 2009).
-------------	---

A sequência gênica presente na região do enhancer *SBE2* e o padrão de atividade deste enhancer possui um alto grau de conservação dentre *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus* e *Xenopus tropicalis* (JEONG et al., 2009). A atividade conservada do *enhancer SBE2*

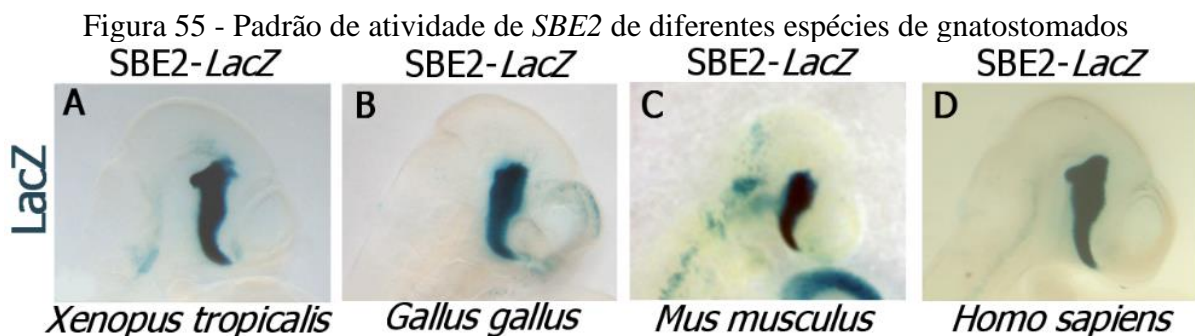
sugere um mecanismo molecular de ativação da expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural bastante conservado nos gnatostomados (ver figura 54 e 55).

Figura 54 - A sequência gênica de *SBE2* é altamente conservada entre espécies de gnatostomados



Fonte: JEONG et al. (2006).

Nota: Grau de conservação da sequência gênica de *SBE2* de *Mus musculus*, *Gallus gallus* e *Xenopus tropicalis* em comparação a *Homo sapiens*.

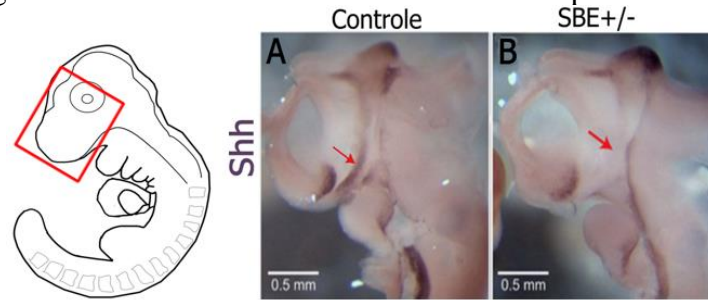


Fonte: Retirado de (JEONG et al., 2006; SAGAI et al., 2019).

Nota: Embriões de *Mus musculus* em A-D com inserção de gene repórter para sequências de *SBE2* derivadas de diferentes espécies. O resultado mostrou que o cenário molecular nas diferentes espécies estudadas foi capaz de ativar o *enhancer* *SBE2* de forma praticamente idêntica. Isso demonstra atividade altamente conservada desse *enhancer* nas células da LMRV do tubo neural.

Trabalhos realizados por CRANE-SMITH et al. (2021) mostraram que embriões de *Mus musculus* mutantes homocigóticos para *Sbe2* perdem a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural (ver figura 56), confirmando a relação da sequência regulatória *SBE2* com a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural.

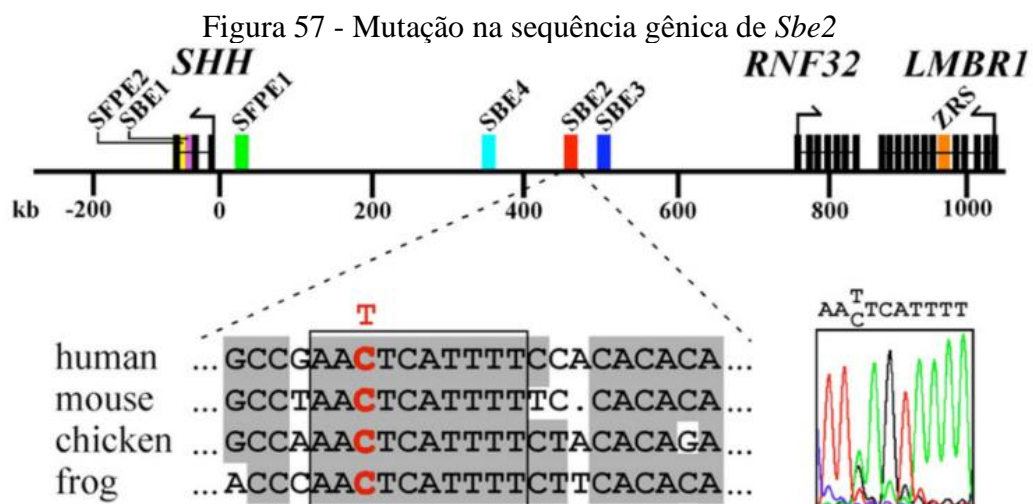
Figura 56 - A atividade de *Sbe2* atua sobre a expressão de *Shh*



Fonte: Retirado de CRANE-SMITH et al. (2021).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A e B. Secção sagital na região da linha média de embriões de *Mus musculus* próximo ao momento inicial de condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio E10.5 para *Mus musculus*). Embrião selvagem em A e mutante heterozigótico para *Sbe2* em B. Os resultados através de hibridização *in situ* para *Shh* mostraram que em embriões *Sbe*<sup>+/-</sup>, ocorreu total perda da expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural (ver flecha vermelha em B) em comparação ao controle (ver flecha vermelha em A).

Corroborando com o experimento de CRANE-SMITH et al. (2021) nos quais mutantes para *SBE2* perdem expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural (ver figura 56), experimentos realizados por JEONG et al. (2009) mostraram que mutações na sequência gênica de *SBE2* resulta na perda da expressão de *Shh* na mesma região do tubo neural. Para isso, os autores utilizam embriões transgênicos de *Mus musculus* com uma variação nucleotídica na sequência do enhancer *Sbe2*, caracterizada pela mutação de uma citosina - *Sbe2* (C) - por uma timina - *Sbe2* (T) (ver figura 57).



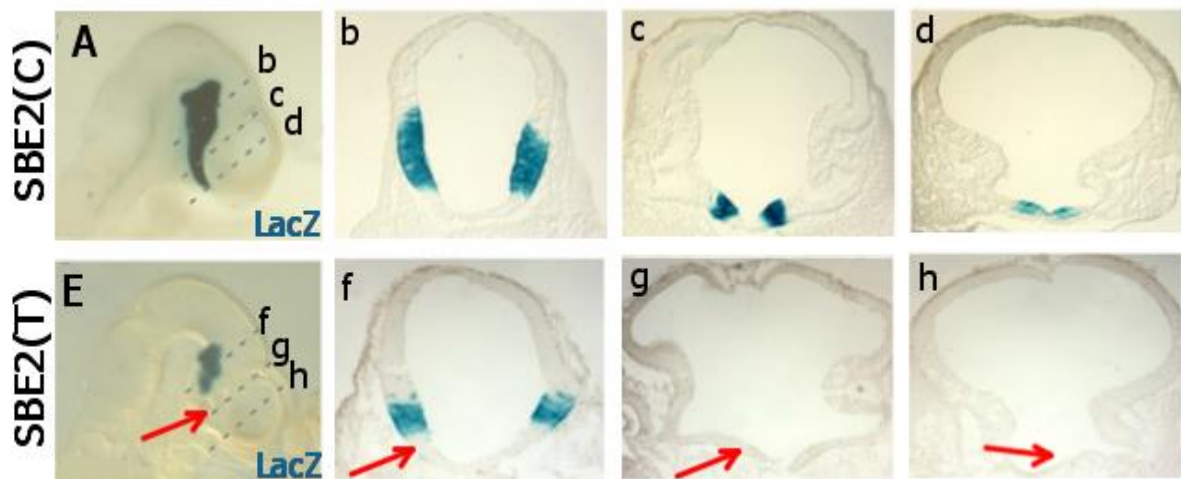
Fonte: Retirado de JEONG et al. (2009).

Nota: Na imagem de cima, a localização da sequência de *Sbe2* com relação a outras regiões regulatórias, incluindo a região codificadora de *Shh*. Na imagem de baixo, uma amplificação da sequência gênica de *Sbe2* onde ocorreu a variação nucleotídica presente nos embriões de *Mus musculus* transgênicos (ver "T" no quadrado preto representando a substituição de uma citosina por uma timina).

Além disso, segundo JEONG et al. (2009), a região de mutação está localizada em uma região altamente conservada que tem sido mantida em humanos, *Mus musculus*, *Gallus gallus* e anuros por 450 milhões de anos.

Para analisar a distribuição espacial da atividade de *Sbe2* em embriões selvagens e mutantes, foram utilizados embriões de *Mus musculus* transgênicos nos quais o gene-repórter construído gerou colorações que permitiram analisar a distribuição espacial de atividade de *Sbe2*. Em embriões selvagens, a construção do gene-repórter recapitulou a da expressão de *Shh* no diencéfalo (ver figura 58, A-d). Já embriões mutantes, a construção do gene-repórter resultou em severa redução da atividade de *Sbe2* e consequentemente da expressão de *Shh* (ver flechas vermelhas na figura 58, E-h), indicando que a mutação na sequência gênica de *Sbe2* alterou a atividade deste enhancer e consequentemente, o mecanismo de indução da expressão de *Shh* nesta região.

Figura 58 - Mutação em *Sbe2* reduz a sua atividade nas células da LMRV do tubo neural



Fonte: Retirado de JEONG et al. (2009)

Nota: Visão lateral de embrião de *Mus musculus* próximo ao momento inicial de condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio E10.5 para *Mus musculus*). Embriões com domínio espacial da atividade de SBE2 em embriões selvagem em **A** e mutantes para *Sbe2* em **E**. As linhas pontilhadas em **A** e **E** representam os cortes histológicos em **b**, **c**, **d** e **f**, **g**, **h**, respectivamente. Os resultados mostraram através de coloração representando a atividade de X-gal, que em embriões mutantes (*Sbe(T)*), a redução na atividade de *Sbe2* ocorreu nas células da LMRV ao nível da vesícula óptica até a extensão rostral do diencéfalo (flecha vermelha em **E-H**).

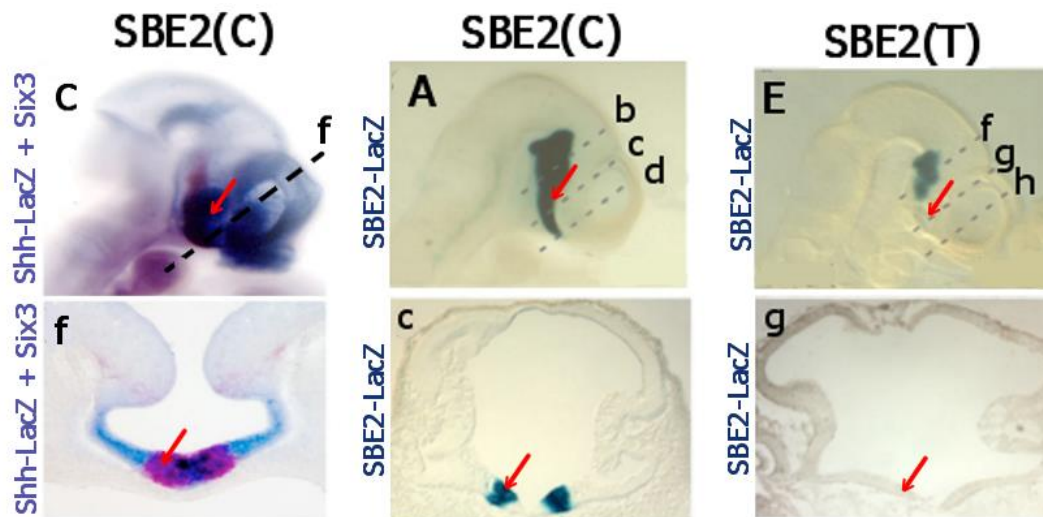
De acordo com os resultados mostrando redução na expressão de *Shh* em embriões mutantes para a sequência gênica de *Sbe2* (ver figuras 56 e 58), é possível inferir que o enhancer



*Sbe2* controla a expressão de *Shh* nas células da LMRV do tubo neural, sendo este mecanismo molecular, altamente conservado durante a evolução dos gnatostomados.

Completando o ciclo de feedback positivo entre *Shh* e *Six3* nas células da LMRV do tubo neural, experimentos realizados por JEONG et al. (2009) identificaram SIX3 como o ligante do enhancer *Sbe2*, atuando como um ativador da expressão de *Shh* (JEONG et al., 2009). Interessantemente, quando analisamos o local de perda da atividade de *Sbe2* em embriões mutantes (*Sbe2(T)*) (ver figura 59, E e g) e comparamos com a sobreposição da expressão de *Shh* e *Six3* (figura 59, C e f), o local é o mesmo (ver figura 59).

Figura 59 - Perda de atividade de *Sbe2* em embriões mutantes sobrepõe com expressão de *Shh* e *Six3*

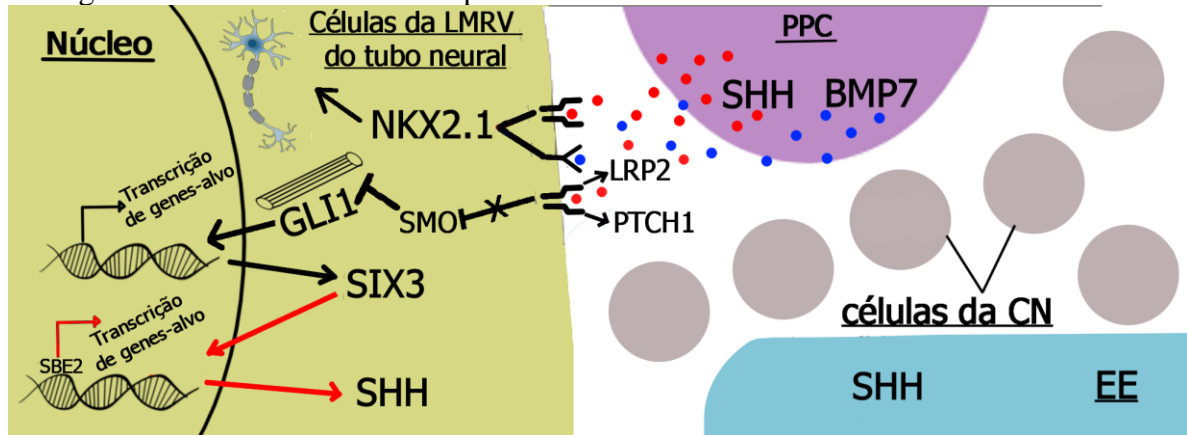


Fonte: Retirado de JEONG et al. (2009).

Nota: Esquema mostrando visão lateral de embrião de *Mus musculus* no período próximo ao momento inicial de condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio E10.5 para *Mus musculus*), com domínios de expressão sobreposta de *Shh* e *Six3* por expressão de X-gal e hibridização *in situ*, respectivamente. As linhas pontilhadas em C, A e E representam o local onde ocorreu as secções coronais mostradas em f, c e g, respectivamente. Interessantemente, os resultados da atividade de X-gal mostrando o padrão espacial da atividade de *Sbe2* em embriões selvagens e mutantes (visão lateral e secção coronal apresentadas em A, E e c, G, respectivamente), mostrou drástica redução da atividade de *Sbe2* em embriões mutantes (ver flechas vermelhas em E e g). Esta redução ocorre no exato local de sobreposição da expressão de *Shh* e *Six3* (ver flecha vermelha em C e f).

Juntas, estas informações apontam para a regulação direta de SIX3 sobre a expressão de *Shh* no tubo neural, atuando através da sua ligação ao enhancer *Sbe2*, mantendo o ciclo de feedback positivo entre estas duas moléculas sinalizadoras nas células da LMRV do tubo neural (ver flechas vermelhas na figura 60).

Figura 60 - *SIX3* atua sobre a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 51), acrescido do resultado mostrando a atuação do fator de transcrição *SIX3* como um ativador da expressão de *SHH*. O mecanismo molecular envolvido nesta ativação envolve a ligação de *SIX3* ao enhancer *SBE2*. Para isso, *SIX3* entra no núcleo, se liga ao enhancer *SBE2* e ativa a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural (flechas vermelhas). Portanto, quando ativado por *SHH*, *SIX3* mantém o ciclo de feedback positivo ativando a expressão de *SHH* novamente. Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

Compreendendo como *SHH* secretado pela PPC é capaz de induzir a sua própria expressão nas células da LMRV do tubo neural, em seguida foi verificado como a sinalização *SHH* estaria atuando sobre a formação da trabécula, uma vez que, como dito anteriormente (rever item 1.2.3.2 da introdução), esta proteína atua diretamente sobre este processo em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Mus musculus*, sendo portanto, considerada uma proteína primária na metodologia deste trabalho (em caso de dúvidas, rever item 4.2.1 da metodologia).

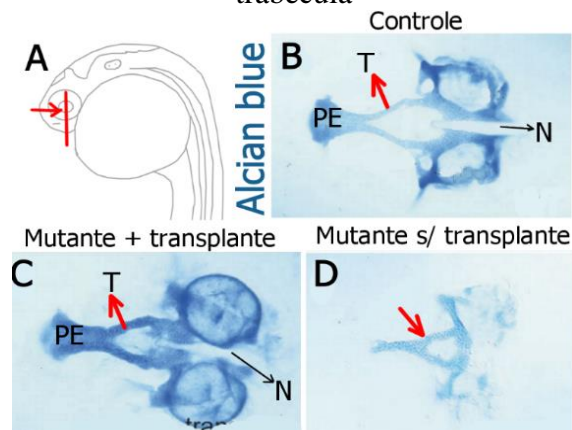
### 5.11 SHH EXPRESSO NAS CÉLULAS DA LMRV DO TUBO NEURAL ATUA NA FORMAÇÃO DA TRABÉCULA ATRAVÉS DA EE

EBERHART et al. (2006) e WADA et al. (2005b) foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho pois abordaram experimentos a respeito da atuação da EE sobre a formação da trabécula e também trouxeram o estudo das células da LMRV do tubo neural atuando sobre este processo, colaborando com informações bastante interessantes para o desenvolvimento do presente trabalho.

WADA et al. (2005) realizou experimentos a fim de compreender qual é a estrutura embrionária fonte de *Shh* necessária para o desenvolvimento adequado do neurocrânio anterior. Para isso, os autores utilizaram embriões de *Danio rerio* para testar a capacidade das células de

embriões selvagem de resgatar o desenvolvimento da trabécula quando transplantadas para embriões hospedeiros deficientes em *shh*. Isso criou o que os autores chamam de embriões-mosaico. Para isso, células do ectoderma dorsal (futuras células da LMRV do tubo neural) de embriões selvagem, foram transplantadas para a mesma região em embriões hospedeiros mutantes homocigóticos para *shh* (*shh*<sup>-/-</sup>). O resultado mostrou recuperação do desenvolvimento da trabécula e em alguns casos, também houve uma adequada separação bilateral da trabécula (ver figura 61, C) em comparação com embriões mutantes que não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagem (ver figura 61, D).

Figura 61 - Shh secretado nas células da LMRV do tubo neural atua na formação inicial da trabécula



Fonte: Retirado de WADA et al. (2005).

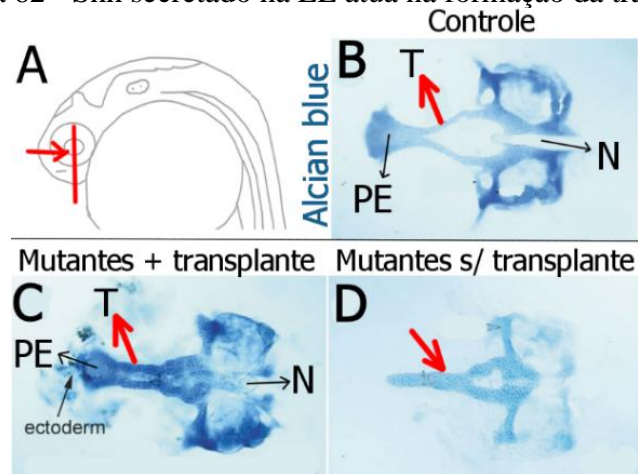
Nota: Em **A**, esquema visão lateral de embriões de *Danio rerio* mostrando o local de visão dorsal (traço vermelho em **A**) da dissecação do neurocrânio apresentado em **B**, **C** e **D**. Em **B**, **C** e **D**, visão dorsal do neurocrânio anterior dissecado de embriões após a formação da trabécula (equivalente a 5dpf em *Danio rerio*). Em **B** o neurocrânio de um embrião selvagem, em **C**, embriões mutantes homocigóticos para *shh* que receberam transplante de células do ectoderma dorsal (futuro tubo neural) de embriões selvagem no estágio inicial da gástrula (6 horas pós-fertilização (hpf)) e em **D**, embriões mutantes que não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embrião selvagens. O resultado mostrou através do marcador de cartilagem Alcian blue, que em embriões mutantes submetidos a transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagens, ocorreu recuperação quase total do neurocrânio anterior (**C**), ficando bastante semelhante ao neurocrânio de embriões selvagem (**B**), enquanto que nos embriões mutantes que não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagens, o desenvolvimento da trabécula foi totalmente alterado (**D**). N, notocorda; PE, placa etmoidal; T, trabécula.

WADA et al. (2005) também realizaram o mesmo experimento de transplante para gerar embriões-mosaico só que desta vez, utilizando as células da EE de embriões selvagens. O objetivo foi analisar a capacidade da EE de resgatar o desenvolvimento do neurocrânio anterior quando transplantadas para embriões hospedeiros *shh*<sup>-/-</sup>. O resultado mostrou a recuperação do desenvolvimento da trabécula (ver figura 62, C) em comparação com embriões mutantes que



não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagem (ver figura 62, D), porém, a separação bilateral da trabécula não ocorreu totalmente (ver figura 62).

Figura 62 - Shh secretado na EE atua na formação da trabécula



Fonte: Retirado de WADA et al. (2005).

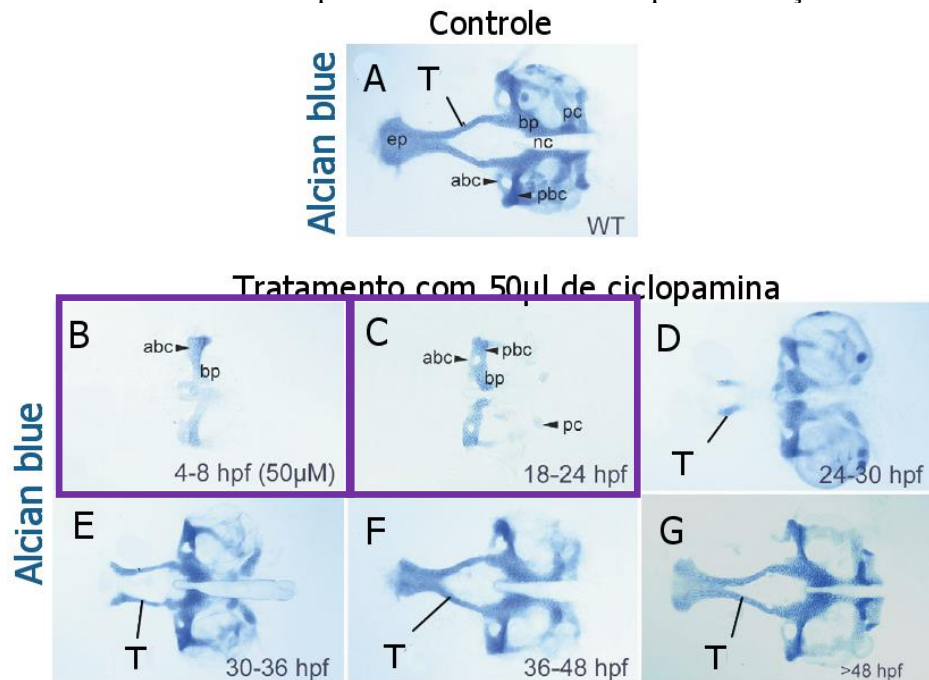
Nota: Em A, esquema mostrando visão lateral de embriões de *Danio rerio* com o local de visão dorsal (traço vermelho em A) da dissecção do neurocrânio apresentado em B, C e D. Em B, C e D, visão dorsal do neurocrânio anterior dissecado de embriões após a formação da trabécula (equivalente a 5dpf em *Danio rerio*). Em B o neurocrânio de um embrião selvagem, em C, embriões mutantes homocigóticos para *shh* que receberam transplante de células do ectoderma dorsal (futuro tubo neural) de embriões selvagem no estágio inicial da gástrula (6hpf) e em D, embriões mutantes que não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embrião selvagens. O resultado mostrou através do marcador de cartilagem Alcian blue, que em embriões mutantes submetidos a transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagens, ocorreu recuperação parcial do neurocrânio anterior (C), ficando bastante semelhante ao neurocrânio de embriões selvagem (B), enquanto que nos embriões mutantes que não receberam transplante de células do ectoderma dorsal de embriões selvagens, o desenvolvimento da trabécula foi totalmente alterado (D). N, notocorda; PE, placa etmoidal; T, trabécula.

Os resultados apresentados por WADA et al. (2005a) com transplante do ectoderma dorsal (futuro tubo neural) (ver figura 61) e EE (ver figura 62) de embriões selvagens para embriões mutantes *shh*<sup>-/-</sup>, sugerem que as células da LMRV do tubo neural e a EE formam dois centros organizadores, onde sinais moleculares vindos destas estruturas atuam no desenvolvimento do neurocrânio anterior, sendo Shh necessário para o processo.

Sabendo da necessidade da expressão de *shh* para a formação da trabécula (EE e células da LMRV do tubo neural), os autores decidiram realizar experimentos para compreender a necessidade temporal de Shh para este processo. Para isso, utilizaram embriões de *Danio rerio* submetidos a tratamento com um bloqueador da sinalização Hh - Ciclopamina. Os resultados mostraram duas importantes informações: (1) a necessidade de Shh para a formação da

trabécula é maior em estágios mais iniciais do desenvolvimento, diminuindo à medida que o processo de desenvolvimento ocorre (ver figura 63) e (2) as primeiras 24 horas são as mais cruciais quanto a necessidade de Shh para a formação da trabécula (ver figura 63, B e C).

Figura 63 - Necessidade temporal da atividade de Shh para formação da trabécula



Fonte: Retirado de WADA et al. (2005).

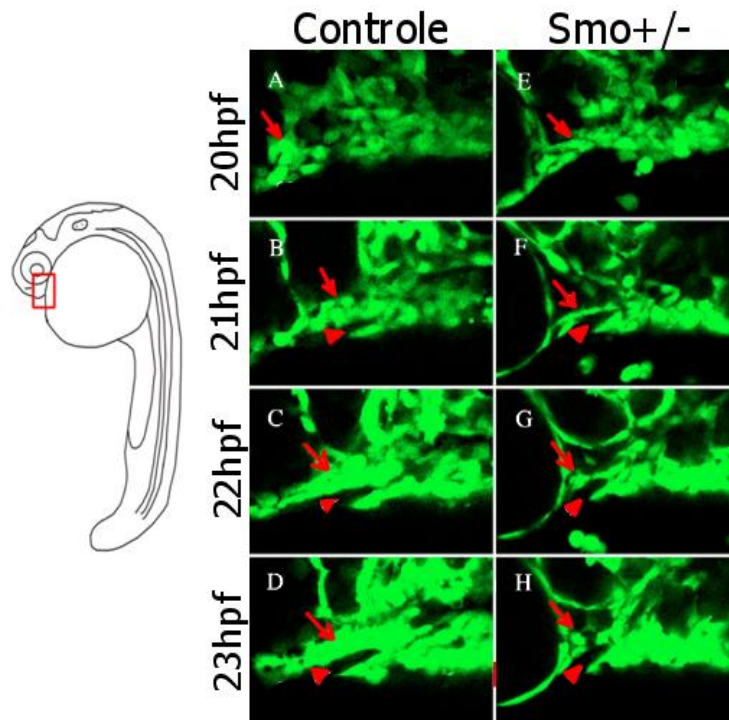
Nota: Visão dorsal do neurocrânio de embriões de *Danio rerio* controle em **A** e submetidos a tratamento com 50 µl de ciclopamina em **B-G**. O momento de tratamento está nas respectivas imagens, no canto inferior direito.

Resultados obtidos através de marcação de cartilagem com Alcian blue mostraram que quanto mais novos os embriões eram submetidos ao tratamento com ciclopamina, maior eram as perdas e alterações no neurocrânio, incluindo a trabécula. As primeiras 24 horas (ver destaques nos quadrados em roxo) foi o momento onde a perda e alteração na formação da trabécula foram mais intensas. abc, comissura basicapsular anterior; bp, placa basal (onde está localizada a cartilagem paracordal localizada já na região cordal); ep, placa etmoidal; nc, notocorda; pcb, comissura basicapsular posterior; pc, cartilagem parachordal; t, trabécula.

Corroborando com WADA et al. (2005), EBERHART et al. (2006) realizou experimentos com embriões mutantes heterozigóticos para *smo* (*smo+/-*) - uma proteína essencial na via de sinalização Shh -, nos quais as células da CN expressavam GFP de forma permanente (ver figura 64). Os resultados mostraram que as células da CN de embriões *smo+/-* migraram normalmente (ver flecha vermelha na figura 64, E e F) assim como o controle (ver flecha vermelha na figura 64, A e B), mas ao chegar na região dorsal da EE, estas células condensaram minimamente ou falharam em condensar (ver figura 64, G e H). Este resultado

aponta para uma necessidade de Shh para condensação das células da CN progenitoras da trabécula, mas não para a migração ou sobrevivência destas células.

Figura 64 - Em embriões *smo*<sup>+/-</sup>, as células da CN na região dorsal da EE falham em condensar



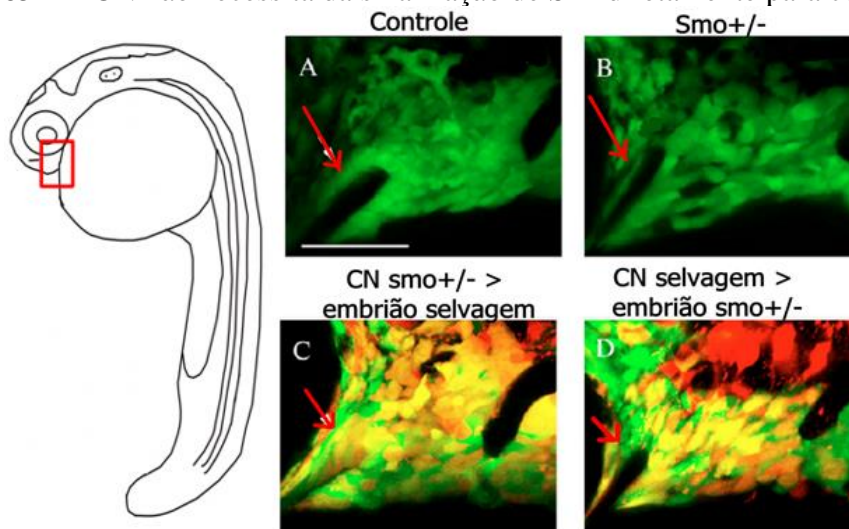
Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A-H. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* controle em A-D e mutantes *smo*<sup>+/-</sup> em E-H. O estágio do desenvolvimento está nas respectivas linhas, no canto inferior esquerdo, referente ao período um pouco após o fechamento do tubo neural para formar o prosencéfalo. Resultados obtidos através de detecção de fluorescência (green fluorescence protein) mostraram que assim como nos embriões controle (ver flecha vermelha em A), as células da CN os embriões mutantes migraram normalmente (ver flecha vermelha em E). Em 21hpf, o estomodeu se forma (ver ponta da flecha vermelha em B e F), com as células da CN na região dorsal deste (ver flechas vermelha em B e F). Em 22hpf, as células da CN iniciam o processo de condensação na região dorsal da EE de embriões selvagem (ver flecha vermelha em C e D), mas falham em condensar na região dorsal da EE de embriões mutantes *smo*<sup>+/-</sup> (ver flecha vermelha em G e H).

Para saber se as células da CN precisam receber a sinalização Shh diretamente para condensarem ou não, (EBERHART et al., 2006) utilizaram embriões-mosaico, onde hospedeiros selvagens receberam transplante de células da CN *Smo*<sup>+/-</sup> (*CN smo*<sup>+/-</sup> > *embrião selvagem*) e embriões *Smo*<sup>+/-</sup> receberam transplante de células da CN selvagem (*CN selvagem* > *embrião smo*<sup>+/-</sup>). *Smo* é uma proteína presente na cascata de sinalização Shh. Portanto, caso alterações na proteína *Smo* nas células da CN comprometam a formação da trabécula, significa que as células da CN necessitam receber diretamente a sinalização de Shh para condensarem.

O resultado mostrou condensação normal das células da CN na região dorsal da EE em CN *smo*<sup>+/-</sup> > embrião selvagem (ver flecha vermelha em figura 65, C), sugerindo que para que a condensação ocorra, as células da CN não necessitam diretamente de Shh. No entanto, o resultado mostrou falha na condensação das células da CN na região dorsal da EE em CN selvagem > embrião *smo*<sup>+/-</sup> (ver flecha vermelha em figura 65, D), sugerindo que para que a condensação ocorra, estruturas epiteliais em torno da CN necessitam diretamente de Shh (ver figura 65).

Figura 65 - A CN não necessita da sinalização de Shh diretamente para condensar



Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A-D. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* após a condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio de 30hpf para *Danio rerio*), sendo controle em **A**, mutantes *smo*<sup>+/-</sup> em **B** e mosaicos em **C** (CN *smo*<sup>+/-</sup> > embrião selvagem) e **D** (CN selvagem > embrião *smo*<sup>+/-</sup>). Os resultados obtidos através de detecção de fluorescência (green fluorescence protein) mostraram que embrião mosaico CN *smo*<sup>+/-</sup> > embrião selvagem as células da CN condensaram normalmente (ver flecha vermelha em **C**) quando comparadas ao controle (ver flecha vermelha em **A**). Já em embriões mosaicos CN selvagem > embrião *smo*<sup>+/-</sup>, as células da CN falharam em condensar, adquirindo um aspecto bastante parecido com embriões mutantes *smo*<sup>+/-</sup>.

No entanto, os autores raramente observaram formação de cartilagem nos embriões mosaicos CN *smo*<sup>+/-</sup> > embrião selvagem, sugerindo que existe uma necessidade da sinalização de Shh diretamente para a diferenciação das células da CN em estágios mais posteriores.

A fim de analisar se o estomodeu é a estrutura presente na região pré-cordal que precisa receber a sinalização Shh para promover a condensação das células da CN, (EBERHART et al., 2006) utilizaram embriões mosaico mutantes *smo*<sup>+/-</sup> que receberam transplante de células selvagens do estomodeu. Os resultados mostraram condensação normal das células da CN em

embriões mosaicos (ver figura 66, flecha vermelha em B) quando comparados ao controle (ver figura 66, flecha vermelha em A), chegando até a expressar marcadores condrogênicos como Sox9a. Este resultado fornece evidência direta de que a recepção da sinalização Shh é necessária no ectoderma estomodeu para a condensação das células da CN na região dorsal da EE (ver figura 66).

Figura 66 - Estomodeu selvagem é capaz de retomar a condensação das células da CN em embriões *smo+/-*



Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006)

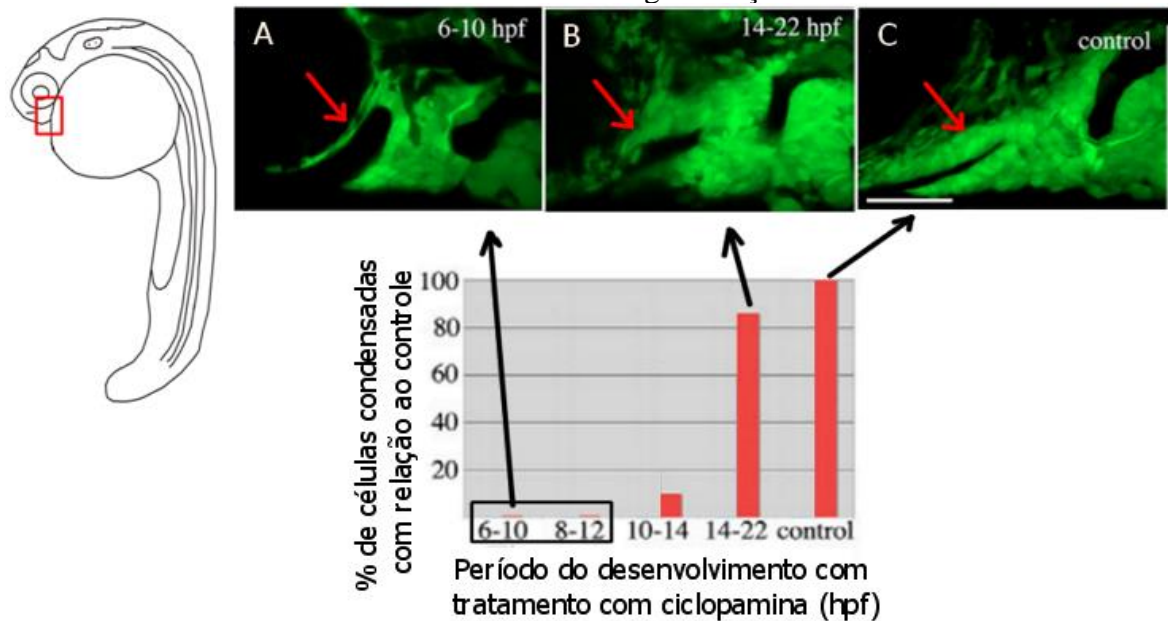
Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A e B. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* após a condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio de 30hpf para *Danio rerio*), sendo controle em A e mosaico em B (estomodeu selvagem > embrião *smo+/-*). Os resultados obtidos através de detecção de fluorescência (green fluorescence protein) mostraram que no embrião mosaico as células da CN condensaram normalmente (ver flecha vermelha em B), assim como no controle (ver flecha vermelha em A).

No entanto, nenhuma cartilagem se desenvolve nos embriões mosaicos da figura 66 B, o que é consistente com um requisito tardio direto da sinalização Shh sobre as células da CN para o processo de diferenciação em condrócitos.

A fim de compreender quando a sinalização Shh é secretada para o estomodeu e qual é a estrutura que faz isso, (EBERHART et al., 2006), utilizou embriões submetidos a tratamento com ciclopamina em diferentes momentos do desenvolvimento e identificou que o período de 6-12hpf é o momento crucial de recepção de Shh pela EE para promover condensação adequada das células da CN (ver figura 67).



Figura 67 - Período crucial para estomodeu detectar Shh e promover condensação das células da CN é no final da gastrulação

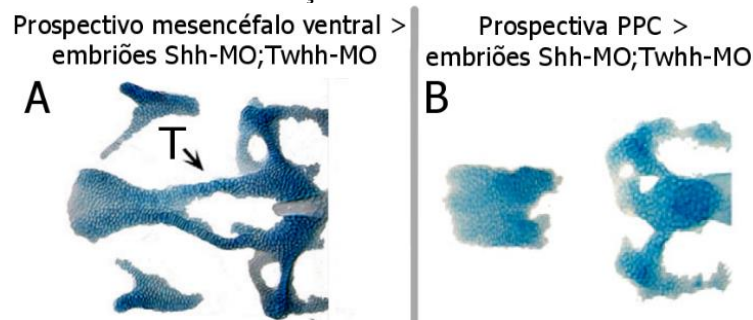


Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A, B e C. Visão lateral de embriões de *Danio rerio* controle em C e tratados com ciclopamina durante os respectivos períodos no canto superior direito em A e B. Os resultados obtidos através de detecção de fluorescência (green fluorescence protein) mostraram que o período de tratamento que mais afetou a condensação das células da CN foi entre 6 e 12 hpf (ver flecha vermelha em A e quadrado preto no gráfico), comparados ao controle (ver flecha vermelha em C) e a tratamentos mais tardios (ver flecha vermelha em B).

O resultado de embriões tratados com ciclopamina em diferentes períodos do desenvolvimento (ver figura 67) apontam para a detecção crucial de Shh pelo estomodeu no final da gastrulação e início da neurulação (equivalente a 6-12hpf em *Danio rerio*) para promover a condensação das células da CN progenitoras da trabécula. Neste momento, *shh* é expresso na região pré-cordal pelas células da LMRV do tubo neural e pela PPC, sendo, portanto, uma destas duas estruturas responsáveis por secretar Shh que será detectado pelo estomodeu. Para testar isso, os autores realizaram transplante da PPC prospectiva e do mesencéfalo ventral de embriões selvagem para os respectivos locais em embriões deficientes para *shh* e *Tiggy-winkle hedgehog*. Os resultados mostraram que o transplante do mesencéfalo ventral prospectivo de embriões selvagens foi capaz de resgatar significativamente a condensação e os fenótipos esqueléticos (ver figura 68, A), mas o transplante da PPC não foi capaz (EBERHART et al., 2006) (ver figura 68, B).

Figura 68 - O primórdio cerebral ventral é a fonte de Shh para o estomodeu promover a condensação das células da CN



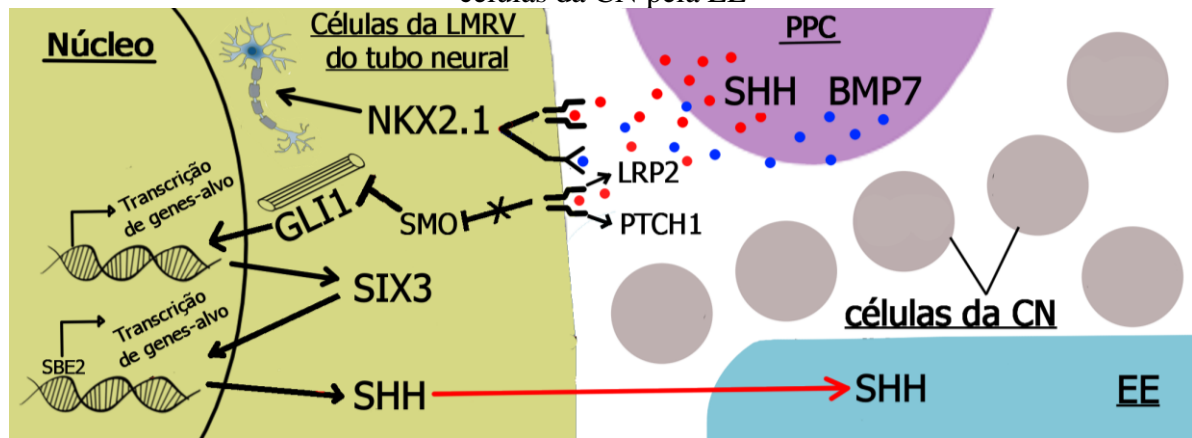
Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006).

Nota: Visão dorsal do neurocrânio de embriões de *Danio rerio* mosaico após a formação da trabécula (equivalente a 4dpf para *Danio rerio*), os quais em **A** ocorreu transplante do prospectivo mesencéfalo ventral e em **B**, transplante da prospectiva PPC de embriões selvagens para embriões morfólino para *shh* e *twhh*. Os resultados obtidos através de coloração por Alcian blue mostraram que somente o primórdio cerebral ventral foi capaz de retomar o processo de formação inicial da trabécula (ver flecha preta em **A**), sendo a PPC, incapaz de fazê-lo (ver **B**). T, trabécula.

Os resultados do transplante do prospectivo primórdio cerebral ventral recuperando o desenvolvimento da trabécula apresentados na figura 68, A, apontam que a estrutura secretora de Shh para o estomodeu promover condensação adequada das células da CN é o primórdio cerebral ventral, que no final da gastrulação, atua sobre os precursores da EE. Isso faz das células da LMRV do primórdio cerebral uma fonte crucial de Shh para a ectoderma do estomodeu durante o processo de condensação das células da CN. O estomodeu, por sua vez, é o receptor crucial do sinal de Shh para promover a condensação das células da CN. Portanto, Shh tem um papel bastante específico no estabelecimento do ambiente epitelial local durante o desenvolvimento dos elementos esqueléticos craniofaciais anteriores ((EBERHART et al., 2006).

Juntos, os resultados apresentados da figura 61-68 trazem algumas informações importantes: (1) Shh secretado pelas células da LMRV do tubo neural e a EE atuam sobre a formação da trabécula; (2) o período crucial na qual Shh é necessário para este processo de formação da trabécula são as primeiras 24 horas; (3) as células da CN não necessitam receber a sinalização Shh diretamente para condensar, sendo esta mediada pela EE. No entanto, parecem precisar de Shh diretamente para diferenciar; o período crucial para a EE receber Shh secretado pelo primórdio cerebral ventral é no final da gastrulação e início da neurulação (ver figura 69).

Figura 69 - SHH expresso nas células da LMRV do tubo neural induz a condensação das células da CN pela EE



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 60), acrescido do resultado mostrando a atuação de Shh secretado pelo primórdio cerebral ventral sobre os precursores ectodérmicos do estomodeu (flecha vermelha). Esferas em marrom demarcam o local onde as células da CN estarão futuramente após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

Portanto, se pode dizer que Shh expresso nas células da LMRV do tubo neural e na EE do estomodeu são cruciais para a formação inicial da trabécula pelas células da CN, atuando sobre o seu processo de condensação (ver flecha vermelha na figura 69).

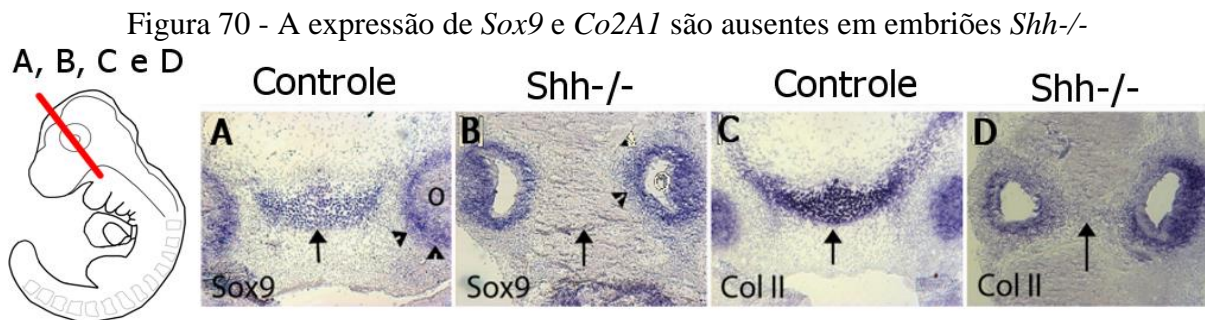
### 5.12 SHH ATIVA A EXPRESSÃO DE SOX9 VIA GLI1

A partir dos resultados apresentados até aqui, foi questionado a possibilidade de *SHH* expresso nas estruturas pré-cordais ativar a expressão de *SOX9* nas células da CN. Isso pois SHH parece estar envolvido como um mediador das interações moleculares entre as estruturas pré-cordais, logo, poderia também estar mediando a interação entre estas estruturas pré-cordais e as células da CN. No entanto, os termos de busca relacionando a expressão de *SOX9* nas células da CN utilizados para a etapa de seleção de genes não mostraram nenhuma relação de *SOX9* com *SHH*. Por isso, foi realizada uma busca ampliada que por ser mais ampla, resultou em estudos que apontam para a atuação de SHH sobre a expressão de *SOX9* na região pré-cordal via fator de transcrição GLI1.

Dentre os trabalhos encontrados, NIE et al. (2005) propôs que a interação entre a sinalização SHH e SOX9 é um mecanismo crítico na regulação da padronização e formação da base do crânio. Corroborando com NIE et al. (2005), BALCZERSKI et al. (2012) encontrou informações que sugerem que a atuação da expressão de *Shh* sobre marcadores condrogênicos



da base cranial realmente ocorre. Nesse trabalho os autores investigaram o desenvolvimento da base cranial utilizando embriões de *Mus musculus* mutantes para *Shh* (*Shh*<sup>-/-</sup>), nos quais houve ausência de expressão de *Sox9* e *Col2A1* na futura base cranial (ver figura 70, B e D) quando comparados aos embriões controle (ver figura 70, A e C).



Fonte: Retirado de BALCZERSKI et al. (2012).

Nota: À esquerda, esquema mostrando em vermelho, o local dos cortes histológicos apresentados em A-D. Em A-D, embriões de *Mus musculus* no momento em que as células da CN formadoras da trabécula iniciam a expressão de marcadores de cartilagem (equivalente ao estágio de 11.5 para *Mus musculus*), com embriões controle em A e C e mutantes homocigóticos para *Shh* em B e D. Os resultados obtidos através de hibridização *in situ* para *Sox9* e *Col2* mostraram que em embriões mutantes houve perda da expressão de *Sox9* e *Col2* na futura base cranial (ver flechas pretas em B e D) quando comparados ao controle (ver flecha preta em B e D).

BALCZERSKI et al. (2012) também estudou o desenvolvimento da base cranial de *Gallus gallus* inibindo a sinalização SHH em HH13 com ciclopamina. Os resultados mostraram através de hibridização *in situ* que, em HH18/19 ocorreu expressão insignificante dos genes *SOX9* e *COL2A1*. Também ocorreu um estreitamento ao longo do eixo medial-lateral quando comparados aos controles, consistente com o papel da expressão de *SHH* na expansão da linha média. Juntos, estes resultados (dados não mostrados) apontam para a necessidade de SHH para a condrogênese da base cranial em *Mus musculus* e *Gallus gallus*.

Em *Danio Rerio*, experimentos realizados por WADA et al. (2005a) apresentaram dados relacionando a expressão de *smo* com *sox9* em progenitores condrogênicos. Os experimentos foram executados utilizando embriões de *Danio rerio* mosaico, onde embriões mutantes heterocigóticos para *smo* receberam transplante unilateral de estomodeu vindo de embriões doadores selvagens (CN *smo*<sup>+/-</sup> > embrião selvagem). Os resultados mostraram recuperação de *sox9a* nas células da CN localizadas na região dorsal do estomodeu no lado dos embriões que sofreu transplante da EE (ver flecha vermelha na figura 71, B), apresentando um padrão de expressão de *sox9* bastante semelhante aos embriões controle (ver flecha vermelha na figura

71, A). No lado onde não ocorreu o transplante, a expressão de *sox9* permaneceu reduzida (ver flecha vermelha na figura 71, C).



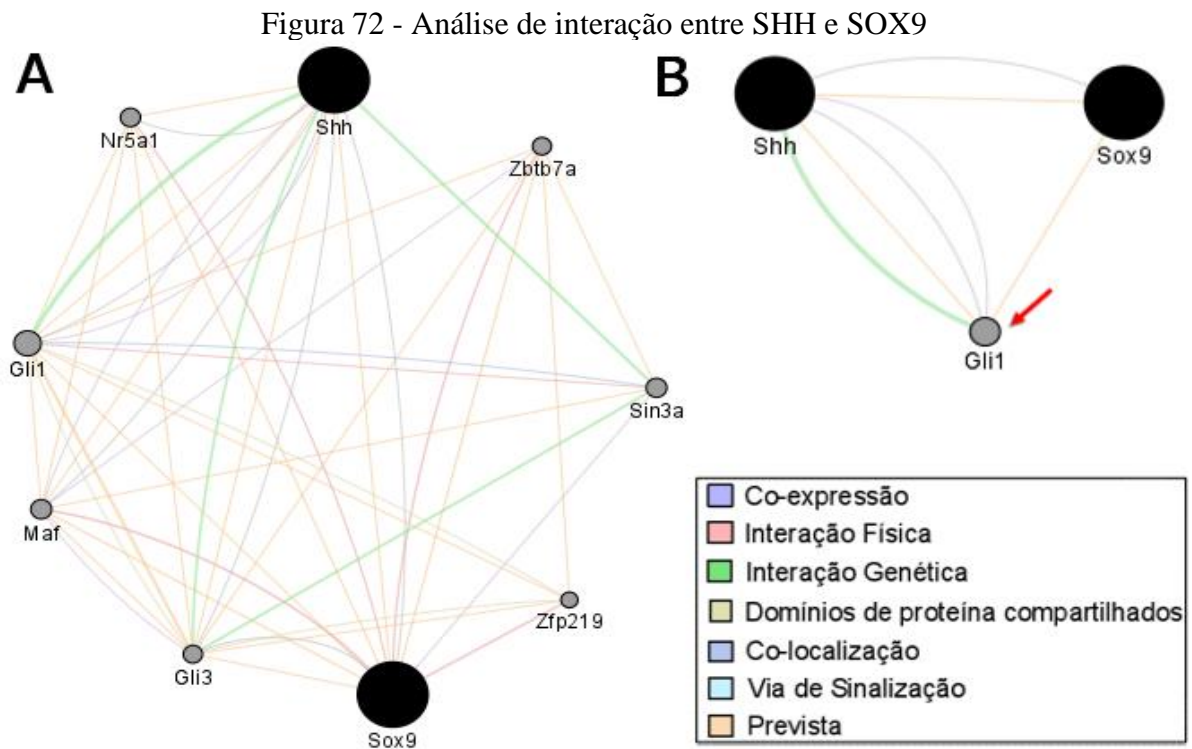
Fonte: Retirado de (EBERHART et al., 2006).

Nota: À esquerda, esquema mostrando o local da visão lateral do embrião apresentado em A, B e C. Visão lateral da região do estomodeu (\*) de embriões de *Danio rerio* no período após a condensação das células da CN para formar a trabécula (equivalente ao estágio de 30hpf para *Danio rerio*), sendo controle em A, e embriões *smo-/-* em B e C. Em B e C, transplante unilateral de estomodeu doado a partir de um embrião selvagem para embriões mutantes, mostrando o lado transplantado em B e o não transplantado em C. Os resultados obtidos através de hibridização *in situ* para *sox9* mostraram que em embriões mutantes houve recuperação da expressão de *sox9* nas células da CN localizadas na região dorsal do estomodeu no lado transplantado (ver flecha vermelha em B). No entanto, no lado não transplantado, houve perda da expressão de *sox9* nas células da CN (ver flecha vermelha em C).

Os resultados de redução da expressão de *sox9* e *col2a* em embriões *shh-/-* (ver figura 70, B e D) e recuperação da expressão de *sox9* em embriões *smo+/-* com transplante do estomodeu selvagem (ver figura 71, B) sugerem que Shh pode estar mediando seus efeitos no desenvolvimento da trabécula induzindo a expressão de *sox9* nas células da CN *in vivo*.

Além disso, experimentos utilizando cultura de condrócitos humanos *in vitro*, expostos a SHH exógeno aumentou a expressão de *SOX9* nestas células (BIEN-WILLNER; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2007).

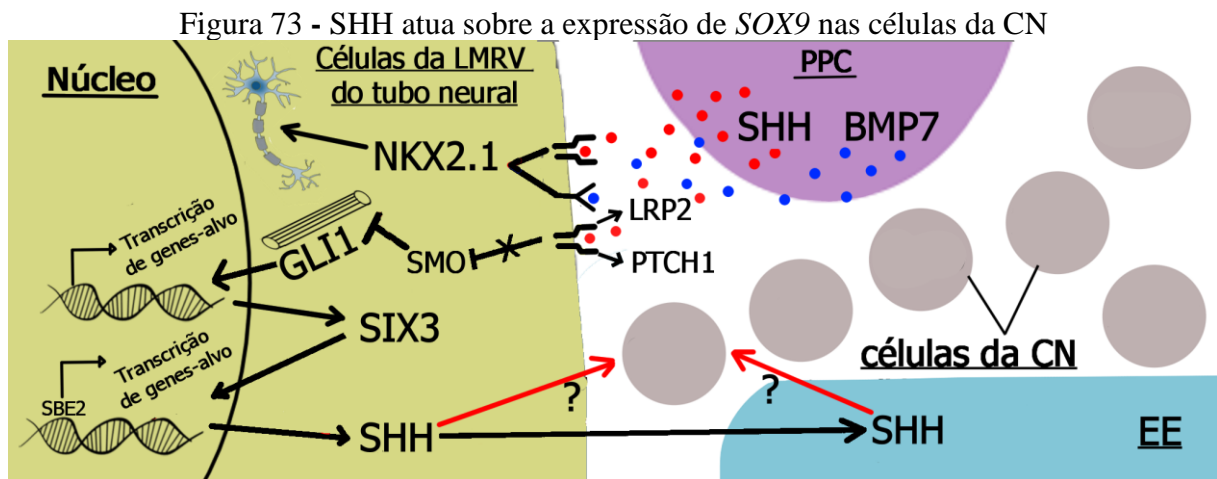
Para analisar como a atuação de SHH sobre a ativação da expressão de *SOX9* ocorre, análises *in silico* realizadas por BIEN-WILLNER; STANKIEWICZ; LUPSKI (2007) sugerem que SHH ativa a expressão de *SOX9* através do fator de transcrição GLI1, que se liga na região regulatória denominada *SOX9 Enhancer CRE1 (SOX9CRE1)*. *SOX9CRE1* possui uma sequência gênica altamente conservada entre espécies como *Homo sapiens*, *Gallus gallus* e *Mus musculus*. Esse dado corrobora com uma análise da interação entre SHH e *SOX9* para *Mus musculus* realizada pela autora do presente trabalho através do GeneMANIA (ver figura 72).



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Análise de interações entre as proteínas SOX9 e SHH para *Mus musculus*. Cada cor de linha descreve uma relação, conforme a legenda apresentada no canto inferior à direita. Esferas pretas representam as primárias, ou seja, proteínas-alvo de estudo na análise. Esferas cinzas representam proteínas secundárias, ou seja, proteínas apresentadas nos resultados da análise e que podem estar mediando a interação entre as proteínas primárias, SHH e SOX9. A fim de visualizar as interações de forma mais limpa, a análise foi configurada para mostrar apenas as vinte proteínas mais relevantes, das quais somente proteínas que atuam como fator de transcrição e que consequentemente podem estar atuando diretamente sobre a expressão de SOX9, foram deixadas na análise. Em **A**, o resultado com as vinte proteínas mais relevantes para a análise e que atuam como fator de transcrição. Em **B**, foi selecionada apenas a proteína GLI1 (flecha vermelha) por ser a única expressa nas células da LMRV do tubo neural dentre as proteínas apresentadas no resultado em **A**. Esta seleção se deve ao fato de que a interação em **A** mostra proteínas cuja atuação ocorre em diversas partes do organismo e não somente no local alvo de estudo. Análise original disponível em <<https://genemania.org/search/mus-musculus/sox9/shh/>>. Acesso em 29/06/2021.

Os dados da análise da interação entre SHH e SOX9 (ver figura 72), sugerem que SHH pode estar atuando sobre a expressão de *Sox9*, regulando a sua expressão positivamente através do fator de transcrição GLI, um fator de transcrição que atua na cascata de sinalização de SHH. Portanto, tanto *SHH* quanto *SOX9* parecem exercer um papel crucial na formação da base cranial. No entanto, não foi possível concluir qual a fonte de SHH na região pré-cordal que ativa a expressão de *SOX9* nas células da CN (ver pontos de interrogação na figura 73).



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 64), acrescido do resultado mostrando a atuação de Shh secretado na região pré-cordal sobre as células da CN (ver flecha vermelha com ponto de interrogação). Esferas em marrom representam as células da CN após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.

## 6 DISCUSSÃO

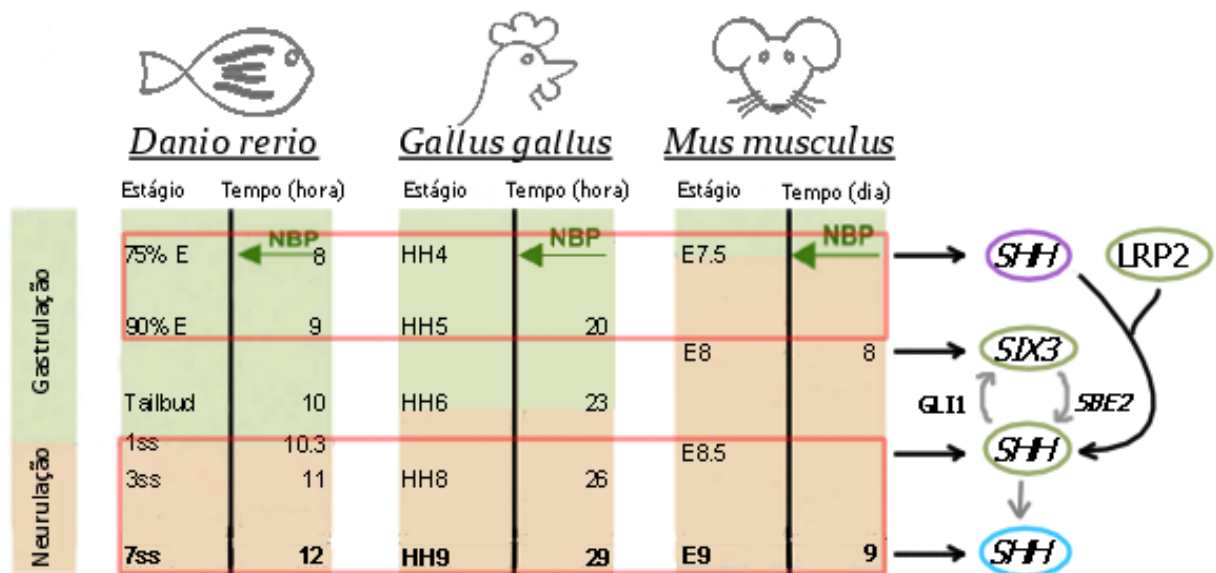
Os resultados apresentados neste trabalho, apontam para uma cooperação das estruturas embrionárias pré-cordais sobre a formação da trabécula, sendo a sinalização Shh, a principal envolvida neste processo. No entanto, para que a sinalização Shh atue sobre as células da CN para a formação da trabécula, ocorrem interações moleculares entre as estruturas pré-cordais PPC, EE e células da LMRV do tubo neural, em um período no qual as células da CN ainda nem migraram do tubo neural. Este período no qual as interações ocorrem vai do final da gastrulação até o momento do fechamento do tubo neural na região adjacente à trabécula, equivalente a HH4-9 para *Gallus gallus* (ver imagem 69).

As interações moleculares entre as estruturas pré-cordais que atuam na formação da trabécula inicia com a atuação da proteína SHH, secretada pela PPC, sobre as células da LMRV do tubo neural, induzindo a expressão de SHH nesta região (ver retângulo vermelho superior na figura 69). Experimentos com remoção ou transplante ectópico da PPC durante o estágio pré-somítico *in vivo*, reduziu e induziu ectopicamente, respectivamente, a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural. Já cultivo de explantes da placa neural lateral em contato com a PPC no início da gastrulação *in vitro*, induziu a expressão de *SHH* nos explantes (AOTO et al., 2009; OHYAMA et al., 2005; PERA; KESSEL, 1997). Estes dados mostram que a atuação de SHH secretado pela PPC sobre a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo

neural ocorre no final da gastrulação, no entanto, ainda permanece desconhecido o exato momento em que SHH secretado pela PPC é detectado pelas células da LMRV do tubo neural.

Um dos receptores de SHH nas células da LMRV do tubo neural, LRP2, começa a ser expresso na placa neural (futuro tubo neural) no final da gastrulação (ver 'LRP2' no círculo verde, figura 69) (CHRIST et al., 2012), exato momento em que inicia também a expressão de SHH na PPC (ver 'SHH' no círculo rosa, figura 69), mostrando uma sincronia entre a secreção de SHH pela PPC e a atividade do receptor LRP2 nas células da LMRV do tubo neural para a captação de SHH. Esta sincronia corrobora com DALE et al. (1999), onde a PPC e as células da LMRV do tubo neural permanecem em próximo contato da gastrulação ao início da neurulação (equivalente a HH4-8 em *Gallus gallus*).

Figura 74 - Resumo temporal da sinalização envolvida na formação da trabécula



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Análise comparativa dos estágios do desenvolvimento de *Danio rerio*, *Gallus gallus* e *Mus musculus* durante o final da gastrulação até o período onde ocorre o fechamento do tubo neural adjacente ao local de formação da trabécula. As flechas pretas à direita apontam o início da expressão de genes e atividade proteica na PPC (círculo rosa), células da LMRV do tubo neural (círculo verde) e EE (círculo azul) nos períodos do desenvolvimento equivalentes para as três espécies descritos na mesma linha. As flechas cinzas apontam interações entre estes genes e proteínas. O quadrado vermelho superior destaca o período de interação entre a PPC e as células da LMRV do tubo neural e o retângulo vermelho inferior destaca o período de interação entre as células da LMRV do tubo neural com a EE.

Experimentos realizados por CHRIST et al. (2012) responderam qual o exato momento em que SHH secretado pela PPC é detectado pelas células da LMRV do tubo neural. Em embriões mutantes para LRP2, a expressão de *Six3* falha em acontecer no início da

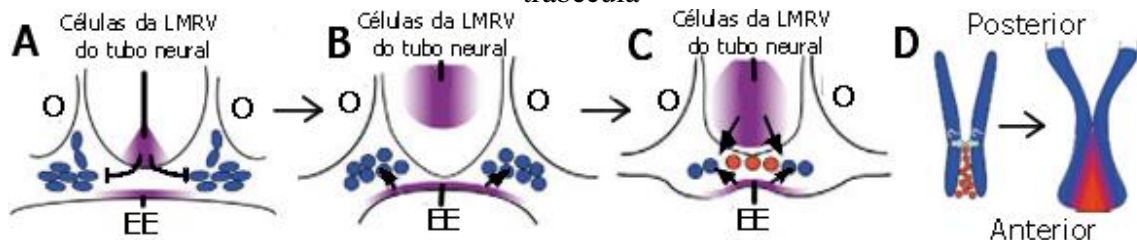


neurulação (ver ‘*SIX3*’ no círculo verde, figura 69) e a expressão de *SHH* falha em acontecer logo em seguida (ver ‘*SHH*’ no círculo verde, figura 69). Portanto, é provável que *SHH* secretado pela PPC é captado pelas células da LMRV do tubo neural durante o fim da gastrulação (quando inicia a expressão de *SHH* na PPC e *LRP2* nas células da LMRV) e início da neurulação (quando inicia a expressão de *SIX3* e *SHH* nas células da LMRV do tubo neural), equivalente ao estágio E7.5 a E8.5 para *Mus musculus* (ver retângulo vermelho superior na figura 69).

Quando *SHH* secretado pela PPC é detectado pelas células-alvo da LMRV do tubo neural, a sinalização *SHH* é ativado nas células-alvo, ativando a expressão de *SIX3* via fator de transcrição *GLI1* (ver flecha cinza com ‘*GLI1*’ na figura 69). A ativação da expressão de *SIX3* resulta na atividade do fator de transcrição de mesmo nome codificado por este gene, que atua sobre a expressão de *SHH* ao se ligar na região regulatória *SBE2* (ver flecha cinza com ‘*SBE2*’ na figura 69), gerando um feedback positivo entre *SHH* e *SIX3* nas células da LMRV do tubo neural (CRANE-SMITH et al., 2021; GENG et al., 2008; JEONG et al., 2009; SANEK et al., 2009).

Após o estabelecimento e manutenção da expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural, experimentos realizados por WADA et al. (2005) apontam essa expressão como essencial na formação da trabécula, formando junto com a expressão de *SHH* na EE, dois centros organizadores na formação da trabécula. No entanto, apesar de ambas as estruturas atuarem através da secreção de *SHH*, o papel das células da LMRV do tubo neural e da EE são diferentes neste processo (ver figura 70).

Figura 75 - *SHH* secretado pelas células da LMRV do tubo neural e EE sobre a formação da trabécula



Fonte: Retirado de WADA et al. (2005).

Nota: Seções transversais (A, B e C) de um embrião ilustrando três etapas pelas quais *Shh* controla o padrão e a condrogênese da trabécula: (A) Em um primeiro momento, *Shh* secretado pelas as células da LMRV do tubo neural (roxo) evita a mistura de células da CN (ovais azuis) na linha média; (B) *Shh* secretado pela EE promove a condrogênese da trabécula (setas pretas em B) (nesse estágio, a expressão de *shh* no tubo neural não se estende para a região próxima a formação da trabécula (hipotálamo ventral) e, portanto, é improvável que influencie no

processo de condrogênese das regiões laterais da trabécula; (C) Os precursores da região anterior da trabécula - futuro etmoide -, (círculos vermelhos e azuis) são induzidos a condricificar por Shh secretado pelas células da LMRV do tubo neural (hipotálamo ventral) e pela EE. Em **D**, esquema mostrando visão dorsal das células da CN precursoras da região lateral (azul) e as células da CN precursoras da região medial (vermelho) da trabécula. O, olhos.

Segundo WADA et al. (2005), ambas as estruturas parecem exercer um papel na condensação e diferenciação das células da CN para formar a trabécula, mas as células da LMRV do tubo neural também atuam na morfogênese bilateral da trabécula, através da divisão bilateral desta cartilagem.

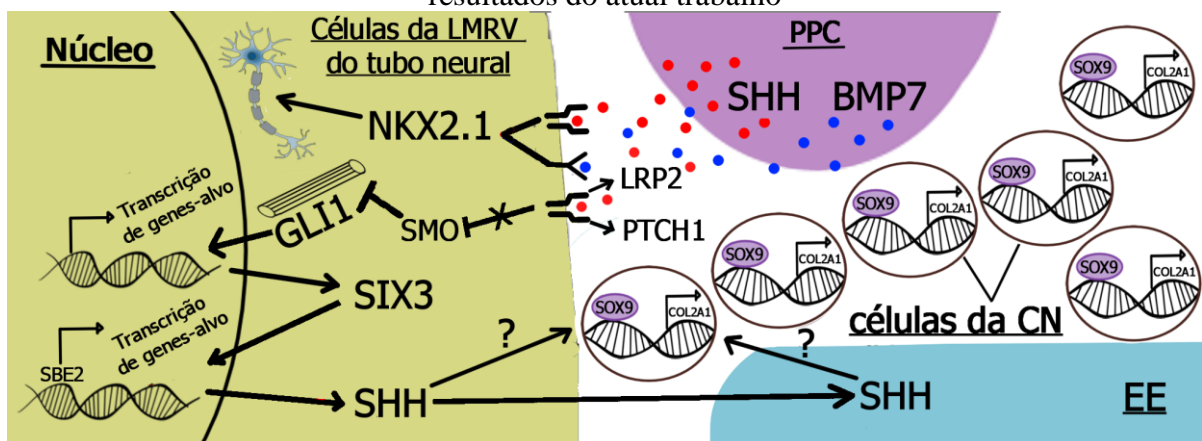
EBERHART et al. (2006) mostrou que as células da CN não necessitam receber a sinalização SHH diretamente, ao contrário da EE, que atua como um receptor da sinalização SHH vinda das células da LMRV do tubo neural, possibilitando a condensação das células da CN para formar a trabécula. Além disso, os experimentos realizados por (EBERHART et al., 2006) mostraram que, ao contrário das células da LMRV do tubo neural, a PPC não atua diretamente sobre a EE para mediar a condensação das células da CN. Além desse trabalho, não foi encontrado nenhum outro trabalho que mostre a atuação direta ou indireta da PPC sobre a formação da trabécula. Interessantemente, o conjunto dos resultados apresentados no presente trabalho mostra que, apesar da PPC não atuar diretamente sobre a EE e conseqüentemente sobre a formação da trabécula, ela atua indiretamente. Isso porque a PPC induz a expressão de *SHH* nas células da LMRV do tubo neural, que por sua vez, atua como uma estrutura fonte de SHH captado pela EE, possibilitando a condensação das células da CN. Isso explica porque transplante da PPC de embriões selvagem não conseguiu recuperar o desenvolvimento da trabécula em embriões morfolidos para SHH, uma vez que, para que isso fosse possível, seria necessário ter as células da LMRV do tubo neural mediando a interação entre a PPC e a EE. No entanto, isso não foi possível pois nos embriões que tiveram o mRNA de *shh* bloqueado (utilizando morfolino), a tradução de *shh* nas células da LMRV do tubo neural foi impedida. Portanto, nossos resultados mostram que existe uma cooperação entre as estruturas pré-cordais durante o processo de formação da trabécula, a qual a PPC também faz parte.

(EBERHART et al., 2006) ainda mostraram que o momento crucial da necessidade de SHH para promover a condensação das células da CN que irão formar a trabécula, ocorre entre a gastrulação e início da neurulação (equivalente entre 6 e 12 hpf para *Danio rerio*), equivalente ao exato período do desenvolvimento em que todos os processos de interações moleculares

apresentados até agora (ver figura 69) ocorrem. Dentro deste período, o momento crucial que a EE deve detectar SHH secretado pelas células da LMRV do tubo neural para promover a condensação das células da CN parece ocorrer no início da neurulação (equivalente a 10.3 e 12 hpf para *Danio rerio*), uma vez que (1) neste período, a expressão de *SHH* já ocorre nas células da LMRV do tubo neural e (2) são os últimos momentos cruciais quanto a necessidade da sinalização de SHH para a condensação das células da CN na formação da trabécula, segundo os experimentos realizados por (EBERHART et al., 2006). Além disso, segundo WADA et al. (2005), o efeito da ciclopamina perdura por um bom tempo após a sua aplicação, explicando a falta da trabécula em embriões de *Danio rerio* nas primeiras 24hpf, mesmo com aplicações em estágios mais anteriores.

E por fim, estudos com experimentos *in vivo* e *in vitro* somados a análises *in silico* sugerem que SHH ativa a expressão de *SOX9* em células-alvo através da atividade do fator de transcrição GLI1 (BALCZERSKI et al., 2012; BIEN-WILLNER; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2007; EBERHART et al., 2006; NIE et al., 2005). Isso pode indicar uma atuação das células da LMRV do tubo neural ou EE através de SHH sobre as células da CN para induzir a expressão de *SOX9*. No entanto, se somente uma destas estruturas ou ambas é a fonte de *SHH* que ativa a expressão de *SOX9* nas células da CN, permanece inexplicado (ver figura 71).

Figura 76 - Resumo das sinalizações previamente conhecidas e das apresentadas nos resultados do atual trabalho



Fonte: Produzido pela autora (2021).

Nota: Continuação do esquema anterior (ver figura 68), mostrando as sinalizações moleculares previamente conhecidas apresentadas na introdução (*SOX9* atuando para ativar a expressão de *Col2A1*), acrescida dos resultados apresentados no presente trabalho. Esferas em marrom representam as células da CN após o processo de migração do tubo neural para a região dorsal da EE.



BMP7 por sua vez, se mostrou uma molécula secretada pela PPC bastante interessante inicialmente, atuando junto com SHH para induzir a expressão de *NKX2.1* nas células da LMRV do tubo neural. No entanto, estudos mostram que a expressão de *NKX2.1* nesta região não está relacionada a processos esqueléticos (GERMAIN et al., 2013a; KOBAYASHI et al., 2002).

Foi possível perceber durante a execução deste trabalho que o contexto molecular presente na formação da cartilagem trabécula nos gnatostomados é altamente conservado durante a evolução deste táxon. Primeiramente, isso se mostra presente na morfologia desta cartilagem. Apesar de variações na sua forma de acordo com a espécie, sendo mais alongada em espécies com proeminência facial maior, como *Mus musculus*, existe um padrão morfológico bem conservado, caracterizado pela fusão na região anterior para formar o osso etmoide e pela bifurcação na região posterior para formar o osso pré-esfenoide. Esse padrão morfológico conservado entre os gnatostomados corrobora com uma sinalização conservada de SHH durante o desenvolvimento da base do crânio, segundo BALCZERSKI et al. (2012). Isso inclui o alto grau de conservação da sequência gênica presente na região do enhancer *SBE2* e o padrão de atividade deste enhancer em *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus* e *Xenopus tropicalis*, sugerindo um mecanismo molecular de ativação da expressão de SHH nas células da LMRV do tubo neural bastante conservado nos gnatostomados.

Outra informação retirada dos experimentos apresentados neste trabalho, foi que existem diferentes necessidades da sinalização SHH para a formação de cartilagem originada a partir das células da CN e mesoderma. Isso se deve ao fato de que segundo CHRIST et al. (2012), embriões mutantes para *LRP2*<sup>-/-</sup> não têm alteração na expressão de SHH no tubo neural caudal, sugerindo que a regulação da competência de resposta a SHH extracelular no tubo neural caudal é distinta na rostral. Isso corrobora com os trabalhos apresentados anteriormente por AOTO et al. (2009) e GARCÍA-CALERO et al. (2008), que mostraram que, a retirada da PPC afeta a expressão de SHH apenas no prosencéfalo, permanecendo intacta em níveis mais caudais. Além disso, segundo BALCZERSKI et al. (2012), o início da condrogênese de *Mus musculus* na base do crânio ocorre mais tarde do que no tronco, coincidindo com a resposta à sinalização de SHH. Estas informações apontam para a importância temporal de resposta à sinalização SHH para o processo de condrogênese no crânio, que parece diferir ao longo do eixo axial do embrião. Além disso, em *Mus musculus* a expressão de *Col2a* pode ser observada

na cartilagem paracordal (que faz fronteira com a trabécula mas está presente na região cordal), antes da trabécula, corroborando com a diferença temporal no processo de formação de cartilagem na região cordal e pré-cordal (MCBRATNEY-OWEN et al., 2008). E por fim, a inativação de *SOX9* resultou na ausência de cartilagens e ossos endocondrais derivadas das células da CN cefálica, mas não afetou elementos do esqueleto derivados do mesoderma e ossos com ossificação intramembranosa (MORI-AKIYAMA et al., 2003), sugerindo diferentes processos regulatórios para a formação de cartilagem originada a partir das células da CN e mesoderma.

Os processos moleculares apresentados neste trabalho abordam estágios do final da gastrulação até o momento da neurulação, quando a placa neural adjacente a região de formação da trabécula fecha para formar o tubo neural. Porém, é importante lembrar que as células da CN que vão formar a trabécula chegam na EE após este período (equivalente ao estágio HH14 em *Gallus gallus*), e só iniciam a expressão de *COL2A* um bom tempo depois (equivalente a HH25 em *Gallus gallus*). Durante este período, pouco é conhecido sobre as sinalizações moleculares que acometem as células da CN progenitoras da trabécula, abrindo portas para muitos estudos a respeito do desenvolvimento craniofacial nesta região.

## 7 CONCLUSÃO

Diante das interações moleculares traçadas neste trabalho, é possível apontar algumas informações principais contidas no mesmo: (1) existe uma cooperação entre as estruturas embrionárias pré-cordais PPC, EE e células da LMRV do tubo neural através de interações moleculares que atuam sobre a formação inicial da trabécula; (2) a PPC não atua diretamente sobre as células da CN que irão formar a trabécula, mas ela atua indiretamente sobre este processo através da sua interação com as células da LMRV do tubo neural; (3) o padrão molecular de formação da trabécula parece ser bastante conservado dentre os gnatostomados, o que possibilitou juntar resultados de experimentos realizados em diferentes espécies para formar a rede de interações moleculares através da análise comparativa do desenvolvimento, respeitando as particularidades de cada espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMANN, H. B. The Problem of Cyclopia. Part II. **The Quarterly Review of Biology**, v. 11, n. 3, p. 284–304, 1936.
- ALBERTS, B. **Molecular Cell Biology**. 6<sup>o</sup> ed. [s.l: s.n.].
- ALTABA, A. R. I. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. **Development**, v. 125, n. 12, p. 2203–2212, 1998.
- AOTO, K. et al. Mouse Shh is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 327, n. 1, p. 106–120, 2009.
- BALCZERSKI, B. et al. Distinct spatiotemporal roles of hedgehog signalling during chick and mouse cranial base and axial skeleton development. **Developmental Biology**, v. 371, n. 2, p. 203–214, 2012.
- BI, W. et al. Sox9 is required for cartilage formation. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 85–89, 1999.
- BI, W. et al. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 12, p. 6698–6703, 2001.
- BIEN-WILLNER, G. A.; STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. SOX9<sup>cre1</sup>, a cis-acting regulatory element located 1.1 Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 10, p. 1143–1156, 2007.
- BOLLENBACH, T. et al. Precision of the Dpp gradient. **Development**, v. 135, n. 6, p. 1137–1146, 2008.
- BRAND, M. et al. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. **Development**, v. 123, p. 129–142, 1996.
- BRIAN K., H. **Bones and Cartilage - Developmental and Evolutionary Skeletal Biology**. [s.l: s.n.].
- BRIAN K., H. **The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution**. Boston: [s.n.].
- BRONNER-FRASER, M. t Fragments of the Ion along Neural Crest. v. 145, p. 131–145, 1984.
- CAICEDO, A. Paracrine and Autocrine Interactions in the Human Islet. **Semin Cell Dev Biol**, v. 24, n. 1, p. 11–21, 2013.
- CHEUNG, M. et al. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. **Developmental Cell**, v. 8, n. 2, p. 179–192, 2005.
- CHRIST, A. et al. LRP2 Is an Auxiliary SHH Receptor Required to Condition the Forebrain Ventral Midline for Inductive Signals. **Developmental Cell**, v. 22, n. 2, p. 268–278, 2012.
- CHRISTIANSEN, J. H. et al. EMAGE: a spatial database of gene expression patterns during mouse embryo development. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. 637–641, 2006.
- CORDERO, D. et al. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 4, p. 485–494, 2004.
- COSTA-SILVA, B. et al. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 6, p. 955–967, 2009.
- COULY, G. F.; COLTEY, P. M.; LE DOUARIN, N. M. The triple origin of skull in

higher vertebrates: A study in quail-chick chimeras. **Development**, v. 117, n. 2, p. 409–429, 1993.

CRANE-SMITH, Z. et al. A Highly Conserved Shh Enhancer Coordinates Hypothalamic and Craniofacial Development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. April, 2021.

CREUZET, S. et al. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. **Development**, v. 129, n. 18, p. 4301–4313, 2002.

CUBBAGE, C. C. . M. P. M. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). **Journal of Morphology**, v. 229, n. 2, p. 121–160, 1996.

DALE, J. K. et al. Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. **Cell**, v. 90, n. 2, p. 257–269, 1997.

DALE, K. et al. Differential patterning of ventral midline cells by axial mesoderm is regulated by BMP7 and chordin. **Development**, v. 126, n. 2, p. 397–408, 1999.

DANIEL E SHUMER, N. J. N. N. P. S. Using ZFIN: Data Types, Organization, and Retrieval Ceri. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.

DARNELL, D. K. et al. GEISHA: An in situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, n. 1–4, p. 30–35, 2007.

DE BEER, G. R. Memoirs: On the Nature of the Trabecula Cranii. **Journal of Cell Science**, v. s2-74, n. 296, p. 701–536, 1931.

DE BEER, G. R. **The development of the vertebrate skull**. New York: [s.n.].

DE BEER, S. G. **The Development of the Vertebrate Skull**. [s.l.: s.n.].

DE CROMBRUGGHE, B. et al. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. **Matrix Biology**, v. 19, n. 5, p. 389–394, 2000.

DE CROMBRUGGHE, B.; AKIYAMA, H. Transcriptional Control of Chondrocyte Differentiation. In: **The Skeletal System**. New York: [s.n.]. p. 365.

EBERHART, J. K. et al. Early Hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development. **Development**, v. 133, n. 6, p. 1069–1077, 2006.

EPPIG, J. T. Mouse genome informatics (MGI) resource: Genetic, genomic, and biological knowledgebase for the laboratory mouse. **ILAR Journal**, v. 58, n. 1, p. 17–41, 2017.

FRANZ, M. et al. GeneMANIA update 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W60–W64, 2018.

GARCÍA-CALERO, E. et al. Early mammillary pouch specification in the course of prechordal ventralization of the forebrain tegmentum. **Developmental Biology**, v. 320, n. 2, p. 366–377, 2008.

GENG, X. et al. Haploinsufficiency of Six3 Fails to Activate Sonic hedgehog Expression in the Ventral Forebrain and Causes Holoprosencephaly. **Developmental Cell**, v. 15, n. 2, p. 236–247, 2008.

GERMAIN, D. et al. Derivation and Isolation of NKX2.1-Positive Basal Forebrain Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. v. 22, n. 10, p. 1477–1489, 2013a.

GERMAIN, N. D. et al. Derivation and isolation of NKX2.1-positive basal forebrain progenitors from human embryonic stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 10, p. 1477–1489, 2013b.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11ª edição ed. [s.l.: s.n.].

GRIFFIN, J. N. et al. Fgf8 dosage determines midfacial integration and polarity within the nasal and optic capsules. **Developmental Biology**, v. 374, n. 1, p. 185–197, 2013.

- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49–92, 1951.
- HAMILTON, H. **Lillie's Development of the Chick - An Introduction to Embriology**. 3rd. ed. New York: [s.n.].
- HEIDELBERG, J. F. et al. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1118–1123, 2002.
- HENDI, J. M. et al. Plastic surgery considerations for holoprosencephaly patients. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 15, n. 4, p. 675–677, 2004.
- HOOGAN, B. L. Bmps: multifunctional regulators of mammalian embryonic development. **Harvey Lect**, p. 83–98, 1996.
- HU, D.; MARCUCIO, R. S. A SHH-responsive signaling center in the forebrain regulates craniofacial morphogenesis via the facial ectoderm. **Development**, v. 136, n. 1, p. 107–116, 2009.
- JEFFREY, A.; GOLDEN, M. D. Holoprosencephaly: A defect in Brain Patterning. p. 283, 1998.
- JEONG, Y. et al. A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. **Development**, v. 133, n. 4, p. 761–772, 2006.
- JEONG, Y. et al. Regulation of a remote Sonic hedgehog forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein Yongsu. **Nature Genetics**, v. 40, n. 11, p. 1348–1353, 2009.
- JOHNSTON, M. C. A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. **The Anatomical Record**, v. 156, n. 2, p. 143–155, 1966.
- KARDONG, K. **Vertebrates : Comparative Anatomy, Function, Evolution**. 5. ed. [s.l.] McGraw-Hill Publishing, 2009.
- KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.
- KIMMEL, C. B.; MILLER, C. T.; MOENS, C. B. Specification and morphogenesis of the zebrafish larval head skeleton. **Developmental Biology**, v. 233, n. 2, p. 239–257, 2001.
- KIST, R. et al. Conditional inactivation of Sox9: A mouse model for campomelic dysplasia. **Genesis**, v. 32, n. 2, p. 121–123, 2002.
- KOBAYASHI, D. et al. Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. v. 93, p. 83–93, 2002.
- KRONENBERG, H. M.; MCMAHON, A. P.; TABIN, C. J. Growth Factors and Chondrogenesis. In: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS (Ed.). . **The Skeletal System**. New York: [s.n.]. p. 365.
- KURATANI, S. Evolution of the vertebrate jaw: Comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty. **Journal of Anatomy**, v. 205, n. 5, p. 335–347, 2004.
- KURATANI, S. Cephalic neural crest cells and the evolution of craniofacial structures in vertebrates: Morphological and embryological significance of the premandibular-mandibular boundary. **Zoology**, v. 108, n. 1, p. 13–25, 2005.
- KURATANI, S. Evolution of the vertebrate jaw from developmental perspectives. **Evolution and Development**, v. 14, n. 1, p. 76–92, 2012.
- KURATANI, S. The neural crest and origin of the neurocranium in vertebrates. **Genesis**, v. 56, n. 6–7, p. 1–7, 2018.
- KURATANI, S.; AHLBERG, P. E. Evolution of the vertebrate neurocranium:

Problems of the premandibular domain and the origin of the trabecula. **Zoological Letters**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2018.

KURATANI, S.; OTA, K. G. Evolutionary Origin of Bone and Cartilage in Vertebrates. In: **The Skeletal System**. New York: [s.n.]. p. 365.

LANA-ELOLA, E. et al. Noggin null allele mice exhibit a microform of holoprosencephaly. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 4005–4015, 2011.

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S. E. Craniofacial Patterning. In: **The Skeletal System**. Cold Spring ed. New York: [s.n.]. p. 365.

LE DOUARIN, N. M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637–4650, 2004.

LE LIEVRE, C. S. Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. VOL. 47, n. 1893, p. 17–37, 1978.

LE LIEVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 34, n. 1, p. 125–154, 1975.

LEE, J. et al. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. **Development**, v. 124, n. 13, p. 2537–2552, 1997.

LEFEBVRE, V. et al. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 4, p. 2336–2346, 1997.

LORING, J.; GLIMELIUS, B.; WESTON, J. A. Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro. **Developmental Biology**, v. 90, n. 1, p. 165–174, 1982.

MACKIE, E. J. et al. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 1, p. 46–62, 2008.

MARCUCIO, R. S. et al. Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. **Developmental Biology**, v. 284, n. 1, p. 48–61, 2005.

MCBRATNEY-OWEN, B. et al. Development and tissue origins of the mammalian cranial base. **Developmental Biology**, v. 322, n. 1, p. 121–132, 2008.

MCCARTHY, R. A.; ARGRAVES, W. S. Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 6, p. 955–960, 2003.

MORI-AKIYAMA, Y. et al. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9360–9365, 2003.

NG, L. J. et al. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 183, n. 1, p. 108–121, 1997.

NIE, X. et al. Developmentally regulated expression of Shh and Ihh in the developing mouse cranial base: Comparison with Sox9 expression. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 286, n. 2, p. 891–898, 2005.

NODEN, D. M. An analysis of the migratory behavior of avian cephalic neural crest cells. **Developmental Biology**, v. 42, n. 1, p. 106–130, 1975.

OHYAMA, K. et al. Directed differentiation of neural cells to hypothalamic

dopaminergic neurons. **Development**, v. 132, n. 23, p. 5185–5197, 2005.

OHYAMA, K.; DAS, R.; PLACZEK, M. Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP. **Development**, v. 135, n. 20, p. 3325–3331, 2008.

OTA, K. G.; KURAKU, S.; KURATANI, S. Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 672–675, 2007.

PERA, E. M.; KESSEL, M. Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. **Development**, v. 124, n. 20, p. 4153–4162, 1997.

PERFETTO, L. et al. SIGNOR : a database of causal relationships between biological entities. v. 44, n. October 2015, p. 548–554, 2016.

PLACZEK, M. et al. Mesodermal control of neural cell identity: Floor plate induction by the notochord. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 985–988, 1990.

PLACZEK, M.; JESSELL, T. M.; DODD, J. Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. **Development**, v. 117, n. 1, p. 205–218, 1993.

PLATT, J. Ectodermic origin of the cartilage of the head. **Anat. Anz.**, 1893.

POURQUIÉ, O. et al. Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 11, p. 5242–5246, 1993.

SAGAI, T. et al. SHH signaling mediated by a prechordal and brain enhancer controls forebrain organization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 47, p. 23636–23642, 2019.

SAITO, A. et al. Complete cloning and sequencing of rat gp330 /" megalin ," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. v. 91, n. October, p. 9725–9729, 1994.

SANEK, N. A. et al. Zebrafish *zic2a* patterns the forebrain through modulation of Hedgehog-activated gene expression. **Development**, v. 136, n. 22, p. 3791–3800, 2009.

SCHILLING, T. F.; KIMMEL, C. B. Musculoskeletal patterning in the pharyngeal segments of the zebrafish embryo. **Development**, v. 124, n. 15, p. 2945–2960, 1997.

SHIGETANI, Y.; NOBUSADA, Y.; KURATANI, S. Ectodermally derived FGF8 defines the maxillomandibular region in the early chick embryo: Epithelial-mesenchymal interactions in the specification of the craniofacial ectomesenchyme. **Developmental Biology**, v. 228, n. 1, p. 73–85, 2000.

SPOELGEN, R. et al. LRP2/megalín is required for patterning of the ventral telencephalon. **Development**, v. 132, n. 2, p. 405–414, 2005.

STELZER, G. et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, n. June, p. 1.30.1-1.30.33, 2016.

STERN, C. D. The Chick. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9–17, 2005.

SWARTZ, M. E. et al. Examination of a palatogenic gene program in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 9, p. 2204–2220, 2011.

TRAINOR, P. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. [s.l: s.n.].

TRAINOR, P. A. Induction and Specification of Neural Crest Cells: Extracellular Signals and Transcriptional Switches. In: BAE, C.-J.; SAINT-JANNET, J.-P. (Eds.). . **Neural Crest Cells - Evolution, Development and Disease**. New York: [s.n.]. p. 458.

WADA, N. et al. Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. **Development**, v. 132, n. 17, p. 3977–3988, 2005a.

WADA, N. et al. Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. **Development**, v. 132, n. 17, p. 3977–3988, 2005b.

WADA, N.; NOHNO, T.; KURATANI, S. Dual origins of the prechordal cranium in the chicken embryo. **Developmental Biology**, v. 356, n. 2, p. 529–540, 2011.

WALLIS, D. E. et al. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. **Nature Genetics**, v. 22, n. 2, p. 196–198, 1999.

WARDE-FARLEY, D. et al. The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 214–220, 2010.

WILLNOW, T. E. et al. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8460–8464, 1996.

WRIGHT, E. et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. **Nature Genetics**, v. 9, n. 1, p. 15–20, 1995.

YAN, C. Y. I. Divisão de trabalho entre as células: Diferenciação. In: RIO DE JANEIRO: EDITORA GUANABARA KOOGAN (Ed.). . **Biologia Celulas e Molecular**. Rio de Janeiro: [s.n.].

YOUNG, B. et al. Indian and sonic hedgehogs regulate synchondrosis growth plate and cranial base development and function. **Developmental Biology**, v. 299, n. 1, p. 272–282, 2006.

ZHAO, Q. et al. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 209, n. 4, p. 377–386, 1997.

ZHOU, G. et al. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 24, p. 14989–14997, 1998.



## APÊNDICE 1

Documento elaborado pela autora para sintetizar todos os artigos encontrados através do levantamento bibliográfico (etapa de seleção de genes e interação entre genes) e que foram utilizados durante os resultados do presente trabalho por conterem informações que permitiram montar uma rede regulatória entre os genes selecionados na região pré-cordal

**Quadro 11 – Estudos do levantamento bibliográfico utilizados para estruturar a rede regulatória presente na região pré-cordal**

Artigo	Citação no texto	Termos de busca utilizados para encontra-lo
Derivation and isolation of NKX2.1-positive basal forebrain progenitors from human embryonic stem cells	(GERMAIN et al., 2013b)	((nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (shh[Title/Abstract]));
Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals	KOBAYASHI et al. (2002)	((nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); ((six3[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (six3[Title/Abstract])); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (shh[Title/Abstract])); (shh[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (six3[Title/Abstract]))
Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog	ALTABA (1998)	((nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); ((gli1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (shh[Title/Abstract])); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (gli1[Title/Abstract])); (shh[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (gli1[Title/Abstract]))
Early mammillary pouch specification in the course of prechordal ventralization of the forebrain tegmentum	GARCÍA-CALERO et al. (2008)	((nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (shh[Title/Abstract] AND (prechordal plate[Title/Abstract] AND (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])); (shh[Title/Abstract] AND (prechordal plate[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])); (nkx2.1[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (shh[Title/Abstract]));
Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein	JEONG et al. (2009)	((six3[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (shh[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (six3[Title/Abstract])); (shh[Title/Abstract] AND (sbe2[Title/Abstract]))
Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly	GENG et al. (2008)	((six3[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (shh[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (six3[Title/Abstract]));
Zebrafish zic2a patterns the forebrain through modulation of Hedgehog-activated gene expression	SANEK et al. (2009)	((six3[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh); (shh[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract] AND (six3[Title/Abstract])); ((Hh signaling[Title/Abstract] AND (forebrain[Title/Abstract]))
Cooperation of BMP7 and SHH in the	(DALE et al., 1997)	((Bmp7[Title/Abstract] AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract] AND (shh);

induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm		(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]); (shh[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract])
Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons	OHYAMA et al. (2005)(OHYAMA; DAS; PLACZEK, 2008)	((Bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (shh)
SHH signaling mediated by a prechordal and brain enhancer controls forebrain organization.	SAGAI et al. (2019)	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]); (sonic[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])
Mouse Shh is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis.	AOTO et al. (2009a)	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]); (sonic[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]);
LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals.	CHRIST et al. (2012)	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]); (sonic[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]);
Early Hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development	EBERHART et al. (2006a)	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]); (shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]);
Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate.	PERA; KESSEL (1997)	(sonic[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])
Distinct spatiotemporal roles of hedgehog signalling during chick and mouse cranial base and axial skeleton development.	BALCZERSKI et al. (2012).	(shh[Title/Abstract]) AND (cranial base[Title/Abstract]); (shh[Title/Abstract]) AND (sox9[Title/Abstract])
A Highly Conserved Shh Enhancer Coordinates Hypothalamic and Craniofacial Development.	CRANE-SMITH et al. (2021)	(shh[Title/Abstract]) AND (sbe2[Title/Abstract])
Developmentally regulated expression of Shh and Ihh in the developing mouse cranial base: Comparison with Sox9 expression	NIE et al. (2005)	(shh) AND (sox9)

## APÊNDICE 2

Quadro 12 - Termos de busca utilizados na base de dados PUBMED para o levantamento bibliográfico

OBJ	Proteína	Local	Termo de busca utilizado	TE
Seleção	<i>NKX2.1</i>	Células da LMRV do tubo neural	((nkx2.1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh)	26
	<i>GLI1</i>		((gli1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh)	16
	<i>SIX3</i>		((six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])) AND (shh)	36
	<i>BMP7</i>	PPC	((bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract])) AND (shh) ((bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract])) AND (shh)	0 4
Interação	<i>SHH / NKX2.1</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (nkx2.1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (nkx2.1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract])	3 0
	<i>SHH / SIX3</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (Six3[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract])	0 0
	<i>SHH</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	15 5
	<i>SHH / GLI1</i>	PPC // Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract])	0 0
	<i>SHH</i>	EE / PPC	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract])	1 0
	<i>SHH</i>	EE / PPC	(shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract])	1 0
	<i>SHH / BMP7</i>	PPC	(shh[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (bmp7[Title/Abstract]) (shh[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (bmp7[Title/Abstract])	0 0
	<i>NKX2.1 / SIX3</i>	Células da LMRV do tubo neural	(nkx2.1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract])	1
	<i>NKX2.1 / SHH</i>	Células da LMRV do tubo neural	(nkx2.1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (shh[Title/Abstract])	25
	<i>NKX2.1 / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(nkx2.1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract])	2
	<i>SHH / NKX2.1</i>	EE / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (nkx2.1 [Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>NKX2.1 / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (nkx2.1 [Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>BMP7 / NKX2.1</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (nkx2.1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract]) (bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (nkx2.1[Title/Abstract])AND (forebrain[Title/Abstract])	0 0
	<i>SHH / SIX3</i>	Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract])	35

	<i>SIX3 / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract])	0
	<i>SHH / SIX3</i>	EE / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>SIX3 / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>BMP7 / SIX3</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
			(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (six3[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>SHH / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract])	15
	<i>SHH</i>	Células da LMRV do tubo neural / EE	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>SHH / GLI1</i>	Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>SHH / BMP7</i>	Células da LMRV do tubo neural / PPC	(shh[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract])	0
			(shh[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract]) AND (bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract])	2
	<i>SHH / GLI1</i>	EE / Células da LMRV do tubo neural	(shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract]) AND (gli1 [Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
			(shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>BMP7 / GLI1</i>	PPC / Células da LMRV do tubo neural	(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
			(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (gli1[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	0
	<i>BMP7 / SHH</i>	PPC / EE	(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract])	0
			(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (shh[Title/Abstract]) AND (oral ectoderm[Title/Abstract])	0
	<i>BMP7 / SHH</i>	PPC / EE	(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract])	0
			(bmp7[Title/Abstract]) AND (prechordal mesoderm[Title/Abstract]) AND (shh[Title/Abstract]) AND (stomodeum[Title/Abstract])	0
<b>BA</b>	<i>SHH / SBE2</i>	-	(shh[Title/Abstract]) AND (sbe2[Title/Abstract])	4
	<i>SHH / SOX9</i>	-	(shh) AND (sox9)	86
	<i>SHH</i>	Prechordal Plate / Forebrain	(sonic[Title/Abstract]) AND (prechordal plate[Title/Abstract]) AND (forebrain[Title/Abstract])	14

BA = Busca Amplificada; OBJ = Objetivo; TE = Trabalhos encontrados para o termo de busca.